基于 HILIC 模式的 HPLC-CAD 法测定伏格列波糖的有关物质和含量

黄海伟[1]，袁　松[1]，王艺璇[2]，庾莉菊[1]，陈　华[1]*

（1. 中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，北京 102629；
2. 中国药科大学，江苏南京 211100）

摘要：建立了基于亲水相互作用色谱模式的 HPLC- 电雾式检测器（CAD）法，用于测定伏格列波糖原料药的有关物质和含量。采用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱（3.0 mm×150 mm，2.7 μm），以 200 mmol/L 甲酸铵溶液（用甲酸调至 pH 3.0）和乙腈（体积比 250 ∶ 750）为流动相，流速为 0.5 mL/min，柱温为 50 ℃，CAD 温度 50 ℃，数据采集频率 2 Hz，过滤常数为 3.6 s。方法学研究结果显示，主峰及各杂质间分离度良好，且在相应的质量浓度范围内具有良好的线性关系。3 个已知杂质的平均加样回收率（n=9）分别为 103.0%、99.0%、95.6%，RSD 分别为 4.1%、5.6%、4.2%，主成分的平均回收率（n=9）为 100.0%，RSD 为 1.1%；伏格列波糖及其杂质 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的检测限分别为 1.3、2.6、3.3、1.5 ng。该法操作简单、专属性强，可为无紫外吸收的强极性化合物的质量控制研究提供参考。

关键词：伏格列波糖；含量测定；有关物质；高效液相色谱；电雾式检测器；亲水相互作用色谱；质量控制

中图分类号：R917；R977.1^{+}5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)12-1560-06

引用：黄海伟，袁　松，王艺璇，等. 基于 HILIC 模式的 HPLC-CAD 法测定伏格列波糖的有关物质和含量[J]. 中国医药工业杂志，2025, **56**(12): 1560-1565. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.12.009

Determination of Related Substances and Content of Voglibose by HPLC-CAD Method Based on HILIC Mode

HUANG Haiwei[1], YUAN Song[1], WANG Yixuan[2], YU Liju[1], CHEN Hua[1]*

(*1. NMPA Key Lab. for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629;
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211100*)

ABSTRACT: A HPLC-charged aerosol detector (CAD) method based on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) mode was established for the determination of related substances and content of voglibose in bulk drug. An Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z column (3.0 mm×150 mm, 2.7 μm) was used, with 200 mmol/L ammonium formate solution (pH 3.0 adjusted with formic acid) and acetonitrile (250 ∶ 750) as the mobile phase. The flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 50 ℃. The temperature of the CAD was 50 ℃, the data acquisition frequency was 2 Hz, and the filtration constant was 3.6 s. The methodological research results showed that the separation between the main component and various impurities was good, and there was a good linear relationship of the main component and various impurities in the corresponding mass concentration ranges. The average recoveries of three known impurities (n=9) were 103.0%, 99.0%, and 95.6%, with RSD of 4.1%, 5.6%, and 4.2%, respectively. The average recovery of main component (n=9) was 100.0%, with RSD of 1.1%. The detection limits for voglibose and its impurities Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ were 1.3, 2.6, 3.3, and 1.5 ng, respectively. This method is easy to operate and has high specificity, which can provide a reference for the quality control research of strongly polar compounds without ultraviolet absorption.

Key Words: voglibose; assay; related substance; HPLC; charged aerosol detector; hydrophilic interaction chromatography; quality control

伏格列波糖（voglibose，**1**），为日本武田工业株式会社研发的 α- 葡萄糖苷酶抑制剂，通过竞争性抑制双糖类水解酶 α- 葡萄糖苷酶的活性，延缓糖类的消化和吸收，从而降低餐后高血糖水平。**1** 于 1994 年首次在日本上市，1998 年在国内上市，因所用剂量小、不良反应少、疗效突出，已逐步成为国内 2 型糖尿病患者的主流降糖药 [1]。目前 **1** 仅在 ChP 2020 年版和《日本药局方》18 版中收载，其有关物质和含量测定均采用反相离子对色谱法，在以多氨基键合聚乙烯醇为填充剂的色谱柱上完成分离，并通过荧光反应试剂柱后衍生化测定。HPLC- 荧光检测器法 [2—3] 虽较为常用，但操作烦琐，影响因素较多，重现性较差。此外，研究人员开发了 HPLC- 蒸发光散射检测器法 [4]、HPLC- 示差折光检测器法 [5]、离子色谱法 [6]、HPLC-MS 法 [7] 等，却也普遍存在灵敏度或重现性较差等问题。

