

# 反相离子对高效液相色谱法测定四联抗结核 复方制剂中盐酸乙胺丁醇的含量

戚燕, 杨庆云, 吴松\*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 测定抗结核复方制剂中盐酸乙胺丁醇的含量。方法: 采用反相离子对色谱法。C<sub>18</sub>柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 四氢呋喃 - 0.4% 庚烷磺酸钠 (含有 0.016% 硫酸铜, 用磷酸调 pH 至 4.5) (25: 75) 为流动相; 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长为 258 nm; 柱温: 室温。结果: 盐酸乙胺丁醇在 0.08~0.32 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度范围内呈良好的线性关系。回收率为 99.8%。结论: 样品分离效果好, 测定结果准确、可靠, 重复性好。

**关键词:** 盐酸乙胺丁醇; 反相离子对色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0645-03

## Ion pair RP- HPLC determination of ethambutol hydrochloride in the combined preparation of antitubercular

Q I Y an, YANG Q ing- yun, WU Song\*

(Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective** To determine the content of ethambutol hydrochloride in the combined preparation of antitubercular. **Method** An ion pair RP- HPLC method was established using C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of 0.016% bhestone in THF - 0.4% SHS (adjust pH to 4.5 with phosphoric acid) (25: 75). The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup>, detection wavelength at 258 nm. **Results** The linear range of ethambutol hydrochloride was 0.08-0.32 mg · mL<sup>-1</sup>, the average recovery was 99.8%. **Conclusion** The method showed good separation, the results are accurate and reproducible.

**Key words** ethambutol hydrochloride; ion pair RP HPLC; determination

结核病是一种由结核菌感染引起的慢性传染病, 我国是全球 22 个结核病高负担国家之一, 活动性肺结核病人人数居世界第二位, 结核病在我国仍然是一个危害人民健康的严重公共卫生问题。特别是耐药性结核菌感染和艾滋病合并感染, 已经成为人类面临的一个重大挑战。因此, 对结核病治疗药物的研究开发已成为目前国内外新药研究的焦点之一。盐酸乙胺丁醇 (ethambutol hydrochloride) 是一种合成抗结核药, 对结核杆菌和其他分枝杆菌有较强的抗菌活性, 常与其他抗结核药联合应用, 可增强疗效并延缓细菌耐药性的产生<sup>[1]</sup>, 利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、盐酸乙胺丁醇复方制剂体内和体外抗结核作用显著优于其组成各药单用的作用, 且明显的缩短了治疗周期。本文对该复方制剂中盐酸乙胺丁

醇的含量测定方法进行研究。由于盐酸乙胺丁醇无紫外吸收, 而盐酸乙胺丁醇与铜离子络合得到的络合物有较强的紫外吸收, 故可通过该络合物来测定复方制剂中盐酸乙胺丁醇的含量<sup>[2~4]</sup>。在酸性条件下该络合物与庚烷磺酸钠形成离子对, 用反相离子对色谱法可测定盐酸乙胺丁醇的含量, 利福平在该色谱条件下不出峰, 盐酸乙胺丁醇与其他样品分离效果好, 空白样品无干扰, 测定结果准确。

### 1 仪器与试剂

岛津 LC-10A vp 型高效液相色谱仪, CLASS-VP 色谱数据系统; 色谱柱为北京分析仪器厂 Kromasil-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 四氢呋喃为色谱纯 (Merck), 水为重蒸水, 庚烷磺酸钠为高效液相色谱级。含量测定用对照品盐酸乙胺丁

\* 通讯作者 Tel: (010) 83163542 E-mail: w@imm.ac.cn

醇、异烟肼、吡嗪酰胺、利福平均购自中国药品生物制品检定所, 抗结核复方制剂为自制, 规格: 盐酸乙胺丁醇 250 mg, 异烟肼 120 mg, 吡嗪酰胺 400 mg, 利福平 120 mg

## 2 色谱条件

$C_{18}$ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 四氢呋喃 - 0.4% 庚烷磺酸钠 (含有 0.016% 硫酸铜, 用磷酸调 pH 至 4.5 (25:75) 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 258 nm; 柱温: 室温。

