

油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液 HPLC含量测定方法的研究

姜波¹, 唐建华², 吴俊伟²

(1. 重庆方通动物药业有限公司, 重庆荣昌 402460; 2. 西南大学荣昌校区, 重庆荣昌 402460)

[收稿日期] 2009-11-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)05-0028-03 [中图分类号] S859.796

[摘要] 建立了油制磺胺间甲氧嘧啶钠(SMM-Na)混悬注射液含量测定的HPLC方法。样品中加入表面活性剂使其成为微乳溶液,然后稀释进样分析。色谱柱为phenomenex synerg Hydro-RP(250 mm × 4.6 mm, 4 μm),柱温40℃,以甲醇-乙腈-1.5%冰乙酸水溶液(10:20:70)为流动相,流速为1 mL/min,检测波长271 nm。同一样品经永停滴定法和HPLC两种方法进行含量测定并进行t检验分析,结果显示 $t > 0.05$, $P < 0.05$,呈显著差异。HPLC测定制剂的平均含量为98.99%,RSD为0.48%。磺胺间甲氧嘧啶在20~60 μg/mL的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。本方法更简单、快速、准确,可用于油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液的含量测定。

[关键词] 磺胺间甲氧嘧啶钠;混悬注射液;高效液相色谱法;含量测定

Assay of Sulfamonomethoxine Sodium Oily Injectable Suspension by HPLC

JANG Bo¹, TANG Jian-hua², WU Jun-wei²

(1. Chongqing Fangtong Animal Pharmaceutical CO., LTD, Rongchang, Chongqing 402460;

2. South West University, Rongchang, Chongqing 402460; China)

Abstract: An HPLC method was established to assay the sulfamonomethoxine sodium (SMM-Na) oily injectable suspension. The sample was diluted solution of microemulsion after adding surfactant and was analyzed. HPLC column was a phenomenex synerg Hydro-RP(250 mm × 4.6 mm, 4 μm), the temperature was set at 40℃. Mobile phase was a mixture of methanol-acetonitrile-1.5% acetic acid solution (10:20:70, V/V) with a flow rate of 1 mL/min and detective wavelength of 271 nm. The sample was tested by methods of nitrite titration and by HPLC. The results is significant verified by t-test, showing $t > 0.05$, $P < 0.05$. The average content is 98.99% with RSD of 0.48% by HPLC. The peak area at concentration range of 20~60 μg/mL of sulfamonomethoxine has a good linear relationship with concentration. The HPLC method is found easy, convenient and precise for assay of sulfamonomethoxine sodium oily injectable suspension.

Key words: SMM-Na; oily injectable suspension; HPLC; assay

磺胺间甲氧嘧啶钠属于合成抗菌药,《中国兽药典》2005年版一部中收载了磺胺间甲氧嘧啶钠注射液^[1],其中含量测定方法为永停滴定法。油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液为重庆方通动物药

业有限公司拟报新兽药,由于油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液是以注射用油为分散介质,不能够直接采用法定标准(永停滴定法)进行含量测定,需要对样品进行前处理后,再进行测定。为了简单、快

作者简介:姜波(1981年-),男,重庆荣昌人,主要从事兽药新剂型新制剂的研究。E-mail: jingboxue@126.com

通讯作者:吴俊伟,教授。E-mail: wjw999@163.com

速、准确的检测该制剂的含量,进行该制剂的 HPLC 含量测定方法研究,并与法定方法进行了比较。

1 材料与试剂

1.1 仪器和设备 BP211D 电子精密天平, Orion Research, Inc; CJ - 882A 大功率磁力搅拌器,金坛市医疗仪器厂; ZYT - 1 型自动永停滴定仪,上海安亭电子仪器厂; Waters2695 型高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器, Empower2 工作站,美国 Waters 公司。

1.2 试剂 乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.3 药品 磺胺间甲氧嘧啶对照品,含量 98.5%,批号 066H0688,购自 sigma 公司;磺胺间甲氧嘧啶钠原料(含量 99.2%,高效液相色谱法测定),重庆通量药业有限公司;油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液,规格 20%,批号 20080801、20080802、20080803,重庆方通动物药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 永停滴定法

2.1.1 样品的前处理 取样品,摇匀,精密称取本品适量(约相当于磺胺间甲氧嘧啶钠 2 g),加氯仿 15 mL,精密加入盐酸溶液(1:2)40 mL,磁力搅拌 10 min,静置,取上清液过滤,滤液备用。

