

柱前衍生-反相高效液相色谱测定牛磺罗定及固体制剂含量

陈 曦¹, 雷 勇², 张 宁^{*2}, 王业秋², 逢居龙²

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘 要:本文建立了对甲苯磺酰氯柱前衍生-反相高效液相色谱紫外检测法测定牛磺罗定及其固体制剂含量的方法。利用牛磺罗定中含有仲胺基的特点,以对甲基苯磺酰氯柱前衍生牛磺罗定, Venusil XBP C₁₈ 色谱柱分离,在 240 nm 波长检测,线性范围为 0.016~0.160 g·L⁻¹ ($r=0.9995$),衍生化产物在 24 h 内稳定,相对标准偏差(RSD)为 3.8%,回收率为 98.5%~101.2%。本方法简便、灵敏度高,且对检测设备要求低,适用于工业生产中大批量牛磺罗定原料药及其固体制剂的含量测定。

关键词:柱前衍生化;高效液相色谱;对甲基苯磺酰氯;牛磺罗定

中图分类号:O657.7⁺2 文献标识码:A

牛磺罗定是一种牛磺酸类的广谱抗菌药,具有强大的抑菌^[1-3]和抗内毒素作用^[4],临床上广泛用于治疗腹膜炎、预防术后感染等^[5]。近年来,随着抗生素的滥用,几乎所有的常规抗生素都出现了相应的抗药性致病株系,致病菌的耐药性问题已经日益严重地威胁着人们的健康。与抗生素相比,人们证实不论在体外还是临床,牛磺罗定都没有诱使任何微生物耐药性的产生,具有很好的耐药性和抗药性,且副作用小。牛磺罗定是一个有极大应用前景的药物。但是由于牛磺罗定本身没有紫外吸收,牛磺罗定制剂的质量控制,尤其是制剂中牛磺罗定的含量测定一直是个难点。

目前,关于牛磺罗定含量的测定多采用衍生化法。Stendel 等人^[6]以丹磺酰氯衍生化后采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测;Woolfson 等人^[7]以 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD-Cl)衍生化后采用 HPLC-FLD 检测;Young-Sihn 等人^[8]以变色酸衍生化后采用 HPLC-UV 检测等。但前两者所需的衍生化试剂价格昂贵,后者变色酸只能与水溶液中的牛磺罗定所分解出的甲醛反应,不能直接测定牛磺罗定的含量。上述各种方法均存在繁琐、成本高、对检测设备要求苛刻等不足。因此,开发一种简便、稳定且适用性好的牛磺罗定含量测定方法具有重要意义。

对甲基苯磺酰氯(*p*-Toluenesulfonyl Chloride)是一种价格低廉、反应活性较强的常见衍生化试剂,可与含有仲胺基结构(牛磺罗定含有两个仲胺基)的化合物反应^[9],其反应产物具有较强的紫外吸收。鉴于此,本实验以对甲基苯磺酰氯衍生化牛磺罗定,采用 HPLC-UV 检测,测定了牛磺罗定片剂中牛磺罗定的含量。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

P680 型高效液相色谱、UVD170u 紫外检测器(美国,戴安公司);XH-C 型漩涡混合器(金坛市医疗仪器厂);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BC-W205 型恒温水浴锅(上海贝凯生物化工设备有限公司);Venusil XBP C₁₈ 色谱柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

牛磺罗定、对甲基苯磺酰氯和 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD-Cl)(购于 Acros Organics 公

收稿日期:2010-05-04

修回日期:2010-07-25

* 通讯作者:张 宁,男,博士,副教授,主要从事药物活性筛选及体内代谢研究。

司);乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。

牛磺罗定片剂(自制):取牛磺罗定 25 g,交联聚乙烯吡咯烷酮 6 g,羧甲淀粉钠 1 g,微晶纤维素 9 g,乳糖 7.5 g,阿司巴坦 0.5 g,硬脂酸镁 1 g,制成 100 片,即每片含牛磺罗定 250 mg。空白片剂(自制):辅料与牛磺罗定片剂辅料相同,但未加牛磺罗定。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品溶液和衍生化试剂溶液的配制 精密称取牛磺罗定,加乙腈制成浓度为 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准品溶液,分别移取 0.4、0.8、1.6、3.2 和 4.0 mL 置于 10 mL 的容量瓶中,加乙腈稀释至刻度,4℃ 保存,备用。精密称取对甲基苯磺酰氯适量,加乙腈制成浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的衍生化试剂溶液,备用。

