

高效液相色谱法测定盐酸罗格列酮片的含量及有关物质

李 珏^{1,2}, 贾 飞², 吴永江¹ (1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江省食品药品检验所, 浙江 杭州 310004)

[摘要] **目的** 建立测定盐酸罗格列酮片含量及有关物质的 HPLC 方法。**方法** 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以 0.025 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈 (50 : 50) 为流动相, 检测波长 245 nm。**结果** 罗格列酮峰与各主要杂质及强制破坏产生的降解产物的杂质峰均分离良好, 最低检测限为 0.29 ng; 罗格列酮浓度在 19.57 ~ 195.70 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程 $A = 68\,525\,C + 31\,152$, $r = 1.000\,0$ ($n = 6$); 日内精密度 ($RSD < 0.5\%$) 与日间精密度 ($RSD < 1.0\%$) 良好; 平均回收率为 99.8% ($RSD = 0.3\%$, $n = 9$); 供试品溶液在 10 h 内稳定。**结论** 本方法准确、灵敏、可靠, 专属性强, 可用于盐酸罗格列酮片的质量控制。

[关键词] 盐酸罗格列酮片; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0049-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.013

Determination of content of rosiglitazone hydrochloride tablets and related substance by HPLC

LI Jue^{1,2}, JIA Fei², WU Yong-jiang¹ (1. School of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method to determine the content and related substance of rosiglitazone hydrochloride tablets. **Methods** The analysis was achieved on a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase of 0.025 mol/L ammonium acetate-acetonitrile (50: 50). The detection wavelength was at 245 nm. **Results** There was good resolution among the peak of rosiglitazone, the main related substances and the degradable impurities after being destroyed. There was a good linear relationship between the peak area and the concentration of rosiglitazone in the range of 19.57 ~ 195.70 μg/ml ($r = 1.000\,0$, $n = 6$). Regression equation could be expressed by $A = 68\,525\,C + 31\,152$, $r = 1.000\,0$ ($n = 6$). The precision in a day ($RSD < 0.5\%$) and during the days ($RSD < 1.0\%$) were good. The average recovery was 99.8% ($RSD = 0.3\%$, $n = 9$) and the limit of detection was 0.29 ng. The solution was stable for 10 hours. **Conclusion** The method was specific, accurate, sensitive and could be used to determine rosiglitazone.

[Key words] rosiglitazone hydrochloride tablets; assay; related substance; HPLC

罗格列酮 (rosiglitazone) 为噻唑烷二酮类降糖药, 本品可通过增加组织对胰岛素敏感性, 提高细胞对葡萄糖的利用而发挥降低血糖的疗效, 可明显降低空腹血糖及胰岛素和 C-肽水平, 对餐后血糖和胰岛素亦有明显的降低作用, 使糖化血红蛋白 (HbA_{1c}) 水平明显降低^[1]。其机制是通过特异性激活一种核受体——过氧化物酶体增殖因子激活的 γ 型受体 (PPAR γ), 有效降低靶组织对胰岛素的抵抗, 从而降低血糖^[2]。单独及联合用药可治疗 2 型糖尿病、代谢综合征、多囊卵巢综合征 (PCOS) 等^[3]。其原创药为马来酸罗格列酮片 (商品名为“文迪雅”), 由葛兰素史克公司研发成功, 1999 年在美国首先上市, 2000 年在中国上市。国内目前有多家企业生产盐酸罗格列酮片, 执行不同的注册标准, 国内外药典均未见收

