

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定盐酸赛庚啉的有关物质

吴荷琴,陈朝霞(常州四药制药有限公司,江苏常州 213004)

[摘要] **目的** 建立测定盐酸赛庚啉有关物质的高效液相色谱法。**方法** 选用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-缓冲液[称取辛烷磺酸钠 2.16 g, 加水约 500 ml, 溶解, 加入冰醋酸 10.0 ml 和三乙胺 5.0 ml, 加水至 1 000 ml, 摇匀, 用三乙胺调节 pH 至 7.0] (85:15, V/V), 过滤并脱气; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 286 nm; 进样量: 10 μl; 柱温: 25 °C。**结果** 盐酸赛庚啉和杂质 A、B、C 的线性范围分别为 0.056 2~5.620 μg/ml ($r=0.999\ 8$), 0.052 4~5.240 μg/ml ($r=1.000\ 0$), 0.050 3~5.032 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 0.053 2~5.316 μg/ml ($r=0.999\ 7$); 盐酸赛庚啉和杂质 A、B、C 的定量限在 0.049~0.054 μg/ml 之间, 检测限在 0.019~0.022 μg/ml 之间; 回收率在 98%~100% 之间; 重复性 RSD 为 5.5% ($n=6$)。**结论** 该方法简便灵敏, 结果准确可靠, 重复性好, 可用于盐酸赛庚啉有关物质的质量控制。

[关键词] 盐酸赛庚啉; 有关物质; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)01-0060-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.014

Assay of cyproheptadine hydrochloride and the related substances with HPLC

WU Heqin, CHEN Zhaoxia (Changzhou Siyao Pharm, Changzhou City, Changzhou 213004, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for the assay of cyproheptadine hydrochloride and the related substances. **Methods** The HPLC was performed on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at the temperature of 25 °C with the mobile phase of acetonitrile-buffer Solution (Dissolve 2.16 g of sodium octane-1-sulfonate with about 500 ml of water and mix well. Add 10.0 ml of glacial acetic acid and 5.0 ml of triethylamine, and dilute with water to 1 000 ml, mix well and adjust to pH 7.0 with triethylamine) (85:15, V/V). The flow rate was 1.0 ml/min and detection wavelength was 286 nm. The injection volume was 10 μl. **Results** The calibration curves of cyproheptadine hydrochloride, impurity A, B and C showed good linear response in the range from 0.056 2 to 5.620 μg/ml ($r=0.999\ 8$), 0.052 4 to 5.240 μg/ml ($r=1.000\ 0$), 0.050 3 to 5.032 μg/ml ($r=0.999\ 9$) and 0.053 2 to 5.316 μg/ml ($r=0.999\ 8$) respectively. The LOQs for cyproheptadine hydrochloride, impurity A, B and C were within 0.049-0.054 μg/ml, LODs were within 0.019-0.022 μg/ml with recovery between 98%-100%. RSD of repeatability was 5.5% ($n=6$). **Conclusion** This method gave an accurate and reliable results. It can be used for quality control of cyproheptadine hydrochloride.

[Key words] cyproheptadine hydrochloride; related substances; HPLC

盐酸赛庚啉(cyproheptadine hydrochloride)是一种抗过敏类药物,有抗组胺、抗 5-羟色胺的作用,用于治疗荨麻疹、湿疹、过敏性鼻炎和皮肤瘙痒等过敏性疾病^[1]。文献中使用高效液相色谱法对盐酸赛庚啉制剂的含量和有关物质进行测定^[2,3]。中华人民共和国药典 2015 年版(简称中国药典)^[4]、欧洲药典 8.0 版^[5]、美国药典 39 版^[6]中采用高效液相色谱法梯度洗脱测定盐酸赛庚啉有关物质。笔者综合不同国家药典特点,进行了条件优化,以乙腈-缓冲液为流动相等度洗脱测定盐酸赛庚啉有关物质,并按照中国药典四部的要求^[7]进行了方法学验证。本法