1.2.2 样品溶液配制 取 50 mg 经研磨后的牛磺罗定片剂粉末,精密称定,置于 25 mL 的容量瓶中,加乙腈适量,超声提取 30 min,用乙腈定容至刻度,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,4℃ 保存,备用。

1.2.3 色谱条件 Venusil XBP C_{18} 色谱柱($250\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:乙腈-水(体积比为 30:70),等度洗脱。流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长:240 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL 。

1.2.4 衍生化及预处理 取标准品溶液(或样品溶液)1 mL 置于 10 mL 的容量瓶中,加入衍生试剂溶液 1 mL,封口膜封口,震荡 30 s,置于 95℃ 的水浴锅中,反应 5 min,冰水浴冷却,加乙腈稀释至刻度,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,备用。反应过程见图 1。

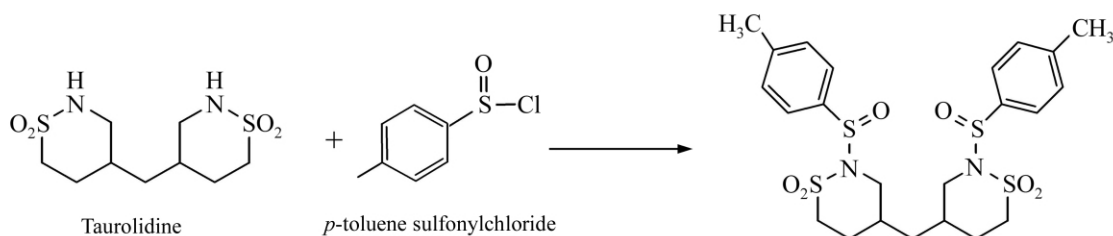


图 1 牛磺罗定和对甲基苯磺酰氯的反应途径

Fig. 1 A proposed reaction pathway between taurolidine and *p*-toluene sulfonylchloride

2 结果与讨论

2.1 衍生化产物的鉴定

分别取 1 mL 标准品溶液与 1 mL 乙腈、1 mL 乙腈与 1 mL 衍生化试剂溶液、1 mL 标准品溶液与 1 mL 衍生化试剂溶液,依次按实验方法 1.2.4 进行操作,并按实验选定色谱条件进行检测,结果如图 2。由图 2 可见,图 2-3 中的单峰为牛磺罗定衍生化后的产物峰,衍生化试剂对测定无干扰。

2.2 衍生化条件的优化

2.2.1 衍生化试剂的选择 考察了 NBD-Cl 和对甲基苯磺酰氯 2 种常用衍生化试剂。NBD-Cl 与牛磺罗定按文献^[7]条件进行反应,平行制备样品溶液与空白样品溶液各 3 份,结果样品溶液衍生化后在全波长下只出现 NBD-Cl 峰,峰面积与空白溶液的相差不大。改变反应条件及流动相,也未出现除 NBD-Cl 峰以外的峰。表明 NBD-Cl 与牛磺罗定的衍生化产物未能达到 UV 的检出限,所以文献^[7]中用灵敏度较 UV 高的 FLD 检测器进行检测。

对甲基苯磺酰氯考察的结果见图 2。表明对甲基苯磺酰氯与牛磺罗定的衍生化反应活性较强,其衍生化产物在 240 nm 波长下有较强的吸收,且其价格低廉,所以选择对甲基苯磺酰氯为本实验衍生化试剂。

2.2.2 衍生化反应条件的选择 分别考察了反应温度、反应时间和衍生化试剂浓度对反应条件的影响。

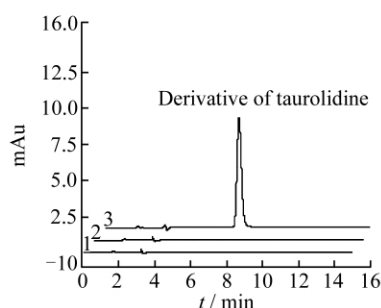


图 2 牛磺罗定经对甲基苯磺酰氯衍生化后产物的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the product of taurolidine by *p*-toluenesulfonyl chloride derivatization

1. without *p*-toluenesulfonyl chloride; 2. without Taurolidine; 3. the product of taurolidine by *p*-toluenesulfonyl chloride derivatization.

