

HPLC法测定盐酸马普替林片的含量及溶出度

夏瑞, 车宝泉, 田洁, 董素英

(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立 HPLC法测定盐酸马普替林片含量及溶出度。方法: 采用 Phenomenex C₁₈柱 (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm), 流动相为甲醇-硫酸铵缓冲液 (60:40); 检测波长为 230 nm, 流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹。结果: 盐酸马普替林色谱峰峰形对称, 峰纯度检查为 0.9999, 含量测定方法的线性范围在 0.1000~1.0000 mg $\cdot$ mL⁻¹, 平均回收率为 99.4%; 溶出度测定的线性范围为 0.0100~0.1000 mg $\cdot$ mL⁻¹, 平均回收率。结论: 本测定方法简便、准确, 可用于盐酸马普替林片的含量及溶出度的测定。

关键词: 盐酸马普替林片; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)10-1729-05

HPLC determination of maprotiline hydrochloride tablets and its dissolution

XIA Rui, CHE Bao-quan, TIAN Jie, DONG Su-ying

(Beijing Municipal Institute of Drug Control Beijing 100035, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determination of content and dissolution of maprotiline hydrochloride tablets. **Method** A Phenomenex C₁₈ column (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm) was adopted with mobile phase consisted of ammonium sulfate buffer solution-methanol (40:60) at the flow rate of 1 mL $\cdot$ min⁻¹. The detection wavelength was 230 nm. **Result** Maprotiline hydrochloride peak was symmetrical in the chromatograph, the peak purity index is 0.9999. The linear range was 0.1000~1.0000 mg $\cdot$ mL⁻¹ for assay, the average recovery was 99.4%, and for dissolution the linear range was 0.0100~0.1000 mg $\cdot$ mL⁻¹, the average recovery was 99.6%.

Conclusion This method is simple, specific and can be used for the determination of maprotiline hydrochloride tablets and its dissolution.

Key words maprotiline hydrochloride tablets; HPLC

盐酸马普替林片为四环类抗抑郁药, 能阻止中枢神经突触前膜对去甲肾上腺素的再摄取, 具有解除精神迟滞作用, 从而达到抗抑郁的效果, 消除忧郁情绪。中国药典 2005年版^[1]收载有盐酸马普替林片, 但含量均匀度、溶出度及含量测定均采用了比色的方法, 方法繁琐且重复性差; USP^[2] 30版中也收载有盐酸马普替林片, 采用了液相色谱法测定含量, 但要求使用氰基柱, 系统适用性试验要求拖尾因子不得过 2.0, 且试验发现该条件下色谱峰拖尾严重; 欧洲药典 6.0^[3]版中盐酸马普替林的有关物质测定采用了液相的方法, 但采用的色谱柱为硅胶柱, 且流动相系统较繁琐; 标准号为 (试行) WS-025(X-025)-99中采用了紫外双波长的方法测定盐酸马普替

林片的含量; 目前也有液相色谱法测定盐酸马普替林片的文献报道^[4], 并且在流动相中加入高浓度的三乙胺作扫尾剂, 但都不能完全解决色谱峰拖尾的问题。盐酸马普替林含有 N 原子, 能与固定相中硅羟基发生相互作用, 形成次保留效应, 造成色谱峰拖尾, 因此解决盐酸马普替林色谱峰的拖尾是方法中的关键。本文在对各国药典以及文献中盐酸马普替林分析方法进行系统比较的基础上, 建立了其含量测定方法, 解决了盐酸马普替林在色谱柱上拖尾严重的问题, 在该条件下色谱峰峰形对称, 为测定盐酸马普替林片的含量提供了一种既简便又准确的方法。

1 仪器与试药

日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-M20A 二极管阵列检测器, LC-20AT 泵, SIL-20AC 自动进样器以及 CBM-20A 系统控制器, CTO-20A 控温箱; KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 工作频率 40 kHz, 超声电功率 500 W)。

盐酸马普替林对照品由中国药品生物制品检定所提供; 盐酸马普替林片由 A 制药有限公司 (为薄膜衣片, 批号为 X0012, X0013, X0014)、B 制药有限公司 (批号为 079100) 以及 C 制药有限公司 (批号为 05111Q, 070321) 提供; 辅料由 A 制药有限公司以及 B 制药有限公司提供; 所用试剂甲醇为色谱纯, 硫酸铵为分析纯, 水为纯化水。

