

RP-HPLC法测定咪达唑仑糖浆有关物质

程霞, 陈亮, 黄丽娜, 王国海, 李春明

(江苏恩华药业股份有限公司, 江苏 徐州 221007)

摘要:目的: 本文建立了反相高效液相色谱方法测定咪达唑仑糖浆有关物质。方法: 采用大连依利特C₁₈ ODS(5 μm, 4.6mm×250mm)色谱柱, 以甲醇-0.0672%醋酸铵溶液(60:40)为流动相, 检测波长为220nm, 流速1.0ml/min。结果: 在此条件下, 咪达唑仑与有关物质得到有效分离, 咪达唑仑糖浆的最低检测限为0.08ng。结论: 本方法灵敏度高, 专属性好, 简便快速, 可用于咪达唑仑糖浆有关物质的测定。

关键词: 咪达唑仑, 糖浆, 有关物质, 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1009-8143(2010)02-0076-04

Determination of Related Substances of Midazolam Syrup by RP-HPLC

Chen Xia, Chen Liang, Huang L-ina, Wang Guo-hai, Li Chun-ming

(Jiangsu Nhwa Pharmaceutical Co., Ltd, Xuzhou, Jiangsu221007, China)

Abstract: Objective: To establish RP-HPLC method for the determination related substances of midazolam syrup. Method: The separation was performed on Hypersil ODS C₁₈ column (250mm×4.6mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-0.0672% ammonium acetate (60:40) with a flow rate of 1.0ml/min. The detection wavelength was at 254nm. Results: A satisfactory separation condition among midazolam and the related impurities was obtained. The detection limit of midazolam syrup was 0.08ng. Conclusions: The method was sensitive, specificity and rapid, which can be used for determination of related substances of midazolam syrup.

Keywords: midazolam; syrup; related substance; high performance liquid chromatography

咪达唑仑是一种新型苯并二氮杂卓类衍生物(见图1), 其药效包括抗焦虑、催眠、抗惊厥和顺行性遗忘作用。本品具有起效快、血浆清除快、作用时间短、强效、并发症少、副作用小等特点。临床研究表明其效果明显优于其它同类药物, 在临床使用中深受麻醉医师的欢迎和推崇, 目前本品已广泛使用于临床麻醉。但是, 目前国内咪达唑仑剂型相对单一, 虽然有咪达唑仑多种规格的注射剂和片剂, 但没有糖浆剂上市。咪达唑仑糖浆作为口服用药, 具有更适宜儿童服用、剂量准确、安全、有效、不用打针等特点。咪达唑仑糖浆术前给药有明显的抗焦虑、催眠、抗惊厥和顺行性遗忘作用, 它起效快、术后较安静, 96%的患儿产生良好的顺行性遗忘作用,

使小儿麻醉更安全。因此, 在国外咪达唑仑糖浆是一种深受广大患者及其父母信赖和欢迎的口服麻醉药物^[1]。

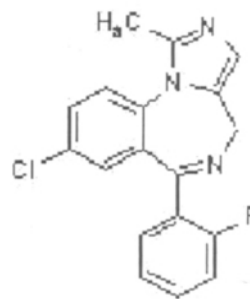


图1 咪达唑仑化学结构式
Fig.1 Chemical structure of midazolam

收稿日期 2010-1-18

作者简介 程霞(1971~), 女, 执业药师, 从事药品研发和质量保证工作。Email: zbcxxy@163.com

目前,国内对咪达唑仑糖浆的相关研究未见报道,而且对其主药-咪达唑仑的研究也主要集中在血浆中咪达唑仑浓度的检测^[2-6]。国内对其有关物质的检测主要采用薄层色谱法^[7]。该方法不但操作繁琐、费时,而且试验结果的专属性与准确性很差。因此寻求一种简单、快速、准确地检测咪达唑仑糖浆中有关物质的检测方法是必然趋势。本文通过对咪达唑仑糖浆有关物质进行研究,为临床正确使用咪达唑仑糖浆提供理论依据。这对于改变我国咪达唑仑剂型相对单一,提高小儿麻醉用药的有效性与安全性,以及促进我国医药行业的良好发展都具有重要意义。

1 实验部分

1.1 主要仪器与药剂

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪,配 VWD 检测器(美国安捷伦公司),N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司),Milli-Q 纯水机(Millipore 公司)。

咪达唑仑对照品(批号 20080301),含量为 99.7%,有关物质小于 0.2%,由江苏恩华药业股份有限公司提供;咪达唑仑糖浆(批号:20080401,20080402,20080403)由江苏恩华药业股份有限公司提供。

甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:大连依利特 C₁₈ ODS (5μm, 4.6mm×250mm);流动相:甲醇-0.0672%醋酸铵溶液(60:40);检测波长:220nm;流速:1.0ml/min;柱温:室温;进样量:20μL。