2.1.2 滴定 精密量取续滤液 10 mL,加盐酸溶液(1:2)5 mL、水 40 mL,用亚硝酸钠滴定液(0.1 mol/L)滴定。每 1 mL 亚硝酸钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 30.23 mg 的 $C_{11}H_{11}N_4NaO_3S_6$ 。另取本品,同时测其相对密度,将供试品量换算成毫升数,计算,即得。

2.2 高效液相色谱法

2.2.1 色谱条件^[2] 色谱柱 phenomenex synergi Hydro - RP(250 mm × 4.6 mm, 4 μm);流动相为甲醇 - 乙腈 - 1.5% 冰乙酸水溶液(10:20:70);检测波长 271 nm;流速为 1 mL/min;柱温 40。

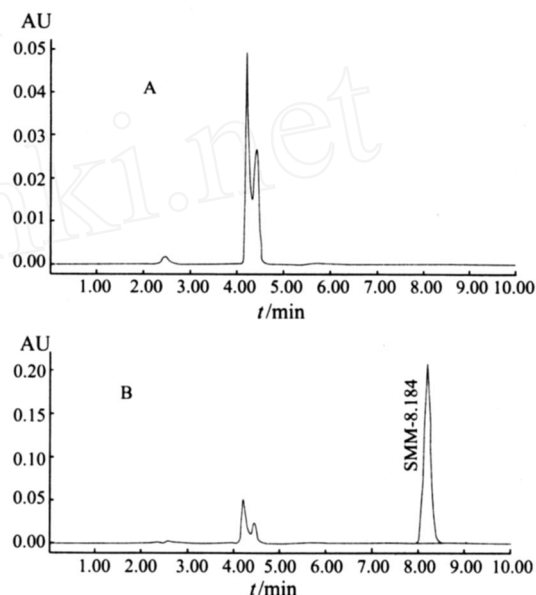
2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取磺胺间甲氧嘧啶对照品适量,加适量稀盐酸试液溶解,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含磺胺间甲氧嘧啶 40 μg 的溶液,摇匀,备用。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密称取本品适量(约相当于磺胺间甲氧嘧啶钠 0.4 g)置 100 mL 量瓶内,加入 20 mL 氯仿,轻微振摇混合均匀,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 5 mL 置 100 mL 干燥量瓶中,加入吐温 - 80 10 mL,轻微振摇混合均匀,用 10% 盐酸甲醇溶液(取盐酸 100 mL,加入甲醇 500 mL,加注射用水至 1 000 mL)稀释至刻

度,摇匀;精密量取 10 mL 置 50 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,备用。

2.2.4 含量测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪测定。按外标法以峰面积计算,即得。另取本品,同时测其相对密度^[3],将供试品量换算成毫升数,计算,即得;将以上测定结果乘以系数 1.142 6,换算为磺胺间甲氧嘧啶钠进行计算,即得。

2.2.5 按照上述色谱条件将空白样品(不含有磺胺间甲氧嘧啶钠)及供试品进样,色谱图见图 1。



A. 空白样品; B. 供试品

图 1 HPLC 色谱图

2.3 方法验证

2.3.1 比较试验^[4] 分别用永停滴定法和高效液相色谱法测定三个批次的油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液,得到两组含量测定结果,并进行分析,见表 1。

表 1 两种方法测定磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液含量结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	含量 / %		相对偏差 / %
	永停滴定法	HPLC	
20080801	96.5 ± 0.34	98.9 ± 0.05	-2.49
20080802	95.8 ± 0.33	98.2 ± 0.06	-2.51
20080803	97.6 ± 0.43	99.5 ± 0.03	-1.95

注:相对偏差 = (HPLC 测得含量 - 永停滴定法测得含量) / 永停滴定法测得含量 × 100%

计算两种方法测定结果的相对平均偏差为 -2.32%。对两种方法测定结果进行 *t* 检验,显示 $t > 0.05, P < 0.05$, 呈显著差异。

2.3.2 精密度试验 试验样品批号为 20080801, 规格 20%, 按 HPLC 测定 7 次, 结果见表 2。

表 2 高效液相色谱法精密度试验结果

试验编号	含量 %	平均含量 / %	RSD / %
	99.2	98.99	0.48
	98.8		
	98.5		
	99.4		
	99.1		
	99.6		
	98.3		