2 含量测定

2.1 溶液配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸马普替林对照品适量, 加流动相适量, 超声 5 min, 配制含 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取细粉适量 (约相当于盐酸马普替林 50 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声 5 min 并充分振摇, 使盐酸马普替林溶解, 用流动相稀释至刻度, 滤过, 即得。

2.2 方法与结果

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$), 流动相为甲醇-硫酸铵缓冲液 [取硫酸铵 10.5 g 和 2 mL 三乙胺溶于 1000 mL 水中, 用稀硫酸试液 (中国药典 2005 年版附录 XV B) 调节 pH 至 4.0] (60:40); 检测波长为 230 nm, 进样体积 $10 \mu\text{L}$ 。

2.2.2 系统适用性试验 取“2.1”项下的对照品溶液和供试品溶液分别注入液相色谱仪, 见图 1, 盐酸马普替林的理论板数为 4500, 拖尾因子为 1.01, 用二极管阵列检测器对供试品溶液的色谱峰纯度测定, 色谱峰纯度为 0.9999。

2.2.3 辅料干扰试验 分别取 2 个不同生产厂家提供辅料适量, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声 5 min, 放冷至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪。记录色谱图 (见图 2)。结果表明, 辅料不干扰盐酸马普替林含量的测定。

2.2.4 线性关系考察 取盐酸马普替林对照品适量, 加流动相分别制成浓度为 0.1009, 0.2523, 0.5046, 0.7569, 1.009 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 分别取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积对

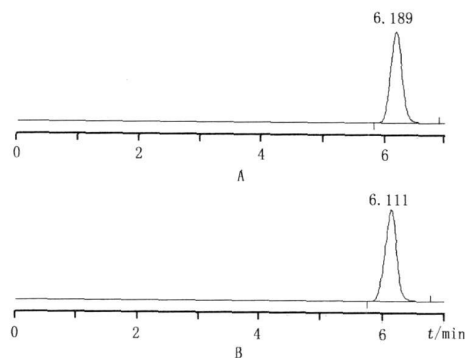


图1 对照品溶液(A)及样品溶液(B)的液相色谱图

Fig1 HPLC chromatograms of reference (A) and sample (B)

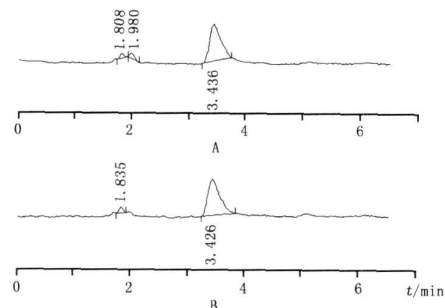


图2 辅料色谱图

Fig2 HPLC chromatograms of excipients provided by different pharmaceutical company

A. A 制药有限公司辅料 (excipient made by A company) B. B 制药有限公司辅料 (excipient made by A company)

浓度做标准曲线。线性方程为:

$$Y = 5.099X + 0.243 \quad r = 0.9993$$

在盐酸马普替林浓度为 $0.100 \sim 1.000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 稳定性考察 取“2.1”项下配制的对照品溶液和供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进行色谱分析, 对照品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.23%。供试品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.08%; 说明对照品溶液和供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

2.2.6 精密度试验 取“2.1”项下配制的同一份对照品溶液和供试品溶液, 分别连续进样 5 次, 对照品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.11%, 供试品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.13%。

2.2.7 重复性试验 取同批号样品细粉 6 份 (每份约相当于盐酸马普替林 50 mg), 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相适量, 加流动相平行制成 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下的色谱条件进行测定, 结果 6 份结果的平均值为 97.88%, 其 RSD 为 0.35%。

2.2.8 定量限 取盐酸马普替林原料用流动相配

制成每 1 mL 中含 200 ng 的溶液,精密量取 10 μ L 分别注入液相色谱仪,盐酸马普替林峰高约为基线噪音的 10 倍(以信噪比 $SN = 10$ 计),因此盐酸马普替林的定量限为 2 ng

2.2.9 回收率测定 分别精密称取盐酸马普替林原料约 40 50 60 mg 置 100 mL 量瓶中,加入处方量的辅料(取 2 个生产厂家提供的辅料各分别配制 9 份供试品溶液),加流动相适量,超声 5 min,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液测定;另精密称取盐酸马普替林对照品适量,加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液;

