

使用亲水作用液相色谱(HILIC)与紫外(UV)和质谱(MS)检测联用系统分析二甲双胍及其杂质

Brianna R Clements, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

在美国，糖尿病是致死的主要疾病，因此用于控制糖尿病的药物对社会很重要。二甲双胍是一种常见的糖尿病一线治疗药物，尤其常用于II型糖尿病。在本研究中，将HILIC与MS和UV检测相结合，可以对极性药物二甲双胍及其有关杂质进行保留、分离和鉴定。已证明，该方法在定量原料药中的二甲双胍时具有良好的线性和重现性。此外，对多批次固定相的测试展现出可重现的结果。

优势

- 一种快速的单一分析方法，能够保留和分离二甲双胍及有关杂质
 - 该方法与MS兼容，可有效鉴定和检测不含发色团的杂质
 - 准确和精密的线性使其成为一种定量分析二甲双胍原料药的方法
-

简介

根据美国疾病控制与预防中心(CDC)的数据,有3730万美国人患有糖尿病,且目前糖尿病是美国第七大致死疾病¹。在这3730万例患者中,90%的患者属于II型糖尿病。二甲双胍是II型糖尿病的常用推荐初始用药²。鉴于II型糖尿病的流行和严重程度,生产二甲双胍药物的制药公司必须使用有效的方法进行质量控制检测。对此,我们开发出一种使用HILIC结合UV和MS检测来保留、分离和鉴定二甲双胍及其杂质的快速可靠的方法。

HILIC与传统的反相液相色谱(RPLC)³功能相反,是保留和分离极性化合物的理想技术⁴。本方法中使用了Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC色谱柱。Z-HILIC,也称为两性离子HILIC,是指填充在色谱柱内的亚乙基桥杂化颗粒与磺基甜菜碱官能团相连接。该官能团在颗粒表面形成致密的高含水量层,与HILIC的有机-水分配机制相结合,可保留和分离二甲双胍及其杂质。

在本研究中,将HILIC与MS和UV检测相结合,可以对极性药物二甲双胍及其有关杂质进行保留、分离和鉴定。已证明,该方法在定量药物样品中的二甲双胍时具有良好的线性和重现性。此外,对多批次固定相的测试展现出可重现的结果。

实验

分离方法的样品描述

盐酸二甲双胍、杂质A(氰基胍)、杂质C(N,N-二甲基-1,3,5-三嗪-2,4,6-氰胺)、杂质D(1,3,5-三嗪-2,4,6-氰胺)、杂质E(1-甲基双胍单盐酸盐)和杂质F(盐酸二甲胺)购自Sigma Aldrich (Milwaukee, WI)。杂质B((4,6-二氨基-1,3,5-三嗪-2-基)胍二盐酸盐)购自Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)。用80:20乙腈:去离子水制备单标储备液。然后混合标准储备液,使用80:20乙腈:去离子水使杂质和二甲双胍的浓度分别为10 µg/mL和100 µg/mL。溶液储存于2 °C~8 °C下,并且可以在分析之前平衡至室温。

线性样品描述

用80%乙腈制备浓度为1 mg/mL的盐酸二甲双胍储备液。然后,使用80:20乙腈:去离子水将该储备液稀释为浓度在50 µg/mL至150 µg/mL范围内的各种校准标准品。

二甲双胍药片(500 mg)由外部供应商提供。在处理药片时,通过称取5片药片以确定二甲双胍含量与片剂重量的比

率。然后，使用研钵和研杵研磨片剂。将磨碎的片剂称重并稀释，使稀释剂和药物样品的浓度分别为80%乙腈和100 µg/mL。分析前，使用13 mm 0.2 µm尼龙针式过滤器过滤100 µg/mL药片样品。