1 极性强，不含紫外吸收的发色团或荧光吸收的荧光团，因此常规 HPLC 法的开发难度大。亲水相互作用色谱（hydrophilic interaction chromatography，HILIC）是一种类似于正相色谱的分离手段，能为极性化合物提供良好的分离能力 [8]，而电雾式检测器（charged aerosol detector，CAD）是一种不依赖于化合物分子结构的通用型检测器，适用于大部分半挥发性和非挥发性化合物的检测，在糖类分析中多有应用 [9—10]。因此，本研究建立了基于 HILIC 模式的 HPLC-CAD 法测定 **1** 原料药的含量和有关物质，以期为 **1** 的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

Ultimate 3000 型液相色谱仪（美国 Thermo 公司，包括 Corona Veo 型 CAD）；XPR603S 型电子天平、XP205 型电子天平和 S40-K 型酸度计（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 原料药（上海天伟生物制药有限公司，批号 TW102-200101、TW102-211203）；**1** 对照品（含量 99.9 %，批号 100826-202305）、杂质Ⅰ［(1*S*,1'*S*,2*S*,2'*S*,3*R*,3'*R*,4*S*,4'*S*,5*S*,5'*S*)-5,5'-[[(*R*)-3- 羟基丙烷 -1,2- 二基］双（亚氨二基）］双［1-（羟甲基）-1,2,3,4- 环己四醇］，**2**］对照品（含量 100 %，批号 101529-202302）、杂质Ⅱ［(1*S*,1'*S*,2*S*,2'*S*,3*R*,3'*R*,4*S*,4'*S*,5*S*,5'*S*)-5,5'-[[(*S*)-3- 羟基丙烷 -1,2- 二基］双（亚氨二基）］双［1-（羟甲基）-1,2,3,4- 环己四醇］，**3**］对照品（含量 100 %，批号 101530-202302）和杂质Ⅲ［(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-5- 氨基 -1- 羟甲基 -1,2,3,4- 环己四醇（维列胺），**4**］对照品（含量 100 %，批号 101449-202001）均购于中国食品药品检定研究院；乙腈为 HPLC 级，甲酸、甲酸铵为 LC-MS 级，其他试剂均为 HPLC 级或 LC-MS 级，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 柱（3.0 mm×150 mm，2.7 μm）；*流动相* 200 mmol/L 甲酸铵水溶液（用甲酸调至 pH 3.0）和乙腈（体积比 250 ∶ 750），等度洗脱；*流速* 0.5 mL/min；*柱温* 50 ℃；*CAD 雾化温度* 50 ℃；*数据采集频率* 2 Hz；*过滤常数* 3.6 s；*进样量* 50 μL（有关物质检查），10 μL（含量测定）。

2.2 溶液配制

稀释剂：即流动相，同时也是空白溶剂。

贮备液：称取 **1** 对照品 25 mg，置 25 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，作为 **1** 对照品贮备液；称取 **2**、**3**、**4** 对照品各 10 mg，分别置 10 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，作为杂质对照品贮备液。称取 **1** 对照品 100 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，作为含量测定用对照品贮备液。

混合贮备液：精密量取 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品贮备液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相定容，摇匀，作为混合贮备液。

系统适用性溶液：称取 **1** 对照品 25 mg，置 25 mL 量瓶中，加流动相适量使溶解，精密加入 **2**、**3**、**4** 对照品贮备液各 0.25 mL，用流动相定容，摇匀，作为系统适用性溶液。

有关物质检查用溶液：称取 **1** 原料药 25 mg，置 25 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，作为供试品溶液；精密量取供试品溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相定容，摇匀，作为有关物质检查

收稿日期：2025-04-13
基金项目：中国食品药品检定研究院关键技术研究基金（GJJS-2022-4-1）
作者简介：黄海伟，硕士，从事化学药品的质量控制研究。
通信作者：陈　华，主任药师，从事药品质量安全的研究与开发。