表 1 不同品牌色谱柱的系统适用性参数

Tab 1 System suitability parameters of column of different brand

编号 (No.)	色谱柱 (column)	R_t /min	拖尾因子 (tail factor)	理论板数 (theoretical plate)	测定结果 (results) %	RSD %
1	Phenomenix C_{18} 柱 (column) (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm)	4.908	1.01	4532	99.7	0.5
2	Capcell PAK C_{18} 柱 (column) (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm)	6.189	1.03	4906	100.3	0.35
3	Agilent C_{18} 柱 (column) (4.6 mm $\times$ 25 cm, 5 μ m)	9.001	1.03	9334	99.2	0.7

2 号色谱柱为资生堂生产,色谱柱中采用了非极性基团封尾技术,使硅羟基活性降低,从而改善了与含 N 原子化合物的分离,从而能大大降低色谱峰的拖尾,但另两种品牌的色谱柱都是常规的色谱柱,从上表中可看出,本方法对色谱柱具有很好的耐用性。

2.2.11 样品测定 取样品细粉适量(约相当于盐酸马普替林 50 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相适量,超声 5 min 并充分振摇,使盐酸马普替林溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图;另精密称取盐酸马普替林对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算,结果 A 制药有限公司 3 批样品的含量分别为 100.0%, 100.9%, 99.9%; B 制药有限公司 1 批样品含量为 96.9%; C 制药有限公司的 2 批样品含量分别为 97.4%, 98.2%。

3 溶出度的测定

3.1 溶液的配制

3.1.1 供试品溶液 中国药典 2005 年版中盐酸马普替林片的溶出介质为 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液,因此本方法中取溶出液作为供试品溶液。

3.1.2 对照品溶液 取盐酸马普替林对照品适量,精密称定,用 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液溶解并稀释制成每 mL 中含 50 μ g 的溶液,作为对照品溶液。

3.2 方法与结果 色谱条件同含量测定

3.2.1 辅料干扰试验 分别取 2 个不同生产厂家

同法测定计算测得量及回收率。结果低浓度的平均回收率为 98.5% ($n = 6$), $RSD = 1.5\%$; 中等浓度的平均回收率为 99.7% ($n = 6$), $RSD = 0.9\%$; 高浓度的平均回收率为 100.1% ($n = 6$), $RSD = 1.2\%$ 。平均回收率为 99.4% ($n = 18$), $RSD = 1.5\%$ 。

2.2.10 色谱柱的耐用性试验 选用 3 种色谱柱,本文色谱条件下,同时用 1# 和 2# 色谱柱分别在 2 台液相色谱仪对同一批样品进行含量测定各 5 份,其相对误差为 0.6%,3# 色谱柱对同一批样品测定了 2 份,具体测定结果及系统适用性参数见表 1。

提供辅料适量,置 500 mL 量瓶中,加 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液适量,超声 5 min,加 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液 10 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图(见图 3)。结果表明,辅料不干扰盐酸马普替林溶出含量的测定。

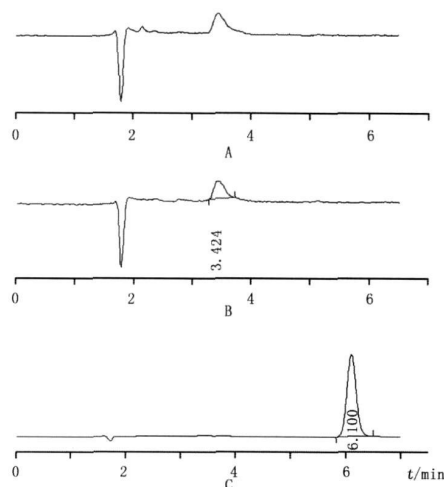


图 3 辅料及样品色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of excipients provided by different pharmaceutical company and sample

A. A 制药有限公司辅料 (excipient made by A company) B B 制药有限公司辅料 (excipient made by B company) C. 样品溶液 (sample solution)

3.2.2 线性关系考察 取盐酸马普替林适量,加 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液分别制成浓度为 10 25 50 75 100 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液,精密量取 10 μ L,分别注