大大节省了分析时间,而系统适用性试验要求和检测灵敏度没有降低,能同时检测降解杂质和工艺杂质,包括中国药典中的杂质 I(即本法的杂质 B)、美国药典中的赛庚啉相关物质 A(即本法的杂质 A)、赛庚啉相关物质 C(即本法的杂质 C)和阿米替林相关物质 A(即本法的杂质 B),采用主成分自身对照法对其他有关物质进行定量。本法线性范围宽,灵敏度高,方法简便、准确,适用于盐酸赛庚啉的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);AG135 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);TOLEDO 320 pH 计(瑞士梅特勒-托利多公

司)。盐酸赛庚啉(常州四药制药有限公司,批号:X03011、X03021、X03031);盐酸赛庚啉对照品(美国药典会,批号:G);杂质A(赛庚啉相关物质A)对照品(欧洲药典会,批号:2),杂质B(阿米替林相关物质A)对照品(批号:20140612)和杂质C(赛庚啉相关物质C)对照品(批号:20140613)均来自常州四药制药有限公司。冰醋酸为分析纯,乙腈、辛烷磺酸钠和三乙胺均为色谱纯,购自 Merck 公司,水为超纯水。

2 溶液配制

2.1 供试品溶液 精密称定供试品约25 mg,置50 ml容量瓶中,加流动相30 ml,溶解,加流动相至刻度,摇匀。

2.2 对照溶液 精密吸取供试品溶液5 ml置50 ml容量瓶中,加流动相至刻度;精密量取1 ml,置50 ml容量瓶中,加流动相至刻度,摇匀。

2.3 系统适用性溶液 精密称取盐酸赛庚啉对照品2.5 mg、杂质A对照品1.25 mg、杂质B对照品2.5 mg、杂质C对照品2.5 mg置100 ml容量瓶中,加2.0 ml乙腈溶解,用流动相稀释至刻度,精密吸取1 ml,置25 ml容量瓶中,加流动相至刻度,摇匀。

3 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)。流动相:乙腈-缓冲液[称取辛烷磺酸钠约2.16 g,加水约500 ml,溶解,摇匀。加入冰醋酸10.0 ml和三乙胺5.0 ml,加水至1000 ml,摇匀,用三乙胺调节pH至7.0](85:15,V/V);流速:1.0 ml/min,检测波长:286 nm,进样量:10 μl,柱温:25℃。

4 方法学验证

4.1 系统适用性试验 系统适用性溶液连续进样5次,盐酸赛庚啉、杂质A、杂质B和杂质C之间的分离度应符合规定,按盐酸赛庚啉峰面积计算相对标准偏差应不大于2.0%。结果盐酸赛庚啉峰的RSD为1.3%,分离度见表1。

4.2 专属性试验

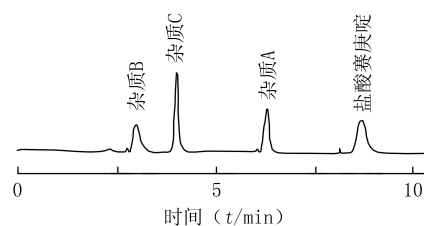


图1 盐酸赛庚啉系统适用性试验色谱图

4.2.1 酸破坏 称取盐酸赛庚啉约25 mg置50 ml容量瓶中,加0.1 mol/L的盐酸溶液3.0 ml,室温放置14 d,加入0.1 mol/L的氢氧化钠溶液3.0 ml,用流动相稀释至刻度,用0.45 μm的PTFE滤膜过滤,弃去初滤液2 ml。

4.2.2 碱破坏 称取盐酸赛庚啉约25 mg置50 ml容量瓶中,加0.1 mol/L的氢氧化钠溶液3.0 ml,室温放置14 d,加入0.1 mol/L的盐酸溶液3.0 ml,用流动相稀释至刻度,用0.45 μm的PTFE滤膜过滤,弃去初滤液2 ml。

