

RP-HPLC法测定磷酸咯萘啶注射液含量及有关物质

高素英¹, 朱义²

(1 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004 2 杭州民生药业集团有限公司, 杭州 310011)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定磷酸咯萘啶注射液含量及有关物质。方法: 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 - 0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 (含 0.1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.0) (15: 85) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 278 nm, 结果: 磷酸咯萘啶测定的线性范围为 40.1~120.4 μg·mL⁻¹, r = 1.000 最低检测限为 0.8 ng 低、中、高浓度的平均回收率为 99.5%, 99.6%, 99.5% (n = 3); RSD 分别为 0.35%, 0.30%, 0.42%。日内和日间精密度的 RSD 分别为 0.33% 和 0.20%。结论: 本方法简便、快速, 结果准确、可靠。

关键词: 磷酸咯萘啶注射液; 含量测定; 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: 0254-1793(2009)11-1953-03

RP-HPLC determination of malaridine phosphate injection and its related substances

GAO Su-ying¹, ZHU Yi²

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control Hangzhou 310004, China 2. Minsheng Pharmaceutical Group Co. Ltd Hangzhou 310011, China)

Abstract Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of content and the related substances of malaridine phosphate injection. **Methods** Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted as the stationary phase with the mobile phase of acetonitrile - 0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ solution (containing 0.1% triethylamine, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) (15: 85) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 278 nm. **Results** The linearity was in the range of 40.1 - 120.4 μg·mL⁻¹ with a regression coefficient of 1.000. The low, medium and high average recoveries of the method were 99.5%, 99.6%, 99.5% (n = 3), RSDs was 0.35%, 0.30%, 0.42%. The RSDs of average contents of intra-day and inter-day were 0.33% and 0.20%, respectively. **Conclusions** The method is simple, rapid and accurate.

Key words malaridine phosphate injection; determination; related substances; HPLC

磷酸咯萘啶 (malaridine phosphate) 为抗疟药, 能杀死疟原虫裂殖体, 迅速治愈疟疾, 多用于抢救凶险型疟疾, 疗效较好, 毒副作用小, 能克服氯喹等药物的抗药性。其注射液中国药典 2005 年版二部采用紫外分光光度法测定含量, 专属性差, 本文采用高效液相色谱法测定其含量及有关物质, 方法简便、快速、专属性强, 可为以后中国药典的修订提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (带自动进样器), 二极管阵列检测器。

磷酸咯萘啶注射液 (批号 0602272, 0707192, 0707242, 规格 2ml 80mg) 由杭州民生药业集团有限公司提供, 磷酸咯萘啶对照品为中国药品生物制品检定所提供 (批号 10144-0101)。乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 - 0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 (含 0.1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.0) (15: 85) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 278 nm, 进样量为 10 μL, 按磷酸咯萘啶峰计算理论板数

大于 2000

3 方法专属性考察

3.1 降解产物的检出 分别取本品 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 分别加入 $6.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2.0 mL, 放置 8 h 分别加入 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2.0 mL, 放置 24 h 加入 30% 过氧化氢溶液 2.0 mL, 放置 4 h 在 5200 k 光照下放置 48 h 在 90°C 水浴中加热 4 h, 上述酸、碱破坏的供试品溶液分别中和后加水稀释至刻度, 其余样品加水稀释至刻度, 作为

供试品溶液各进样 10 μL 。结果在酸、碱、氧化、热破坏条件下, 样品有关物质明显增加, 且产生的降解杂质均能与主峰很好分离; 样品对光比较稳定, 几乎无降解 (见图 1)。通过对磷酸咯萘啶注射液主成分及降解产物进行 HPLC 分离检测, 结果表明采用 HPLC 法测定磷酸咯萘啶注射液含量及有关物质的方法专属性良好。另取辅料适量, 按处方配成空白溶液, 同法操作, 结果未见出峰, 说明辅料对含量及有关物质的测定无干扰, 见图 1。