## 3 测定方法

取本品 10 片, 研成细粉, 混合均匀, 精密称取适量 (约相当于含盐酸乙胺丁醇 20 mg) 置于 100 mL 量瓶中, 加入水适量, 振摇使主药溶解, 再用水稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 作为供试品溶液。取盐酸乙胺丁醇对照品 20 mg 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加入水适量, 振摇使溶解, 再用水稀释至刻度, 摇匀,

过滤, 作为对照品溶液。精密量取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算样品中盐酸乙胺丁醇的含量。

## 4 方法的专属性

称取对照品盐酸乙胺丁醇、利福平、异烟肼、吡嗪酰胺及本品细粉适量, 分别制成相应的对照品溶液和样品溶液, 并配制空白辅料, 照“3”项下方法实验, 上述溶液各取 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果显示, 利福平在该色谱条件下不出峰, 本品溶液中异烟肼与异烟肼对照品峰保留时间一致, 本品溶液中吡嗪酰胺与吡嗪酰胺对照品峰保留时间一致, 异烟肼、吡嗪酰胺与盐酸乙胺丁醇分离效果良好, 因此, 该法对本品中盐酸乙胺丁醇的含量测定, 具有较好的专属性。见图 1。

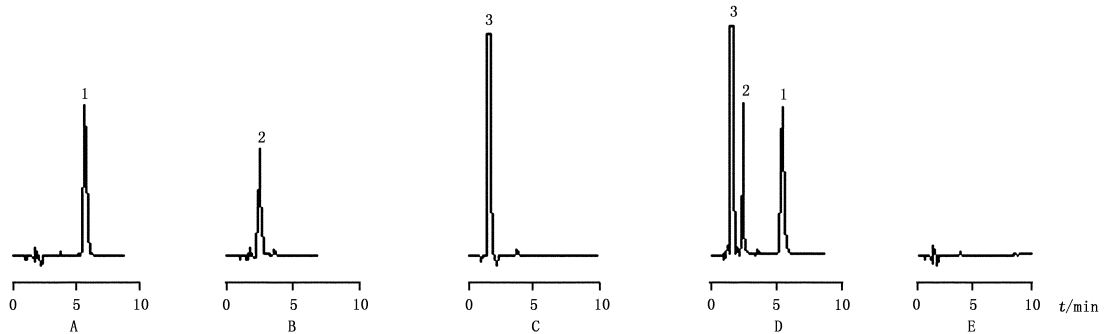


图 1 离子对 - HPLC 色谱图

Fig 1 Ion-pair HPLC chromatograms

A. 盐酸乙胺丁醇对照品 (ethambutol hydrochloride chemical reference substance) B. 异烟肼对照品 (Isoniazid chemical reference substance) C. 吡嗪酰胺对照品 (Pyrazinamide chemical reference substance) D. 样品 (sample) E. 空白 (blank)

1. 盐酸乙胺丁醇 (ethambutol hydrochloride) 2. 异烟肼 (Isoniazid) 3. 吡嗪酰胺 (Pyrazinamide)

## 5 线性关系的考察

精密称取盐酸乙胺丁醇对照品 20.0 mg 置于 50 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀作为储备液。精密量取 2, 4, 5, 6, 8 mL 储备液分别于 5 个 10 mL 量瓶中, 均用水稀释至刻度, 摇匀。照本品含量测定项下的方法操作, 精密量取上述溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作线性回归, 回归方程为:

$$y = 2 \times 10^7 x - 2.2 \times 10^5 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 盐酸乙胺丁醇在 0.08 ~ 0.32 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好。

## 6 进样精密度

精密称取盐酸乙胺丁醇对照品 20.0 mg 置于 50 mL 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀作为储备液。分别精密量取储备液 6, 5, 4 mL 各 3 份, 置于

10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得对照品溶液。按照含量测定的方法, 精密量取对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪中, 记录主峰的峰面积, 计算含量测定的精密度, 结果高、中、低 3 种浓度的平均峰面积的 RSD 分别为 0.45%, 0.19%, 1.01%。

## 7 溶液稳定性考察

取含量测定供试品溶液, 在放置 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 后, 取样测定。结果表明: 杂质含量与初始溶液相比无明显变化, 没有降解产物出现, 样品溶液在 24 h 内性质稳定, RSD 为 0.72%。