2.3.3 线性关系考察试验 精密称取磺胺间甲氧嘧啶对照品适量, 加适量稀盐酸试液适量使溶解, 加 50% 甲醇溶液稀释配制成最终浓度为每 1 mL 含 20、30、40、50、60 μg, 均按照 2.2 项下进行测定, 得峰面积 (y) 与样品浓度 (x, μg/mL) 之间校正曲线的回归方程为 $y = 79\ 698x + 146\ 207$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。结果显示: 在 20 ~ 60 μg/mL 的浓度范围内, 峰面积与最终浓度有良好的线形关系 (图 2)。

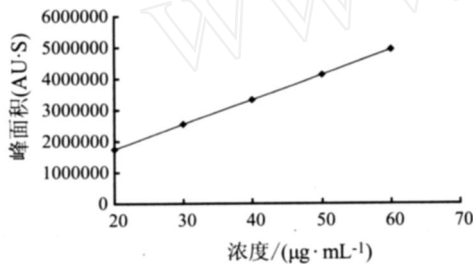


图 2 标准曲线图

2.3.4 回收率试验

2.3.4.1 对照品贮备液的配制 精密称取磺胺间甲氧嘧啶对照品 0.350 20 g (相当于磺胺间甲氧嘧啶钠 400 mg), 加适量稀盐酸试液溶解, 加 50% 甲醇溶液制成含磺胺间甲氧嘧啶浓度为 35.02 mg/mL 的溶液, 即为对照品贮备液。

2.3.4.2 不同浓度回收试验 分别精密量取磺胺间甲氧嘧啶对照品贮备液 7.5、10、12.5 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 按处方浓度比例加入注射用油、助悬剂、稳定剂等其它辅料, 按 2.2.3 项下方法分别制成最终浓度相当于磺胺间甲氧嘧啶钠 30、40、50 μg/mL 的 3 种溶液 (相当于平常分析浓度的 75%、100%、125%), 每种浓度配制 3 份共配制 9 份溶液, 均按照 2.2 项下进行测定 (检测结果以磺胺间甲氧嘧啶计), 结果见表 3。

3 讨论

由于油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液是以

表 3 不同浓度回收试验结果

待检测浓度 / (μg·mL ⁻¹)	检测浓度 / (μg·mL ⁻¹)	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
26.265	26.186	99.7	99.2	0.25
	26.291	100.1		
	26.133	99.5		
35.020	35.091	100.2		
	34.949	99.8		
	34.953	99.8		
43.775	43.735	99.9		
	43.770	100.0		
	43.908	100.3		

注射用油为分散介质, 对其主要成分直接进行检测, 辅料会对含量测定造成干扰, 影响含量测定的准确性, 并导致检验设备的污染, 所以需要对该制剂进行前处理。永停滴定法进行检测时, 样品采用了油 - 水两相分离的前处理方法^[5]; 高效液相色谱法进行检测时, 样品采用了水包油使其成为微乳的前处理方法^[6]。通过对比试验证明, 两种方法存在显著的差异, 油 - 水两相分离的前处理方法, 估计是由于样品在两相分离过程中有部分损失, 更在滴定过程中, 供试溶液出现浑浊现象, 导致检测结果差异显著; 样品经过水包油使其成为微乳的前处理方法, 不仅样品无损丢失, 利用高效液相色谱法的高分离度, 含量测定时也不受其他辅料的干扰。

在其他以注射用油或与水不互溶的溶媒为载体时, 可以参考将样品用表面活性剂制成微乳的方法, 用 HPLC 进行测定, 该方法可以屏蔽相关辅料对药物检测的干扰, 结果更准确。

通过比较试验, 精密度、线性和线性范围、回收率试验, 结果均能满足含量测定要求。以上结果说明 HPLC 比永停滴定法测定该制剂的含量数据更接近其真实值, 具有测定结果准确、简单、快速等优点。所以高效液相色谱法可用于油制磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液的含量测定。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [S]. 二 五 年版一部. 北京: 中国农业出版社, 2006: 342
- [2] 吴俊伟, 饶勇, 姜波. 磺胺间甲氧嘧啶钠混悬注射液在猪体内的药动学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(7): 718 - 722
- [3] 中华人民共和国农业部. 进口兽药质量标准 [S]. 二 六 年版. 18 - 19.
- [4] 李凡, 朱志华, 姜凤丽, 等. 磷酸泰乐菌素颗粒剂生物效价测定方法的建立及验证 [J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(7): 35 - 36
- [5] 中华人民共和国农业部. 进口兽药质量标准 [S]. 二 六 年. 12 - 13.
- [6] 毕殿洲. 药剂学 [M]. 第四版. 人民卫生出版社, 1999: 219 - 227.