

高效液相色谱法测定氢溴酸高乌甲素含量与有关物质

胡雪莲, 余涛, 邢茂, 雷健, 陈琳, 张恩娟
(第三军医大学新桥医院药剂科, 重庆 400037)

[摘要] 目的 建立测定氢溴酸高乌甲素含量及有关物质的高效液相色谱法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠-甲醇 (28: 72) 为流动相, 检测波长 252 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 在该色谱条件下, 各杂质峰与主峰均能良好分离; 氢溴酸高乌甲素的检出限为 0.32 ng, 氢溴酸高乌甲素在进样量 2.37~31.60 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=1.0000$)。结论 该方法简便快捷, 准确实用, 适用于氢溴酸高乌甲素的质量控制。

[关键词] 高乌甲素, 氢溴酸; 含量测定; 有关物质; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R286 R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2011)02-0249-03

氢溴酸高乌甲素是从高乌头中提取的总碱, 经化学分离获得的二萜类单体——刺乌头碱的氢溴酸盐^[1], 为国内首创的非依赖性镇痛药, 是卫生部《癌症病人三阶梯止痛疗法指导原则》中规定的中度镇痛药。氢溴酸高乌甲素原料的部颁标准^[2]中含量测定方法为非水滴定法; 也有文献采用内标法^[3]。但滴定法测定结果偏高, 内标法不够简便, 笔者在本实验中建立了外标法进行含量测定, 并与滴定法进行了比较。部颁标准^[2]中采用薄层色谱 (TLC) 法测定其他生物碱, 灵敏度低, 笔者建立了高效液相色谱 (HPLC) 法测定有关物质, 以便更好地对氢溴酸高乌甲素原料进行质量控制。

1 仪器与试剂

Waters 600 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)、Waters 2487 紫外检测器。氢溴酸高乌甲素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100289-200902), 氢溴酸高乌甲素原料药 (陕西大河药业有限责任公司, 批号: 20090201L, 20090301L, 20090201), 甲醇 (色谱纯, Scharlau Chemie S. A.), 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠-甲醇 (28: 72); 柱温: 25 °C; 检测波长: 252 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积: 20 μL。

[收稿日期] 2010-05-03 **[修回日期]** 2010-06-15

[作者简介] 胡雪莲 (1979-), 女, 湖北荆门人, 工程师, 硕士, 主要从事新药研发工作。电话: 023-68774770, E-mail: huxuelian1979@163.com。

[通讯作者] 张恩娟 (1961-), 女, 辽宁沈阳人, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 药物新剂型。电话: 023-68755401, E-mail: ejzhang@mail.xqhospital.com.cn

2.2 检测波长的选择 精密称取氢溴酸高乌甲素对照品适量, 用流动相制成每毫升约含 20 μg 的溶液, 以流动相为空白于 200~400 nm 波长范围内扫描。结果对照品在 221, 252, 309 nm 波长处有吸收峰。考虑到 221 nm 靠近末端吸收, 309 nm 波长处峰值较低, 因此选择波长 252 nm 为检测波长。

2.3 色谱条件的选择及系统适用性 参照卫生部标准氢溴酸高乌甲素片剂^[2]含量测定项下的色谱条件进行实验, 结果发现磷酸二氢钠浓度较高 (0.1 mol·L⁻¹) 时, 柱压较高, 后调整为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液-甲醇 (28: 72), 柱压降低, 且主峰峰形对称, 理论塔板数大于 1500, 主峰与杂质峰的分度 > 1.5。故选择此色谱条件。

2.4 精密度考察 精密称取氢溴酸高乌甲素对照品适量, 用流动相制成每毫升约含 40 μg 的溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 记录色谱图, 峰面积 RSD 为 1.5% ($n=5$), 说明本色谱系统重复性较好。

2.5 专属性考察 储备液的配制: 称取氢溴酸高乌甲素原料适量, 用流动相配制成相当于氢溴酸高乌甲素浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的储备液。

2.5.1 酸破坏实验 量取储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加入 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸 1 mL, 80 °C 水浴加热 1 h, 冷却, 用 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至中性, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过。

2.5.2 碱破坏实验 量取储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加入 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 15 min, 用 0.5 mol·L⁻¹ 盐酸调 pH 至中性, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过。

2.5.3 高温破坏实验 量取储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 于 105 °C 加热 9 h, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过。

2.5.4 强光破坏实验 量取储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 于 19 000 lx 照度下照射约 8 h, 加流动相至刻

度, 摇匀, 滤过。

2.5.5 氧化破坏实验 量取储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加入高锰酸钾试液 3 滴, 室温放置 30 min 后, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过。分别取上述各溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图 (图 1)。