方法条件

在本方法中，利用两种检测器。液流布置为先通过非破坏性紫外检测器，然后流入破坏性MS检测器。此外，使用分流阀。当二甲双胍峰被洗脱时，分流阀将液流从UV引导至废液。这样可以避免QDa™过饱和，因为二甲双胍的浓度高于其杂质浓度。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Arc™ Premier液相色谱系统
检测：	Waters 2998光电二极管阵列检测器，240 nm Waters ACQUITY QDa质谱检测器
色谱柱：	Atlantis Premier BEH Z-HILIC, 4.6 × 100 mm, 2.5 µm
柱温：	40 °C
样品温度：	15 °C
进样体积：	10 µL
流速：	1.4 mL/min
流动相A：	90:10乙腈:去离子水（含10 mM甲酸铵和0.1%甲酸）
流动相B：	去离子水（含10 mM甲酸铵和0.1%甲酸）

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	1.4	94.4	5.6	初始
2.00	1.4	94.4	5.6	6
6.50	1.4	11.1	88.9	6
7.50	1.4	11.1	88.9	6
7.60	1.4	94.4	5.6	6
12.00	1.4	94.4	5.6	6

质谱条件

质谱系统：	Waters ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式：	ESI+
采集范围：	40 amu~300 amu
毛细管电压：	0.8 kV
锥孔电压：	15 V

数据管理

色谱软件：	Waters Empower™ 3软件
-------	---------------------

结果与讨论

本方法在专属性和保留性方面对二甲双胍及其相关杂质表现出良好的重现性。

在六次进样过程中，分析物的峰面积%RSD≤6%，保留时间%RSD≤1%（表1和表2）。空白进样证明稀释剂与标准品峰之间无干扰峰（图1a）。叠加色谱图清晰地展示了本方法的重现性（图1b）。

保留时间重现性	杂质C (min)	杂质A (min)	二甲双胍 (min)	杂质D (min)	杂质E (min)	杂质B (min)
平均值	1.310	1.482	2.451	2.790	3.815	4.082
标准偏差	0.002	0.003	0.006	0.006	0.004	0.002
%RSD	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1

