

盐酸二甲双胍缓释片中双氰胺及有关物质的测定

张 竞*,王雪芹#(河南省食品药品检验所,郑州 450003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)12-1716-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.12.47

摘要 目的:建立测定盐酸二甲双胍缓释片中双氰胺及有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil SCX 磺酸基阳离子交换柱,流动相为 1.7% 磷酸二氢铵溶液(磷酸调节 pH 至 3.0),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 218 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 20 μl。结果:双氰胺、盐酸二甲双胍进样量分别在 0.105 2~10.52、0.509~50.9 ng 范围内与各自峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 9, 0.999\ 8$);精密性、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 2%;双氰胺平均回收率为 100.5%,RSD=1.87%($n=9$)。结论:该方法简便快速、灵敏度高、专属性强,可用于盐酸二甲双胍缓释片中双氰胺及有关物质的测定。

关键词 盐酸二甲双胍缓释片;双氰胺;有关物质;HPLC

Determination of Dicyandiamide and Related Substances in Metformin Hydrochloride Sustained-release Tablets

ZHANG Jing, WANG Xue-qin (Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of dicyandiamide and related substances in Metformin hydrochloride sustained-release tablets. METHODS: The HPLC method was performed on a Venusil SCX sulfonic acid based cationic ion-exchange column with the mobile phase of 1.7% ammonium dihydrogen phosphate (adjusted pH=3.0 by phosphoric acid) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 218 nm, the temperature was 40 ℃ and the volume was 20 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the volume of dicyandiamide and metformin hydrochloride and the peak area in the range of 0.105 2-10.52 and 0.509-50.9 ng ($r=0.999\ 9, 0.999\ 8$); the RSDs of precision, repeatability and stability test were all less than 2%; the average recovery of dicyandiamide was 100.5% (RSD=1.87%, $n=9$). CONCLUSIONS: This method is simple, rapid, sensitive, speciality and can be used to determine dicyandiamide and related substances of Metformin hydrochloride sustained-release tablets.

KEYWORDS Metformin hydrochloride sustained-release tablets; Dicyandiamide; Related substances; HPLC

盐酸二甲双胍缓释片为治疗 2 型糖尿病的基本药物,在临床上具有较多优势^[1]。双氰胺是其在制剂或贮存过程中降解产生的主要杂质。盐酸二甲双胍缓释片现行质量标准中有关物质检查均采用高效液相色谱(HPLC)法,但色谱条件不同,因此双氰胺与辅料的分离效果存在较大差异。为有效控制产品质量,笔者参考有关文献^[2-4],在方法学验证的基础上,对现行质量标准进行完善与提高,采用 HPLC 法对盐酸二甲双胍缓释片中的有关物质进行测定,以为盐酸二甲双胍缓释片的质量控制方法提供参考。

1 材料

Waters ACQUITY(H-CLASS)HPLC 仪,包括四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列(PDA)检测器,Empower 工作站(美国 Waters 公司);KQ-500DE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:80 kHz);XR205SM-DR 电子天平(瑞士 Precisa 公司)。

双氰胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100206-2011103);盐酸二甲双胍缓释片(河南福森药业有限公司,

规格:0.5 g,批号:120401、120601、120602、120603、120604、120605、130301、130302、130303、140104、140303、140304、140305);盐酸二甲双胍原料药(河南福森药业有限公司,批号:140110);辅料(河南福森药业有限公司,批号:140102);磷酸二氢铵为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil SCX 磺酸基阳离子交换柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 1.7% 磷酸二氢铵溶液(磷酸调节 pH 至 3.0);流速: 1.0 ml/min;检测波长: 218 nm;柱温: 40 ℃;进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品的细粉适量(约相当于盐酸二甲双胍 50 mg),置于 100 ml 量瓶中,加流动相适量,超声处理使其溶解,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液。

