

使用标示灵敏度为 $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或灵敏度最高的
鲎试剂可对细辛脑注射剂进行细菌内毒素检查，
为建立统一且严格安全的细菌内毒素检查标准提
供了参考。

REFERENCES

[1] SUN C Y, ZHAO Y P, GUO J H. Quality evaluation and study

on current standardsofasarone injection [J]. Drug Standard
China(中国药品标准), 2012, 13(3): 181-184.

[2] 曹霞斐, 鲎试剂法检测细辛脑注射液的细菌内毒素[J]. 中
国医药指南, 2010, 24(8): 48-50.

[3] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 99-102, 附录 212-215.

[4] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范
(2010 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:
310-325.

收稿日期: 2015-06-17

不同 HPLC 检查瑞格列奈片有关物质的对比研究

黄朝辉¹, 蔡丹丹², 周征¹(1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.宁波戒毒研究中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 寻找合适的 HPLC 检查中国药典 2010 年版(Ch.P 2010)二部收载的瑞格列奈片的有关物质。方法 分别试验了 Ch.P 2010、美国药典 37 版(USP 37)和欧洲药典 2014 版(EP 2014)所载瑞格列奈原料药及片剂有关物质检查的 4 种 HPLC, 考察了这 4 种方法的流动相稳定性、色谱柱耐用性和有关物质检出灵敏度。结果 Ch.P 2010 所载方法的流动相 B 析出大量结晶。EP 2014 方法的色谱柱耐用性较差, 在试验的 3 种色谱柱中, 只有 1 种色谱柱能达到分离度要求。USP 37 所载的瑞格列奈片剂方法分析耗时较长, 使主要杂质峰型变宽, 检出灵敏度降低。只有 USP 37 所载的瑞格列奈原料药有关物质检查方法同时具备流动相稳定、对主要杂质有很好的检出灵敏度和优秀的色谱柱耐用性等优点。结论 Ch.P 2010 所载瑞格列奈有关物质检查方法应作修改。USP 37 所载瑞格列奈原料药有关物质检查方法可以大幅提高检测效率, 是最适合 Ch.P 2010 收载的瑞格列奈片有关物质检查的方法。

关键词: 瑞格列奈; 有关物质; 系统适用性; 高效液相色谱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)02-0208-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.019

Investigation on Different HPLC to Determine the Related Substances of Repaglinide Tablets

HUANG Zhaohui¹, CAI Dandan², ZHOU Zheng¹(1.Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2.Ningbo Drug Research Center, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To find a suitable HPLC method to determine the related substances of repaglinide tablets recorded in Ch.P 2010. **METHODS** The performances of 4 kinds of HPLC which recorded in Ch.P 2010, USP 37 and EP 2014 were tested. The stability of mobile phase, ruggedness of the chromatographic column and detection sensitivity were comprehensively surveyed. **RESULTS** A large amount of crystals were precipitated in the mobile phase B of Ch.P 2010. Only one out of three chromatographic columns met the resolution requirement using EP 2014 method, which indicating the ruggedness of chromatographic column was poor in this method. In the method of USP 37 for repaglinide tablets, the retention time of the main impurity was too long and its peak became wider so that the detection sensitivity was reduced. The method of USP 37 for repaglinide had the advantages of mobile phase stability, excellent detection sensitivity and ruggedness of chromatographic column. **CONCLUSION** The method of Ch.P 2010 should be modified. The method of USP 37 for repaglinide is best fit the determination of the related substances is no more essential.