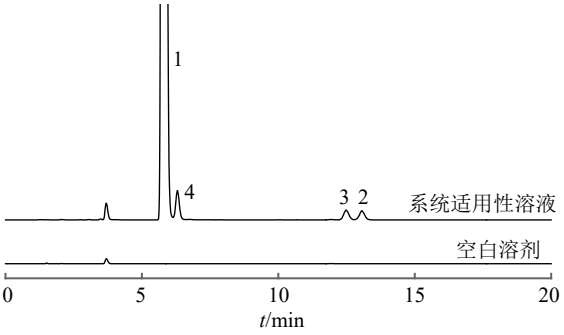
用自身对照溶液（1%）。

含量测定用溶液：称取**1**原料药和对照品各25 mg，分别置25 mL量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，分别作为含量测定用供试品溶液和对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

取“**2.2**”项下空白溶剂和系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果如图1所示。该条件下**1**峰与**4**峰之间的分离度为2.22，**2**峰与**3**峰之间的分离度为1.65，空白溶剂在主峰和杂质峰处无干扰。



1—**1**；2—**2**；3—**3**；4—**4**。

图1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatography

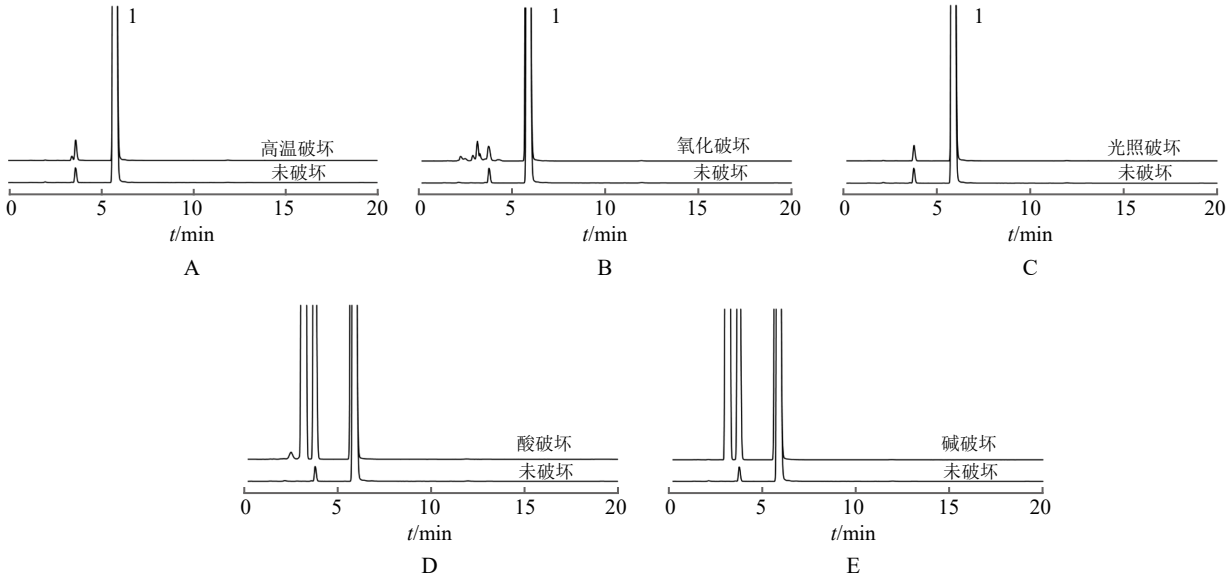
2.3.2 专属性试验

称取**1**对照品20 mg，共6份，分别进行如下破坏性试验。未破坏：加入流动相溶解并定容至20 mL，摇匀。酸破坏：加入0.1 mol/L盐酸1 mL，常温放置1 h后，加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL中和，再用流动相定容至20 mL，摇匀。碱破坏：加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL，常温放置1 h后，加入0.1 mol/L盐酸1 mL中和，再用流动相定容至20 mL，摇匀。氧化破坏：加入30%过氧化氢溶液1 mL，室温放置2 h后，用流动相定容至20 mL，摇匀。高温破坏：加入流动相5 mL使溶解，置90 ℃水浴中加热5 h，放冷至室温后用流动相定容至20 mL，摇匀。光照破坏：置254 nm紫外灯下照射8 h，加流动相溶解并定容至20 mL，摇匀。

精密量取上述溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，结果如图2所示，经酸、碱、氧化、高温、紫外光照射，主峰和杂质峰及各杂质峰之间分离效果仍较好，说明方法专属性良好。