2.2.2 双氰胺对照品溶液 取双氰胺对照品适量,精密称定,加水定量稀释成每 1 ml 中约含 0.1 mg 双氰胺的溶液。

2.2.3 有关物质自身对照溶液 分别精密量取上述供试品溶液、双氰胺对照品溶液各 1 ml,置于同一 200 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 空白辅料溶液 按处方配制不含盐酸二甲双胍及双氰

* 主管药师。研究方向:药物分析。电话:0371-63388108。E-mail: zjing780624@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:0371-63388295。E-mail: wangxueqin2008@126.com

胺的样品,按“2.2.1”项下方法制备,即得空白辅料溶液。

2.2.5 混合对照品溶液 分别称取双胍胺、辅料、盐酸二甲双胍原料药适量,制成双胍胺质量浓度为1.05 μg/ml、盐酸二甲双胍质量浓度为5.09 μg/ml的混合对照品溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 干扰试验 分别取“2.2”项下空白辅料溶液、双胍胺对照品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图1。由图1可见,空白辅料对测定无干扰,双胍胺能与盐酸二甲双胍达到良好分离。

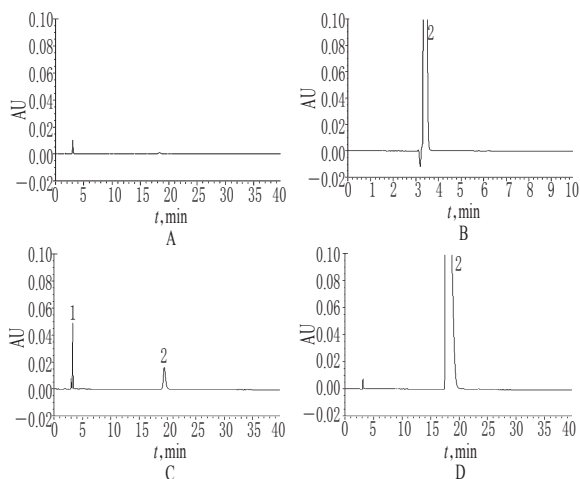


图1 高效液相色谱图

A.空白辅料;B.双胍胺对照品;C.混合对照品;D.供试品;1.双胍胺;2.盐酸二甲双胍

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank accessories; B.dicyandiamide reference; C.mixed reference; D.test sample; 1.dicyandiamide; 2.metformin hydrochloride

2.3.2 破坏试验 (1)高温破坏:取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量(相当于盐酸二甲双胍5 mg)于105 °C烘箱中放置6 h后,精密称取适量,加入流动相溶解并稀释制成每1 ml内含盐酸二甲双胍0.5 mg的溶液,摇匀,滤过,备用;(2)光照破坏:取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量(相当于盐酸二甲双胍5 mg),置于4 500 lx条件下光照48 h,精密称取适量,加入流动相溶解并稀释制成每1 ml内含盐酸二甲双胍0.5 mg的溶液,摇匀,滤过,备用;(3)酸破坏:取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量(相当于盐酸二甲双胍5 mg),加1 mol/L盐酸溶液1 ml,摇匀,水浴加热30 min,放冷,加入1 mol/L氢氧化钠溶液约1 ml中和,加流动相至10 ml,摇匀,滤过,备用;(4)碱破坏:取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量(相当于盐酸二甲双胍5 mg),加1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,摇匀,水浴加热30 min,放冷,加入1 mol/L盐酸溶液约1 ml中和,加流动相至10 ml,摇匀,滤过,备用;(5)氧化破坏:取盐酸二甲双胍缓释片细粉适量(相当于盐酸二甲双胍5 mg),加30%过氧化氢溶液1 ml,摇匀,水浴加热30 min,放冷,加流动相至10 ml,摇匀,滤过,备用。精密量取上述5种溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图2。由图2可见,高温破坏和光破坏后杂质未见明显增加,酸破坏后杂质归一化含量为0.17%,碱破坏后为28.31%,氧化破坏后为