入液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积对浓度做标准曲线。盐酸马普替林的线性方程:

$$Y = 67.19X + 0.1033 \quad r = 0.9997$$

在盐酸马普替林浓度为 $0.0100 \sim 0.1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围,浓度与峰面积呈良好的线性关系。

3.2.3 稳定性考察 取“3.1”项下配制的对照品溶液和供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 进行色谱分析,对照品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.22%,供试品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.45%;说明对照品溶液和供试品溶液至少在 8 h 内稳定。

3.2.4 精密度试验 取“3.1”项下配制的同一份对照品溶液和供试品溶液,连续进样 5 次,对照品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.11%,供试品溶液中盐酸马普替林峰面积的 RSD 为 0.23%。

3.2.5 回收率测定 分别精密称取盐酸马普替林原料约 15, 18, 20 mg 置 500 mL 量瓶中,加入处方量的辅料(取 2 个生产厂家提供的辅料各分别配制 9 份供试品溶液),加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液适量,超声 5 min,加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液测定;另精密称取盐酸马普替林对照品适量,加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.05 mg 的溶液,作为对照品溶液;同法测定计算测得量及回收率。结果低浓度的平均回收率为 99.3% ($n = 6$), RSD = 0.4%;中等浓度的平均回收率为 99.6% ($n = 6$), RSD = 0.7%;高浓度的平均回收率为 100.0% ($n = 6$), RSD = 0.5%。平均回收率 99.6% ($n = 18$), RSD 为 0.40%。

3.2.6 样品测定 按中国药典 2005 年版中盐酸马普替林片的溶出度方法对 6 批样品进行实验,取溶出液滤过,精密量取续滤液 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图;另精密称取盐酸马普替林对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算,结果 A 制药有限公司 3 批样品的溶出度分别为 99.1%, 100.4%, 97.5%; B 制药有限公司 1 批样品溶出度为 97.7%; C 制药有限公司的两批样品溶出度分别为 94.0%, 94.3%。

4 讨论

4.1 流动相系统中盐的种类确定 美国药典盐酸马普替林片中含量测定中是以 4 g 氯化四甲基铵溶于 495 mL 水中,加入乙腈 500 mL,磷酸 1 mL 为流动相,检测波长为 272 nm,流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,色谱柱为氟基柱,系统适用性试验要求马普替林峰理

论板数不低于 1500,拖尾因子不得过 2.0,峰面积 RSD 不得过 2.0%,实验中发现色谱峰的拖尾因子约为 1.49,且色谱峰为宽峰,使得柱效大大降低;在采用其他文献资料的方法时,拖尾因子均在 1.50 以上;曾采用不同的流动相系统进行比较,其中以醋酸铵-甲醇系统色谱峰形较好,但拖尾情况与药典或文献中情况基本相当,经过反复实验,采用了硫酸铵-甲醇系统,同时加入三乙胺作为扫尾剂,结果显示,同一根色谱柱,在比较文献方法、醋酸铵-甲醇系统以及硫酸铵-甲醇系统,采用硫酸铵-甲醇系统时色谱峰形对称、尖锐,色谱柱柱效有着显著提高。

4.2 pH 的影响 调节缓冲液的 pH,按“2.2.1”项下的条件对室温下放置 1 周的供试品溶液进行试验, pH 对盐酸马普替林色谱峰的保留时间没有太大的影响,但当 pH 6.0 时盐酸马普替林与相邻色谱峰的分度为 1.42,当 pH 为 4.0 时分离度达到 1.78,进一步调节 pH 至 3.0 时,分离度达到 1.90,但在水相 pH 为 4.0 时,缓冲液的缓冲能力较强,当进一步调节 pH 至 3.0 时,需要加入较多的稀硫酸试液,综合考虑将缓冲液的 pH 定为 4.0。

4.3 硫酸铵浓度的影响 分别配制含不同浓度硫酸铵 ($0.0, 0.02, 0.05, 0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的流动相进行试验,不含硫酸铵的流动相系统中,盐酸马普替林色谱峰拖尾严重,随着硫酸铵浓度的增加,拖尾现象有着显著的改善,但由于盐浓度太大,会对仪器有一定的影响,因此,将硫酸铵的浓度定为每 1000 mL 中含有 10.5 g (约为 $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