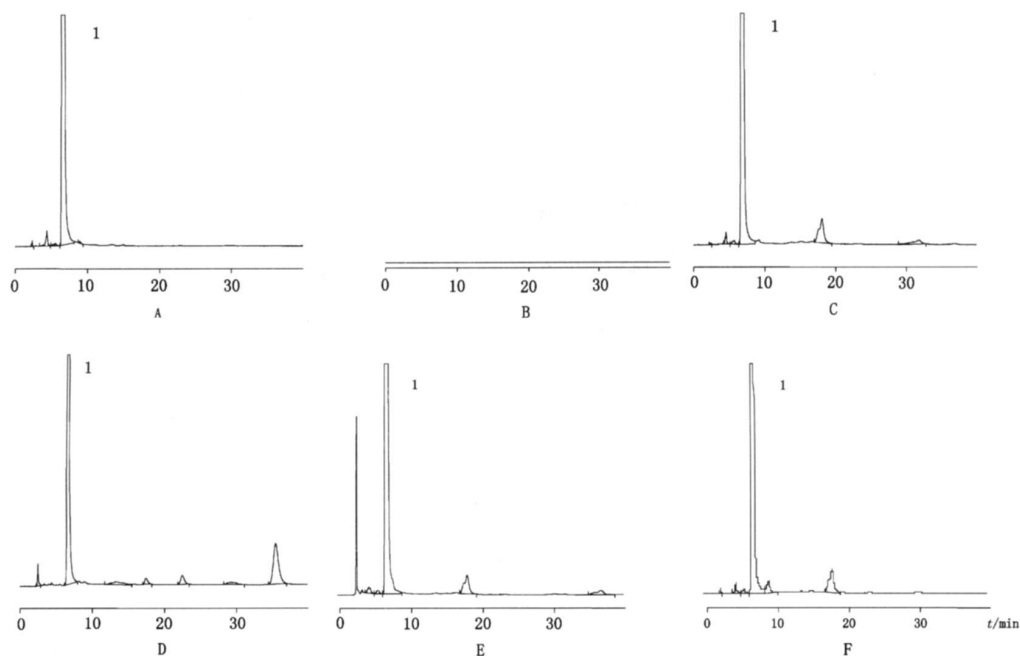


图 1 HPLC 方法专属性考察图谱

Fig 1 Chromatograms of the exclusion inspection of HPLC method

A. 样品 (sample) B. 空白辅料 (blank excipient) C. 酸破坏样品 (sample destroyed by acid) D. 碱破坏样品 (sample destroyed by alkali) E. 氧化破坏样品 (destroyed by oxidation) F. 热破坏样品 (sample destroyed by heat)

1 磷酸咯萘啶 (malaridine phosphate)

4 方法学考察

4.1 线性关系 精密称取磷酸咯萘啶对照品适量, 加水溶解并稀释制成每 1 mL 中含咯萘啶 40.14, 64.22, 72.25, 80.28, 88.31, 96.34, 120.42 μg 的溶液, 照含量测定项下的方法测定, 用峰面积 Y 对浓度 X 作线性回归后得:

$$Y = 45.721X - 40.657 \quad r = 1.0000$$

结果表明, 咯萘啶在 40.14~120.42 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

4.2 最低检出量 在上述选定的色谱条件下, 按信噪比为 3, 磷酸咯萘啶的最低检测量为 0.8 ng

4.3 精密度试验 取本品 (批号 0602272), 照“5”项下的方法于同一日内和不同日间 (5 d 内, 每

日测定 1 次) 分别测定含量 5 次, 计算日内和日间精密度, 结果日内平均含量为 96.5%, RSD 为 0.33%; 日间平均含量为 96.4%, RSD 为 0.20%。

4.4 溶液的稳定性 取“6”项下有关物质用供试品溶液 (批号 0707192), 分别在 0, 4, 6, 24 h 进样, 结果总杂质分别为 1.44%, 1.47%, 1.51% 和 1.51%, 表明有关物质测定样品溶液在 24 h 内基本稳定。

4.5 回收率试验 精密称取磷酸咯萘啶对照品适量, 加入处方量的辅料, 加水溶解并稀释制成每 1 mL 中含咯萘啶 64, 80, 96 μg 的溶液各 3 份, 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取磷酸咯萘啶对照品, 同法测定, 计算回收率, 结果低、中、高 3 种浓度

的平均回收率分别为 99.5%, 99.6%, 99.5%; RSD 分别为 0.35%, 0.30%, 0.42%。试验表明: 高效液相色谱法测定本品的含量, 方法回收率好。

5 含量测定

精密量取本品适量, 加水稀释制成每 1 mL 中含咯萘啶 80 μg 的溶液, 摇匀, 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取 105°C 干燥至恒重磷酸咯萘啶对照品适量, 同法测定, 按外标法以主峰的峰面积计算含量, 同时以中国药典 2005 年版二部收载的方法测定含量, 结果见表 1。

