

RP-HPLC法测定盐酸曲美他嗪的含量和有关物质

周健鹏, 田勇*

(天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要 目的: 建立测定盐酸曲美他嗪含量和有关物质的反相高效液相色谱法。方法: 采用高效液相色谱法, 以 Ultimate™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 以水-甲醇-乙腈-庚烷磺酸钠溶液 (60: 40: 10: 3) 为流动相, 流速为 1.2 mL · min⁻¹, 检测波长为 210 nm。结果: 盐酸曲美他嗪浓度在 0.005~0.05 mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好, $r = 0.9999$, 精密度试验结果 RSD = 0.1% ($n = 5$), 检出限为 0.05 μg · mL⁻¹。结论: 本方法简便、快速、准确、专属性好。

关键词: 盐酸曲美他嗪; 反相高效液相色谱法; 含量测定; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0464-03

RP-HPLC determination of trimetazidine dihydrochloride and its related substances

ZHOU Jian-peng TIAN Yong*

(Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for determination of the contents of trimetazidine dihydrochloride and its related substances. **Methods** The separation was performed on an Ultimate™ C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of water-methanol-acetonitrile-heptane sulfonic acid sodium solution (60: 40: 10: 3). The flow rate was 1.2 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 210 nm. **Results** The calibration curves were linear between 0.005–0.05 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), RSD = 0.1% ($n = 5$). The detection limit of trimetazidine dihydrochloride was 0.05 μg · mL⁻¹. **Conclusions** The method is simple, rapid, accurate and reproducible.

Key words trimetazidine dihydrochloride; RP-HPLC; content determination; related substances

盐酸曲美他嗪 (trimetazidine dihydrochloride, 又称心康宁、三甲氧苄嗪) 是一种抗心肌缺血的新药, 化学名为: 1-[(2,3,4-三甲氧苄基)甲基]-哌嗪二盐酸盐, 相对分子质量为 339.3^[1]。2001 年法国施维雅公司生产的片剂在我国上市, 至今该药品已在众多省市进入了医保药物目录, 表明其良好的治疗效果已被相关的管理机构及专家接受, 具有良好的市场前景^[2]。

因目前国内外文献关于其原料含量测定的有关报道较少, 故本文建立了盐酸曲美他嗪的反相高效液相色谱测定方法, 用于本品的含量测定, 为控制该药的原料药及其制剂的质量提供了可靠依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪 (Waters 2695

Separations Module, Waters 2487 Dual Wavelength Absorbance Detector), 瑞士 METTLER DL25 电位滴定仪, 瑞士 METTLER AE 240 天平。

盐酸曲美他原料, 盐酸曲美他嗪对照品 (纯度 99.5%), 杂质对照品 a, b, c 均由 A 药厂提供, 甲醇 (色谱纯, 天津康科德公司), 乙腈 (色谱纯, 天津康科德公司), 纯化水 (本所自制), 庚烷磺酸钠 (高效液相色谱专用试剂, 山东禹王实业有限公司禹城化工厂), 磷酸 (分析纯), 硝酸 (分析纯)。

2 色谱条件

色谱柱为 Ultimate™ C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-甲醇-乙腈-庚烷磺酸钠溶液 (取庚烷磺酸钠 5.5 g 加入磷酸 3 mL, 用水稀释至 100 mL, 摇匀) (60: 40: 10: 3), 流速为 1.2 mL ·

* 通讯作者 Tel: (022) 23374074 E-mail: Ronakko_li@163.com

mL^{-1} , 检测波长为 210 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL 。在上述色谱条件下, 盐酸曲美他嗪对照品的色谱图见图 1, 盐酸曲美他嗪色谱峰保留时间约为 11.5 min, 盐酸曲美他嗪色谱峰与杂质峰完全分离 (见图 1)。理论板数按曲美他嗪峰计算, 不低于 3000。