4.2.3 氧化破坏 称取盐酸赛庚啉约25 mg置50 ml容量瓶中,加3%的过氧化氢溶液3.0 ml,放置于60℃的条件下100 min,用流动相稀释至刻度,用0.45 μm的PTFE滤膜过滤,弃去初滤液2 ml。

4.2.4 光照破坏 称取盐酸赛庚啉约25 mg置50 ml容量瓶中,放置于25℃光照4500 Lx的条件下14 d用流动相溶解并稀释至刻度,用0.45 μm的PTFE滤膜过滤,弃去初滤液2 ml。

4.2.5 热破坏 称取盐酸赛庚啉约25 mg置50 ml容量瓶中,放置于60℃的条件下14 d,用流动相溶解并稀释至刻度,用0.45 μm的PTFE滤膜过滤,弃去初滤液2 ml。

分别取酸、碱、氧化、光照和热破坏条件下的溶液进样,记录色谱图。考察最接近主峰的杂质峰和主峰的分离情况,并用DAD检测器测定主峰峰纯度。计算不同破坏试验条件下的质量平衡。结果见表2,图2。

表2 盐酸赛庚啉有关物质专属性试验结果

名称	盐酸赛庚啉含量(%)	杂质含量(%)	分离度	主峰峰纯度因子	质量平衡(%)
酸破坏	102.62	0.05	8.49	998.556	102.7
碱破坏	102.48	0.04	9.94	998.041	102.5
氧化破坏	91.91	9.90	5.23	998.846	101.8
光照破坏	102.76	0.14	8.52	998.390	102.9
热破坏	101.76	0.05	10.17	998.176	101.8

