

HPLC法测定维格列汀片中的有关物质

黄 姍^{1*}, 张梦泽²(1.河南省口岸食品检验检测所, 郑州 450003; 2.河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2138-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.34

摘要 目的: 建立测定维格列汀片中有关物质的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Xterra MS C₁₈, 流动相为[磷酸盐缓冲液-水-乙腈-甲醇(400:600:15:15, V/V/V/V)]-[磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇(400:450:150, V/V/V)](梯度洗脱), 流速为1.2 mL/min, 检测波长为210 nm, 柱温为35 ℃, 进样量为10 μL。结果: 杂质A、B、C、D检测质量浓度线性范围分别为18.80~188.0 μg/mL($r=0.999\ 5$)、22.64~226.4 μg/mL($r=0.999\ 6$)、21.74~217.4 μg/mL($r=0.999\ 7$)、19.12~191.2 μg/mL($r=0.999\ 8$); 检测限分别为4.18、2.68、1.12、1.34 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%; 加样回收率分别为97.9%~103.1%(RSD=2.01%, $n=9$)、98.8%~104.1%(RSD=1.93%, $n=9$)、98.0%~103.6%(RSD=1.81%, $n=9$)、100.8%~104.1%(RSD=0.98%, $n=9$)。结论: 该方法操作简单、结果准确, 可用于维格列汀片中有关物质的测定。

关键词 维格列汀片; 有关物质; 高效液相色谱法

Determination of Related Substances in Vildagliptin Tablets by HPLC

HUANG Shan¹, ZHANG Mengze²(1. Henan Province Port Institute for Food Inspection and Testing, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Vildagliptin tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Xterra MS C₁₈ column with mobile phase consisted of [phosphate buffer-water-acetonitrile-methanol (400:600:15:15, V/V/V/V)]-[phosphate buffer-acetonitrile-methanol (400:450:150, V/V/V)] (gradient elution) at the flow rate of 1.2 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 18.80-188.0 μg/mL for impurity A ($r=0.999\ 5$), 22.64-226.4 μg/mL for impurity B ($r=0.999\ 6$), 21.74-217.4 μg/mL for impurity C ($r=0.999\ 7$), 19.12-191.2 μg/mL for impurity D ($r=0.999\ 8$). The limits of detection were 4.18, 2.68, 1.12, 1.34 μg/mL, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; the recoveries of impurity A, B, C and D were 97.9%-103.1% (RSD=2.01%, $n=9$), 98.8%-104.1% (RSD=1.93%, $n=9$), 98.0%-103.6% (RSD=1.81%, $n=9$), 100.8%-104.1% (RSD=0.98%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the determination of related substances in Vildagliptin tablets.

KEYWORDS Vildagliptin tablets; Related substances; HPLC

维格列汀(Vildagliptin)化学名为1-[(3-羟基-1-金刚烷基)氨基]乙酰基]-2-氰基-(S)-四氢吡咯烷, 是一种具有选择性和口服活性的特异性二肽酰基酶-4(DPP-4)抑制剂^[1], 可以刺激胰岛素基因表达和胰岛素生物合成, 属于新一代口服降血糖药物^[2-4]。目前, 我国关于维格列汀有关物质的测定尚未见报道^[5]。为更好地控制维格列汀片的质量, 笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定该制剂中有关物质的方法。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪, 包括二极管阵列检测器(DAD)、色谱工作站(美国Agilent公司); XP-205型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司); KQ-250DV型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 40 kHz); Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore

公司)。

1.2 药品与试剂

维格列汀片(上海太昊生物科技医药有限公司, 批号: 150701、150702、150703, 规格: 50 mg/片); 维格列汀对照品(上海太昊生物科技医药有限公司, 批号: 131201, 纯度: 99.8%); 杂质A对照品(批号: 1448-001A2, 纯度: 97.6%); 杂质B对照品(批号: 1607-005A3, 纯度: 95.7%); 杂质C对照品(批号: 1424-093A3, 纯度: 99.6%); 杂质D对照品(批号: 1497-003A7, 纯度: 98.1%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、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: Xterra MS C₁₈(50 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相: [磷酸盐缓冲液-水-乙腈-甲醇(400:600:15:15, V/V/V/V)](A)-[磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇(400:450:150,