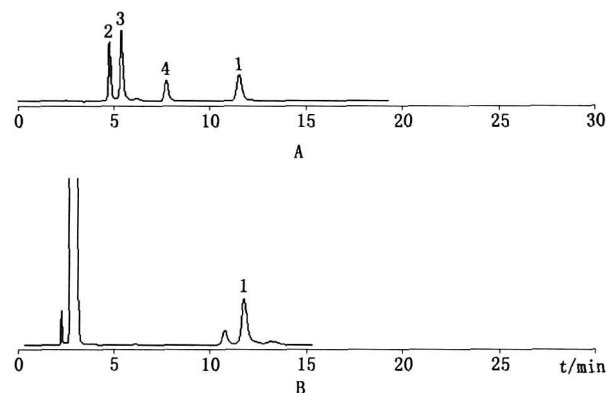


图 1 杂质对照品 (A) 和氧化破坏 (B) 色谱图

Fig1 Chromatograms of standard reference substance impurities (A) and oxidation decomposed (B)

1 盐酸曲美他嗪 (trimetazidine dihydrochloride) 2 杂质 a (impurity A) 3 杂质 b (impurity B) 4 杂质 c (impurity C)

3 专属性考察

3.1 取“有关物质检查”项下杂质对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件, 记录色谱图。杂质 a ($t_R = 4.820 \text{ min}$)、杂质 b ($t_R = 5.441 \text{ min}$) 及杂质 c ($t_R = 7.796 \text{ min}$) 均与盐酸曲美他嗪 ($t_R = 11.653 \text{ min}$) 分离良好, 见图 1。

3.2 将盐酸曲美他嗪原料分别经强光 (4500 lx ± 500 lx) 照射、加热、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液及 5% 过氧化氢溶液氧化破坏后, 按样品测定项下的色谱条件进样, 记录色谱图。结果盐酸曲美他嗪的各降解产物均能与主成分有效分离, 由此说明本方法的专属性符合要求。

从上述实验结果看, 在选定的色谱条件下, 各杂质及降解产物均能与盐酸曲美他嗪主成分分离完全, 不干扰本品的测定, 表明本方法专属性良好。

4 线性范围

4.1 精密称取盐酸曲美他嗪对照品 10 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。按上述色谱条件各精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色

谱图。以盐酸曲美他嗪的峰面积 A 为纵坐标, 盐酸曲美他嗪对照品浓度 C 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程:

$$A = 1 \times 10^8 C - 202646 \quad r = 0.9999$$

结果表明盐酸曲美他嗪在浓度为 $0.005 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时线性关系良好。

4.2 分别精密量取杂质对照溶液 0.5 2.5 5 7.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为溶液 ① ② ③ ④。按上述色谱条件分别精密量取溶液 ① ② ③ ④ 及杂质对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。盐酸曲美他嗪杂质 a 杂质 b 杂质 c 回归方程分别为:

$$Y = 115097X - 15495 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 107375X - 14811 \quad r = 1$$

$$Y = 160881X - 27283 \quad r = 1$$

$$Y = 64799X - 13584 \quad r = 1$$

结果表明: 盐酸曲美他嗪、杂质 a b c 在浓度为 $0.5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时线性关系良好。

5 精密度及重复性试验

取盐酸曲美他嗪对照品溶液 ($0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 重复进样 5 次, 以峰面积来考察精密度, 计算 RSD 为 0.11%。

取批号为 061001 的样品 6 份, 按样品测定项下操作, 计算含量, 结果测得含量分别为 99.5%, 99.5%, 99.6%, 100.0%, 99.7%, 99.4%; RSD 为 0.21%, 结果见表 2。

6 检测限

取盐酸曲美他嗪对照品适量, 加水溶解并逐步稀释, 最低检测浓度为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($SN = 3$), 进样量为 1.0 ng。

7 样品测定

取盐酸曲美他嗪 25 mg 精密称定, 加水制成 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为供试液, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取盐酸曲美他嗪对照品适量, 同法测定, 按外标法以峰面积计算含量, 结果见表 1。

8 有关物质检查

分别精密称取杂质对照品 a b c 各 10 mg 置同一 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质对照品储备液; 精密称取盐酸曲美他嗪供试品 100 mg 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 精密量取上述两种溶液各 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质对照溶液。取杂质对照溶液与供试品