2.3.3 线性试验

精密量取“**2.2**”项下混合贮备液适量，用流动



A—高温破坏性试验样品；B—氧化破坏性试验样品；C—光照破坏性试验样品；D—酸破坏性试验样品；E—碱破坏性试验样品。

1—**1**。

图2 强制降解试验色谱图

Fig.2 Chromatograms of the Stressing Tests

相稀释制成 **1**、**2**、**3**、**4** 的质量浓度分别为 0.2、0.5、0.8、1.0、2.0 μg/mL 的系列线性混合溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。以各成分峰面积（*A*）为纵坐标、质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归分析，结果如表 1 所示，**1** 和杂质 **2**、**3**、**4** 在相应质量浓度范围内与峰面积具有良好线性关系。

表 1 有关物质测定用的线性试验结果

Tab.1 Results of Linearity Test for Determination of Related Substances

化合物	线性范围 /（μg·mL^{-1}）	线性方程	相关系数（*r*）	相对校正因子
1	0.20 ～ 1.99	*A*=1.710 4*c* − 0.172 6	0.998 1	1.00
2	0.19 ～ 1.94	*A*=1.012 9*c*+0.026 4	0.998 9	0.59
3	0.22 ～ 2.24	*A*=1.125 3*c* − 0.119 7	0.997 8	0.66
4	0.26 ～ 2.60	*A*=1.908 2*c* − 0.237 5	0.999 0	1.12

精密量取“**2.2**”项下含量测定用对照品贮备液适量，用流动相稀释制成 **1** 质量浓度分别为 0.4、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL 的系列线性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。以峰面积（*A*）为纵坐标、质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归分析，得线性回归方程 *A*=1 687.1*c* − 173.8（*r*=0.999 9），结果表明 **1** 质量浓度在 0.4 ～ 1.4 mg/mL 与其峰面积呈良好的线性关系。

2.3.4 检测限与定量限

精密量取“**2.2**”项下混合贮备液适量，用流动相逐步稀释，分别进样检测。以色谱峰信号与噪声信号比值（*S*/*N*）10 ∶ 1 和 3 ∶ 1 分别作为定量限和检测限。结果显示，**1**、**2**、**3**、**4** 的定量限分别为 4.2、8.7、9.5、4.5 ng，检测限分别为 1.3、2.6、3.3、1.5 ng。

2.3.5 精密度试验

取“**2.3.3**”项下 **1**、**2**、**3**、**4** 的质量浓度为 1.0 μg/mL 的线性混合溶液，连续进样 6 次。结果显示，**1**、**2**、**3**、**4** 保留时间的 RSD（*n*=6）分别为 0.13%、0.08%、0.10%、0.10%，峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.58%、3.55%、2.96%、1.00%，可见有关物质测定方法的精密度良好。

取“**2.2**”项下含量测定用对照品溶液，连续进样 6 次，**1** 保留时间和峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.21%、0.42%，表明含量测定方法的精密度良好。

2.3.6 重复性考察

取同一批 **1** 原料药按“**2.2**”项下方法分别制备有关物质测定和含量测定用重复性试验溶液各 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。结果显示，6 份供试品溶液中总杂质含量均≤ 0.04%；含量测定结果的平均值为 99.80%，RSD（*n*=6）为 0.83%。可见，有关物质和含量测定所得结果的重复性良好。

2.3.7 回收率试验

称取 **1** 原料药（批号 TW102-200101）25 mg，置 25 mL 量瓶中，加流动相适量使溶解，平行制备 9 份，分别加入“**2.2**”项下混合贮备液 2.0、2.5、3.0 mL，再用流动相定容，摇匀，作为低、中、高 3 个水平（相当于杂质限度的 80%、100% 和 120%）样品，每个水平各制备 3 份。按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，计算回收率。结果显示，有关物质检测时，杂质 **2**、**3**、**4** 的平均回收率（*n*=9）分别为 103.0%、99.0%、95.6%，RSD 分别为 4.1%、5.6%、4.2%。

分别称取 **1** 原料药（批号 TW102-200101）20、25、30 mg，各置 25 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，作为低、中、高 3 个水平（相当于含量的 80%、100% 和 120%）样品，每个水平各制备 3 份。按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，计算回收率。结果显示，含量测定时，**1** 的平均回收率和 RSD（*n*=9）分别为 100.0%、1.1%。