表1 盐酸赛庚啉有关物质系统适用性试验结果

名称	杂质B	杂质C	杂质A	盐酸赛庚啉
分离度	...	4.4	11.0	7.4

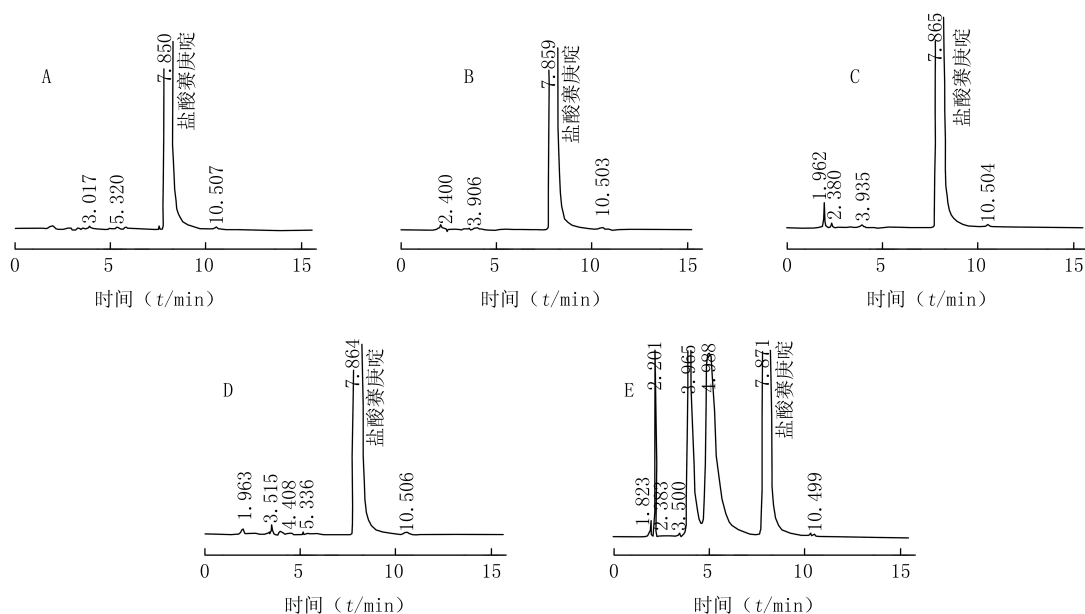


图2 盐酸赛庚啶专属牲试验色谱图

A.酸破坏;B.碱破坏;C.热破坏;D.光照破坏;E.氧化破坏

降解杂质峰均能与盐酸赛庚啶峰分离。强制降解试验显示盐酸赛庚啶在氧化条件下不稳定,在酸、碱、光照和热条件下稳定。此方法适用于盐酸赛庚啶有关物质的检测。

4.3 线性关系 精密称取盐酸赛庚啶对照品 2.5 mg,置 100 ml 容量瓶中,加 2.0 ml 乙腈溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为盐酸赛庚啶储备溶液。精密称取杂质 A 对照品 1.25 mg,置 100 ml 容量瓶中,加 2.0 ml 乙腈溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为杂质 A 对照品储备溶液。精密称取杂质 B 对照品 2.5 mg,置 100 ml 容量瓶中,加 2.0 ml 乙腈溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为杂质 B 对照品储备溶液。精密称取杂质 C 对照品 2.5 mg,置 100 ml 容量瓶中,加 2.0 ml 乙腈溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为杂质 C 对照品储备溶液。精密量取各成分的储备液,用流动相稀释成相应浓度的溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,以溶液浓度(X)为横坐标,进行线性回归,得到回归方程。结果见表 3。

表3 盐酸赛庚啶有关物质线性和范围结果

名称	线性方程(n=8)	线性范围(μg/ml)
杂质 A	$Y = 33.78X - 0.0394 (r = 1.0000)$	0.0524~5.240
杂质 B	$Y = 33.735X + 0.0834 (r = 0.9999)$	0.0503~5.032
杂质 C	$Y = 19.309X + 1.033 (r = 0.9997)$	0.0532~5.316
盐酸赛庚啶	$Y = 17.964X + 0.5532 (r = 0.9998)$	0.0562~5.620

结果表明,杂质 A、杂质 B、杂质 C 和盐酸赛庚啶的线性关系良好。

4.4 定量限和检测限 取“4.3”项下各成分的储备溶液,用流动相逐级稀释,按上述色谱条件进样,记录色谱图,以信噪比 10:1 时的浓度作为定量限;定量限溶液连续进样 6 次,计算峰面积的相对标准偏差。峰面积 RSD 值见表 4。以信噪比 3:1 时的浓度作为检测限。结果见表 4。

表4 盐酸赛庚啶有关物质定量限和检测限结果

名称	检测限(μg/ml)	定量限(μg/ml)	RSD(%)
杂质 A	0.019	0.049	4.8
杂质 B	0.020	0.050	3.9
杂质 C	0.021	0.052	4.0
盐酸赛庚啶	0.022	0.054	4.7

4.5 精密度试验

4.5.1 重复性 分别取本品 6 份,均精密称定,用流动相溶解并稀释制成每 1 ml 中含盐酸赛庚啶约 0.5 mg 的溶液,按上述色谱条件进样,记录色谱图,以测得杂质总含量来计算精密度,盐酸赛庚啶杂质总含量平均值为 0.023%,RSD 为 5.5% (n=6),表明本方法精密度良好。

4.5.2 中间精密度 由第二个分析员在不同日期、不同 HPLC 仪器,照“4.5.1”项下进行重复性试验。结果盐酸赛庚啶杂质含量平均值为 0.024%,RSD 为 6.2% (n=6)。所有 12 个结果的 RSD 为 5.9% ,

