

HPLC法测定注射用盐酸哌甲酯中的有关物质

张雪玲^{1*}, 王超众², 贾首时², 于晓秋¹, 张连成^{2#}(1. 齐齐哈尔医学院附属第二医院药剂科, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔市食品药品检验检测中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)12-1711-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.12.35

摘要 目的: 建立测定注射用盐酸哌甲酯中有关物质的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters symmetry C₁₈, 流动相为甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(60:40, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果: 杂质 A、杂质 B 检测质量浓度线性范围均为 0.02~3.0 μg/mL (*r* 均为 0.999 8); 定量限分别为 0.2、0.6 ng, 检测限分别为 0.06、0.2 ng; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 加样回收率分别为 98.2%~100.0% (RSD=0.56%, *n*=9)、98.0%~100.3% (RSD=0.70%, *n*=9)。结论: 该方法操作简便、结果准确, 适用于注射用盐酸哌甲酯中有关物质的测定。

关键词 盐酸哌甲酯; 高效液相色谱法; 有关物质; 杂质 A; 杂质 B

Determination of Related Substances in Methylphenidate Hydrochloride for Injection by HPLC

ZHANG Xueling¹, WANG Chaozhong², JIA Shoushi², YU Xiaoqi¹, ZHANG Liancheng² (1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. Qiqihar Center for Food and Drug Control, Heilongjiang Qiqihar 161005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Methylphenidate hydrochloride for injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, the column temperature was 35 °C and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of impurity A and B were 0.02-3.0 μg/mL (*r*=0.999 8). The limits of quantitation were 0.2, 0.6 ng, and the limits of detection were 0.06, 0.2 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility were all lower than 2.0%; recoveries were 98.2%-100.0% (RSD=0.56%, *n*=9), 98.0%-100.3% (RSD=0.70%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for the determination of related substance in Methylphenidate hydrochloride for injection.

KEYWORDS Methylphenidate hydrochloride; HPLC; Related substance; Impurity A; Impurity B

盐酸哌甲酯是药效介于苯丙胺和咖啡因之间的一种中枢神经兴奋药, 能改善神经活动, 解除疲劳感, 小剂量可通过动脉化学感受器反射性兴奋神经中枢, 大剂量可直接兴奋延髓中枢^[1-3]; 临床上主要用于治疗巴比妥类药物引起的嗜睡、倦怠、呼吸抑制, 各种忧郁症, 神经官能症等, 是治疗注意力缺陷和多动障碍的首选药物^[4-5]。目前, 测定该制剂中有关物质的方法为薄层色谱法, 但该方法灵敏度低、专属性差^[6]。根据该制剂的合成路线, 杂质 A、B 均为成品中可能存在的原料、中间体和降解产物^[7-8], 且目前尚未有同时测定该制剂中杂质 A、B 的报道。为此, 笔者参考相关文献^[9], 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立了测定注射用盐酸哌甲酯中有关物质的方法, 以期完善注射用盐酸哌甲酯的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695 型 HPLC 仪, 包括 2489 紫外检测器、Quick-

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0452-2739694

通信作者: 主任药师。研究方向: 药物分析。电话: 0452-2798729。E-mail: zhangliancheng_ren@163.com

Start Empower 3 色谱工作站 (美国 Waters 公司); BP211D 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q Advantage A10 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸哌甲酯 (北京双鹤药业股份有限公司, 批号: 121102、130401、130901, 规格: 20 mg/支; 苏州第壹制药有限公司, 批号: 140311、130801、131109, 规格: 20 mg/支); 盐酸哌甲酯对照品 (上海博顿生物化工有限公司, 批号: 100305-201401, 纯度: 99.9%); 杂质 A 对照品 (批号: 201302-1401, 纯度: 99.8%)、杂质 B 对照品 (批号: 201302-1703, 纯度: 99.8%) 均购自深圳菲斯生物科技有限公司; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters symmetry C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(60:40, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取杂质A和杂质B对照品各10 mg,置于同一100 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液1 mL,置于100 mL量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得。