上述结果表明，本法进行有关物质和含量测定时的回收率良好。

2.3.8 溶液稳定性

取“**2.3.6**”项下有关物质测定用重复性试验溶液，室温放置，于 4、6、10、20 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，考察该溶液的稳定性。结果显示，总杂质含量的极差≤ 0.01%，说明有关物质在室温条件下 20 h 内稳定。

再取“**2.3.6**”项下含量测定用重复性试验溶液，室温放置，于 3、6、14、28 h 时取样检测，考察该溶液的稳定性。结果显示，各时间点 **1** 峰面积的

RSD（n=4）为 1.09%，说明 **1** 在室温条件下 28 h 内稳定。

2.4 样品测定

按“**2.2**”项下分别制备有关物质检查和含量测定检测用溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。有关物质 **2**、**3**、**4** 采用加校正因子的主成分自身对照法计算，其他单个杂质采用不加校正因子的主成分自身对照法计算；含量测定采用外标法计算，2 批样品的测定结果如表 2 所示，均符合 ChP 2020 年版对 **1** 的相应规定。

表 2　HILIC 模式下 HPLC-CAD 法测定原料药中有关物质和 1 含量的结果 /%

Tab.2　Determination Results of Related Substances and **1** Content in Bulk Drug by HPLC-CAD Method Based on HILIC Mode/%

批号	含量（按无水物计 /%）	有关物质 /%				
		2	**3**	**4**	其他单个杂质	杂质总量
TW102-200101	100.2	未检出	未检出	未检出	0.03	0.03
TW102-211203	99.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

3　讨论

3.1 色谱条件的选择和优化

3.1.1 色谱柱的选择

ChP 2020 年版采用反相离子对色谱法洗脱后再进行衍生化检测 **1**，推荐使用 Shodex Asahipak NH_2 P-50 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）。曾采用该色谱柱，尝试了多种色谱条件，均无法得到满意结果，可见药典收载的色谱条件不适用于 CAD 检测。随后，考虑采用 HILIC 模式分离 **1** 及其杂质。根据样品特性及流动相 pH 值，选择了 3 种亲水色谱柱［色谱柱 A：Dikma Polyamino HILIC 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），色谱柱 B：SeQuant® ZIC®-HILIC 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），色谱柱 C：Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 柱（3.0 mm×150 mm，2.7 μm）］进行考察。结果显示，在色谱柱 A、B 上，杂质 **2**、**3** 共流出，且由于出峰时间较长，色谱峰展宽，导致响应较低；在色谱柱 C 上，杂质 **2**、**3** 呈现为双峰，有完全分离的可能性，且响应较高。最终选择色谱柱 C 进一步优化色谱条件。

3.1.2 流动相优化

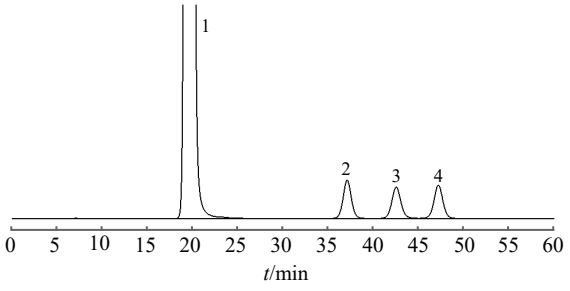
HILIC 的分离效果受多种色谱条件的影响，其中有机相比例、缓冲盐浓度和流动相 pH 值对化合物的保留行为都有重要影响[11]。本研究分别对这 3 个影响因素进行了考察。结果表明，各组分的保留时间都随着乙腈比例的增大而增加，表现出典型的亲水色谱特征；**2**、**3** 的极性显著大于 **1**、**4**，所以乙腈比例的调整对 **2**、**3** 影响较大，当乙腈比例 >75% 以后，**2**、**3** 的峰逐渐展宽，灵敏度降低，故确定乙腈的比例为 75%。