表2.二甲双胍和杂质混标的保留时间表（含%RSD）。请注意，使用UV无法检测到杂质F，因此缺少其UV数据。

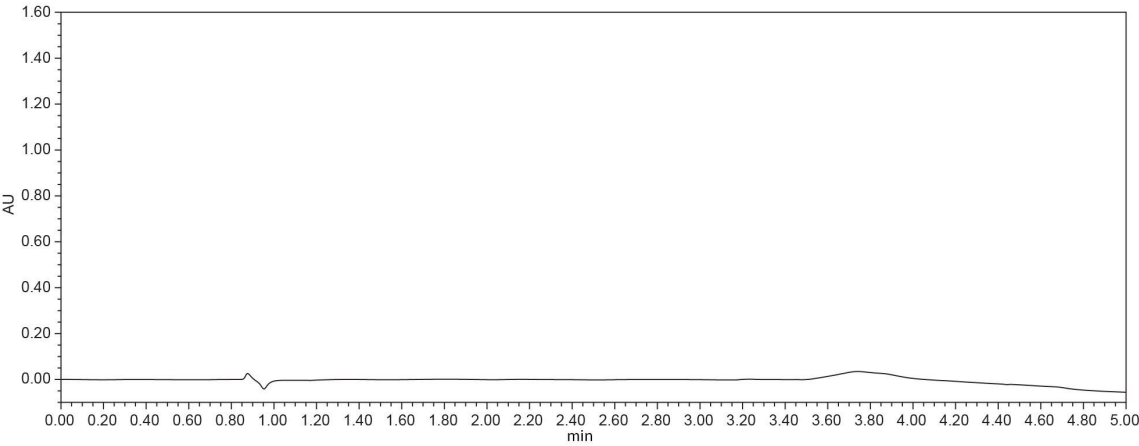


图1a.样品稀释剂（80:20乙腈:去离子水）的空白进样。

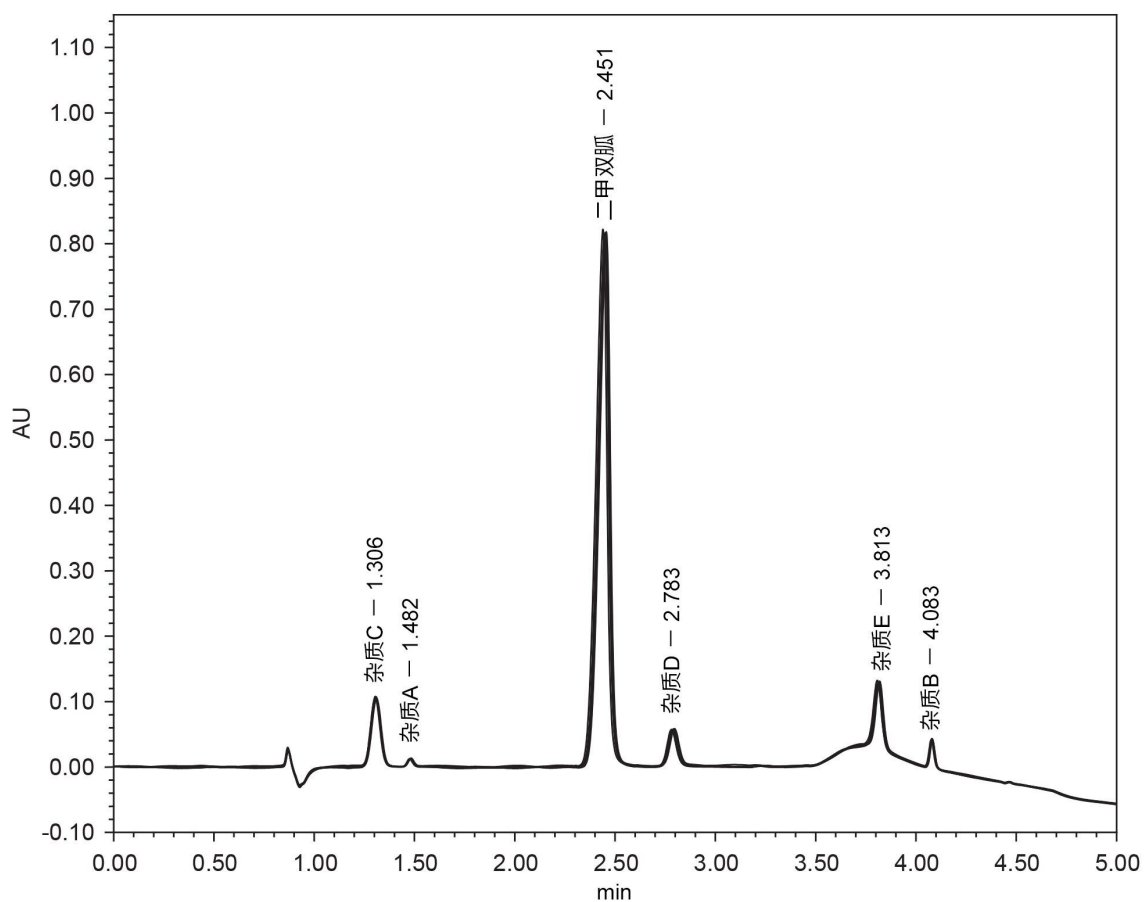


图1b.二甲双胍和杂质标准品六次进样得到的叠加色谱图。请注意，使用UV检测无法观察到杂质F。

在本研究期间，还采集了质谱图数据。质谱图数据有助于鉴定在UV中观察到的杂质，而且可以观察到UV谱图中没有的杂质F（图2A和图2B）。由于仪器设置，与UV保留时间相比，MS检测存在轻微延迟。