溶液各 20 μ L 进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算已知杂质含量, 用自身对照法计算其他杂质含量, 杂质 a b c 不得过 0.5%, 其他单个杂质不得过 0.2%, 杂质总量不得过 1.0%, 结果见表 1。

表 1 样品含量和有关物质测定结果 ($n = 2, \%$)
Tab 1 Results of contents and related substances

批号 (batch)	含量 (content)	杂质 a (impurity a)	杂质 b (impurity b)	杂质 c (impurity c)	其他杂质 (other impurities)	杂质总量 (total impurities)
061001	100.1				0.02	0.02
061002	100.2	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.03	0.03
061003	99.9				0.05	0.05

9 与容量分析法比较

取批号 061001 供试品 6 份, 每份取 0.12 g 精密称定, 加水 50 mL 溶解, 加硝酸 1.0 mL, 照电位滴定法 (中国药典 2005 年版二部附录 VII A), 用硝酸银滴定液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定, 计算含量, 与 HPLC 方法结果进行比较, $t_{0.05, 5} = 2.571$, $t < t_{0.05, 5}$, 表明两种分析方法测得的两组数据间无显著性差异, 结果见表 2。

表 2 HPLC 法含量和容量分析法含量结果比较 ($n = 2, \%$)
Tab 2 Comparison of HPLC and volumetric analysis

序号 (No.)	HPLC	容量分析法 (the content of volumetric analysis)
1	99.5	99.6
2	99.5	99.8
3	99.6	99.8
4	100.0	99.9
5	99.7	99.5
6	99.4	99.7
$\bar{X}$	99.6	99.7
s	0.214	0.147
S_R		0.183
t		0.949

10 讨论

10.1 取盐酸曲美他嗪对照品及杂质对照品 a b c 适量, 以纯化水为溶剂分别配制成一定浓度的对照品溶液, 在 200~400 nm 波长处进行紫外光谱扫描, 盐酸曲美他嗪、杂质 b、杂质 c 最大吸收波长在 210 nm 附近, 杂质 a 在 202 nm 波长处有最大吸收, 由于 202 nm 接近紫外区末端, 故选择检测波长为 210 nm。

10.2 杂质 a b c 为盐酸曲美他嗪原料的工艺杂质和降解产物, 在流动相中加入离子对试剂, 盐酸曲美

他嗪样品离子在流动相中与离子对试剂的反离子生成不荷电的中性离子对 (离子对模式说), 增加了样品离子在非极性固定相中的溶解度, 使分配系数增加, 改善分离效果, 从而使盐酸曲美他嗪与其杂质分离度符合要求。作者参考相关文献 [1], [2], 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇- $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 ($\text{pH} = 3.0$) 为流动相时的分离效果, 无论流动相比例如何调整, 样品与已知杂质仍然无法分开, 杂质 b 与盐酸曲美他嗪色谱峰重叠, 杂质 a c 出峰时间几乎相同, 不能达到试验要求。经实验研究采用离子对色谱法, 调整流动相各组分比例, 盐酸曲美他嗪与其杂质得到较好的分离。

10.3 盐酸曲美他嗪容量分析法采用银量法, 用硝酸银滴定液滴定, 测定供试液中氯离子浓度, 电位法指示终点, 由于这种方法测定的是其中盐酸含量, 不是药物分子活性部分 (有机碱), 当其成盐工艺中盐酸与有机碱配比不当时, 成品中可能含有的杂质干扰实验测定结果, 专属性比较差; HPLC 方法可以将主成分与杂质有效分离, 专属性强, 此方法简便、快速、重现性好。

参考文献

1 Altiocka G, Kircali K, Aboul- Enein HY. Rapid HPLC and direct flow injection analysis assay for the determination of trimetazidine HCl in pharmaceutical tablet formulation. *J liquid chromatogr related technologies* 2006 29 (15): 2245
2 WANG Zhi-bin (王知斌), SUN Jin (孙进), SUN Ying-hua (孙英华), *et al* RP-HPLC determination of trimetazidine dihydrochloride and its related substances in tablets (RP-HPLC 法测定盐酸曲美他嗪片的含量和有关物质). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2006 23(8): 514

(本文于 2008 年 11 月 29 日修改回)