分别配制 10、20、50、100、200 mmol/L 的甲酸铵缓冲液（pH 3.0）进行洗脱考察。结果显示，各组分的保留时间变化不明显。这可能是固定相的静电吸引作用与盐浓度增加导致的保留增强作用共同造成的[12]。但缓冲盐浓度可使各组分的峰形明显改善，有效提升分离效率；其中，对 **1** 与 **4** 的作用尤为显著，当甲酸铵为 200 mmol/L 时，**1** 与 **4** 可达到基线分离。综合考虑 **1** 与 **4**、**2** 与 **3** 之间的分离度以及保留时间，确定缓冲盐浓度为 200 mmol/L。

在上述试验结果的基础上，考察缓冲液 pH 值分别为 3.0、3.8、4.8、6.4 时的分离效果。结果表明，随着 pH 值的降低，**1** 与 **4** 的保留效果减弱，分离度逐渐降低，而 **2** 与 **3** 的保留效果逐渐增强。在 pH 3.0 时，**2** 与 **3** 已完全分离，此时 **1** 与 **4** 峰也能达到基线分离，故缓冲液 pH 值确定为 3.0。

3.2 方法比较

ChP 2020 年版中 **1** 原料药及制剂的有关物质和含量测定均使用柱后衍生化荧光检测（系统适用性图谱如图 3 所示），虽然采用荧光检测器时灵敏度高，但存在平衡时间长、检测时间长（一次进样就需 60 min）、采用柱后衍生化操作复杂、影响因素多等问题。本研究建立的 HILIC-CAD 检测法可使各成分之间的分离度 >1.5，对于灵敏度最差的组分 **3**，亦能完全满足检测需求。采用 2 种方法对同一批样品的有关物质和含量进行测定，有关物质总量相差 0.01%，含量结果相差 0.4%，结果表明本法可作为 **1** 原料药有关物质和含量测定的替代方法。并且，



1—**1**；2—**2**；3—**3**；4—**4**。

图 3 ChP 2020 年版收录方法的系统适用性试验典型色谱图

Fig.3 Typical Chromatogram of System Suitability Test for the Method Included in ChP 2020 Edition

本法操作简便，专属性和重复性良好，可为无紫外吸收的强极性化合物的质量控制提供技术参考。

参考文献：

[1] 田 慧, 李春霖, 纪立农. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南 (2022 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2022, **30**(1): 2-51.

[2] 孙文霞, 陈 勇. 高效液相色谱法测定伏格列波糖口腔速溶膜中伏格列波糖的含量和有关物质 [J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2019, **38**(3): 247-250.

[3] 祝传勇, 刘 宁, 李 强, 等. 高效液相色谱法测定伏格列波糖片有关物质 [J]. 中国新药杂志, 2017, **26**(4): 443-449.

[4] 王欣荣, 孙 敏, 何璧梅, 等. HPLC-ELSD 测定法在伏格列波糖生产中的运用 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, **34**(12): 730-733.

[5] 曾 洁. RID-HPLC 法测定伏格列波糖口腔崩解片中伏格列波糖含量 [J]. 中国药事, 2008, **22**(12): 1093-1094.

[6] 陈 超, 赖雪雯, 蒋 畅. 离子色谱法测定伏格列波糖片的含量 [J]. 海峡药学, 2013, **25**(9): 54-55.

[7] 章向群, 吴凌华, 陈方军, 等. 高效液相色谱 - 质谱法测定伏格列波糖片中伏格列波糖含量 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2014, **43**(2): 141-144.

[8] 邢倩倩, 刘振民, 游春苹. 亲水色谱在食品内源组分分离分析方面的应用进展 [J]. 保鲜与加工, 2021, **21**(8): 126-132.

[9] 陈 蓉, 马冬阳, 郭 彬, 等. HPLC-CAD 法结合化学计量学同时测定甘草中多种糖类 [J]. 中国药师, 2021, **24**(10): 1932-1937.

[10] 黄超群, 刘绿叶, 吕春华, 等. 柱后补偿 - 液相色谱 - 电喷雾式检测器测定饮料中的三氯蔗糖 [J]. 分析化学, 2014, **42**(12): 1869-1870.

[11] 蒲江华, 赵 峡, 韩文伟, 等. 亲水作用色谱在糖类化合物分析中的应用 [J]. 分析测试学报, 2017, **36**(1): 145-150.

[12] 姜 舸, 沈爱金, 郭志谋, 等. 糖类化合物在两性离子亲水作用色谱柱上的保留行为评价 [J]. 色谱, 2015, **33**(9): 929-933.