1.34%;各试验条件下杂质均能与主成分达到良好分离。

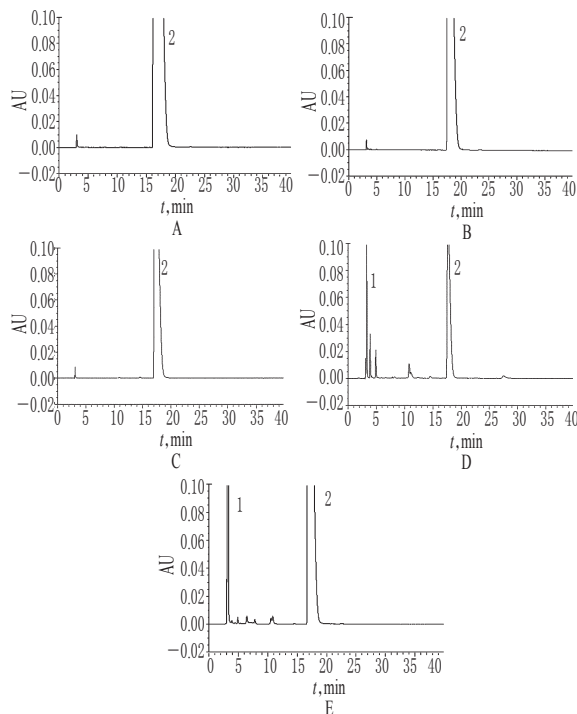


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A.高温破坏样品;B.光照破坏样品;C.酸破坏样品;D.碱破坏样品;E.氧化破坏样品;1.双胍胺;2.盐酸二甲双胍

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

A.temperated damaged sample; B.lighted damaged sample; C.acidized damaged sample; D.alk-alized damaged sample; E.oxidized damaged sample; 1.dicyandiamide; 2.metformin hydrochloride

2.4 线性关系考察

取盐酸二甲双胍原料药、双胍胺对照品适量,精密称定,分别用流动相溶解并稀释制成浓度分别为1.018、0.105 mg/ml的对照品贮备液,分别精密量取上述两种对照品贮备液1、2 ml,置于同一200 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,分别取10、8、5、3、1、0.5、0.3、0.1 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱。以进样量(x, ng)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得双胍胺的回归方程为 $y=10\ 650.22x+456.21$ ($r=0.999\ 9$)、盐酸二甲双胍的回归方程为 $y=4\ 171.67x-535.71$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,双胍胺、盐酸二甲双胍进样量分别在0.105 2~10.52、0.509~50.9 ng范围内与各自峰面积呈良好线性关系。

2.5 检测限和定量限

以信噪比为3测得双胍胺、盐酸二甲双胍检测限分别为0.105、1.527 ng;以信噪比为10测得双胍胺、盐酸二甲双胍定量限分别为0.316、5.090 ng。

2.6 精密度试验

取“2.4”项下线性关系溶液(双胍胺质量浓度为1.052 μg/ml、盐酸二甲双胍质量浓度为5.09 μg/ml),按“2.1”项下色谱条件进样6次。结果,双胍胺、盐酸二甲双胍峰面积的RSD为0.38%、1.48%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取盐酸二甲双胍缓释片细粉(批号:140104)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,于0、1、2.5、4、5、6 h时按“2.1”项下色谱条件进样。结果,双胍胺、盐酸二甲双胍未检出,表明供试品溶液在6 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取盐酸二甲双胍缓释片细粉(批号:140104)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样。结果,双胍胺、盐酸二甲双胍未检出,表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取已知有关物质含量的样品适量(批号:140104),分别加入不同量的双胍胺对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,并按标准曲线法计算双胍胺的回收率,结果见表1。

表1 回收率测定结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test($n=9$)

待测成分	样品含量, g	加入量, ng	测得量, ng	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
双胍胺	0.009 92	4.208	4.257	101.16	100.5	1.87
	0.010 26	4.208	4.224	100.38		
	0.010 03	4.208	4.359	103.60		
	0.010 25	5.260	5.311	100.97		
	0.010 26	5.260	5.292	100.62		
	0.010 49	5.260	5.140	97.72		
	0.010 06	6.312	6.453	102.24		
	0.010 38	6.312	6.215	98.46		
	0.010 34	6.312	6.260	99.18		