固定反应时间为 30 min 和衍生化试剂浓度为 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 温度设定在 $30\sim 100^{\circ}\text{C}$ 之间考察温度对衍生化产物量的影响(以峰面积表示), 结果见图 3; 固定反应温度为 80°C 和衍生化试剂浓度为 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下, 时间设定在 $5\sim 210\text{ min}$ 之间考察反应时间对衍生化产物量的影响(以峰面积表示), 结果见图 4; 固定反应温度为 80°C , 反应时间为 30 min, 衍生化试剂浓度设定在 $5\sim 320\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间研究衍生化试剂浓度对衍生化产物量的影响(以峰面积表示), 结果见图 5。

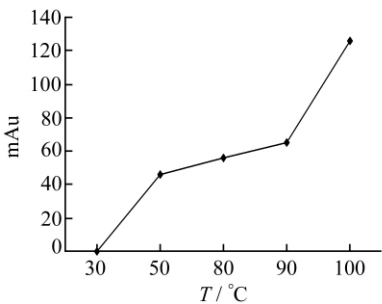


图 3 反应温度对衍生物量的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the amount of derivative products

由图 3 可知, 随着反应时间的延长, 反应温度的升高和衍生化试剂浓度的增大, 衍生化产物的量也不断的增加, 其中温度对反应程度影响最大, 提高温度能够明显提高反应程度。该反应在室温下几乎不进行, 鉴于此, 衍生化反应 5 min 后立即进行冰水浴冷却, 即可终止反应。结合以上的单因素水平考察结果及实验高通量、简便的原则, 选择衍生化反应条件为: 温度 95°C , 时间 5 min, 衍生化试剂浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 方法学考察

2.3.1 重现性及稳定性实验 取 $1\text{ mL } 0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准品溶液, 在选定实验条件下, 进行 6 次平行分析, 其峰面积的 RSD 为 0.37%。取 $1\text{ mL } 0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标

准品溶液, 室温下考察样品衍生化 0、2、4、6、8、10、12 和 24 h (4°C 下贮存) 后产物的稳定性, 结果显示, 测得峰面积的 RSD 为 3.78%。

2.3.2 标准曲线 配制 $0.16、0.32、0.64、0.80$ 和 $1.60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准系列溶液, 分别按实验方法进样检测, 以牛磺罗定浓度为横坐标 $x(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$, 峰面积为纵坐标 $y(\text{mAu})$, 绘制标准曲线, 结果得到线性回归方程为: $y=4.0011x-2.0239, r=0.9995$; 线性范围为 $0.016\sim 0.160\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 回收率实验 取 5 批已知含量的牛磺罗定片剂, 分别加入适量的牛磺罗定标准品, 按 1.2.1 和 1.2.2 项下操作, 2.1 项下进样检测, 结果见表 1。

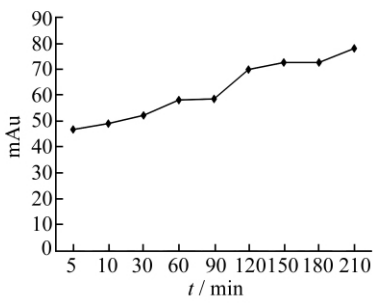


图 4 反应时间对衍生物产量的影响
Fig. 4 Effect of reaction time on the amount of derivative products

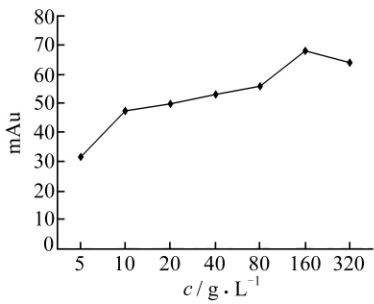


图 5 衍生化试剂浓度对衍生物产量的影响
Fig. 5 Effect of derivatization reagent concentrations on the amount of derivative products.