* 主管药师, 硕士。研究方向: 食品、药品分析及质量标准。电话: 0371-66081055。E-mail: hs13695541@163.com

V/V/V)](B),梯度洗脱(0~1 min,100% A;2~6 min,100%→90% A;7~11 min,90%→30% A;12~21 min,30% A;22 min,30%→100% A;23~28 min,100% A);流速:1.2 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μL^[6]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取杂质A对照品9.40 mg、杂质B对照品11.32 mg、杂质C对照品10.87 mg、杂质D对照品9.56 mg,置于同一10 mL量瓶中,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品细粉适量,精密称定,置于50 mL量瓶中,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶解,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得(常温避光保存)。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺,取不含各待测杂质和主成分的空白辅料适量,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取维格列汀对照品504.1 mg,置于50 mL量瓶中,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,即得维格列汀对照品贮备液。分别精密称取杂质A、B、C、D对照品适量,置于同一100 mL量瓶中,精密加入上述维格列汀对照品贮备液10 mL,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)溶解并稀释制成每1 mL含维格列汀1 mg和杂质A、B、C、D各10 μg的系统适用性溶液。

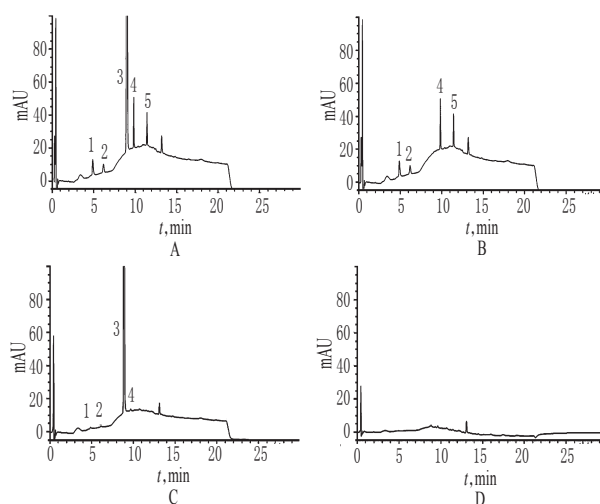
2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和系统适用性溶液各适量,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,分离度均>1.5;理论板数以维格列汀峰计为8 700,保留时间为8.96 min。结果表明,其他成分对测定不干扰。

2.4 破坏性试验

2.4.1 酸破坏样品溶液 精密称取样品细粉适量(约相当于维格列汀50 mg)(批号:150701),置于50 mL量瓶中,加2 mol/L盐酸溶液1 mL,水浴(37 ℃)放置1 h,加2 mol/L氢氧化钠溶液调节pH为中性,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶解,再加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,经0.45 μm

微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。



A.系统适用性溶液;B.混合对照品溶液;C.供试品溶液;D.阴性对照溶液;1.杂质B;2.杂质A;3.维格列汀;4.杂质C;5.杂质D

A. system suitability solution; B. mixed control solution; C. test sample solution; D. negative control solution; 1. impurity B; 2. impurity A; 3. vildagliptin; 4. impurity C; 5. impurity D

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability tests

2.4.2 碱破坏样品溶液 精密称取样品细粉适量(约相当于维格列汀50 mg)(批号:150701),置于50 mL量瓶中,加0.02 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,室温避光放置1 h,加0.02 mol/L盐酸溶液调节pH为中性,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶解,再加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

