

反相高效液相色谱法测定硝酸毛果芸香碱滴眼液的含量和有关物质

王伟^{1,2}, 宁洪鑫², 杨颖²

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要 目的: 建立一种反相高效液相色谱法测定硝酸毛果芸香碱滴眼液的含量和有关物质。方法: 用迪马 ODS 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm), 甲醇-缓冲液(取磷酸 13.5 mL 加水 700 mL、三乙胺 3 mL, 加水稀释至 1000 mL, 用 20% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 3.00 ± 0.02) (80:920) 为流动相; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C; UV 检测波长 220 nm。结果: 该色谱条件下, 毛果芸香碱与各杂质之间分离良好。毛果芸香碱在 2-7 μg · mL⁻¹ (r=0.9992)、50-350 μg · mL⁻¹ (r=0.9996) 范围内, 线性关系良好; 含量测定精密度试验 RSD=0.50% (n=6); 平均回收率为 100.5% (n=9); 有关物质精密度试验 RSD=0.54% (n=6)。结论: 本方法简便、快捷、准确、灵敏, 可有效控制产品质量。

关键词: 眼科用药; 硝酸毛果芸香碱; 反相高效液相色谱法; 含量; 有关物质; 杂质检测; 毛果芸香酸; 异毛果芸香碱; 异毛果芸香酸
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)11-2139-04

RP-HPLC determination of content and related substances of pilocarpine nitrate eye drops

WANG Wei^{1,2}, NING Hong-xin², YANG Ying²

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method of determination for content and its related substances of pilocarpine nitrate eye drops. **Methods:** Employed Dikma ODS column(4.6 mm × 250 mm 5 μm), methanol-buffer solution(80:920), buffer solution is H₃PO₄ 13.5 mL, diluted to 700 mL water, add 3 mL triethylamine, and dilute with water to 1000 mL, adjust with 20% sodium hydroxide to a pH of 3.00 ± 0.02, flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 30°C, ultraviolet detection wavelength: 220 nm. **Results:** Good separation could be achieved between pilocarpine and the related compounds under this chromatographic system. The calibration curve of pilocarpine was linear in the concentration range of 2-7 μg · mL⁻¹ (r=0.9992) and 50-350 μg · mL⁻¹ (r=0.9996), The precision of content and its related substances of pilocarpine was good and the RSD was 0.50% (n=6) and 0.54% (n=6) respectively, The average recovery (n=9) was 100.5%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and sensitive, which can be used to control the quality of products effectively.

Key word: ophthalmic medicine; pilocarpine nitrate; RP-HPLC; content; related substances; impurity tests; pilocarpic acid; isopilocarpine acid

硝酸毛果芸香碱滴眼液(pilocarpine nitrate eye drops)是临床上常用的青光眼治疗剂和缩瞳药。毛果芸香碱的水溶液较稳定,但因呈酸性(pH约为4),对眼睛的刺激性较大;而在碱性条件下,由于含有亚胺唑核及内酯结构,因此易水解和异构化,生成毛果芸香酸和异毛果芸香碱,使其药理活性下降^[1],其降解程度与制备工艺和贮存条件等因素有

关^[2-5]。2010年版中国药典^[6]收载了硝酸毛果芸香碱滴眼液的含量测定方法,但未对杂质进行限定。经试验考察,该方法在水浴加速试验中,不能有效地将毛果芸香碱和其降解产物进行分离,因此参考30版美国药典中硝酸毛果芸香碱^[7]的检测方法,建立了一种新的反相高效液相色谱法,测定硝酸毛果芸香碱滴眼液的含量及有关物质。

1 仪器与试剂

SARTORIUS BP211D 型电子天平, HT-320A 型柱温箱, SPD-10A 岛津紫外检测器, LCD-10AD 型岛津输液泵, Dikma Technologies 5 μm 250 mm \times 4.6 mm ODS 色谱柱。硝酸毛果芸香碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100157-200201), 硝酸毛果芸香碱原料药(德国, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 批号 1029118), 甲醇(色谱级, 天津康科德科技有限公司), 磷酸(分析纯, 天津化学试剂三厂), 三乙胺(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂), 异毛果芸香碱、毛果芸香酸(天津药物研究院化药室合成), 硝酸毛果芸香碱滴眼液(天津药物研究院制剂中心研制, 中国大冢制药有限公司生产, 批号 090606-1、090606-2、090608)。

