

瑞格列奈片残留量的检验方法研究

石学娟 李颖 程欢 吴海龙 王洪珍

(通化万通药业股份有限公司 吉林 通化 134001)

摘要: 目的: 通过对瑞格列奈残留量 HPLC 检验方法的验证, 确定瑞格列奈在生产过程中仪器清洗结束后, 检测其残留量检验方法实用性, 包括检测的线性、灵敏度、回收率及准确度。确保该方法对该药物残留量检测结果的准确性。方法: 采用实验室常用的高效液相色谱法。结果: 经过检验方法的验证, 最终确定该检测方法的线性范围为 0.1011 ~ 2.5283 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性回归方程为: $y=162935x - 8939.2$, 相关系数为 $R^2=0.9992$; 检测方法相当于限度浓度 50% ~ 150% 范围内, 平均回收率均在 60% ~ 69% 范围内, 精密性与重复性良好; 检测限为: 0.0303 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 定量限为: 0.1011 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。确定了凡残留量 1.23 ~ 31.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 均可采用此方法检测。结论: 该方法科学、操作简单, 精密性、准确度、重复性较好。

关键词: 瑞格列奈; 残留量; 高效液相色谱法

Study on the detection method of the residues of repaglinide tablets

Shi Xuejuan, Li Ying, Cheng Huan, Wu Hailong, Wang Hongzhen

Tonghua Wantong Pharmaceutical Co., Ltd., Tonghua 134001, Jilin, China

Abstract: Objective To validate the HPLC method for determining residue level of Repaglinide and determine its linearity, sensitivity, recovery and accuracy. To ensure the accuracy of test results of the residual concentrations. Methods High performance liquid chromatography. Results The linear range of detection 0.1011 ~ 2.5283 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, The linear regression equation was $y=162935x - 8939.2$ ($R^2=0.999$), The average recovery were in the range of 60% ~ 69% with good precision repeatability for equivalent to the limit concentration within range 50% ~ 150%. The detection limit was 0.0303 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the quantitative limit was 0.1011 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. All residue level within 1.23 ~ 31.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ can be detected by this method. Conclusion This method was simple, and had good precision, accuracy and repeatability.

Keywords: Repaglinide; Residue level; HPLC

瑞格列奈片主要具有降糖的作用, 在临床上广泛应用。据报道, 对老年性糖尿病患者经过瑞格列奈片治疗后, 能提高临床治疗效果^[1]; 另有报道, 将瑞格列奈与二甲双胍、阿卡波糖胶囊等联合用药, 用于治疗 2 型糖尿病老年患者的临床效果十分显著, 可明显的改善老年患者血糖、血脂等临床指标, 且不良反应发生率低, 具有临床推广的应用价值^[2,3]; 另有报道, 与二甲双胍联合服用瑞格列奈片治疗妊娠期糖尿病疗效较好, 副作用较少, 也值得临床推广^[4,5]。

生产瑞格列奈片过程中, 按照 GMP 要求, 要经常对制粒机、烘干设备等制药设备清洁, 每次清洗后的瑞格列奈片残留量的检测, 目前没有规范的检验方法。根据《药品生产验证指南》“清洁验证”中残留物浓度限度, 本试验选择擦拭法取样, 测定无水中瑞格列奈的浓度检测。要求设备表面擦拭取样残留物限度不大于 0.539 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。本研究通过对用 HPLC 测定瑞格列奈含量方法的验证, 来确定瑞格列奈残留量用 HPLC 检验方法检测的专属性、灵敏度和回收率及准确度。确保 HPLC 方法对瑞格列奈残留量浓度检测结果的准确性, 是其残留量达到 GMP 要求。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

CPA2P 电子天平 (德国赛多利斯公司); e2695 高效液相色谱仪 (Waters 公司); HT-300 型超声波清洗机 (济宁海腾超声电子设备有限公司); SHB-B95 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试剂

瑞格列奈 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_3$) 对照品 (中国药品生物制品检定所 100753-201303), 含量 99.8%; 醋酸铵 AR (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20191016); 冰醋酸 SR (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20201110); 甲醇 HPLC 纯 (Sigma-Aldrich, 批号: WXBD5246V); 磷酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 实验方法

2.1 验证前的准备工作

2.1.1 仪器

将 HPLC 等所有与验证有关的仪器、仪表、计量器具等, 严格按照相关规定进行校验或确定其校验在有效期内, 符合检测要求, 并确定其准确度、精密性、选择性等技术指标符合该验证方法验证的使用要求。

2.1.2 检验方法

色谱条件 HPLC 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (规格: 4.6mm \times 150mm, 5 μm), 流动相: 醋酸铵缓冲液-甲醇 (20:80); 检测波长: 243 nm。理论板数按瑞格列奈峰计算, 应不低于 4000。进样量: 100 μL ; 流速: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.1.3 溶液配制