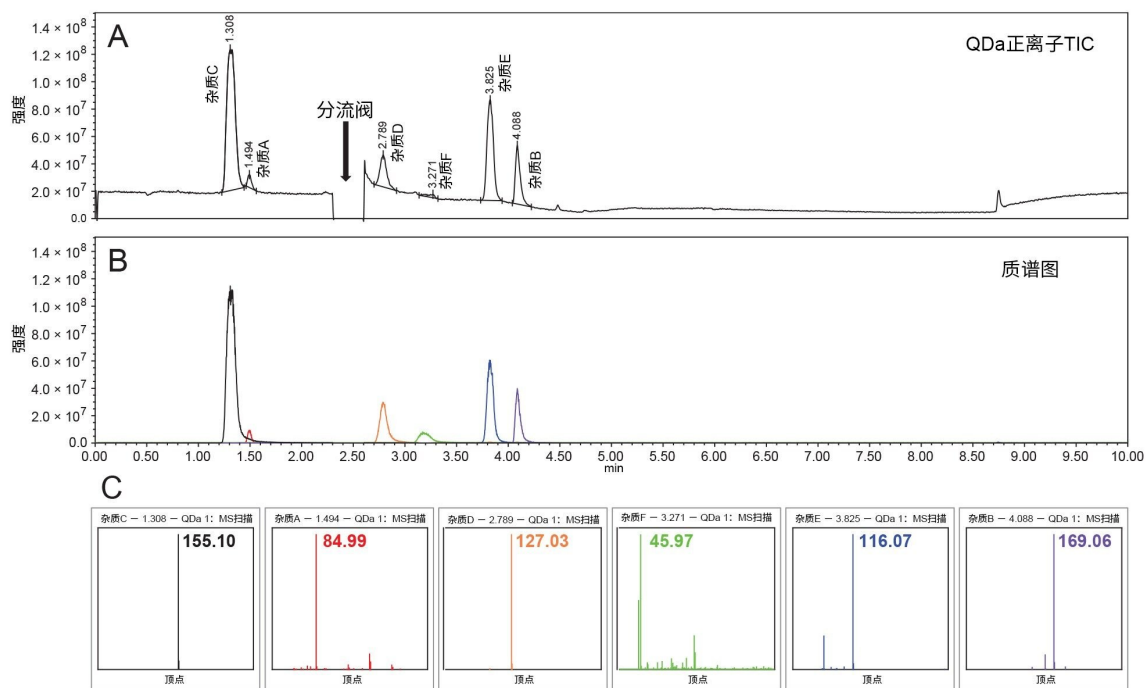


图2A.二甲双胍和杂质标准品的总离子流色谱图(TIC)。在杂质A与杂质D之间,存在液流从QDa转向废液引起的信号下降。这样做的目的是避免二甲双胍峰使检测器过饱和。因此,不存在二甲双胍的MS数据。

图2B.在TIC中检测到的各质量数的提取离子色谱图(XIC)的叠加色谱图(图2A)。

图2C.每个峰的质谱图基峰(m/z)(图2B)。这些质量数用于鉴定杂质。除杂质F外,所有质量数均为各杂质的已报道母离子质量数。

图2C中显示的质量数得到来自PubChem数据库的数据支持(表3)⁵⁻¹⁰。

杂质	可鉴定的质量数 (amu)
杂质A	84.04
杂质B	168.16*
杂质C	154.17
杂质D	126.12
杂质E	115.14
杂质F	45 **

表3.先前文献报道的二甲双胍杂质的质量数。

*考虑到盐酸盐在溶液中的溶解。

**考虑到先前采集的质谱数据。

采集到二甲双胍的线性数据证明所开发的方法适用于定量目的（图3和图4）。

使用尼龙针式过滤器对样品进行过滤，以避免溶解的药物辅料对系统造成任何污染。为确保过滤器不消耗二甲双胍，对过滤器回收样品进行分析（图4A和图4B）。在不受任何药物辅料干扰的条件下对二甲双胍药物样品进行定量（图4C）。