4.4 三乙胺浓度的影响 在水相中每 1000 mL 中加入不同体积的三乙胺,配制不同浓度的三乙胺溶液 ($0.0\%, 0.1\%, 0.2\%, 0.5\%$),分别配制成流动相进行试验,当系统中不含有三乙胺时,色谱峰略有拖尾,三乙胺浓度增加至 0.2% 时,色谱峰对称性最好,三乙胺浓度继续增加时,色谱峰形没有显著变化,因此,水相中每 1000 mL 中加入三乙胺体积 2 mL。

4.5 柱温的影响 设置柱温的温度在 30, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$ 时进行试验,柱温升高,主峰的拖尾因子基本不变,色谱峰形并没有太多的变化,因此,方法中对色谱柱温没有规定。

4.6 检测波长选择 采用二极管阵列检测器对盐酸马普替林色谱峰进行紫外扫描,在 265, 272 nm 波长处有最大吸收,但 2 个波长处盐酸马普替林的吸收值都较小,也即色谱峰响应值较低,测定的检测

限高、灵敏度低, 溶出度项下的溶液浓度较低, 较小的响应值对溶出度的测定结果有影响。另一方面, 在最大吸收波长处测定, 要达到一定的吸收值, 根据朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律, 供试品的浓度一定要增加, 取样量也就大, 取样量太大, 占用了一定的体积, 给含量测定带来误差。如果在 220 nm 低波长处测定, 虽然灵敏度提高, 但低波长测定干扰因素更多, 综合考虑, 采用 230 nm 作为测定波长, 峰面积约为在 265 nm 波长处测定的峰面积的 2~3 倍, 经方法学试验, 在该波长处方法学验证符合定量测定的要求。

5 结论

本文对方法进行了系统验证, 并考察了方法的

耐用性, 以使方法适用于不同的 C₁₈柱。方法简便, 灵敏、准确。为盐酸马普替林片的含量、含量均匀度以及溶出度的质量控制提供了可靠的保证。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部): 466
- 2 USP 30. 2007. Vol 3 2546
- 3 EP 6. 0. 2008. Vol 2 2337
- 4 LI Jie- Bin(李杰滨), LIANG Yun-xia(梁云霞), ZHANG Ya-jian(张亚娟), *et al* Determination of content of maprotiline hydrochloride tablets with high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定盐酸马普替林片的含量). *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2007, 17(8): 1411

(本文于 2008 年 11 月 20 日收到)

中检所 2010 年硕士研究生招生计划

单位代码: 84503 单位名称: 中国药品生物制品检定所 联系人: 孙国顺
电话: 010-67095371 地址: 北京市天坛西里 2 号 邮政编码: 100050

专业名称及研究方向	招生人数	考试科目	导师
Ⅱ 077702 免疫学	3		
01 生物技术药物生物学活性及质量研究		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③601 免疫学 ④901 生物化学与分子生物学	王军志研究员
02 免疫遗传标记基因检测		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③601 免疫学 ④901 生物化学与分子生物学	岳秉飞研究员
077703 病原生物学	3		
01 人类免疫缺陷病毒的分子生物学		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③601 免疫学 ④901 生物化学与分子生物学	王佑春研究员
03 病毒免疫和分子生物学		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③601 免疫学 ④901 生物化学与分子生物学	俞永新院士
077904 药物分析学	7		
01 抗生素质量分析		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③602 分析化学 ④801 有机化学	金少鸿研究员
02 现代仪器分析方法在药品质量控制中的应用		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③602 分析化学 ④801 有机化学	丽霞研究员
03 化学药品杂质谱的控制		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③602 分析化学 ④801 有机化学	胡昌勤研究员
04 生物技术类新药的临床前安全性评价		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③701 药理学 ④901 生物化学与分子生物学	李波研究员
05 中草药有效成分及中药质量控制研究		①101 思想政治理论 ②201 英语一 ③602 分析化学 ④801 有机化学	林瑞超研究员

1、免疫学、分析化学、有机化学、药理学专业课参考书目 请参照“人民卫生出版社”大学统编教材。
2、生物化学与分子生物类专业课参考书目 请参照: ①《生物化学》第七版 查锡良 人民卫生出版社 2008 年出版; ②《生物化学》第三版 贾弘提 北京大学医学出版社 2005 年出版。
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>