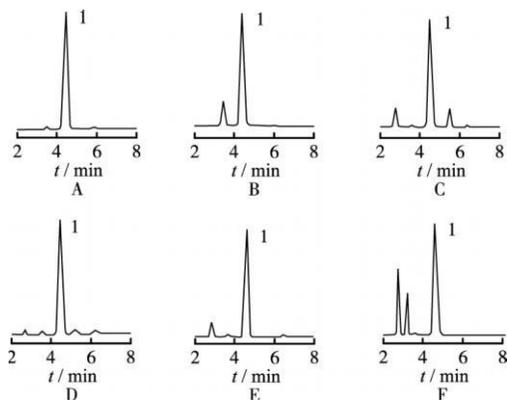


图 1 破坏性实验 HPLC 图谱

A. 未破坏; B. 酸破坏; C. 碱破坏; D. 高温破坏; E. 光照破坏; F. 氧化破坏; 1 氢溴酸高乌甲素

破坏性实验结果表明, 本品在酸、碱、高温、强光、氧化各条件下均发生了 15% ~ 25% 的降解。在所选择的色谱条件下, 各降解产物峰与主峰均达到良好的分离, 且主峰峰形对称, 理论塔板数 > 1 500。说明该方法专属性较好, 所选择的色谱条件能满足有关物质考察的要求。

2.6 耐用性考察 在选择色谱条件基础上, 调整流动相配比 (±2%)、变动检测波长 (±2 nm)、调节柱温 (±5 °C)、改变流速 (±0.2 mL·min⁻¹) 等, 仍能保证主峰和杂质峰基本完全分离, 说明该色谱条件有较好的耐用性。

2.7 检测限 精密称取氢溴酸高乌甲素原料适量, 用流动相溶解, 并多次稀释得到浓度为 0.016 μg·mL⁻¹ 的溶液, 取该溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 氢溴酸高乌甲素峰约为三倍基线噪音高。计算检测限为 0.32 ng。

2.8 线性关系考察 精密称取氢溴酸高乌甲素对照品适量, 置于 25 mL 量瓶, 用流动相溶解并稀释制成浓度为 0.79 mg·mL⁻¹ 贮备液。分别精密量取贮备液 0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 置于 10 mL 量瓶, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。分别取上述溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以主峰面积对进样量进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 95980.00X + 156.22$ ($r = 1.0000$)。说明氢溴酸高乌甲素在进样量 2.37 ~ 31.60 μg 范围内峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.9 方法重复性 分别称取 6 份同一批氢溴酸高乌甲素原料约 10 mg 用流动相溶解并稀释制成浓度约

为 0.04 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为供试品溶液; 另精密称取氢溴酸高乌甲素对照品约 10 mg 用流动相溶解并稀释制成浓度约为 0.04 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。按“2.1”项色谱条件, 分别取供试品溶液及对照品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算含量。结果 6 次平均含量为 94.6%, RSD 为 0.94%。说明本方法具有较好的重复性。

2.10 溶液稳定性 取“2.9”项下的供试品溶液一份, 分别于室温下放置 0、2、4、6、12、27 h 后, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定主峰峰面积, 并计算 RSD, 结果表明峰面积在 27 h 内无明显变化, RSD 为 0.75%。

2.11 样品含量测定 按“2.9”项所述含量测定方法, 对 3 批原料进行检测, 另按卫生部药品标准氢溴酸高乌甲素原料标准^[2], 采用非水滴定法进行检测, 结果见表 1。

2.12 有关物质检测 取氢溴酸高乌甲素原料适量, 加流动相制成每毫升约含氢溴酸高乌甲素 0.1 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 精密量取供试品溶液 0.3 mL 置于 10 mL 量瓶, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液 (3%)。取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分峰高约为记录仪满量程的 10%; 再取供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍。供试品溶液的色谱图中如显示杂质峰, 记录总杂质峰面积, 与对照溶液主峰的面积相比较, 计算总杂质含量, 结果见表 1。

表 1 氢溴酸高乌甲素含量及有关物质测定结果 %

批号	滴定法 含量 %	HPLC 法 含量 %	两种含量 方法偏差	有关物质
20090201L(供注射用)	96.86	94.60	2.26	2.12
20090301L(供注射用)	97.01	94.51	2.50	2.48
20090201L(供口服用)	97.32	93.32	4.00	3.94

