

HPLC测定普瑞巴林含量

丁逸梅^{1,2}, 严相平^{1,2}, 张晓蕾³, 张爱华^{1,2} (1. 南京工业大学药学院, 南京 210009; 2. 南京工业大学江苏省药物研究所, 南京 210009; 3. 南京中医药大学, 南京 210029)

摘要:目的 建立普瑞巴林的含量测定方法。方法 以 2,4,6-三硝基苯磺酸作为衍生化试剂,采用柱前衍生化 HPLC。色谱柱为 C₁₈柱,流动相为 0.01 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液(用磷酸调 pH至 4.0)乙腈(43:57),流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 40℃;检测波长为 350 nm。结果 回收率 99.18%,RSD=1.15%,普瑞巴林在 3.320~49.80 μg·mL⁻¹内呈良好线性关系(r=0.9999)。最低定量限:0.5 μg·mL⁻¹。结论 所建立的方法快速、简便、准确、灵敏,可用于普瑞巴林的含量测定。

关键词:普瑞巴林;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R917.101;R927.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2009)03-0243-03

Determination of Pregabalin by HPLC

DING Yimei^{1,2}, YAN Xiangping^{1,2}, ZHANG Xiaolei³, ZHANG Aihua^{1,2} (1. School of Pharmacy Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute of Material Medical, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 3. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of pregabalin. **METHODS** Samples were derivatized with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA). Separation was achieved on a reversed-phase C₁₈ column with the mobile phase of 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate (pH=4.0)-acetonitrile (43:57). The wavelength was 350 nm. **RESULTS** The average recovery was 99.18%, RSD=1.15%. The calibration curve was linear between 3.320-49.80 μg·mL⁻¹ (r=0.9999), the limit of quantification was 0.5 μg·mL⁻¹ for pregabalin. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and practicable for the assay of pregabalin.

KEY WORDS: pregabalin; HPLC; determination

普瑞巴林(pregabalin)是氨基丁酸(GABA)受体激动剂,结构与加巴喷丁类似,也是GABA的3位烷基取代物,2004年12月,FDA批准辉瑞公司(Pfizer)的普瑞巴林(商品名Lyrica)用于治疗糖尿病性外周神经痛(DPN)及疱疹后遗神经痛(PHN)。同年7月,欧盟批准Lyrica用于治疗外周神经痛及辅助治疗部分性癫痫发作。同年,在美国及其他欧洲国家相继上市。与加巴喷丁相比,本品具有剂量低、毒副作用少的优势。

普瑞巴林为(3S)-3-氨基-5-甲基己酸,是GABA类似物,本身无紫外吸收,以衍生化试剂2,4,6-三硝基苯磺酸引入紫外吸收基团,进行HPLC测定。本试验对普瑞巴林柱前衍生化HPLC进行了方法学研究。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 510泵、Shimadzu检测器SPD-10A VP、HW色谱工作站),Mettler DL53

自动电位滴定仪。2,4,6-三硝基苯磺酸由Sigma公司提供,纯度:99.4%,规格:10 mL,浓度为5%。吡啶、冰乙酸、磷酸、乙酸铵(分析纯,南京化学试剂厂);蒸馏水;乙腈(色谱纯,TEDIA)。氢氧化钠(0.1 mol·L⁻¹)滴定液根据药典配制;高氯酸(0.1 mol·L⁻¹)滴定液根据药典配制;基准物邻苯二甲酸氢钾(优级纯,上海试剂三厂);酚酞指示剂;结晶紫指示剂(分析纯,上海化学试剂厂)。

普瑞巴林样品、对照品(纯度99.3%)由南京工业大学江苏省药物研究所合成研究室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.01 mol·L⁻¹乙酸铵水溶液(用磷酸调节pH至4.0)乙腈(43:57);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长:350 nm;进样量:20 μL。

作者简介:丁逸梅,女,副研究员 Tel:(025)83258221 E-mail:dinyimei743@sohu.com

2.2 溶液的配制

对照品储备溶液的制备:精密称取普瑞巴林对照品约 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50%乙腈稀释至刻度,作为对照品储备液。

对照品溶液的制备:精密量取上述储备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,分别加入衍生化试剂 2, 4, 6 三硝基苯磺酸 0.2 mL,吡啶 3.0 mL,蒸馏水 2.0 mL,密闭,振摇混匀 30 s, 85 °C 水浴加热 1 h,冷水冷却 10 min,加 2.0 mL 冰乙酸,振摇混匀 30 s,加水稀释至刻度,摇匀作为对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取普瑞巴林样品约 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加 50%乙腈稀释至刻度,作为供试品储备液。依法制备供试品溶液。