表明本方法精密度良好。盐酸赛庚啶供试品的典型图谱见图3。

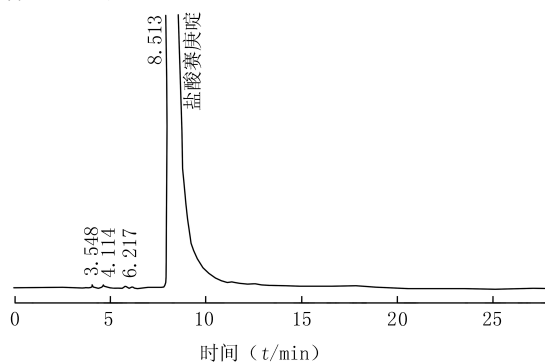


图3 盐酸赛庚啶供试品色谱图

4.6 准确度试验 取本品9份,精密称定,用流动相溶解并稀释制成盐酸赛庚啶浓度约为0.5 mg/ml的本底溶液,分别加入杂质A、杂质B和杂质C的储备溶液,制成约含杂质A、B、C为0.10、0.20、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合溶液,每个浓度重复配制3次,按上述色谱条件进样,记录色谱图,计算回收率。结果见表5

表5 杂质准确度试验结果

杂质	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回收率(%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3		
A	0.10	98.5	99.3	100.1	98.8	0.6
	0.20	98.3	98.5	98.8		
	0.50	99.0	98.6	98.3		
B	0.10	99.0	99.8	98.4	99.4	0.6
	0.20	99.7	99.1	98.9		
	0.50	100.3	99.9	99.1		
C	0.10	99.9	98.9	98.2	99.0	0.6
	0.20	99.3	99.7	98.5		
	0.50	99.0	98.4	99.2		

4.7 稳定性试验 取“2.1”项下的供试品溶液,分别在室温放置0、2、4、6、8、12和24 h进样,记录色谱图,按面积归一化法计算杂质总含量。结果盐酸赛庚啶杂质总含量平均值为0.025%, RSD为4.6%。所以供试品溶液在室温下放置24 h稳定。

4.8 耐用性试验 不同条件,按“4.5.1”项下方法测定杂质总含量,结果见表6。

杂质总含量平均值为0.024%, RSD为5.2%。对方法参数进行有意改变后,分析方法依然可靠。

5 有关物质测定

取3个不同批号的样品,按“2.1”项下方法制备

表6 盐酸赛庚啶有关物质耐用性试验结果

条件	杂质总含量 (%)
色谱柱	
Eclipse XDB-C ₁₈ (Agilent, 4.6 mm×250 mm, 5 μm)	0.024
Kromasil C ₁₈ (Kromasil, 4.6 mm×250 mm, 5 μm)	0.023
柱温(°C)	
20	0.022
25	0.024
30	0.023
不同pH值的缓冲液	
6.8	0.025
7.0	0.024
7.2	0.022
流动相的不同组成比例(V/V)	
87:13	0.024
85:15	0.024
83:17	0.026
流速(ml/min)	
0.8	0.026
1.0	0.024
1.2	0.025
杂质总量平均值	0.024
RSD(%)	5.2

供试品溶液,按上述色谱条件进样,记录色谱图,已知杂质采用外标法定量,其他杂质采用主成份自身对照法定量。盐酸赛庚啶有关物质测定结果见表7。另取3批样品,照中华人民共和国药典2015年版二部方法进行测定。记录色谱图和各峰面积,计算杂质总含量,结果与本文方法基本一致(见表7)。

表7 两种不同方法测定盐酸赛庚啶杂质总含量结果的比较(%)

批号	本文方法	中国药典方法
X03011	0.02	0.03
X03021	0.03	0.02
X03031	0.03	0.04

6 结论

有关物质的验证项目为专属性、准确度、线性和范围、定量限、检测限、精密度、中间精密度、系统适用性、耐用性和溶液稳定性。根据验证结果,所有的验证分析项目均符合规定,说明该分析方法是可靠的,适用于盐酸赛庚啶有关物质的分析。

【参考文献】

[1] 张式凡. 盐酸赛庚啶[J]. 江苏医药, 1980, 8(3): 30.