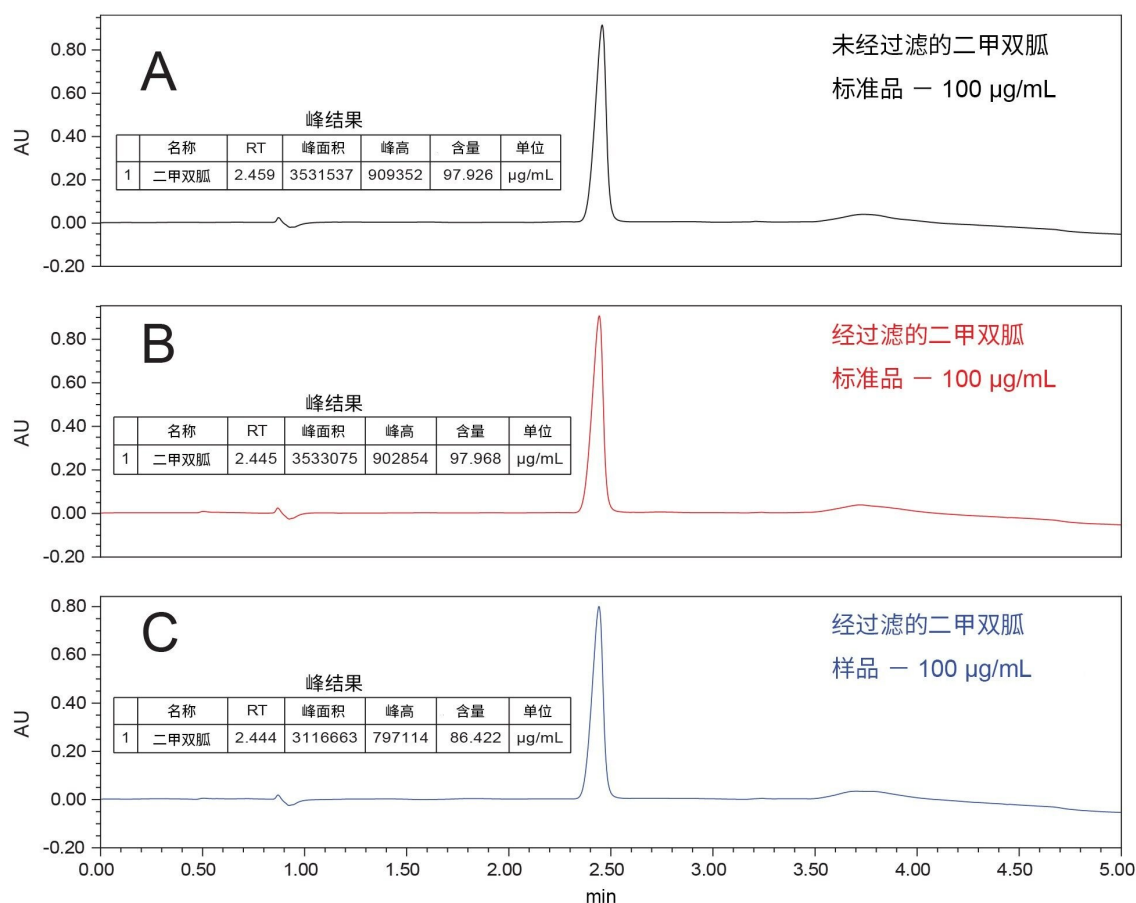


图4A.未经过滤的100 µg/mL二甲双胍标准品的色谱图，定量结果为97.9 µg/mL。

图4B.经过滤的100 µg/mL二甲双胍标准品的色谱图，定量结果为97.9 µg/mL。由此确认二甲双胍不会在通过尼龙针式过滤器时损失。

图4C.制备浓度为100 µg/mL的二甲双胍药物样品的色谱图。二甲双胍峰无任何干扰，定量结果为86.42 µg/mL。请注意，本方法中的样品制备未经优化。

此外，已知杂质均以约10 µg/mL的浓度添加至样品中（图5）。

本方法提供了一种定量二甲双胍的解决方案，可用于同时分析药物样品中的任何杂质。

色谱柱重现性

除创建本方法以外，我们还进一步测试了新Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱固定相的批次重现性。使用前面介绍的起始条件将每根色谱柱平衡1 h。然后，在每根色谱柱上运行二甲双胍和杂质标准品（进样次数n=3）。第二次进样的峰面积计数和保留时间如下表所示（表4和表5）。

峰面积比较	杂质C ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	杂质A ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	二甲双胍 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	杂质D ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	杂质E ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	杂质B ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
色谱柱批次A	373217	24663	3258457	181376	294750	73109
色谱柱批次B	369476	24537	3301612	199124	265114	74585
色谱柱批次C	370847	24206	3313964	206524	298297	65950