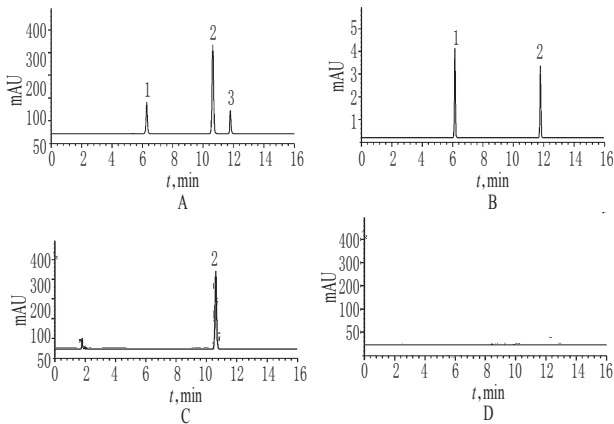
2.2.2 供试品溶液 精密称取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.3 空白溶液 取流动相适量作为空白溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取盐酸哌甲酯对照品20 mg,杂质A和杂质B对照品各10 mg,置于同一50 mL量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下系统适用性溶液、混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度 >3.0 ;理论板数以盐酸哌甲酯峰计为4 000,保留时间为10.7 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A. 系统适用性溶液; B. 混合对照品溶液; C. 供试品溶液; D. 空白溶液; E. 杂质B; 2. 盐酸哌甲酯; 3. 杂质A

A. system suitability solution; B. mixed control solution; C. test sample solution; D. blank solution; E. impurity B; 2. methylphenidate hydrochloride; 3. impurity A

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of system suitability test

2.4 破坏性试验

2.4.1 光破坏样品溶液 取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,置于4 500 lx日光灯下照射24 h,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.2 酸破坏样品溶液 取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液10 mL,摇匀,置于80 $^{\circ}$ C水浴中加热2 h,放冷至室温,加1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

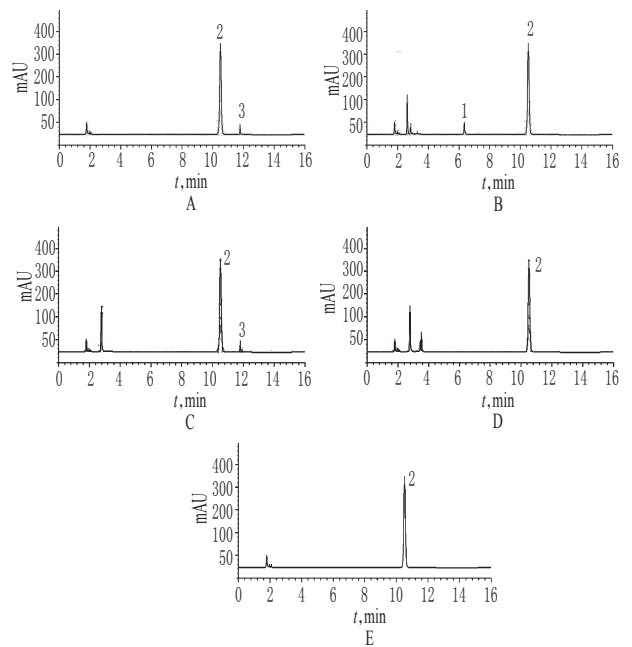
2.4.3 碱破坏样品溶液 取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液10 mL,置于80 $^{\circ}$ C水浴中加热2 h,放冷至室温,加1

mol/L盐酸溶液调pH至中性,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.4 氧化破坏样品溶液 取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,加10%过氧化氢溶液10 mL,摇匀,置于80 $^{\circ}$ C水浴中加热1 h,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.5 高温破坏样品溶液 取样品适量(约相当于盐酸哌甲酯20 mg),置于50 mL量瓶中,置于120 $^{\circ}$ C烤箱中加热2 h,加流动相溶解并定容,摇匀,即得。

精密量取上述各破坏样品溶液10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可知,各降解产物峰、盐酸哌甲酯峰与杂质A峰和杂质B峰完全分离,说明本方法专属性较好。



A. 光破坏样品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 高温破坏样品; 1. 杂质B; 2. 盐酸哌甲酯; 3. 杂质A

A. destroyed by light; B. destroyed by acid; C. destroyed by base; D. destroyed by oxidation; E. destroyed by high temperature; 1. impurity B; 2. methylphenidate hydrochloride; 3. impurity A

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of destructive test

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液适量,加流动相制成每1 mL含杂质A、杂质B均为0.02、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 μ g的系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以杂质A、杂质B质量浓度(x , μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得杂质A、杂质B回归方程分别为 $y=4.382 \times 10^4 x - 5.148 \times 10^3$ ($r=0.9998$)、 $y=4.423 \times 10^4 x - 5.162 \times 10^3$ ($r=0.9998$)。结果表明,杂质A、杂质B检测质量浓度线性范围均为0.02~3.0 μ g/mL。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按