载。由于不同厂家标准中有关物质测定方法不同, 使杂质的分离检测情况存在差异。作者注意到合成工艺中倒数第三步产物 5- $\{4-[(2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)-氨基)乙氧基)苯基]亚甲基\}-2,4$ -噻唑烷二酮 (杂质 Z), 其苯基亚甲基发生双键加氢加成反应后即得罗格列酮, 为了提高杂质尤其是杂质 Z 的分离能力, 有必要改进有关物质测定方法。我们参考文献^[4,5]报道的方法, 研究并建立了 HPLC 测定盐酸罗格列酮片的含量及有关物质的方法, 操作简单、快速、专属性强、结果准确, 较原方法提高了杂质的检出, 有效的保证了产品的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Shimadzu 岛津高效液相色谱仪 (二极管阵列紫外检测器), LC-solution 色谱工作站, Mettler AE240 电子天平。

[作者简介] 李珏 (1981-), 女, 主管药师。Tel: (0571) 86459427, E-mail: lj811005@163.com

1.2 试药 盐酸罗格列酮对照品(批号:100673-200401),由中国药品生物制品检定所提供;盐酸罗格列酮片3批(批号:20100102、20100201、20100202)、空白辅料及5-[4-[(2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)-氨基)乙氧基)苯基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(杂质Z)均由贵州圣济堂制药有限公司提供;乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 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,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液 取罗格列酮对照品约20 mg,精密称定,照“2.1.1”项下同法制备对照品溶液。

2.2 色谱条件及测定方法 色谱柱为Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)柱;以0.025 mol/L醋酸铵溶液-乙腈(50:50)为流动相,流速1.0 ml/min,柱温35℃,检测波长245 nm。取罗格列酮和5-[4-[(2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)-氨基)乙氧基)苯基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(杂质Z)适量,加流动相溶解并稀释制成每1 ml中约含罗格列酮0.5 mg和杂质Z 5 μg的溶液,作为系统适用性溶液,取20 μl注入液相色谱仪,记录色谱图,罗格列酮峰与杂质Z峰的分度应符合规定,理论板数按罗格列酮峰计算不低于2 000。按外标法以峰面积计算,并将结果乘以0.907 4,即得。

3 结果

3.1 专属性试验

3.1.1 空白辅料实验 取处方量辅料,同法制备溶液,进样20 μl,记录色谱,见图1。由色谱图可见,辅料在2 min左右有辅料峰,约占供试液主峰面积的0.1%,考虑辅料峰较小,2 min左右有破坏试验降解物产生,故计算杂质不再扣除辅料峰。

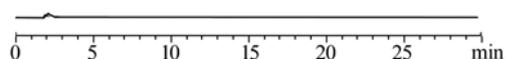


图1 空白辅料色谱图

3.1.2 强制破坏实验

3.1.2.1 酸破坏 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg),置10 ml量瓶中,加流动相约2 ml超声使溶解,加3 mol/L盐酸溶液0.5 ml,室温放置2

h,中和,加流动相稀释至刻度,摇匀。

3.1.2.2 碱破坏 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg),置10 ml量瓶中,加流动相约2 ml超声使溶解,加3 mol/L氢氧化钠溶液0.5 ml,室温放置2 h,中和,加流动相稀释至刻度,摇匀。

3.1.2.3 氧化破坏 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg),置10 ml量瓶中,加流动相约2 ml超声使溶解,加30%过氧化氢溶液0.5 ml,室温放置2 h,加流动相稀释至刻度,摇匀。

3.1.2.4 光照破坏 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg),置10 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,置日光下照射10 h。

3.1.2.5 热破坏 取本品细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg),置10 ml量瓶中,加流动相溶解,置65℃水浴放置10 h,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀。