1.3 溶液的制备

供试溶液:取咪达唑仑糖浆 10mL(约相当于咪达唑仑 20mg),置于分液漏斗中,加饱和碳酸氢钠溶液 10mL,用氯仿提取 3 次,每次 20mL。合并氯仿液,过滤,置于 80℃ 恒温水浴中蒸干,加流动相溶解并稀释至 50mL,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

对照溶液:精密量取供试品溶液 1mL,置于 100mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,作为对照溶液。

2 结果与讨论

2.1 空白辅料的干扰试验

取咪达唑仑糖浆空白辅料(按咪达唑仑糖浆处方配制,但不含咪达唑仑)10mL,置于 50mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,作为咪达唑仑糖浆空白溶液,见图 2-A。另取咪达唑仑糖浆空白辅料 10mL,按有关物质测定法项下的方法操作,制得咪达唑仑糖浆空白溶液(按 1.3 溶液制备法处理后),见图 2-B。取上述两种溶液各 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。

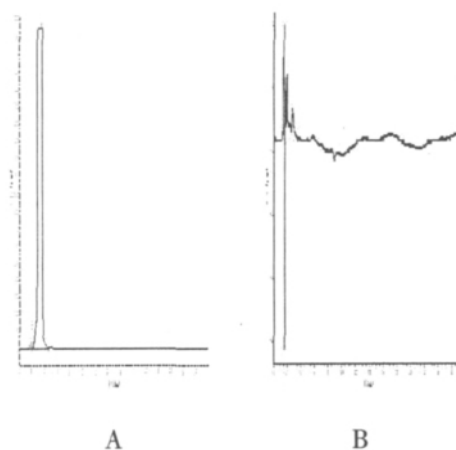


图2 空白辅料色谱图

Fig.2 Chromatogram of the blank accessories

由色谱图 2 可以看出空白辅料未经处理时,空白辅料的峰很强、很宽,会干扰有关物质的测定。按 1.3 溶液制备法处理后,空白辅料出峰很弱,扣除后对有关物质测定不会产生干扰。

2.2 破坏性试验

取咪达唑仑糖浆(批号 20080401)10mL,进行酸破坏、碱破坏、高温破坏、氧化破坏;另取咪达唑仑(批号 20080301)20mg,同法进行酸破坏、碱破坏、高温破坏、氧化破坏,作为对照,方法如下:

2.2.1 酸破坏

取样品和原料各 1 份,加入 3.0mol/L 盐酸溶液 10mL,加热回流 1h,冷却,调至中性,用流动相超声溶解并稀释至 50mL,过滤,作为供试品溶液。

2.2.2 碱破坏

取样品和原料各 1 份,加入 3.0mol/L 氢氧化钠溶液 10mL,加热回流 1h,冷却,调至中性,用流动相

超声溶解并稀释至 50mL, 过滤, 作为供试品溶液。

2.2.3 氧化破坏

取样品和原料各 1 份, 加入 30% 的过氧化氢溶液 5mL 超声 5min, 用流动相超声溶解并稀释至 50mL, 过滤, 作为供试品溶液。

2.2.4 高温破坏

取样品和原料各 1 份, 置 120℃ 的烘箱中烘 48h, 用流动相超声溶解并稀释至 50mL, 过滤, 作为供试品溶液。

分别取上述供试品溶液各 20μL 注入液相色谱仪。从色谱图中可看出, 咪达唑仑糖浆在碱性、氧化、高温条件下不稳定, 降解产物较多, 在酸性条件下相对稳定, 降解产物较少。所有的降解产物都能与咪达唑仑峰较好的分离。

2.3 检测限

取咪达唑仑适量, 用甲醇-0.0672% 醋酸铵溶液 (60:40) 逐级稀释成系列浓度, 取 20μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以信噪比 (S/N) 为 3 时的浓度为最小检测浓度。此时咪达唑仑的最小检测浓度为 4ng/mL, 故本品的检测限为 0.08ng。

2.4 溶液稳定性

取供试品溶液 (批号: 20080401) 放置不同时间 (0, 3, 6, 9 h), 进样 20μL, 记录色谱图。于 1d 内测定 4 次, 每次重复进样 3 次, 采用归一化法, 考察咪达唑仑糖浆有关物质的变化。结果表明: 有关物质含量的 RSD (n=12) 为 0.15%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.5 样品测定

取三批样品 (批号: 20080401, 20080402, 20080403), 按照有关物质测定法进行检查, 结果见表 1、图 3。

表 1 咪达唑仑糖浆有关物质的检查 (n=3)