KEY WORDS: repaglinide; related substance; system suitability; HPLC

瑞格列奈由丹麦诺和诺德公司研制开发, 于 1997 年通过美国 FDA 批准, 1998 年正式上市, 属非磺酰脲类结构的口服促胰岛素分泌剂, 是治疗 II 型糖尿病的新型口服降糖药, 通过刺激胰岛 β 细胞分

泌胰岛素, 起效快, 作用时间短, 不良反应相对较小^[1-4]。瑞格列奈片收载于中国药典 2010 年版(Ch.P 2010)二部^[5], 实验中发现其有关物质检查的高效液相色谱条件存在严重缺陷。为寻找更合适的方法对

作者简介: 黄朝辉, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0574)87834153

E-mail: huang-zhao@163.com

瑞格列奈片有关物质进行检查, 本实验考察 Ch.P2010、美国药典37版(USP37)^[6]和欧洲药典(EP2014)^[7]所载的4种高效液相色谱(HPLC)条件对瑞格列奈片有关物质的检查效果。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(带 DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(带 DAD 检测器, 美国 Waters 公司); XS205DU 电子天平(瑞士梅特勒公司); SB-5200DTN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

乙腈(色谱纯, TEDIA 公司); 甲醇(色谱纯, TEDIA 公司); 磷酸二氢钾、磷酸二氢铵、醋酸铵(均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水; 瑞格列奈片 1 批, 为市售品(江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 140703, 规格: 每片 0.5 mg)。

2 方法与结果

2.1 Ch.P 2010 方法

2.1.1 系统适用性溶液的制备 取瑞格列奈片(规格: 0.5 mg)6 片, 研细, 转移至具塞试管中, 加流动相 B 3 mL, 置 90 °C 水浴加热 24 h, 放冷, 过滤, 取续滤液作为系统适用性溶液。

2.1.2 瑞格列奈有关物质检查 HPLC 条件 Agilent 1200 色谱仪, 以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 4.0 g, 加水 900 mL 使溶解, 用磷酸调节 pH 值至 3.2, 再加水至 1 000 mL)为流动相 A, 流动相 A-乙腈(20:80)为流动相 B, 梯度洗脱(0~15 min, 45%→75%B; 15~25 min, 75%→80%B; 25~30 min, 80%→100%B; 30~45 min, 100%B), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 45 °C, 检测波长 240 nm。Waters symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量 20 μL。结果见图 1。在 Waters 色谱柱上杂质 1 与瑞格列奈主峰没有实现基线分离。

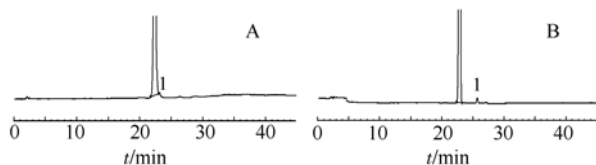


图 1 系统适用性溶液在不同色谱柱上的 HPLC 图

A-Waters symmetry C₁₈ 色谱柱; B-Dikma Inertsustain C₁₈ 色谱柱。

Fig. 1 The HPLC chromatograms on different columns of system suitability solution

A-Waters symmetry C₁₈ column; B-Dikma Inertsustain C₁₈ column.

2.1.3 瑞格列奈片含量测定 HPLC 条件 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。以醋酸铵缓冲液(取醋酸铵 3.85 g, 加水 1 000 mL 使溶解, 用醋酸调 pH 值至 4.0)-甲醇(20:80)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 243 nm, 迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量 20 μL。使用“2.1.1”项下的系统适用性溶液, 进样量 20 μL, 结果见图 2。主要降解产物(峰 1)出现在瑞格列奈主峰的后面, 说明原标准中所说的降解产物峰并不是本研究中的主要降解产物峰, 而是一个次要杂质(峰 2)。

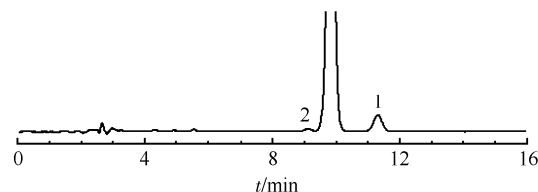


图 2 系统适用性溶液在含量测定方法的 HPLC 图

1-主要杂质; 2-次要杂质。

Fig. 2 The HPLC chromatograms of system suitability solution on assay condition

1-the main impurity; 2-the minor impurity.