取上述各溶液,滤过,取续滤液20 μl注入液相色谱仪,记录色谱图。结果见图2。

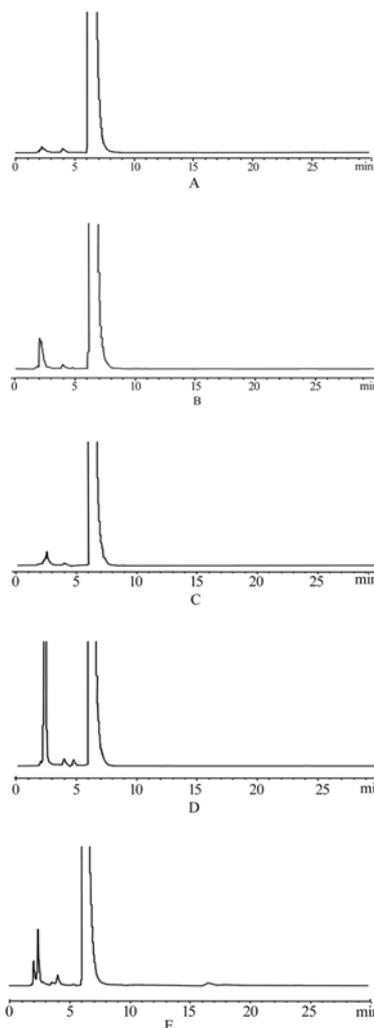


图2 盐酸罗格列酮片的专属性实验色谱图

A-强酸破坏(3 mol/L HCl); B-强碱破坏(3 mol/L NaOH); C-热破坏; D-氧化破坏(30% H₂O₂); E-强光破坏

3.2 系统适用性试验 系统适用性溶液见图3, 罗格列酮的出峰时间为6.26 min, 杂质Z的出峰时间5.45 min, 罗格列酮能与杂质Z基线分离。

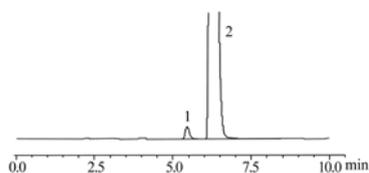


图3 罗格列酮和杂质Z的系统适用性溶液的色谱图

1-杂质Z; 2-罗格列酮

3.3 最低检出量 盐酸罗格列酮对照品溶液逐步稀释, 进样分析, 得罗格列酮最低检出量为0.29 ng (S/N=3)。

3.4 标准曲线 取盐酸罗格列酮对照品约100 mg, 精密称定, 置100 ml量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为标准储备液。分别精密量取该溶液2、5、8、10、15和20 ml置100 ml量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取上述溶液20 μ l分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度C(μ g/ml)对峰面积A作标准曲线, 线性回归方程为: $A = 68\,525\,C + 31\,152$, $r = 1.000\,0$ ($n = 6$), 由此可见罗格列酮浓度在19.57~195.70 μ g/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

3.5 精密度试验 批号为20100102细粉适量(约相当于罗格列酮5 mg), 于同日内和日间(6日内, 每日测定1次)分别测定含量6次, 计算日内和日间精密度, 结果日内平均含量为101.9%, RSD为0.4%; 日间平均含量为102.3%, RSD为0.7%。

3.6 稳定性试验 取批号为20100102的有关物质测定的供试品溶液分别在0、2、5和10 h进样, 测定有关物质, 杂质结果基本一致, 表明溶液10 h内稳定。

3.7 回收率试验 取处方辅料, 另取盐酸罗格列酮对照品适量, 按“2.1”项下分别配制成高、中、低3种不同浓度的溶液(120%、100%、80%)各3份, 分别取上述溶液各20 μ l注入液相色谱仪, 以外标法测定并计算回收率, 其平均回收率为99.8%, RSD为0.3% ($n = 9$)。

3.8 有关物质检查 取本品适量, 用流动相溶解并稀释制成每1 ml中约含罗格列酮0.5 mg的溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 精密量取适量, 加流动相稀释制成每1 ml中约含5 μ g的溶液, 作为对照溶液; 精密量取对照溶液20 μ l注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的20%; 再精密量取供试品溶液和对照溶

液各20 μ l, 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。供试品溶液色谱图中, 单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的1/2 (0.5%), 各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积(1.0%)。

3.9 样品测定 取盐酸罗格列酮片样品3批, 按“溶液的制备”及“有关物质检查”项下方法制备供试品溶液, 测定含量和有关物质, 同批样品含量平行测定4次。结果见表1。

