

RP-HPLC 测定盐酸地芬尼多原料的有关物质

曹凤习, 姜建国, 刘红莉(河北省药品检验所, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定盐酸地芬尼多原料有关物质的方法。方法 采用 VP-ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.5%三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 4.0)-甲醇(44:56)为流动相; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm, 柱温: 30 ℃。结果 盐酸地芬尼多与有关物质及各降解成分完全分离, 重复性及稳定性良好。最低检出限为 1 ng。结论 该方法操作简便、专属性强、灵敏度高、结果准确, 可用于盐酸地芬尼多原料有关物质的检查。

关键词: 高效液相色谱法; 盐酸地芬尼多原料; 有关物质

中图分类号: R927.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)08-0661-04

作者简介: 曹凤习, 女, 副主任技师

Tel: (0311)85212008-8038

E-mail: caofengxi2008@163.com

中国现代应用药学杂志 2009 年 8 月第 26 卷第 8 期

Chin JMAP, 2009 August, Vol.26 No.8

• 661 •

Determination of the Related Substances of Difenidol Hydrochloride by RP-HPLC

CAO Fengxi, JIANG Jianguo, LIU Hongli (Hebei Province Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of related substances of difenidol hydrochloride. **METHODS** VP-ODS C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase consisted of 0.5% triethylamine solution (adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid)-methanol (44 : 56) and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** Related substances and degraded substances were completely separated from difenidol hydrochloride. The method was good repeatability and stability. The LOD was 1 ng. **CONCLUSION** The method was selective, sensitive, accurate, and it is suitable for determination of related substances in difenidol hydrochloride. **KEY WORDS:** HPLC; difenidol hydrochloride; related substances

盐酸地芬尼多(difenidol hydrochloride)是临床上常用的抗晕止吐药,用于治疗高血压、美尼尔氏综合征等引起的眩晕症,口服吸收迅速,疗效确切。其质量标准收录在中国药典 2005 年版二部^[1],但质量标准中未收载有关物质的检查方法,为使该药品的质量标准更加科学、有效,笔者参考文献[2]对盐酸地芬尼多原料的有关物质检查方法进行了研究,结果表明,所建立的方法能有效检出盐酸地芬尼多中的多个杂质,方法准确,灵敏度高,分离度好。可用于盐酸地芬尼多原料中有关物质的控制方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695-2487 高效液相色谱仪(2695 泵, 2487 紫外检测器), Empower 色谱工作站; Agilent 1100 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器)。

盐酸地芬尼多对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100841-200501,纯度:99.3%);盐酸地芬尼多原料:国内 A 厂,批号:080206,080208,080209;国内 B 厂,批号:071122,071215,071225;甲醇、三乙胺为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:岛津 VP-ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.5%三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 4.0)-甲醇(44 : 56);流速:0.8 mL·min⁻¹,检测波长为 210 nm,柱温:30 °C,进样量 20 μL。在上述条件下,盐酸地芬尼多与各杂质峰能很好的分离,理论板数按盐酸地芬尼多峰计算为 3 861,分离度分别为 15.2, 6.8, 11.3。流动相中的三乙胺在 7.36 min 有一色谱峰,与盐酸地芬尼多峰(保留时间约为 8.4 min)的分离度为 1.96,能完全分离,色谱图见图 1。

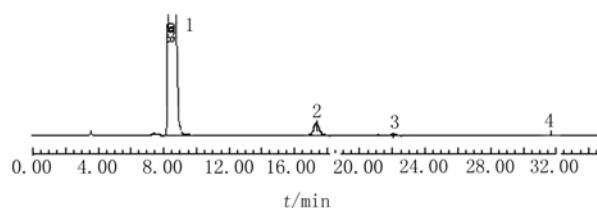


图 1 盐酸地芬尼多有关物质测定色谱图

1-盐酸地芬尼多; 2,3,4-有关物质

Fig 1 Chromatogram of related substances in difenidol hydrochloride

1-difenidol hydrochloride; 2,3,4-related substances

2.2 供试品溶液的制备

取盐酸地芬尼多原料约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 对照溶液的制备

精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.4 测定方法

取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使色谱峰的峰高约为满量程的 10%~20%。再精密量取供试品溶液与对照溶液各 20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍。