## 8 重复性试验

取同一供试品, 分别取样 6 份, 按“3”项下方法测定含量, 结果盐酸乙胺丁醇的含量为 99.38%, 其 RSD 为 0.58%, 试验结果表明该方法重复性良好。

## 9 回收率试验

按处方比例分别精密称取盐酸乙胺丁醇对照品约 40, 50, 60 mg, 利福平对照品约 19.2, 24, 28.8 mg, 异烟肼对照品约 19.2, 24, 28.8 mg, 吡嗪酰胺对照品约 64, 80, 96 mg 及辅料各 3 份于 250 mL 量瓶中, 按“3”项下方法用水配制成相当于样品含量测定浓度的 80%, 100%, 120% 的溶液各 3 份, 另精密量取盐酸乙胺丁醇对照品 20 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照液, 按上述方法测定并计算回收率, 结果平均回收率为 99.3%, 99.4%, 99.9%; RSD 分别为 0.26%, 0.56%, 0.38%。结果可见, 低、中、高 3 种浓度的回收率均符合规定。表明在所选择的含量测定条件下, 方法的回收率较好, 辅料不干扰测定, 该方法可以满足盐酸乙胺丁醇含量测定的需要。

## 10 含量测定结果

按照已建立的测定方法测定 3 批样品中盐酸乙胺丁醇的含量, 结果分别为 99.38%, 99.54%, 99.41%。

## 11 讨论

**11.1 检测波长的选择** 在本品中盐酸乙胺丁醇含量测定对照品的三维图谱中, 于 200 nm~400 nm 范围内作紫外扫描。结果可见, 盐酸乙胺丁醇对照品溶液在 258 nm 处有最大吸收, 故选择 258 nm 作为本品中盐酸乙胺丁醇的检测波长。

**11.2 盐酸乙胺丁醇片中盐酸乙胺丁醇的含量测定** 中国药典<sup>[5]</sup>采用氯仿提取后用非水滴定法, 在操作过程中显色时间及提取速度都会对结果产生影响, 且复方制剂中其他组分也会影响盐酸乙胺丁醇

的测定。因此本实验采用的高效液相色谱法的测定方法简便, 快速, 结果准确有实用价值。在本实验条件下本品中利福平、异烟肼、吡嗪酰胺及辅料均不干扰盐酸乙胺丁醇含量测定。试验发现, 硫酸铜作为流动相对色谱柱有一定的损伤, 从开始使用到进样 500 多针后, 色谱柱的理论塔板数从 3500 降到 2500。硫酸铜对色谱柱的损伤情况以后将进一步的考察。

## 参考文献

1. Elbiquin CA, Bulpit AE, Jaresko GS, *et al*. Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions with food and with antacids *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43: 568
2. SUN Jin (孙进), SONG Hong-tao (宋洪涛), ZHANG Tian-hong (张天虹), *et al*. Determination of Contents and Dissolution of Ethambutol Hydrochloride in Fixed Dose Combinations for Anti-Tuberculosis Drugs by High Performance Liquid Chromatography with Pre-column Derivatization (柱前衍生化高效液相色谱法测定固定剂量复方抗结核制剂中盐酸乙胺丁醇的含量和溶出度), *Chin J Chromatogr* (色谱), 2006, 24(2): 164
3. QIU Han (邱涵), CHEN Su-jian (陈素俭), LI Ling-ling (李玲玲), *et al*. Determination of Assay for Ethambutol Hydrochloride in Ethambutol Hydrochloride Tablets by GC (气相色谱法测定盐酸乙胺丁醇片中盐酸乙胺丁醇的含量), *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(8): 575
4. ZHAO Rui-xian (赵瑞仙), HU Ping (胡萍), WU Xiu-ling (吴秀玲), *et al*. Determination of Assay for Ethambutol Hydrochloride in Ethambutol Hydrochloride Tablets by RP-HPLC (RP-HPLC 法测定盐酸乙胺丁醇片的含量), *J Dali Univ* (大理学院学报), 2007(10)
5. ChP (中国药典). 2005 Vol II (二部): 455

(本文于 2008 年 6 月 24 日修改回)