表1 盐酸罗格列酮片含量及有关物质测定结果($n = 4$, %)

批号	含量(%)	单个最大杂质(%)	总杂质(%)
20100102	101.8 \pm 0.4	0.16	0.74
20100201	103.0 \pm 0.4	0.17	0.86
20100202	103.2 \pm 0.7	0.16	0.82

4 讨论

4.1 流动相的选择 查阅盐酸罗格列酮、马来酸罗格列酮系列品种质量标准, 流动相组成主要有3类, 分别为①磷酸盐缓冲液(pH6.8)-乙腈-甲醇, ②乙酸铵溶液-乙腈, ③0.1%磷酸溶液-乙腈, 根据2009年对国产品种罗格列酮口服固体制剂评价抽验质量分析研究结果是: ①无法分离罗格列酮与杂质Z, ②系统检出杂质质量最多, 故选择②系统进行试验。缓冲盐浓度分别考察了①0.01 mol/L乙酸铵溶液-乙腈, ②0.025 mol/L乙酸铵溶液-乙腈, ③0.05 mol/L乙酸铵溶液-乙腈, 系统适用性试验中①罗格列酮与杂质Z分离度最差, ②和③基本一致, 因此选用缓冲盐浓度较低的②系统。我们又比较了缓冲盐-乙腈的比例a、50:50, b、45:55, c、55:45, b比例主峰出峰时间较快(小于5 min), c比例主峰峰形及理论板数均差于a, 故选择50:50。在参考其他文献^[4~7]流动相的基础上, 进行了实验摸索, 改进流动相条件, 得到了较满意的结果。

4.2 检测波长的选择 经DAD检测, 杂质Z的 λ_{\max} 为245 nm和343 nm, 罗格列酮 λ_{\max} 为246 nm和312 nm。且破坏试验降解产物各杂质在245 nm处均有较大吸收, 故选择杂质Z和罗格列酮都有较大吸收的245 nm为测定波长。

4.3 记录时间的选择 破坏试验各降解产物杂质均在主峰4倍保留时间前出峰, 故选择供试品溶液记录色谱图至主峰的4倍保留时间。

4.4 杂质Z相对响应因子考察 实验考察了杂质Z对罗格列酮的相对响应因子, 结果为1.08, 认为可以以罗格列酮对照计算杂质Z。

(下转第63页)

临床用量逐年增加。本次调查也发现喹诺酮类药物(左氧氟沙星)预防用药为5.53%。喹诺酮类药物在国内滥用造成恶果,导致革兰阴性杆菌耐药率高,38号文件^[2]明确其不宜用作预防给药,使得围手术期抗菌药物应用有据可查,但实际工作中,并未引起医务人员的足够重视。另外使用林可霉素有4例(占2.01%),主要考虑到该药无需皮试,价格低廉,多用于青霉素皮试阳性或经济条件差的患者。但由于克林霉素的体外抗菌活性优于林可霉素,如果因为对一、二代头孢菌素过敏,指导原则推荐用克林霉素预防感染。使用氨曲南有5例(占2.51%),氨曲南是第一个用于临床的单环类抗生素,对G-杆菌有很强的抗菌作用,氨曲南与青霉素和头孢菌素类双环结构不同,具有独特的单环结构,与青霉素和头孢菌素类的交叉过敏率低,只有当病人明确为革兰阴性菌感染切口手术,对上述二类抗生素过敏时,使用氨曲南才是合理。