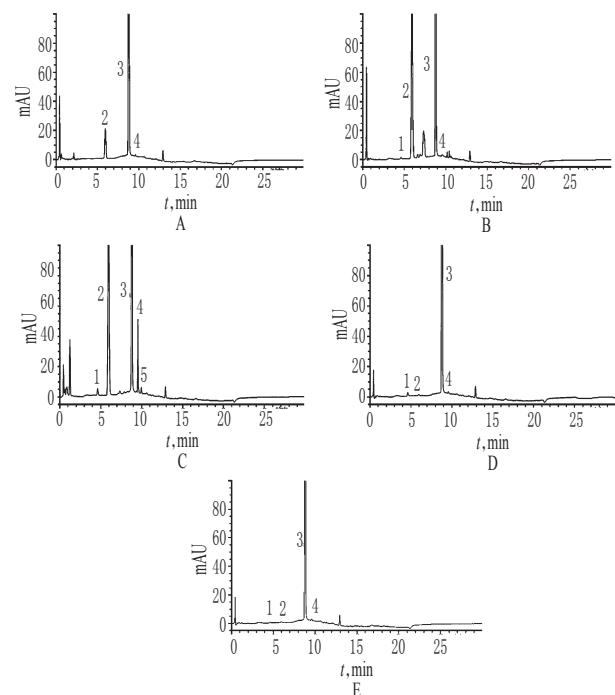
2.4.3 氧化破坏样品溶液 精密称取样品细粉适量(约相当于维格列汀50 mg)(批号:150701),置于50 mL量瓶中,加30%过氧化氢溶液1 mL,水浴(37 ℃)放置1 h,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶解,再加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4.4 高温破坏样品溶液 精密称取样品细粉适量(约相当于维格列汀50 mg)(批号:150701),置于50 mL量瓶中,于105 ℃烘箱中避光放置3 h,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶解,再加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4.5 光照破坏样品溶液 精密称取样品细粉适量(约相当于维格列汀50 mg)(批号:150701),置于50 mL量瓶中,于(12 000±500)lx光照强度下放置24 h,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, V/V)适量,超声处理5 min使溶

解,再加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, *V/V*)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

取上述各破坏样品溶液10 μL,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,样品在酸、碱、氧化、高温、光照破坏条件下均有一定程度的降解,但各降解产物之间及各降解产物与主峰之间均能达到良好分离(分离度>1.5)。



A. 酸破坏;B. 碱破坏;C. 氧化破坏;D. 高温破坏;E. 光照破坏;1. 杂质B; 2. 杂质A;3. 维格列汀;4. 杂质C;5. 杂质D

A. destroyed by acid; B. destroyed by base; C. destroyed by oxidation; D. destroyed by heat; E. destroyed by light; 1. impurity B; 2. impurity A; 3. vildagliptin; 4. impurity C; 5. impurity D

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive tests

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1.0、2.5、5.0、7.5、10 mL,分别置于50 mL量瓶中,加0.2%盐酸溶液-乙腈(90:10, *V/V*)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测有关物质质量浓度(*x*, μg/mL)为横坐标、峰面积(*y*)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.6 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”项下色谱条件进样测定,当信噪比为3:1时,得检测限。结果,杂质A、B、C、D的检测限分别为4.18、2.68、

1.12、1.34 μg/mL。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测有关物质	回归方程	<i>r</i>	线性范围, μg/mL
杂质A	$y=6.32 \times 10^{-1}x-4.32 \times 10^{-2}$	0.999 5	18.80~188.0
杂质B	$y=1.44x+8.59 \times 10^{-2}$	0.999 6	22.64~226.4
杂质C	$y=8.32 \times 10^{-1}x-6.1 \times 10^{-2}$	0.999 7	21.74~217.4
杂质D	$y=9.50 \times 10^{-1}x-5.87 \times 10^{-1}$	0.999 8	19.12~191.2

2.7 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,杂质A、B、C、D峰面积的RSD分别为0.98%、0.66%、0.71%、1.02% (*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:150701)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 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、B、C、D峰面积的RSD分别为2.89%、1.90%、1.66%、0.87% (*n*=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

取样品(批号:150701)细粉适量(约相当于维格列汀50 mg),共6份,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。结果,杂质A、B、C、D峰面积的RSD分别为0.56%、1.26%、0.77%、1.98% (*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:150701)细粉适量,共9份,分别置于50 mL量瓶中,加入低、中、高质量的杂质A、B、C、D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2。

表2 加样回收率试验结果(*n*=9)

Tab 2 Results of recovery test(*n*=9)

待测有关物质	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
杂质A	50.32	0.000 29	0.376 0	0.368 4	97.9	100.3	2.01
	50.19	0.000 26	0.376 0	0.369 9	98.3		
	51.02	0.000 36	0.376 0	0.384 6	102.2		
	50.89	0.000 33	0.470 0	0.464 7	98.8		
	49.88	0.000 20	0.470 0	0.477 3	101.5		
	49.76	0.000 18	0.470 0	0.482 4	102.6		
	50.01	0.000 23	0.564 0	0.563 1	99.8		
	50.22	0.000 27	0.564 0	0.581 8	103.1		
	49.80	0.000 20	0.564 0	0.557 4	98.8		
杂质B	50.32	0.000 59	0.452 8	0.469 3	103.5	101.4	1.93
	50.19	0.000 52	0.452 8	0.471 9	104.1		
	51.02	0.000 69	0.452 8	0.466 6	102.9		