2.5 专属性试验

2.5.1 溶剂干扰试验 取流动相 20 μL,注入液相色谱仪。结果显示,溶剂在此色谱条件下有吸收峰,但不干扰盐酸地芬尼多的测定。色谱图见图 2。

2.5.2 破坏试验 精密称取盐酸地芬尼多原料(批号:080208)约 125 mg,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为原溶液。精密量取原溶液 5.0 mL 4 份,分置 25 mL 量瓶中,分别加入 2 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 1 mL,40 °C 水浴 1 min 作为酸破坏样品;2 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 2 mL,水浴煮沸 60 min 作为碱破坏样品;30%双氧

水溶液 2 mL, 水浴煮沸 60 min, 作为氧化破坏样品及置(4 000±500) lx 强光照射 24 h 作为光照破坏样品。取上述破坏后的样品, 调节 pH 至中性并用流动相稀释, 进样测定, 记录色谱图。另取盐酸地芬尼多原料在 180 °C 加热 1 h, 取出后放冷, 取 12.5 mg 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解

并稀释至刻度, 摇匀, 作为高温破坏样品; 同法测定, 结果见图 2。

通过破坏实验, 可以看出, 盐酸地芬尼多在酸中不稳定, 极易产生杂质, 在强氧化剂环境下也有少量杂质产生, 但所有杂质与主成分均有较好分离。在其他条件下基本稳定。

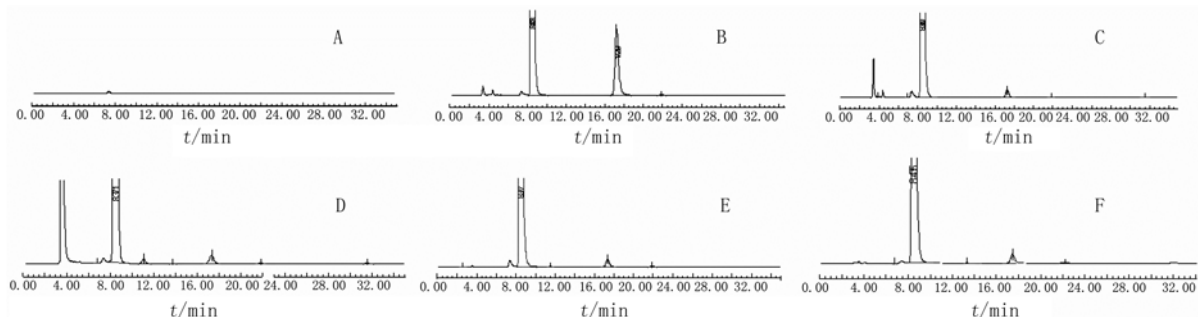


图 2 盐酸地芬尼多破坏试验色谱图

A-空白溶剂; B-酸破坏; C-碱破坏; D-氧化破坏; E-光照破坏; F-高温破坏

Fig 2 Chromatogram of destroyed products separation

A-blank solvent; B-destroyed by acid; C-destroyed by alkali; D-destroyed by oxidation; E-destroyed by light radiation; F-destroyed by heat

2.5.3 合成中间体的制备与定性 据文献[3]报道, 盐酸地芬尼多的主要杂质是生产过程中因酸性介质而产生的盐酸地芬尼多的脱水产物, 其结构已被文献[3]确证为烯化合物。通过破坏试验也证明了其破坏产物主要为烯化合物。为此, 笔者用地芬尼多原料经过酸化、提取得到结晶, 并经红外光谱、紫外光谱、液相色谱保留时间、准分子离子和二级质谱裂解碎片等几方面的信息, 可以证明供试品溶液中的主要杂质与通过将盐酸地芬尼多酸化得到的烯化合物精制品一致。按上述色谱条件, 将烯化合物精制品与盐酸地芬尼多对照品配制成混合溶液进样, 得烯化合物与盐酸地芬尼多的分离度为 16.5, 色谱图见图 3。

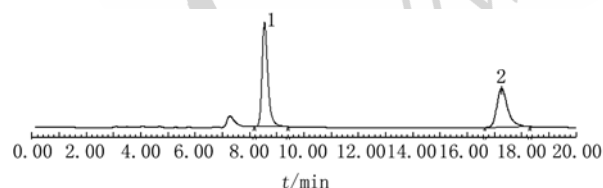


图 3 盐酸地芬尼多与烯化合物色谱峰

1-盐酸地芬尼多; 2-烯化合物

Fig 3 Chromatogram of difenidol hydrochloride and alkene
1-difenidol hydrochloride; 2-alkene