同地区购买的罗布麻叶,按“2.1.2”项下方法制备样品溶液,按照“2.2”项下色谱条件测定槲皮素含量,见表3,结果表明,吉林长春市和河北秦皇岛市的罗布麻叶中槲皮素含量最高,新疆乌鲁木齐的罗布麻叶中槲皮素含量最低。

表3 不同地区罗布麻叶中槲皮素含量

编号	来源	槲皮素百分含量(%)
1	吉林长春市	0.85
2	河北石家庄市	0.68
3	山东潍坊市	0.66
4	广东广州市	0.49
5	江苏无锡市	0.74
6	河北秦皇岛市	0.84
7	内蒙古呼和浩特市	0.55
8	江西南昌市	0.65
9	吉林松原市	0.70
10	四川成都市	0.75
11	安徽合肥市	0.69
12	上海市	0.70
13	新疆乌鲁木齐	0.45

3 讨论

3.1 罗布麻植物可采收叶的时期较长,为提高药材活性成分含量,确定最佳采收时间,本研究对不同生长期罗布麻叶中槲皮素的含量进行了测定,实验表明,罗布麻叶中槲皮素的含量随着植物的生长,经历一个由低到高,再由高转低的过程,这一变化过程和植物本身的新陈代谢变化过程相一致。罗布麻叶的最佳采收时间,选择在植株开始结果到叶开始变黄色期间采收最佳。

3.2 大花罗布麻 *Poacyzuan hendersonii* (Hook. F.) Woodson 是罗布麻的同科植物,主要分布于新

疆、青海和甘肃等省区,当地民间也做药用或茶饮治疗高血压。经对其槲皮素的含量测定,发现在5月和10月的含量较高,其余期间采集的含量稍低^[4],这一结果和我们测定的罗布麻植物有一定差异,可能和不同属种以及不同的气候条件有关。

3.3 经对国内部分省市销售店购买的罗布麻叶中槲皮素的含量测定结果表明,大多数商品的槲皮素含量符合药典规定的要求,也尚有少数样品达不到药典标准,建议有关部门还需加强对罗布麻叶的质量监督检查。

3.4 罗布麻叶是常用中药,具有平肝安神、清热利水的功效。本实验以其活性成分槲皮素为指标,比较不同生长期采集的罗布麻叶中槲皮素的含量,揭示了罗布麻叶药材的最佳采收时间,为获得优质罗布麻叶药材、罗布麻植物的合理使用和开发提供有益的参考。

3.5 试验采用2005年版《中国药典》一部罗布麻叶项下样品制备方法 & 色谱条件进行测定,方法简便、易操作,且峰形对称、分离度好,故本试验结果准确可信。

【参考文献】

- [1] 上海市食品药品监督管理局.上海市中药饮片炮制规范[S].上海:上海科技出版社,2008:245.
- [2] 张志琴,朱双雪.槲皮素的药理活性与临床应用研究进展[J].药学研究,2013,1(7):400-403.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2005年版一部[S].北京:化学工业出版社,2005:146-147.
- [4] 孟庆艳,马玲,吴增志,等.不同采收期大花罗布麻叶中槲皮素的含量测定[J].塔里木大学学报,2010,22(3):22-24.

[收稿日期] 2015-08-29 [修回日期] 2015-12-26

[本文编辑] 顾文华

(上接第63页)

- [2] 吕竹芬,谢清春,申楼.高效液相色谱法测定盐酸赛庚啉片中盐酸赛庚啉的含量[J].海峡药学,2011,23(10):52-54.
- [3] 陈繁华,曾玉梅,庄晓娜.HPLC法测定盐酸赛庚啉片的含量及其有关物质[J].中国药师,2015,18(10):1827-1829.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版二部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:1111-1112.
- [5] The European Pharmacopoeial Convention. European Pharma-

copeia[S]. 8th ed, 2014:1977-1978.

- [6] The United States Pharmacopoeial Convention. U.S. Pharmacopoeia[S]. 39th ed, 2016:3351-3352.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.

[收稿日期] 2016-09-03 [修回日期] 2016-10-14

[本文编辑] 顾文华