续表 2

Continued tab 2

待测有 关物质	取样量, mg	样品含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
杂质C	50.89	0.000 66	0.566 0	0.565 0	99.7	100.7	1.81
	49.88	0.000 45	0.566 0	0.559 7	98.8		
	49.76	0.000 41	0.566 0	0.573 2	101.2		
	50.01	0.000 48	0.679 2	0.696 7	102.5		
	50.22	0.000 54	0.679 2	0.687 2	101.1		
	49.80	0.000 43	0.679 2	0.672 8	99.0		
	50.32	0.000 85	0.434 8	0.447 0	102.6		
	50.19	0.000 79	0.434 8	0.449 1	103.6		
	51.02	0.000 96	0.434 8	0.441 9	101.4		
	50.89	0.000 91	0.543 5	0.554 2	101.8		
	49.88	0.000 73	0.543 5	0.549 1	100.9		
	49.76	0.000 68	0.543 5	0.541 5	99.5		
	50.01	0.000 77	0.652 2	0.641 9	98.3		
	50.22	0.000 82	0.652 2	0.639 3	98.0		
	49.80	0.000 71	0.652 2	0.654 2	100.2		
杂质D	50.32	0.000 77	0.382 4	0.390 5	101.9	102.4	0.98
	50.19	0.000 74	0.382 4	0.393 1	102.6		
	51.02	0.000 85	0.382 4	0.391 7	102.2		
	50.89	0.000 79	0.478 0	0.495 5	103.5		
	49.88	0.000 53	0.478 0	0.498 1	104.1		
	49.76	0.000 51	0.478 0	0.491 0	102.6		
	50.01	0.000 66	0.573 6	0.582 3	101.4		
	50.22	0.000 75	0.573 6	0.578 9	100.8		
	49.80	0.000 50	0.573 6	0.586 7	102.2		

2.11 样品有关物质测定

取 3 批样品细粉各适量(约相当于维格列汀 50 mg),分别按“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,记录峰面积并按外标法计算各待测有关物质的含量^[7-8],结果见表 3(注:“-”为未检出)。

表 3 样品有关物质测定结果(n=3,%)

Tab 3 Determination of related substances of samples (n=3,%)

待测有关物质	150701	150702	150703
杂质A	0.07	0.05	0.06
杂质B	0.16	0.16	0.17
杂质C	0.09	0.08	0.08
杂质D	-	-	-
其他单个杂质	-	-	-
总杂质	0.32	0.29	0.31

3 讨论

笔者采用DAD检测器对各待测有关物质进行全波长扫描,结果显示杂质A、B、C、D在200~400波长范围内均仅有末端吸收,辅料在210 nm处基本无吸收,不干扰各待测有关物质范围内的测定,因此最终选择210 nm作为本试验的检测波长。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,可用于维格列汀片中有关物质的测定。

参考文献

[1] Ishii M, Shibata R, Kondo K, *et al.* Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (39):27235-27345.

[2] 吕晓川,王伟夫.二肽基肽酶IV抑制剂治疗2型糖尿病的临床研究进展[J]. *中国医药导报*, 2008, 5(29):21-22.

[3] 刘甦苏,吴曦,周舒雅,等.3种小鼠品系的四氧嘧啶糖尿病模型建立及初步评价[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35 (11):1958-1960.

[4] 樊新星,徐珽,卢静,等.抗糖尿病新药维格列汀[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(14):1272-1274.

[5] 马廉举,文棘,胡煮,等.反相高效液相色谱法测定维格列汀[J]. *光谱实验室*, 2012, 29(4):2555-2558.

[6] Shantikumar S, Satheeshkumar N, Srinivas R. Pharmacokinetic and protein binding profile of peptidomimetic DPP-4 inhibitor-Teneligliptin in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2015(1002):194-200.

[7] 谢沐风.如何建立高效液相色谱法测定有关物质的方法[J]. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(1):45-47.

[8] 余振喜,庚莉菊,黄海伟,等.浅谈HPLC法测定有关物质时已知杂质的计算方法[J]. *中国药品标准*, 2010, 11(4): 278-279.

(收稿日期:2016-06-30 收稿日期:2017-01-12)

(编辑:刘 柳)