表 1 牛磺罗定的回收率实验
Table 1 Recovery of taurolidine

Sample	Tablet quality (mg)	Content of the sample(mg)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1	50.25	25.13	10.02	35.303	98.53
2	50.08	25.04	9.95	35.118	100.51
3	49.95	24.98	10.03	34.950	99.76
4	50.04	25.02	10.05	34.785	98.86
5	49.96	24.98	10.00	35.280	101.20

由表 1 可计算得出样品平均回收率为 99.77%。以上方法学考察结果表明此 HPLC 分析方法可靠,牛磺罗定衍生化后产物的稳定性也较好。

2.4 样品制剂辅料对含量测定的影响

取空白制剂与牛磺罗定片剂按实验方法配制成待测样品溶液,在实验选定条件下衍生化并测定,结果见图 6。表明制剂辅料对牛磺罗定的含量测定无影响。

2.5 样品含量测定

取 5 批牛磺罗定片剂,按前述方法测得含量分别为 248.5、248.9、251.5、249.5、249.8 mg/tablet。

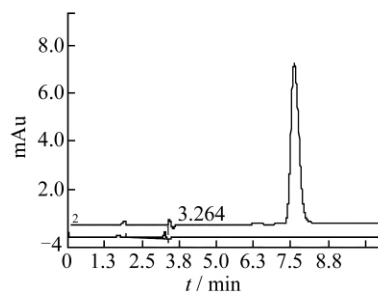


图 6 样品衍生化后的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatograms of the sample after derivatization

1. blank samples; 2. taurolidine tablets.

参考文献:

- [1] McCartney A C, Browne M K. *Progr. Clin Biol. Res.* [J], 1988, **272**:361.
- [2] Bieselt R. *Langenbecks Arch. Chir.* [J], 1997, **382**(4 Suppl. 1):S42-6.
- [3] Wesch G, Petermann C, Linder M M. *Fortschr. Med.* [J], 1983, **101**(12):545.
- [4] Blenkharn J I. *Surg. Res. Commun.* [J], 1987, **2**:149.
- [5] Leaper D J. *Urban and Schwarzenberg* [J], 1985:115.
- [6] Stendel R, Scheurer L, Schlatterer K. *Clinical Pharmacokinetics* [J], 2007, **46**(6):513.
- [7] Woolfson A D, Gorman S P, McCafferty D F, et al. *Int. J. Pharm.* [J], 1989, **49**:135.
- [8] Sihm Y S, Guillory J K, Ekirsch L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [J], 1997, **16**(4):643.
- [9] DONG Wen-geng(董文庚), DENG Xiao-li(邓晓丽), LIU Chang-chun(刘长春), WANG Huan(王欢), LI Yong-hui(李永辉). *Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis)* (理化检验-化学分册) [J], 2001, **37**(11):481.

Determination of Taurolidine by Pre-column Derivatization and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

CHEN Xi¹, LEI Yong², ZHANG Ning^{*2}, WANG Ye-qiu², PANG Ju-long²

(1. Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Medicinal Plants, Beijing 100193;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: A method using pre-column derivatization and reserved-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) UV detection was developed to determine taurolidine. Taurolidine was derivated with *p*-toluenesulfonyl chloride and then separated by Hypersil ODS C₁₈ column, and detected under the 240 nm wavelength. The linear range of taurolidine was from 0.016 to 0.160 g/L with the recoveries from 98.5% to 101.2%. Derivative products were relatively stable during 24 h (RSD = 3.8%). The method was simple, convenient, sensitive and required low-cost detection device, which is possibly more suitable for the determination of industrial production of taurolidine and in its solid dosage forms.

Keywords: Pre-column derivatization; High performance liquid chromatography; *p*-toluenesulfonyl chloride; Taurolidine; UV detection