2 色谱条件

色谱柱: Dikma ODS(250 mm \times 4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-缓冲液(取磷酸 13.5 mL, 加水约 700 mL、三乙胺 3 mL, 加水稀释至 1000 mL, 用 20% 氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.00 ± 0.02) (80:920); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL 。溶剂: 水。理论板数按毛果芸香碱计算应大于 5000, 毛果芸香碱与异毛果芸香碱的分离度应大于 1.6, 其他各峰之间的分离度均符合要求(图 1)。

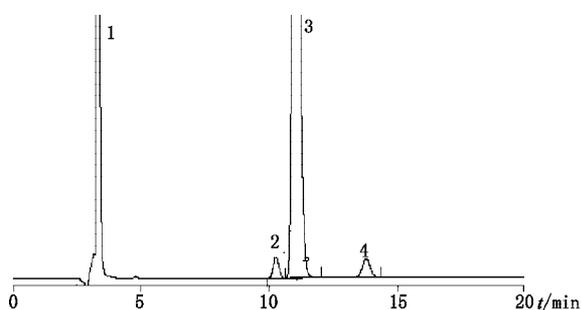


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram

1. 硝酸根离子(NO_3^-)
2. 异毛果芸香碱(isopilcarpine)
3. 毛果芸香碱(pilocarpine)
4. 毛果芸香酸(pilocarpic acid)

3 溶液的制备

3.1 有关物质 精密量取硝酸毛果芸香碱滴眼液($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 精确称取硝酸毛果芸香碱对照品适量, 加水制成浓度为 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 作为对照品溶液。

3.2 含量测定 精密量取硝酸毛果芸香碱滴眼液($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀

释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 精确称取硝酸毛果芸香碱对照品适量, 加水制成浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 作为对照品溶液。

4 有关物质检查

4.1 专属性 取流动相、溶剂(水)、混合辅料溶液、对照品溶液及样品溶液, 分别进样 20 μL , 进行专属性试验考察。结果显示: 硝酸毛果芸香碱保留时间为 11 min 左右, NO_3^- 离子峰在 4 min 左右, 流动相、溶剂(水)、混合辅料溶液对本品主峰及降解产物检测均无干扰。

4.2 线性关系 精密称量硝酸毛果芸香碱对照品 10 mg, 加水溶解并定量稀释成浓度依次为 2, 3, 4, 5, 6, 7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 照上述色谱条件进行试验, 以浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归分析, 得回归方程为:

$$Y = 1.593 \times 10^4 X - 1.261 \times 10^3 \quad r = 0.9992$$

结果表明, 在 $2 \sim 7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内毛果芸香碱线性关系良好。

4.3 精密度试验 取“3.1”项下的供试品溶液, 连续进样 6 次, 按毛果芸香酸的峰面积计算, RSD($n=6$) 为 0.54%。

4.4 重复性试验 取 090608 批样品 6 份, 照“3.1”项下方法操作, 并计算降解产物毛果芸香酸的百分含量, 均值为 0.070%, RSD($n=6$) 为 1.17%。

4.5 破坏试验 取硝酸毛果芸香碱滴眼液及混合辅料溶液, 各 5 份, 分别用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 min、15% H_2O_2 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min、4500 lx 光照 24 h、 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 2 h 进行破坏试验。结果表明: 毛果芸香碱对碱最不稳定, 但各降解产物与毛果芸香碱主峰均有良好的分离(图 2) (异毛果芸香酸相对毛果芸香碱保留时间约为 1.5^[4])。混合辅料无干扰。

4.6 稳定性试验 取“3.1”项下的供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6 h 进行测定, 按毛果芸香酸的峰面积计算, RSD 为 0.55%, 说明本品溶液在 6 h 内较稳定。

4.7 最小检出限 配制一系列硝酸毛果芸香碱对照品溶液, 照上述色谱条件进行试验, 直至色谱峰高度约为基线噪音的 3 倍, 最小检出限为 5 ng。

5 含量测定

5.1 专属性试验 取流动相、溶剂(水)、混合辅料溶液、对照品溶液及样品溶液, 分别进样 20 μL , 进行专属性试验考察。结果显示: 硝酸毛果芸香碱保留

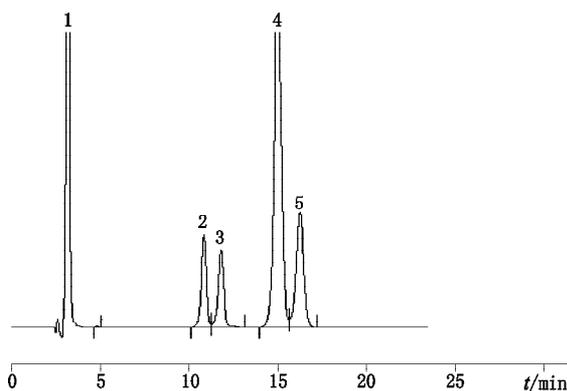


图2 硝酸毛果芸香碱滴眼液破坏试验色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of Pilocarpine nitrate eye drops destroyed by base