2.2 EP2014 所载瑞格列奈原料药有关物质检查的 HPLC 方法

Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 4.0 g, 加水 900 mL 使溶解, 用磷酸调 pH 值至 3.2, 加水至 1 000 mL)为流动相 A, 流动相 A-乙腈(30:70)为流动相 B, 梯度洗脱(0~20 min, 50%→93%B; 20~30 min, 93%B; 30~35 min, 93%→50%B)。流速 1.2 mL·min⁻¹, 柱温 45 °C, 检测波长 240 nm。Thermo hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、迪马 RD-21 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。使用“2.1.1”项下的系统适用性溶液, 进样 20 μL。各色谱柱的分离情况见图 3。使用 Thermo hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱, 没有分离出主要杂质(峰 1), 在迪马 RD-21 C₁₈ 色谱柱上主要杂质(峰 1)勉强与瑞格列奈主峰实现基线分离。

2.3 USP 37 方法

2.3.1 USP37 所载瑞格列奈片有关物质检查的 HPLC Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。流动相为 0.2%磷酸二氢铵溶液(用磷酸调 pH 值至 2.5)-甲醇(30:70), 流速 1.0 mL·min⁻¹,

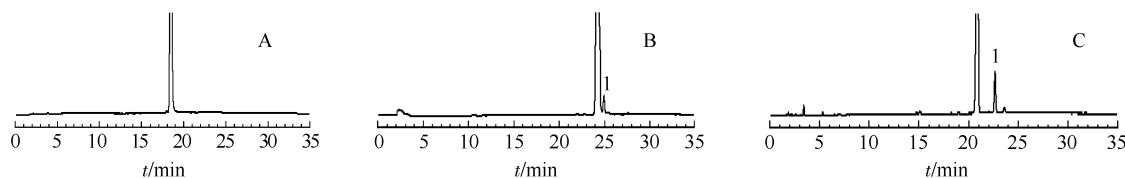


图 3 系统适用性溶液用 EP2014 流动相在不同色谱柱上的 HPLC 色谱图

A-Thermo hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱; B-迪马 RD-21 C₁₈ 色谱柱 C-迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱; 1-主要杂质。

Fig. 3 HPLC chromatograms of system suitability solution on different columns using EP2014 mobile phase

A-Thermo hypersil GOLD C₁₈ column; B-Dikma Inertsustain C₁₈ column; 1-the main impurity.

柱温 45 °C, 检测波长 240 nm, 迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。使用“2.1.1”项下的系统适用性溶液, 进样量 20 μL, 结果见图 4。主要杂质峰(峰 1)出峰时间很晚, 峰型变宽, 灵敏度降低。

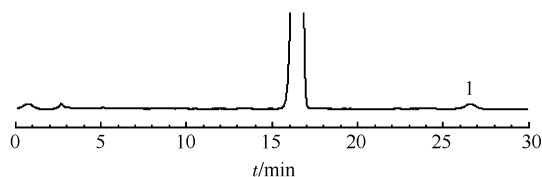


图 4 系统适用性溶液用 USP 7 瑞格列奈片剂流动相的 HPLC 色谱图

1-主要杂质。

Fig. 4 HPLC chromatogram of system suitability solution using USP 37 repaglinide tablets mobile phase

1-the main impurity.

2.3.2 USP37 所载瑞格列奈原料药有关物质检查的 HPLC 方法 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。以 0.3%磷酸二氢钾溶液(1 mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱(0~4 min, 50%→70%B; 4~10 min, 70%B; 10~15 min, 70%→95%B; 15~20 min, 95%B; 20~22 min, 95%→50%B)。流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 45 °C, 检测波长 240 nm。Thermo hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。使用“2.1.1”项下的系统适用性溶液, 进样量 20 μL, 结果见图 5。在