Table 1 Determination of related substances of midazolam syrup

批号	有关物质 (%)
20080401	0.03
20080402	0.06
20080403	0.04

结果表明, 样品中有关物质含量在 0.04% 左右, 故暂定咪达唑仑糖浆中有关物质不得大于 0.5%。

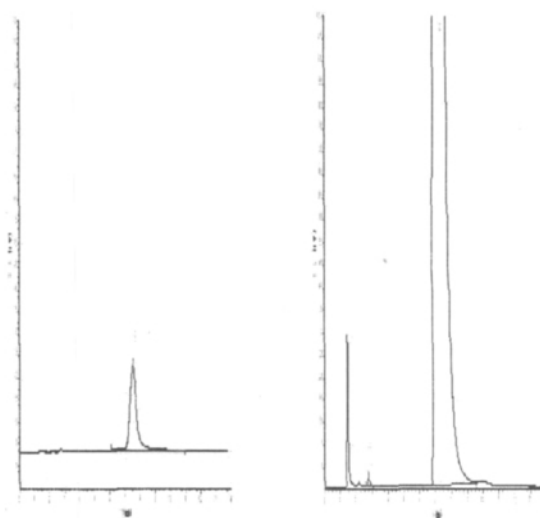


图 3 咪达唑仑糖浆 1% 样品 (C)、咪达唑仑糖浆样品 (D) 色谱图

Fig.3 Chromatogram of the midazolam syrup sample and the sample diluted 100 times

2.6 实验讨论

2.6.1 溶液的制备

由于咪达唑仑糖浆呈酸性, 在酸性条件下部分咪达唑仑开环, 致使部分样品溶解, 不利于测定。加入饱和碳酸氢钠溶液, 可抑制咪达唑仑糖浆的溶解, 使之闭环, 对于样品的测定有促进作用。另外, 在对咪达唑仑进行提取时, 对二氯甲烷、乙醚、氯仿等常用试剂进行了筛选。由于乙醚易挥发, 对试验结果影响较大, 而二氯甲烷对咪达唑仑的提取率没有氯仿高, 故采用氯仿作为提取溶剂。

2.6.2 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对咪达唑仑糖浆供试品溶液进行光谱采集, 根据等紫外吸收图, 在 220nm 处, 主峰和所有杂质能够被合理的检出, 故选择 220nm 作为有关物质的检测波长。

2.6.3 流动相的选择

结合文献的相关报道^[5-6], 分别考察了有机相的比例和盐的溶度对分离度的影响, 实验分别选用乙腈和醋酸铵溶液、甲醇和醋酸铵溶液作为流动相, 当有机相为乙腈时, 发现样品出峰较快, 且主峰和杂质未能得到有效的分离。另外, 醋酸铵在流动相中作为改性剂, 是为了调节离子强度, 得到良好的峰形, 因此选择甲醇和醋酸铵溶液作为流动相。

3 结 论

本文建立了 RP-HPLC 法测定咪达唑仑糖浆的有关物质。样品先经饱和碳酸氢钠溶液碱化,再用氯仿提取。结果咪达唑仑与有关物质分离较好,检测限低,溶液比较稳定。该方法简便、快速,可用于咪达唑仑糖浆有关物质的监控。

参考文献

- [1] Marshall J, Rodarte A, Blumer J, et al. Pediatric pharmacodynamics of midazolam oral syrup. *Pediatric Pharmacology Research Unit Network* [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2000, 40: 578-589.
- [2] 徐波, 张兴安, 曾晓晖, 罗新根. HPLC 法测定人血浆中咪达唑仑的浓度[J]. *中国药房*, 2008, 19(20): 1543-1545.
- [3] 许潇, 谢林, 梁艳, 等. LC-MS 法同时测定大鼠血浆中咪达唑仑、右美沙芬及奥美拉唑的浓度 [J]. *中国药科大学学报*, 2006, 37(3): 246-250.
- [4] 仝淑花, 胡卢丰, 王贤亲, 等. 大鼠血浆中咪达唑仑的 LC-MS/MS 测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(9): 698-701.
- [5] 蔡美华, 王珊娟, 杭燕南. 反相高效液相色谱 - 紫外法测定血浆中咪达唑仑浓度[J]. *中国药房*, 2002, 13(3): 157-158.
- [6] 陆晓彤, 蒋槌廉, 张顺国. 固相萃取 - HPLC 法测定儿童血浆中咪达唑仑的浓度[J]. *中国药房*, 2007, 18(17): 1326-1328.
- [7] WS-77(X-64)-98 咪达唑仑注射液[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.

参考文献编排规则

引用参考文献需按照引文先后在文中标出序号,并与文后参考文献序号一致,用 [1] [2]…标注,正文中未标注序号的文献列于标注序号文献之后。参考文献一律置于文末。格式:

期 刊 [序号]作者. 文题[J]. 刊名,年,卷(期) 起止页码.

专 著 [序号]章节作者. 书名[M]. 版次. 出版地:出版者,出版年 起止页码.

标 准 [序号]标准代号,标准名称[S]. 出版地:出版者,出版年

论 文 集 [序号]作者. 引文文题. 主编. 论文集名[C]. 出版地:出版者,出版年: 起止页码.

电子文献 [序号]主要责任者. 电子文献题名[文献类型/载体类型:EB/OL]. 电子文献的出版或可获得地址,发表或更新日期/引用日期(任选).

(参见 GB/T 7714-2005 《文后参考文献著录规则》)