1. 硝酸根(NO_3^-) 2. 异毛果芸香碱(isopilocarpine) 3. 毛果芸香碱(pilocarpine) 4. 毛果芸香酸(pilocarpic acid) 5. 异毛果芸香酸(isopilocarpic acid)

时间为11 min左右, NO_3^- 离子峰在4 min左右,流动相、溶剂(水)、混合辅料溶液对本品主峰检测均无干扰。

5.2 线性关系 精密称取硝酸毛果芸香碱对照品50 mg,加水制成浓度依次为50,100,200,300,350 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,照上述色谱条件进行试验,以浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归分析,得回归方程为:

$$Y = 1.127 \times 10^4 X + 7.140 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

结果表明,在50~350 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内毛果芸香碱线性关系良好。

5.3 回收率试验 精确称量硝酸毛果芸香碱原料药50.00 mg,置50 mL量瓶中,加水超声至完全溶解,并加水稀释到刻度,摇匀,作为储备液;另称取处方量的混合辅料置100 mL量瓶中,加水超声溶解并加水稀释到刻度(空白溶液);精密量取储备液1.6 mL、2.0 mL、2.4 mL各3份分别置10 mL量瓶中,精密量取上述空白溶液2.0 mL置各量瓶中,加水稀释到刻度,摇匀。照上述色谱方法进行测定,计算平均回收率($n=9$)为100.5%。

5.4 精密度试验 取“3.2”项下供试品溶液,连续进样6次,测得毛果芸香碱峰面积的RSD($n=6$)为0.50%。

5.5 重复性试验 取090608批样品6份,照“3.2”项下方法操作,分别进样,并计算含量,均值为100.0%,RSD($n=6$)为0.50%。

5.6 稳定性试验 取“3.2”项下供试品溶液,分别于0,2,4,6h进行测定,按毛果芸香碱峰面积计算,

RSD为0.26%,说明本品溶液较稳定。

6 样品含量及有关物质测定 取3批硝酸毛果芸香碱滴眼液0时样品,分别按“3.1”项下方法制备样品,照上述色谱条件进行试验,结果见表1。

表1 硝酸毛果芸香碱滴眼液含量及有关物质测定结果($n=2$)

Tab 1 Results of content and related substances of pilocarpine nitrate eye drops

批号 (Lot No.)	含量(标示量) (content) (labelle amount) /%	有关物质-毛果芸香酸/% (related substances - pilocarpic acid)
090606-1	99.9	0.095
090606-2	101.6	0.088
090608	99.3	0.069

7 讨论

7.1 检测波长的选择 通过全波长扫描,硝酸毛果芸香碱为末端吸收,分别在210 nm、215 nm、220 nm、230 nm进行测定,结果没有显著差异,综合考虑选择了220 nm为本品检测波长。

7.2 流动相的选择 采用2010年版中国药典的方法,在进行水浴加速试验样品的检测时发现,此检测方法不能将主成分与产生的杂质进行完全分离(主峰有前沿),有时随着加速时间的延长含量还有反跳现象,有的峰保留时间变化(图3)。2003年版英国药典^[5]收载的方法,流动相为5.5%甲醇、6.0%乙腈和88.5%的0.002 mol·L⁻¹磷酸氢铵磷酸盐,并用6 mol·L⁻¹氨水调节pH至7.75;30版美国药典收载的方法,流动相配比中使用的有机相较少,比较环保,将流动相配比进行适当调整,经方法学验证,该方法专属性较好,能够较好的反映本品质量。

7.3 有关物质的计算 经水浴加速试验(100℃)、湿热加速6个月试验及长期24个月试验考察,毛果芸香碱先异构化产生异毛果芸香碱,进而水解生成毛果芸香酸,始终未见异毛果芸香酸,说明在贮存期毛果芸香酸为终产物,因此本品的有关物质仅控制毛果芸香酸(<4.0%)^[8]。