空白溶液的制备:精密量取 50%乙腈 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,依法制备空白溶液。

2.3 系统适应性试验与空白干扰试验

取普瑞巴林对照品溶液在上述色谱条件下进行测定,结果以主峰计算理论板数为 15 548,拖尾因子为 1.03,与前一峰分离度为 2.32。取对照品溶液,连续进样 5 次,计算普瑞巴林峰面积相对标准偏差, $RSD = 0.38\%$ 。另依法进行空白试验,结果空白无干扰。见图 1。

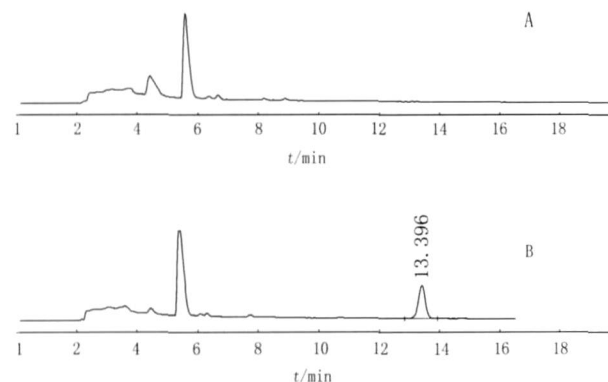


图 1 高效液相色谱图

A - 空白样品; B - 普瑞巴林

Fig 1 HPLC chromatograms

A - blank sample; B - pregabalin

2.4 线性范围与标准曲线

分别精密吸取对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.2, 1.5 mL 置 10 mL 量瓶中,加入衍生化试剂 2, 4, 6 三硝基苯磺酸 0.2 mL,吡啶 3.0 mL,分别加入蒸馏水 2.9, 2.5, 2.0, 1.8, 1.5 mL, 密封,振摇混匀 30 s, 85 °C 水浴加热 1 h,冷水冷却 10 min,加 2.0 mL 冰乙酸,振摇混匀 30 s,加水稀释至刻度,摇匀,分别进样 20 μ L。以浓度 C 为 (μ g \cdot mL⁻¹) 横坐标,峰面积 A 为纵坐标,进行线性回归。普瑞巴林回归方程

为: $A = 0.4180 \times 10^4 + 5.629 \times 10^4 C$, $r = 0.9999$ 。结果表明普瑞巴林在 3.320 ~ 49.80 μ g \cdot mL⁻¹ 内呈良好线性关系。

2.5 溶液稳定性试验

取供试品溶液,室温放置,分别于 0, 1, 3, 4, 5 h 进样,峰面积 RSD 为 0.55%,表明衍生化溶液在 5 h 内是稳定的。

2.6 回收率试验

精密称取已知含量样品适量,加入对照品适量,配制成约相当于含量测定浓度的 80%, 100%, 120% 的供试品溶液各 3 份。依法测定,计算。平均回收率为 99.18%, RSD 为 1.15%。

2.7 重复性试验

精密称取样品 (批号: 050203) 6 份,进行普瑞巴林的含量测定, RSD 为 0.89%。结果表明本方法重复性好。

2.8 中间精密度

由 2 名不同试验者在不同时间、以不同仪器、采用不同色谱柱测定同一批原料样品普瑞巴林的含量, RSD 为 0.96%,结果表明本方法中间精密度良好。

2.9 灵敏度试验

本品最低定量限: 0.5 μ g \cdot mL⁻¹,最低检测限 0.1 μ g \cdot mL⁻¹。

2.10 样品测定

进行了三批样品含量测定,并与甲醛滴定及非水滴定测定结果相比较,结果一致,见表 1。

表 1 三种含量测定方法样品测定结果比较 (%)

Tab 1 Contents of pregabalin determined by three methods (%)

| 批号 | HPLC | 甲醛滴定 ¹⁾ | 非水滴定 ²⁾ |
|--------|-------|--------------------|--------------------|
| 050203 | 99.32 | 99.42 | 99.37 |
| 050311 | 99.16 | 99.23 | 99.09 |
| 050323 | 98.85 | 98.76 | 98.94 |

注: ¹⁾ 甲醛滴定法: 与甲醛溶液反应,以酚酞为指示剂,用氢氧化钠滴定液 (0.1 mol \cdot L⁻¹) 滴定。 ²⁾ 非水滴定法: 以结晶紫作为指示剂,高氯酸为滴定剂 (0.1 mol \cdot L⁻¹) 滴定。

Note: ¹⁾ Formaldehyde Titration: Reaction with formaldehyde solution to phenolphthalein as indicator, titrated with sodium hydroxide solution (0.1 mol \cdot L⁻¹) titration; ²⁾ non-aqueous titration: with crystal violet as an indicator for the titrant perchloric acid (0.1 mol \cdot L⁻¹) titration