2.10 样品有关物质测定

取“2.2.3”项下有关物质自身对照溶液20 μ l注入HPLC仪,调节检测灵敏度,使双胍胺峰高约为满量程的10%,再精密量取“2.2”项下供试品溶液、有关物质自身对照溶液各20 μ l,分别注入HPLC仪,记录色谱至盐酸二甲双胍峰保留时间的2倍。供试品溶液的色谱中如有与双胍胺峰保留时间一致的峰,则按外标法以峰面积按盐酸二甲双胍标示量计算其含量,不得过0.04%;其他单个杂质峰面积不得大于有关物质自身对照溶液主峰面积的0.2倍(0.1%),其他各杂质峰面积的和不得大于有关物质自身对照溶液中盐酸二甲双胍峰面积的1.2倍(0.6%),结果见表2。

3 讨论

3.1 现行标准中有关物质检查方法的优缺点

局颁标准YHB05052008^[3]中的有关物质检查方法采用C₁₈柱,流动相为0.003 mol/L十二烷基硫酸钠溶液(pH4.0)-乙腈(68:32, V/V)。该方法主要缺点为:基线噪音大,检测灵敏度较低。局颁转正标准WS1-(X-035)-2010Z中采用磷酸基阳离子交换柱,在PDA检测器的HPLC仪器上,单个杂质限度与定量限相当。为保证杂质的有效检出和产品质量控制,笔者将

表2 有关物质测定结果

Tab 2 Determination results of related substances

批号	双胍胺	未知单个杂质, %	未知总杂质, %
120401	未检出	未检出	未检出
120601	未检出	0.05	0.05
120602	未检出	未检出	未检出
120603	未检出	未检出	未检出
120604	未检出	未检出	未检出
120605	未检出	0.13	0.13
130301	未检出	0.12	0.12
130302	未检出	未检出	未检出
130303	未检出	0.05	0.05
140104	未检出	未检出	未检出
140303	未检出	0.09	0.09
140304	未检出	0.05	0.05
140305	未检出	0.09	0.09

进样量改为20 μ l,同时增加了对单个未知杂质的质量控制。本研究所选用的色谱系统灵敏度高、基线噪音小,各杂质均能很好检出。

3.2 流动相的选择

笔者分别对pH为2.8、3.0、3.2的流动相进行比较,结果表明,流动相pH的微小改变,对双胍胺和盐酸二甲双胍的分离影响不大。故选择1.7%磷酸二氢铵溶液(pH3.0)为本研究的流动相。

3.3 流速的选择

笔者又分别对0.8、1.0 ml/min的流速进行比较,结果发现,双胍胺的保留时间分别为4.42、3.44 min,盐酸二甲双胍的保留时间分别为24.55、19.23 min。故流速对两组分的保留时间均有较大影响。因有关物质需记录色谱至主成分保留时间的2倍,在保证辅料与双胍胺分离度满足要求、液相系统压力合适的前提下,保留时间越短越好,故选择1.0 ml/min作为本研究的流速。

综上所述,本方法简便快速、灵敏度高、专属性强,可用于盐酸二甲双胍缓释片中双胍胺及有关物质的测定。

参考文献

- [1] 王佳,邹大进.二甲双胍缓释片在2型糖尿病治疗中的优势[J].糖尿病新世界,2008(12):26.
- [2] 孙桂荣,卢华伟,刘爱云.高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍缓释片的有关物质[J].中国药业,2004,13(10):34.
- [3] 杜宁,钱文,周艳丽.HPLC法两种色谱柱测定盐酸二甲双胍缓释片中杂质的比较[J].江苏药学与临床研究,2006,14(1):29.
- [4] 李晓燕,张冬梅.盐酸二甲双胍片有关物质检查方法探讨[J].中国药品标准,2009,10(1):35.

(收稿日期:2014-09-24 修回日期:2015-02-28)

(编辑:陈宏)