醋酸铵缓冲液: 取醋酸铵 3.85g, 加水 1000ml 使溶解, 混匀, 用冰醋酸调 pH 值至 4.0, 过滤, 即得。

空白溶剂: 50% 甲醇。

空白棉签: 取棉签头前端剪下 (4 个), 投入装有 10ml 甲醇的试管中, 超声 30 分钟, 放冷至室温, 加入水 10ml, 超声 5 min, 摇匀。

对照品储备液: 取瑞格列奈对照品 12.6mg, 精密称定, 置 100ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5ml 于 50ml 量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度, 混匀, 既得。

对照品溶液: 精密量取对照品储备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 稀释剂稀释至刻度, 摇匀。

供试品溶液: 取样品, 将棉签头前端剪下, 投入装有 10ml 甲醇的试管中, 超声 30 分钟, 放冷至室温, 加入水 10 ml, 超声 5 min, 摇匀。

3 方法的验证

3.1 线性关系及范围

精密称取瑞格列奈对照品, 以甲醇为溶剂, 配制浓度为 1.26 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 再用 50% 甲醇稀释成浓度分别为 0.1011、0.6321、1.2642、1.8962、2.5283 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 精密吸取上述系列溶液各 100 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 线性关系及范围结果分别见表 1、图 1。以主峰面积为横坐标, 浓度为纵坐标确定线性方程为: $y = 162935x - 8939.2$, $R^2 = 0.9992$ 。

表 1 瑞格列奈含量测定线性关系及范围实验结果

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.1011	0.6321	1.2642	1.8962	2.5283
主峰面积	1657	99879	199988	299215	400918

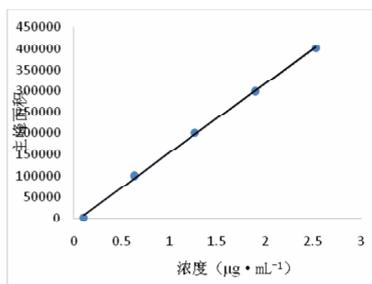


图1 瑞格列奈含量测定线性关系图

严格按验证方案操作, 结果得到线性方程的 $R^2=0.9992$, 表明溶液在 $0.1011 \sim 2.5283 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内, HPLC 主峰面积与浓度呈良好的线性关系。

3.2 回收率及准确度

3.2.1 溶液配制

对照品储备液: 取 2.1.2 项下对照品储备液。

对照品溶液: 同 2.1.2 项下对照品溶液配制, 平行配制 2 份。

50%回收率溶液的制备: 精密量取对照品贮备溶液 1ml, 滴加在 100cm^2 的不锈钢平板上, 平行操作三次即得 50%回收率溶液 50%-①、50%-②、50%-③。

100%回收率溶液的制备: 精密量取对照品贮备溶液 2ml, 滴加在 100cm^2 的不锈钢平板上, 平行操作三次即得 100%回收率溶液 100%-①、100%-②、100%-③。

150%回收率溶液的制备: 精密量取对照品贮备溶液 3ml, 滴加在 100cm^2 的不锈钢平板上, 平行操作三次即得 150%回收率溶液 150%-①、150%-②、150%-③。

3.2.2 擦拭法的回收率

表2 瑞格列奈残留量测定回收率及准确度实验结果

样品	加入量 (μg)	峰面积	测得量 (μg)	回收率%	平均回收率 % (n=3)	平均回收率 % (n=9)	RSD%
50%-①	12.667	50126	6.320	49.9	60	64	11.5
50%-②	12.690	68573	8.646	68.1			
50%-③	12.682	61333	7.734	61.0			
100%-①	25.334	136868	17.258	68.1	64		
100%-②	25.380	134435	16.951	66.8			
100%-③	25.364	112824	14.226	56.1			
150%-①	38.001	195730	24.680	64.9	69		
150%-②	38.070	219692	27.701	72.8			
150%-③	38.046	213271	26.892	70.7			

评价: 结果表明, 瑞格列奈相当于限度浓度 50% ~ 150% 范围内, 平均回收率均在 60% ~ 69% 范围内, 大于 50% 的规定, RSD 为 11.5% (n=9), 回收率及准确度试验良好。

3.3 精密度

3.3.1 重复性

(1) 溶液配制

供试品溶液的制备: 同准确度项下 100% 回收率溶液的制备,

通过轻轻摇动平板促使溶液均匀平铺在整个平板上, 不能溢出。在室温下挥干。将甲醇浸透过的棉签头放置在不锈钢平板上, 稍用力, 平稳而缓慢有序地擦拭表面。交叉擦拭过程应覆盖整个表面, 如图 2 所示。翻转棉签, 让棉签的另一面也进行同样进行交叉擦拭, 只是移动方向与前次垂直, 如图 3 所示。将棉签头前端剪下放入盛有 10ml 甲醇的具塞锥形瓶中, 超声 10min, 加 10ml 水, 摇匀, 经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 前 7ml 初滤液弃去, 取续滤液作为供试品溶液。每个浓度各平行制备 3 份供试品溶液, 共得到 9 份供试品溶液。