表4.采用三个单独的色谱柱批次所得到的二甲双胍和杂质标准品中各分析物的峰面积表。数据来自第二次进样（进样次数n=3）。

保留时间比较	杂质C (min)	杂质A (min)	二甲双胍 (min)	杂质D (min)	杂质E (min)	杂质B (min)
色谱柱批次A	1.272	1.459	2.403	2.752	3.784	4.061
色谱柱批次B	1.287	1.462	2.409	2.733	3.769	4.055
色谱柱批次C	1.314	1.465	2.447	2.832	3.805	4.074

表5.采用三个单独的色谱柱批次所得到的二甲双胍和杂质标准品中各分析物的保留时间表。数据来自第二次进样（进样次数n=3）。

这些结果在各色谱柱性能的叠加色谱图中得到了更清晰的呈现（图6）。采用三个不同吸附剂批次所得到的峰齐平，为使用Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱的消费者提供了信心。

结论

本研究证明，使用Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与MS和UV检测相结合可以成功地分离、保留和鉴定出二甲双胍及其相关物质。Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱已被证明在生产中保持一致。此外，本方法可用于准确定量分析原料药中的二甲双胍。本文为制药行业提供了一种可用于协助对二甲双胍原料药进

行质量控制的方法。

参考资料

1. Centers for Disease Control and Prevention. What is Diabetes?. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [2022年4月28日引用]. 参考网站: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/diabetes.html>.
2. Metformin. The Johns Hopkins Patient Guide to Diabetes. *John Hopkins Medicine*; 2016 [2022年4月28日引用]. 参考网站: <https://hopkinsdiabetesinfo.org/medications-for-type-2-diabetes-metformin/>.
3. Walter T, Berthelette K, Patel A, Alden B, McLaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Atlantis BEH Z-HILIC简介: 一种基于有机/无机杂化颗粒的两性离子固定相, 沃特世应用纪要, 2021, [720007311ZH](#).
4. Clements B, Maziarz M, Rainville P. Method for the Analysis and Quantitation of Pharmaceutical Counterions Utilizing Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Waters Application Note, 2022, [720007564](#).
5. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 10005, Cyanoguanidine; [2022年4月25日引用]. 2004. 参考网站: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cyanoguanidine#:~:text=Molecular%20Weight-,84.08,-Dates<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cyanoguanidine#:~:text=Molecular%20Weight-,84.08,-Dates> .
6. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 24196656; [2022年4月25日引用]. 2004. 参考网站: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24196656#:~:text=Reference-,Molecular%20Weight,204.62,-Computed%20by%20PubChem<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24196656#:~:text=Reference-,Molecular%20Weight,204.62,-Computed%20by%20PubChem>> .
7. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 11469186, 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine, N,N'-

dimethyl-; [2022年4月25日引用].2004.参考网站: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-N_4-N-dimethyl-1_3_5-triazine-2_4_6-triamine#:~:text=Molecular%20Weight-,154.17,-Computed%20by%20PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-N_4-N-dimethyl-1_3_5-triazine-2_4_6-triamine#:~:text=Molecular%20Weight-,154.17,-Computed%20by%20PubChem> .

8. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 7955, Melamine; [2022年4月25日引用].2004.参考网站: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/melamine#:~:text=Reference-,Molecular%20Weight,126.12,-Computed%20by%20PubChem> <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/melamine#:~:text=Reference-,Molecular%20Weight,126.12,-Computed%20by%20PubChem>> .
9. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 15486, 1-Methylbiguanide; [2022年4月25日引用].2004.参考网站: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Methylbiguanide#:~:text=More...-,Molecular%20Weight,115.14,-Dates> <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Methylbiguanide#:~:text=More...-,Molecular%20Weight,115.14,-Dates>> .
10. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 10473, Dimethylamine hydrochloride; [2022年4月25日引用].2004.参考网站: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethylamine-hydrochloride#:~:text=4.2Mass%20Spectrometry> <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethylamine-hydrochloride#:~:text=4.2Mass%20Spectrometry>> .

特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007633ZH, 2022年5月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号