2 根色谱柱上主要杂质(峰 1)与瑞格列奈主峰均完全分离。同样使用这 2 根色谱柱, 按“2.2”项下色谱条件主要杂质(峰 1)与瑞格列奈主峰没有完全分离。两相对比, 说明 USP37 所载瑞格列奈原料药有关物质检查的 HPLC 方法色谱条件非常好, 因此完全不需要破坏性试验制备系统适用性溶液来保证色谱柱对杂质的分离度。

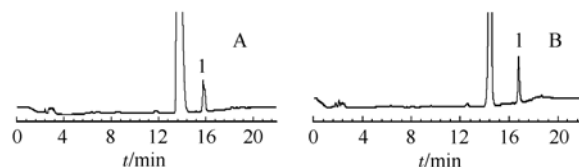


图 5 系统适用性溶液用 USP 37 瑞格列奈原料药流动相的 HPLC 色谱图

A-Thermo hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱; B-Waters symmetry C₁₈ 色谱柱; 1-主要杂质。

Fig. 5 HPLC chromatograms of system suitability solution using USP 37 repaglinide mobile phase

A-Thermo hypersil GOLD C₁₈ column; B-Waters symmetry C₁₈ column; 1-the main impurity.

综上所述, 在不同 HPLC 条件下使用不同色谱柱时杂质 1 与瑞格列奈主峰的分离情况存在明显差异, 见表 1。采用 USP 37 原料药有关物质检查方法时, 在 3 根色谱柱上杂质 1 均能得到有效分离; 而采用 Ch.P 2010 有关物质检查方法和 EP 2014 原料药有关物质检查方法时, 有 3 根色谱柱没有将杂质 1 与瑞格列奈主峰有效分离。可见 USP 37 原料药有关物质检查方法最适合瑞格列奈片有关物质的检查。

表 1 不同条件下杂质 1 与瑞格列奈主峰分离结果

Tab. 1 Results of separation of impurity 1 and repaglinide under different conditions

方法	色谱柱			
	Waters symmetry C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	迪马 Inertsustain C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	迪马 RD-21 C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	Thermo hypersil GOLD C ₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)
Ch.P 2010 有关物质检查方法	没有基线分离	1.12		
EP 2014 原料药有关物质检查方法		1.09	1.02	峰 1 未检出
USP 37 原料药有关物质检查方法	1.14	1.17		1.14
USP 37 片剂有关物质检查方法		1.61		
Ch.P 2010 含量测定方法		1.15		

2.4 瑞格列奈片有关物质检查

2.4.1 供试品溶液制备 取瑞格列奈片(规格: 0.5 mg)6 片, 研细, 转移至具塞锥形瓶中, 分别加入甲醇、磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 4.0 g, 加水 900 mL 使溶解, 用磷酸调 pH 值至 3.2, 加水至 1 000 mL)-乙腈(30 : 70)和乙腈各 3 mL, 超声 10 min, 放冷, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1.0 mL, 置 200 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为自身对照溶液。

2.4.2 高效液相色谱条件 采用“2.3.2”项下 HPLC 条件, 迪马 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。3 种溶剂制备的供试品溶液检查结果见图 6。可见主要杂质(峰 1)大小差异明显。采用自身对照法计算 3 种溶剂溶出的主要杂质峰面积比, 分别为 0.25%, 0.74%和 1.07%。可见无论哪种溶出介质, 单一杂质都超出标准规定范围 0.1%。

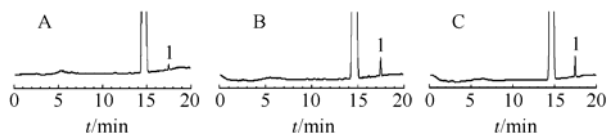


图 6 不同溶剂制备的供试品溶液的 HPLC 色谱图

A-甲醇; B-磷酸盐缓冲液-乙腈(30 : 70); C-乙腈; 1-主要杂质。

Fig. 6 HPLC chromatograms of sample solution in different solvent

A-MeOH; B-phosphate buffered saline-acetonitrile(30 : 70); C-acetonitrile; 1-the main impurity.