3 讨论

氢溴酸高乌甲素原料的部颁标准为非水滴定法, 也有文献^[3]采用内标法进行了研究, 且结果表明非水滴定法测定的结果偏高。笔者采用外标法对氢溴酸高乌甲素原料的含量测定方法进行了研究, 同时, 采用 HPLC 法对其有关物质测定方法进行研究, 并测定了 3 批市售样品的含量和有关物质。结果表明, 采用非水滴定法测得的含量确实偏高, 且偏高程度与有关物质的大小呈正相关。原因是氢溴酸高乌甲素原料中含有其他生物碱, 非水滴定法测定结果为总生物碱, 而 HPLC 法测得的仅为氢溴酸高乌甲素。因此有关物质越大者, 非水滴定法

测定结果偏差也越大。采用 HPLC 外标法测定氢溴酸高乌甲素原料含量,不仅可以解决原方法测定含量偏低问题,而且本方法具有简便、快捷、准确的特点,更适合作为本品的含量测定方法。

文献报道氢溴酸高乌甲素注射液的有关物质含量较高,且各厂家的质量差异较大^[4-5],其重要原因之一是对未对氢溴酸高乌甲素原料的有关物质进行控制。氢溴酸高乌甲素原料的部颁标准中采用 TLC 法检测其他生物碱,采用此方法检测 3 批样品均未显示杂质斑点,但采用 HPLC 法检测有关物质却高达 2%~4%。说明 TLC 法灵敏度太低,宜改为灵敏度更高的 HPLC 法进行质量控制。

[DOI] 10.3870/yydh.2011.02.041

[参考文献]

- [1] 唐希灿,朱梅英,冯洁,等.刺乌头碱氢溴酸盐的药理作用研究[J].药学学报,1983,18(8):579-584
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准(二部)第5册[S].1996,51,53
- [3] 袁才英,位海强,杨青,等.HPLC法改进氢溴酸高乌甲素含量测定方法[J].广东药学,2003,13(2):7-9
- [4] 李军,徐本明,郎跃武,等.HPLC法测定注射用氢溴酸高乌甲素的含量及其他生物碱[J].药物分析杂志,2006,26(10):1497-1499
- [5] 刘朝霞,黄海伟,张启明,等.HPLC法测定氢溴酸高乌甲素注射液有关物质的研究[J].药物分析杂志,2009,29(5):795-798

高效液相色谱法测定 罗红霉素片与罗红霉素分散片溶出度

洪利娅¹,孙晓明²,王建¹

(1.浙江省食品药品检验所,杭州 310004 2.浙江京新药业股份有限公司,新昌 312500)

[摘要] 目的 建立罗红霉素片与罗红霉素分散片的溶出度测定方法。方法 采用转篮法,以醋酸盐缓冲液(pH 5.5)为溶出介质,转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,经 45 min 取样,取样后采用高效液相色谱法测定。结果 罗红霉素在 $0.02 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈较好的线性关系 ($r=0.9999$),罗红霉素片平均回收率 99.6% (RSD=0.8%);罗红霉素分散片平均回收率 99.4% (RSD=0.9%)。17 批片剂和 13 批分散片在 45 min 时平均溶出量均 > 80%,且均一性较好。结论 该方法快速、简便,结果准确可靠,重复性好。

[关键词] 罗红霉素片;罗红霉素分散片;溶出度;色谱法,高效液相

[中图分类号] R972 R927.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)02-0251-03

罗红霉素为大环内酯类抗生素,罗红霉素片及其分散片载于《中华人民共和国药典》2005年版二部^[1],该药溶出度检查方法用硫酸显色,缺乏专属性;将硫酸显色改为用荷移比色法,实验结果也不理想。笔者所在单位为《中华人民共和国药典》2010年版修订品种罗红霉素片及罗红霉素分散片质量标准的起草单位,笔者在本实验中参考同类药的相关文献^[1-3],采用专属性较强的高效液相色谱(HPLC)法,建立了新的溶出度测定方法,经实验发现罗红霉素在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中不稳定,因此实验了新的溶出介质并进行了方法学验证。用所建立的方法测定了

17批片剂样品及13批分散片样品的溶出度,结果均符合规定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 天津大学 ZRS-8B 智能型药物溶出仪,Agilent1100液相色谱仪(包括在线真空脱气机,四元泵自动进样系统)。

1.2 试剂 纯化水,乙腈(色谱纯),醋酸钠和磷酸二氢铵(分析纯),罗红霉素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:200502),罗红霉素片(由全国17家制药公司提供),罗红霉素分散片(由全国13家制药公司提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:岛津 Shim VP-ODS 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相: $0.067 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢铵溶液(用三乙胺调节 pH 至 6.5)-乙腈 (65:35);流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:210 nm;进样量:

[收稿日期] 2010-03-20 [修回日期] 2010-04-27

[作者简介] 洪利娅(1966-),女,浙江人,主任药师,硕士,从事药物分析工作。

[通讯作者] 王建,电话:0571-86459458 E-mail

wangjianhy2000@yahoo.com.cn