“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,杂质A、杂质B的LOQ分别为0.2、0.6 ng,LOD分别为0.06、0.2 ng。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,杂质A、杂质B峰面积的RSD分别为0.46%、0.52%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:121102)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,杂质A、杂质B峰面积的RSD分别为0.64%、0.58%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置12 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:121102)适量,置于50 mL量瓶中,精密加入“2.2.1”项下混合对照品溶液7 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算杂质A、杂质B的残留量。结果,杂质A、杂质B的平均残留量分别为0.06%、0.02%,RSD分别为0.52%、0.97%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取样品(批号:121102)适量,共9份,分别置于50 mL量瓶中,加入低、中、高质量的杂质A、杂质B对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

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

待测有关物质	取样量, mg	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
杂质A	46.29	7.648	6.036	13.67	99.8	99.2	0.56
	46.01	7.601	6.036	13.58	99.1		
	46.18	7.630	6.036	13.56	98.2		
	46.11	7.618	7.042	14.61	99.3		
	46.12	7.619	7.042	14.62	99.4		
	46.15	7.624	7.042	14.59	98.9		
	46.12	7.620	8.048	15.67	100.0		
	46.17	7.628	8.048	15.56	98.6		
	46.07	7.611	8.048	15.59	99.1		
杂质B	46.19	6.427	6.108	12.51	99.6	99.4	0.70
	46.04	6.405	6.108	12.52	100.1		
	46.14	6.420	6.108	12.51	99.7		
	46.11	6.415	7.126	13.49	99.3		
	46.12	6.416	7.126	13.51	99.6		
	46.12	6.417	7.126	13.40	98.0		
	46.18	6.425	8.144	14.47	98.8		
	46.04	6.405	8.144	14.50	99.4		
	46.07	6.410	8.144	14.58	100.3		

2.11 样品有关物质测定

取6批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品

溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算杂质A、杂质B的含量,结果见表2。

表2 样品有关物质测定结果($n=3$, %)

Tab 2 Results of related substance determination ($n=3$, %)

样品批号	杂质A	杂质B
121102	0.064	0.023
130401	0.072	0.011
130901	0.038	0.032
140311	0.082	0.009
130801	0.076	0.017
131109	0.055	0.033

3 讨论

笔者考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液等为流动相对杂质A、杂质B峰分离度的影响。结果,以甲醇-水、乙腈-水为流动相时,杂质A、杂质B峰峰型不好,理论板数均较低;以甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(60:40, V/V)为流动相时,杂质A、杂质B峰峰型较好,且与盐酸哌甲酯色谱峰达到完全分离,各色谱峰理论板数均 ≥ 4000 。因此,本试验选择甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(60:40, V/V)为本试验的流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果准确,适用于注射用盐酸哌甲酯中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 戴淑萍,卢漓江,马爱民.盐酸哌甲酯的临床应用现状[J].中国药房,2008,19(8):626-627.
- [2] 兰瑛,罗蓉,张伶俐.哌甲酯治疗儿童注意缺陷多动障碍的经济学系统评价[J].中国药房,2009,20(23):1763-1767.
- [3] 刘云海,王虹.小儿多动症治疗新药:盐酸托莫西汀[J].医药导报,2004,23(5):350-351.
- [4] 窦克莹,刘雪飞,凌克,等.盐酸哌甲酯门诊处方应用分析[J].北京医药,2011,33(5):413-414.
- [5] 苏志媛.盐酸哌甲酯控释片治疗注意缺陷多动障碍疗效分析[J].现代医学,2010,38(2):122-123.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1028.
- [7] 吴增,于永祥,朱雍,等.盐酸右哌甲酯的合成及工艺改进[J].海峡药学,2010,22(9):211-212.
- [8] 赵勤,周忆新.一阶导数光谱法测定盐酸哌甲酯片含量及含量均匀度[J].抗感染药学,2006,3(1):28-29.
- [9] 李可,钟新忠,廖华卫.RP-HPLC测定盐酸哌甲酯中主药的含量[J].临床合理用药杂志,2009,2(15):28-29.

(收稿日期:2016-04-30 修回日期:2016-12-21)

(编辑:刘柳)