7.4 pH范围的确定 2003版英国药典中硝酸毛果芸香碱滴眼液的pH范围为2.5~4.0^[5],本院研制的硝酸毛果芸香碱滴眼液的pH范围为4.0~6.0。本品既考虑了患者服用的舒适性,同时又对其降解产物进行控制,进一步实现了安全有效性的评价。

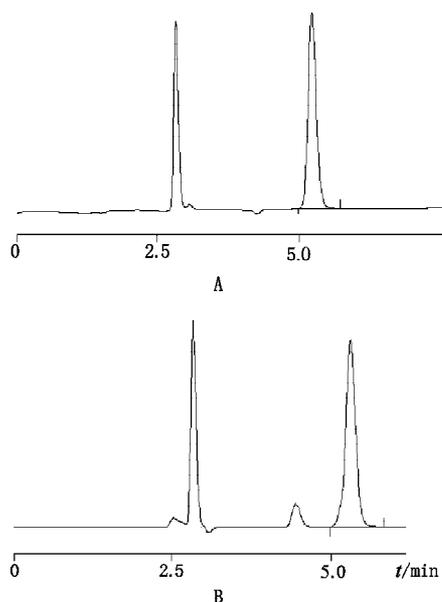


图3 水浴加速破坏试验色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of Pilocarpine nitrate eye drops destroyed by boiling water

A. 破坏前样品(sample before being destroyed) B. 破坏后样品(sample after being destroyed)

参考文献

- 1 GU Xue-qiu(顾学裘) . Pharmaceutical technology instruction(药物制剂注解) . Beijing(北京) : people's medical publishing house (人民卫生出版社) ,1983. 906
- 2 XE Yue-lin(徐月林) ,GAO Jie(高杰) . Determination quality concentration of pilocarpine nitrate eye drops by RP-HPLC(RP-HPLC 法测定硝酸毛果芸香碱滴眼液的质量浓度) . *Anti Infect Pharm(抗感染药学)* 2010 7(2) : 115
- 3 LI Fang(李芳) ,YANG Zhong-yuan(杨仲元) ,HAN Cheng-hua(韩澄华) . Determination of pilocarpine nitrate and its hydrolyzates in eye drops by HPLC(高效液相色谱法测定滴眼液中的硝酸毛果芸香碱及其水解产物) . *Chin J Chromatogr(色谱)* ,1990 ,8(1) : 40
- 4 Kuks PF ,Weekers LE ,Goldhoorn PB. Decomposition of pilocarpine eye drops assessed by a highly efficient high pressure liquid chromatographic method . *Pharm Weekbl Sci* ,1990 ,12(5) : 196
- 5 Jarvinen T ,Suhonen P ,Naumanen H *et al.* Determination of physico-chemical properties stability in aqueous solution and serum hydrolysis of pilocarpic acid diesters. *J Pharm Biomed Anal* ,1991 9(9) : 737
- 6 ChP(中国药典) . 2010. Vol II (二部) : 947
- 7 USP30. 2007. 2950
- 8 BP. 2003. 2569

(本文于 2011 年 6 月 25 日修改回)

《俞永新论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《俞永新论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所) 迎来了她 60 华诞。在中检所 60 华诞之际, 编辑出版老一代中检人的论著文集, 让人们了解中国药检人的奋斗历程, 从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业, 前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富, 系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作, 以体现专业性为主线, 反映团队成就为宗旨, 并以年代代表人物冠以书名编辑成册。

《俞永新论文集》以俞永新院士为核心, 收集俞永新院士及与其他作者合著论文 244 篇, 包括乙型肝炎病毒和疫苗类 87 篇, 出血热病毒和疫苗类 91 篇, 狂犬病病毒和疫苗类 18 篇, 虫媒病毒和疫苗类 25 篇, 综述 23 篇。此外还收集了俞永新院士主编及参与编辑的书籍 10 部。论文以全文刊载并尊重原文, 著作刊载前言或序、著者、目录或书名摘要。对论文有贡献的中检所的专家作者还有李河民、王大江、敖坚、吴慧英、郎书惠、朱荫耕、严子林、聂子林、李雪东、罗惠蓉等。对书籍有贡献的中检所前辈们还有李河民、李德富、袁曾麟、聂子林、周国安、黄建、张华远、辜清吾等。本论著集的编辑出版亦蕴涵了对所有参与工作的老专家们为中检所发展所作贡献的敬重。

本书定价 298.00 元。联系人: 刘小帅; 电话: 010-67095201; 地址: 100050 北京市东城区天坛西里 2 号 中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部