6 有关物质测定

精密量取本品适量, 加水稀释制成每 1 mL 中含咯萘啶 0.4 mg 和 16 μg 的溶液, 作为有关物质测定的供试品溶液和对照溶液。取对照溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 调节仪器灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为仪器满量程的 10%, 再准确量取上述 2 种溶液各 10 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 5 倍。供试品溶液的色谱图中如显杂质峰, 量取各杂质峰面积的和, 以自身对照法计算有关物质的量, 结果见表 1。

表 1 磷酸咯萘啶注射液含量及有关物质测定结果 (%)

Tab 1 The results of assay and test for related substance of malaridine phosphate injection

批号 (Lot No.)	本法 (the method)		ChP ^[4]
	含量 (content)	有关物质 (related substances)	含量 (content)
0602272	96.8	3.29	100.0
0707192	95.8	1.43	97.0
0707242	97.5	1.41	98.8

7 讨论

7.1 测定波长的选择 经二极管阵列检测器检测后, 发现磷酸咯萘啶在 278 nm 的波长处有最大吸收, 故选用 278 nm 为含量测定的波长; 同时磷酸咯萘啶的大多数降解产物均在 278 nm 波长处有最大吸收, 辅料在该波长处无吸收, 考虑到制剂主要是控制生产贮藏中产生的降解产物, 故选择 278 nm 为有关物质的检测波长。

7.2 流动相的选择 在建立本文的方法时, 比较了文献报道^[1-3]的测定磷酸咯萘啶的 HPLC 条件, 结果在同一色谱柱上, 以文献^[1]的峰型最好, 柱效较高; 同时又比较了 0.03 mol·L⁻¹、0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (含 0.1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.0) 2 种不同盐浓度与乙腈混合为流动相, 结果 0.03 mol·L⁻¹ 时色谱峰型略差, 0.05 mol·L⁻¹ 已完

全能满足分析需要, 考虑到盐浓度高对色谱系统的损伤, 故选择乙腈 - 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (含 0.1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.0) (15: 85) 为流动相。

7.3 有关物质检查 磷酸咯萘啶注射液经酸、碱、氧化、热破坏后, 产生的杂质峰均在主峰保留时间的 5 倍内, 却均能与主峰基线分离, 说明本色谱系统能有效控制其降解产物。并将记录时间定为主峰保留时间的 5 倍。

7.4 色谱柱的耐用性 分别采用 3 种不同品牌的色谱柱, Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 结果磷酸咯萘啶峰柱效和对称性均较好, 且能与杂质基线分离, 证明该流动相系统对 C₁₈ 柱具有普遍实用性, 系统的耐用性较好。

7.5 样品溶解溶剂的选择 为避免溶剂效应, HPLC 法测定时首选流动相为溶解溶剂, 但以流动相为溶剂测定本品某批样品时, 发现在 Q 4 1Q 16 h 测定有关物质结果为 2.93%, 3.23%, 3.49%, 3.55%, 说明样品在流动相并不稳定, 后改用水为溶解溶剂, 结果表明样品在水中稳定。

7.6 小结 本文建立的 HPLC 法的测定结果明显低于药典的 UV 法, 可能因为药典的 UV 法专属性差, 测定的含量中包括了杂质量, 而 HPLC 法测定的为其真实含量, 同时作为用药风险较高的注射剂, 控制有关物质量也是非常必要的, 所以本文建立的方法可为磷酸咯萘啶注射液标准提高提供参考。

参考文献

- ZHOU Ji-chun (周继春), WANG Xue-qin (王雪芹), WANG Ju-cai (王巨才). HPLC determination of the content of malaridine phosphate tablets (HPLC 测定磷酸咯萘啶片主药含量). *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2002, 17(5): 363
- TAO Yi (陶奕), ZHANG Hao-bing (张皓冰), JIN Qi-yun (金琦芸), et al. Simultaneous determination of malaridine, sulfadoxine and pyrimethamine in an antimalarial compound preparation by HPLC (HPLC 同时测定抗疟复方制剂中磷酸咯萘啶、磺胺多辛与乙胺嘧啶含量). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41(8): 634
- GUO You-mei (郭幼梅), ZHANG Li-wen (张丽文), JIANG Yan (姜宴). RP-HPLC determination of the content of malaridine phosphate enteric-coated tablets (RP-HPLC 测定磷酸咯萘啶肠溶片含量). *J Shanghai Med Univ* (上海医科大学学报), 1999, 26(6): 453
- ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部): 879

(本文于 2008 年 11 月 11 日收到)