2.6 溶液稳定性试验

取“2.2”项下供试品溶液(批号: 080208), 分别于 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样, 记录色谱图, 结果不同时间色谱峰面积与杂质百分比一致, RSD 为 1.8%与 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取盐酸地芬尼多(批号: 080208)25 mg 共 6 份, 以上述方法测定, 计算各杂质总量、平均值及相应的 RSD。结果表明: 6 次测定杂质总量 RSD 为 1.4%, 表明本法重复性良好。

2.8 耐用性试验

在上述色谱条件下, 改变流速、在 30 °C 以内变化柱温, 各色谱峰的保留时间稍有位移, 但峰型仍良好, 各主峰之间分离度仍符合要求。分别选用 3 种不同厂家不同规格的色谱柱: VP-ODS C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Diamonsil C₁₈(4.6 mm×200 mm, 5 μm); Agela C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)进行试验, 峰形、柱效、分离度均能达到要求, 测定结果也基本一致。表明本法重复性和耐用性良好, 符合测定要求。

2.9 最低检出限

取盐酸地芬尼多对照品 12.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相不断稀释进样, 记录峰面积, 使峰高大约为基线噪音的 3 倍, 记录色谱图。试验结果表明, 在上述色谱条件下盐酸地芬尼多检测限为 1 ng。

2.10 样品有关物质的测定

按“2.1”至“2.4”项下方法, 分别配制并测定 6 批样品的有关物质, 测定结果见表 1。

3 讨论

3.1 测定波长的选择

将盐酸地芬尼多制备成 0.5 mg·mL⁻¹ 的溶液, 在

表 1 样品有关物质测定结果

Tab 1 The result of related substances of samples

样品批号	有关物质/%	
	单个最大杂质/%	杂质总和/%
080206	0.8	0.9
080208	1.0	1.1
080209	0.3	0.3
071122	0.2	0.2
071215	0.2	0.2
071225	0.2	0.2

Agilent 1100 高效液相色谱仪上,用二极管阵列检测器测定,盐酸地芬尼多分别在 258 nm 与 214 nm 波长处有最大吸收,杂质在 250 nm 与 204 nm 处有最大吸收。但 258 nm 与 250 nm 响应值太小,不宜作为检测波长。为使杂质有较大的响应值,同时考虑到主成分的吸收和溶剂三乙胺的影响,选择 210 nm 做为检测波长。在此波长下,盐酸地芬尼多与各杂质的峰纯度均大于 0.999 9,峰纯度高,能完全分离主峰与相关杂质。

3.2 流动相的选择

参照文献[2]及中国药典 2005 年版二部盐酸地芬尼多片溶出度检查色谱条件,初步将流动相定为:甲醇-0.5 mol·L⁻¹ 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 值至 4.0)(56 : 44), pH 值的改变对峰的保留时间影响不大,但随着 pH 值的减小,峰形变得有些拖尾。

将三乙胺浓度变小,峰形明显拖尾。经试验在 0.5 mol·L⁻¹ 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 4.0)时,峰形良好,同时主峰与溶剂及有关物质峰能完全分离。因此将流动相定为甲醇-0.5 mol·L⁻¹ 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 4.0) (56 : 44)。

3.3 溶剂的选择

由于盐酸地芬尼多在水中略溶,首选水作为溶剂,但试验发现,用水作为溶剂时,在瓶壁有气泡附着,影响试验的准确性,改用流动相作溶剂,但不能排除上述现象,还能减小溶剂对有关物质的干扰,因此,选择流动相作为溶剂。

3.4 有关物质限度的确定

依据药品质量标准分析方法指导原则及相关文献,确定有关物质检查限度为:单一杂质的峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍(0.5%);各杂质峰面积和不得大于对照溶液主峰面积 1 倍(1.0%)。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版.二部)[S]. 2005: 490.
- [2] GUO H Z, CUI X Y, YANG Z. Determination of diphenidol hydrochloride tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2000, 31(4): 166-167.
- [3] WANG W T. Identification and determination of impurity in diphenidol hydrochloride [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1984, 4(1): 8-12.