3.4 预防用药持续时间 根据《抗菌药物临床应用指导原则》,术后预防应用抗菌药物一般应短程使用,手术结束后,将不会再有细菌污染发生,不必使用抗菌药物。抗菌药物的有效覆盖时间应包括整个手术过程和手术结束后4h,总的预防时间不超过24h,个别情况可延长至48h,手术时间较短(<2h)的清洁手术,术前一次即可。本次调查中,术后持续用药时间为1~12d,平均3d,其中术后持续用药时间5~12d的患者有37例,占18.59%,明显存在用药时间过长的现象。短时间预防应用抗菌药物可减少不良反应,细菌不易产生耐药菌株,而术后连续多日用药与术前一次足量用药相比,并不能进一步降低手术部位感染^[10]。Harbarth等^[11]认为,用药时间过长与细菌耐药性的出现密切相关。故一般认为,术后48h未感染的切口,再继续应用抗菌药物已属不必要。

综上所述,通过对我院ICS手术抗菌药物预防

使用的调查发现,抗菌药物在ICS围手术期预防性应用的效果是值得肯定的,但还存在一些问题,集中体现为用药种类选择不当、给药时机不合理、用药疗程过长等,直接的后果是导致药品费用的上涨及细菌耐药株的增加,需要在今后的工作中加以改进,也希望行政部门加以监督,促使抗菌药物的合理应用。

【参考文献】

- [1] 马爱群,胡大一. 心血管病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:609.
- [2] 卫生部办公厅. 关于抗菌药物临床应用管理有关问题的通知. 卫办医政发[2009]38号.
- [3] 中华医学会外科分会,中华外科杂志编辑委员会. 围手术期预防应用抗菌药物指南[J]. 中华外科杂志,2006,44(23):1594.
- [4] 段红,田蕾,李严,等. 心脏介入诊疗抗生素使用调查研究[J]. 武警医学,2003,14(11):680.
- [5] 褚桂芬,杨应杰,张永凤,等. 循证评价妇产科围手术期预防性应用抗生素的现状[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(22):3500.
- [6] 许恒忠,张鉴. 抗菌药物临床合理应用指南[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [7] 王选锭,应可净,刘光富,等. 头孢西丁与头孢美唑随机对照治疗细菌性感染124例临床评价[J]. 中国临床药理学杂志,1996,12(4):193.
- [8] 张永信. 头霉素、氧头孢烯类抗生素的临床应用[J]. 上海医药,2004,25(1):19.
- [9] 汤建平,曹加,陆伟,等. 一代头孢菌素用量与金黄色葡萄球菌耐药的相关性[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(12):1788.
- [10] 黎沾良. 外科临床中预防性和治疗性应用抗菌药物的区别和原则[J]. 中国实用外科杂志,2001,21(1):4.
- [11] Harbarth S, Samore MH, Lichtenberg D, et al. Prolonged antibiotic prophylaxis after cardiovascular surgery and its effect on surgical site infections and antimicrobial resistance[J]. Circulation, 2000, 101(25):2916.

[收稿日期] 2011-08-22

[修回日期] 2011-10-20

(上接第51页)

【参考文献】

- [1] 王幼君,李淑芬. 茄尼醇和尼古丁的提取与工艺研究[J]. 天津化工,2003,17(3):37.
- [2] 邹俊杰,曲卫,冯晓云. 盐酸罗格列酮片治疗2型糖尿病的疗效及安全性[J]. 药学服务与研究,2008,8(3):174.
- [3] 朱光宇. 罗格列酮的临床应用进展[J]. 安徽医药,2005,9(9):644.
- [4] 郑国钢,方滢芝. RP-HPLC法测定盐酸罗格列酮含量及有关物质[J]. 药物分析杂志,2005,25(1):104.
- [5] 王国俊,叶晓琳,傅萍. HPLC法测定复方罗格列酮盐酸二甲双胍片中罗格列酮的含量[J]. 中国药房,2009,20(1):57.
- [6] 庞晓华,陈春水. 马来酸罗格列酮缓释片有关物质的测定[J]. 中国医药导报,2008,5(14):29.
- [7] 高立军,王维贤,梅兴国. 高效液相色谱法测定罗格列酮钠片含量及有关物质[J]. 科学技术与工程,2006,6(12):1678.

[收稿日期]2011-04-29

[修回日期]2011-10-08