3 讨论

本研究在重复 Ch.P 2010 方法时发现, 将磷酸二氢钾缓冲液(取磷酸二氢钾 4 g, 加水 900 mL 使溶解, 用磷酸调 pH 值至 3.2)与乙腈以 20 : 80 的比例混合时析出大量结晶。经微孔滤膜(0.45 μm)过滤, 滤液作为流动相 B, 放置过夜后再次析出大量晶体, 并导致高效液相色谱仪管路堵塞。按照 EP2014 方法将流动相 B 中乙腈的比例下调至 70%, 二者混合时有浑浊产生, 经振摇混合均匀后完全澄清, 溶液放置 48 h 不析出晶体。可见 Ch.P 2010 方法的流动相 B 中乙腈含量过高导致了溶液不稳定。0.3%磷酸二氢钾溶液(1 mol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0)-甲醇(5 : 95)混合, 溶液澄清, 放置 48 h 不析出晶体。

Ch.P 2010 片剂含量测定时要求使用有关物质检查项下制备的系统适用性溶液, 本研究发

现系统适用性溶液中主要降解产物峰在瑞格列奈主峰之后, 可见原标准所说的降解产物峰指的是本研究主要降解产物之后的另一个降解产物, 而该降解产物不是供试品溶液中的主要杂质峰。

分别采用甲醇、“2.2”项下流动相 B、乙腈做溶剂制备有关物质检查的供试品溶液, 结果乙腈溶出的杂质质量最大, 甲醇溶出量最小。说明该杂质在乙腈中有较大的溶解度。

在有关物质检查项下, EP 2014 列举了 4 个有关杂质, USP 37 列举了 3 个有关杂质, 二者只有 1 个杂质相同。从各杂质的相对保留时间判断, 本样品中的主要杂质不属于 EP 2014 和 USP 37 的任一杂质。国内对瑞格列奈有关物质检查的文章^[8-9]也没有报道该杂质。因此, 其结构有待确证, 其来源有待探索。

本研究通过实验考察, 明确了 Ch.P2010 所载方法存在流动相 B 不稳定和色谱柱耐用性差的缺点。USP 37 瑞格列奈原料药有关物质检查方法色谱柱耐用性好, 分析时间短, 完全不需要进行热降解制备系统适用性溶液, 提高了检查效率和结果的准确性。

REFERENCES

- [1] MALAISE W J. Stimulation of insulin release by non-sulfonylurea hypoglycemic agents: the meglitinide family [J]. Horm Metab Res, 1995, 27(6): 263-266.
- [2] OLIVER S, AHMAD S, HATORP V. Pharmacokinetics and bioavailability of repaglinide, a new OHA for patients with NIDDM [J]. Diabetologia, 1997, 40(suppl 1): 320.
- [3] GROMADA J, DISSING S, KOFOED H, et al. Effects of the hypoglycaemic drugs repaglinide and glibenclamide on ATP-sensitive potassium-channels and cytosolic calcium levels in beta TC3 cells and rat pancreatic beta cells. [J]. Diabetologia, 1995, 38(9): 1025-1032.
- [4] WU S Y, GENG X Q, ZHOU Y H, et al. Effects of pioglitazone, repaglinide or metformin on blood uric acid and renal function in recent-onset type 2 diabetes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(2): 181-184.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2010: 1060.
- [6] USP 37 [S]. 4547.
- [7] EP 2014 [S]. II-733.
- [8] LIN C, MA H L, LIN D Q, et al. Determination of related substances in repaglinide tablets by HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2013, 11(6): 467-469.
- [9] XIE J X, BAI M, YAO D Y, et al. Improvement in determination method of related substances in repaglinide tablets [J]. Sci Tech Eng(科学技术与工程), 2014, 14(7): 129-131.

收稿日期: 2015-05-22