3 结果与讨论

普瑞巴林是 GABA 类似物,没有明显的紫外吸收 (仅有较弱的末端吸收),因而用 HPLC-UV 法测定时,需进行衍生化处理,引入紫外吸收基团以便检

测。采用正交设计考察了衍生化时间、温度、冰乙酸用量^[1-3]对衍生化结果的影响。结果证明 85 ℃,加热 1 h,加冰乙酸 2.0 mL 时衍生化效果最佳,衍生化产物稳定。

采用衍生化 RP-HPLC 测定普瑞巴林的含量,该方法灵敏、稳定,为有效控制普瑞巴林的质量提供了一种可行的方法。

REFERENCES

- [1] WANG M J. The analysis of amikacin sulfate injection and its related substances by RP-HPLC [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2001, 26(5): 345-347.
- [2] EP3[S]. 2000(Supp): 267.
- [3] USP24[S]. 1999: 107.

收稿日期: 2007-12-18

HPLC-R 测定复方甘露醇注射液中甘露醇、葡萄糖的含量

柯云翠, 朱义 (杭州民生药业集团有限公司, 杭州 310011)

摘要:目的 建立复方甘露醇注射液中甘露醇、葡萄糖含量测定方法。方法 用 HPLC-R 法,以强酸性阳离子交换树脂(钙型)(Sugar Pak 300 mm × 6.5 mm)为固定相,水为流动相,柱温(85 ± 1) ℃,流速 0.5 mL · min⁻¹;检测器为示差折光检测器,池温 40 ℃。结果 甘露醇在 0.15 ~ 15 mg · mL⁻¹内呈良好的线性关系, $Y = 643.467X - 15.373$ ($r = 0.9998, n = 7$),平均回收率为 100.1% (RSD = 0.89%, $n = 9$);葡萄糖在 0.05 ~ 5 mg · mL⁻¹内呈良好的线性关系, $Y = 640.151X - 3.7196$ ($r = 1.0000, n = 7$),平均回收率为 100.1% (RSD = 0.73%, $n = 9$)。结论 该方法简便准确,重复性好,符合甘露醇、葡萄糖含量测定的要求。

关键词:甘露醇;葡萄糖;HPLC-R I

中图分类号: R917.101; R917.4 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)03-0245-03

Determination of Mannitol and Glucose in the Compound Mannitol Injection by HPLC-R I

KE Yuncui, ZHU Yi (Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC-R I method for the determination of the contents of mannitol and glucose in Compound Mannitol Injection. **METHODS** The HPLC-R I system consisted of strong acid cation exchange resin (Ca²⁺) (Sugar Pak 300 mm × 6.5 mm) as stationary phase, water as mobile phase at the flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. The column temperature was (85 ± 1) ℃. The differential refractive index detector temperature was 40 ℃. **RESULTS** The linear of glucose was 0.05-5 mg · mL⁻¹, $Y = 640.151X - 3.7196$ ($r = 1.0000, n = 7$), the average recovery was 100.1% (RSD = 0.89%, $n = 9$). The linear of mannitol was 0.15-15 mg · mL⁻¹, $Y = 643.467X - 15.373$ ($r = 0.9998, n = 7$), the average recovery was 100.1% (RSD = 0.73%, $n = 9$). **CONCLUSION** This method is simple, accurate and better reproducibility, can meet with the requirement of the determination of the contents of mannitol and glucose.

KEY WORDS: mannitol; glucose; HPLC-R I

复方甘露醇注射液是由 15%甘露醇、5%葡萄糖和 0.45%氯化钠加水组成的复方制剂,为渗透性脱水利尿药,用于降低颅内压、眼内压、利尿及防止早期肾功能不全等。

本品中的甘露醇、葡萄糖结构相似,具有非常相近的理化性质,用传统的氧化还原法、旋光法等测定含量,相互难以排除干扰,或专属性不强,均不适用

于甘露醇、葡萄糖的定量分析。国外药典^[1-3]采用 HPLC-R 法,以钙型强阳离子交换树脂柱,以水为流动相,进行甘露醇的含量测定,国内也有文献报道采用 HPLC-R 法以磺化聚苯乙烯类凝胶填充柱^[4]或 HPLC-ELSD 法以氨基柱^[5]测定甘露醇、葡萄糖的含量。本试验建立 HPLC-R 对本品中甘露醇、葡萄糖的含量进行测定。

作者简介:柯云翠,女,主管药师 Tel: (0571) 89973607 E-mail: dczkyc@163.com