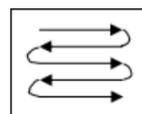


图2

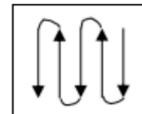


图3

3.2.3 测定法

精密量取各溶液 $100 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算回收率。

$$\text{回收率 \%} = \frac{A_x \times C_{\text{对}}}{A_R \times C_{\text{供}}} \times 100\%$$

式中: A_x 为供试品溶液的主峰面积; A_R 为对照品溶液的主峰面积; $C_{\text{对}}$ 为对照品溶液的浓度, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; $C_{\text{供}}$ 为供试品溶液的浓度, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2.4 测定结果

瑞格列奈相当于限度浓度 50% ~ 150% 范围内, 共 9 份供试品溶液的平均加样回收率应大于 50%。结果见表 2。

平行操作 5 份作为供试品溶液。

(2) 测定法

取各溶液 $100 \mu\text{L}$ 对照品溶液进 2 针, 供试品溶液进 1 针, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。

(3) 测定结果

取本品 6 份样品, 含量测定结果 RSD 小于 10%, 见表 3。结果表明, 该方法的重复性良好。

表3 重复性试验结果

供试品	供试品峰面积	测得量 (μg)	加入量 (μg)	回收率%	平均回收率 % (n=6)	RSD (%)
样 1-1	136868	17.258	25.334	68.1	63	5.3
样 1-2	128412	16.192	25.334	63.9		
样 1-3	123004	15.510	25.334	61.2		
样 1-4	116931	14.744	25.334	58.2		
样 1-5	127752	16.108	25.334	63.6		
样 1-6	130053	16.398	25.334	64.7		

评价: 结果表明, 平均含量的 RSD 为 5.3% (n=6), 大于回收

(下转第 108 页)

(上接第 96 页)
率 50% 的规定, 重复性良好, 符合要求。

3.3.2 稳定性

取“准确性”项下对照品溶液和“重复性”试验项下供试品溶液, 分别放置 0、6、12、24 h 后, 进样检测, 结果见表 4。

表 4 溶液稳定性测定结果

时间	对照品峰面积	与 0h 比较	供试品峰面积	与 0h 比较
0h	200647	---	136868	---
6h	202134	101	137400	100
12h	203059	101	138653	101
24h	201466	100	138505	101

对照品溶液和供试品溶液中的含量均为初始值的 90% ~ 110% 范围内, 说明对照品溶液及供试品溶液在 24h 内稳定, 结果表明溶液稳定性良好, 符合规定。

3.4 检测限及定量限

采用观察 HPLC 色谱图基线噪音与主成分峰的信噪比法确定其定量限与检测限。取专属性项下瑞格列奈对照品储备液适量, 用 50% 甲醇逐级稀释, 分别吸取溶液 100 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。当峰高的信噪比为 3 : 1 左右时, 对应的样品浓度即为检测限; 而当峰高的信噪比为 10 : 1 左右时, 对应的样品浓度即为定量限。测定结果表明, 该方法的检测限为: 0.0303 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 定量限为: 0.1011 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该条件下的定量限足够满足于不低于

25.24 $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$ 的残留量检测。

4 验证结论

根据上述不同指标的检验结果的验证, 表明采用高效液相色谱法对瑞格列奈残留量的检测方法可行。该方法的具体的线性范围为 0.1011 ~ 2.5283 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在 50% ~ 150% 浓度范围内, 平均加样回收率在 60% ~ 69% 范围内; 采用的擦拭法回收率为 64.0%; 检测方法的精密性与重复性良好; 定量限为 0.1011 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 能够满足检测的要求。因此, 确定了凡瑞格列奈残留量高于 25.24 $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$, 且供试品溶液浓度在 1.23 ~ 31.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内, 均可采用该方法进行检测。

参考文献

[1]郭艳茹,李岭.采用瑞格列奈片治疗老年糖尿病的临床疗效及用药安全性[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(38):103-106.
 [2]张丽华.瑞格列奈片联合盐酸二甲双胍片对 2 型糖尿病的治疗效果分析[J].中国实用医药,2019,14(20):107-108.
 [3]林丽萍,程定超,谢梅芳,等.瑞格列奈片联合阿卡波糖胶囊治疗老年 2 型糖尿病的效果及安全性[J].临床合理用药杂志,2022,15(11):85-85.[4]刘蕾.瑞格列奈片联合二甲双胍治疗妊娠期糖尿病患者的疗效[J].川北医学院学报,2019,34(1):85-88.
 [5]杨梨,张瑛,杨娜.瑞格列奈片联合二甲双胍治疗妊娠期糖尿病患者的疗效分析[J].现代诊断与治疗,2021,32(20):3244-3246.
 基金项目:吉林省科技发展计划项目(编号:20191102020YY)。