

高效液相色谱法测定注射用匹多莫德中匹多莫德的含量

刘宏¹, 茆玲²

(1. 吉林省通化市人民医院药剂科, 吉林通化 134001; 2. 南京市六合区人民医院药剂科, 江苏南京 211500)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定注射用匹多莫德中匹多莫德含量的方法。方法: 采用 Diamonsil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 0.01 mol/L NaH₂PO₄-甲醇-水(97:2:1)(磷酸调节 pH 至 pH=2.5); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 ml/min。结果: 匹多莫德在 0.273 2~4.371 2 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 7$), 平均回收率为 99.66%, $RSD=0.80\%$ ($n=6$)。结论: 本方法简便、准确、重现性好, 可用于注射用匹多莫德中匹多莫德的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 匹多莫德; 注射用匹多莫德; 含量测定

[中图分类号] R927.2

[文献标识码] B

[文章编号] 1673-7210(2010)04(a)-088-02

Content determination of pidotimod and its related substances in Pidotimod for Injection by HPLC

LIU hong¹, MAO Ling²

(1. Department of Pharmaceutics, the People's Hospital of Tonghua, Tonghua 134001, China; 2. Department of Pharmaceutics, the People's Hospital of Nanjing, Nanjing 211500, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the content determination of pidotimod in Pidotimod for Injection by HPLC. **Methods:** The Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used. The mobile phases consisted of 0.01 mol/L-sodium dihydrogen phosphate dihydrate, methanol and water (97:2:1) (adjust pH to pH=2.5 by phosphoric acid), the flow rate was 1.0 ml/min and the detection wavelength was at 210 nm. **Results:** The linear ranges of pidotimod was at 0.273 2~4.371 2 μg ($r=0.999\ 7$), the average recovery was 99.66% with a RSD of 0.80% ($n=6$). **Conclusion:** The method is fast, reliable, accurate and can be used in the quality control of pidotimod in Pidotimod for Injection.

[Key words] HPLC; Pidotimod; Pidotimod for Injection; Content determination

匹多莫德首先由意大利 Poli 化学工业公司研制开发, 1993 年上市并进入临床应用, 是一种人工合成的免疫刺激剂, 虽无直接杀菌及抗病毒作用, 但可增强特异性及非特异性免疫功能^[1]。目前国内上市的匹多莫德的剂型主要有口服溶液、颗粒剂、片剂等, 但还没有匹多莫德注射液及冻干粉针。笔者采用高效液相色谱法测定注射用匹多莫德中的匹多莫德的含量, 方法准确、高效、简便、快速。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-10AT 泵, 岛津 SPD-10A 紫外检测器; HW-2000 色谱工作站。

1.2 试剂

匹多莫德对照品(批号: 100588-200501, 含量: 100%, 中国药品生物制品检定所); 匹多莫德对照品(批号: 100588-200501, 含量: 100%, 南京威尔曼药物研究所); 磷酸二氢钠为分析醇; 甲醇、异丙醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L NaH₂PO₄-甲醇-水(97:2:1)(磷酸调节 pH 至 pH=2.5); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 ml/min。柱温: 室温; 进样量: 20 μl; 理论塔板数按匹多莫德计不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取匹多莫德对照品适量(约 25 mg), 置 25 ml 量

瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度摇匀, 精密移取 1 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 配制成每毫升含匹多莫德 0.1 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取本品适量(含匹多莫德约 12.5 mg), 置 25 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密移取 2 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成每毫升含匹多莫德 0.1 mg 的供试品溶液。

另精密称取本品适量, 置 25 ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 配制成每毫升含匹多莫德约 0.5 mg 的有关物质检查的供试品溶液。精密移取供试品溶液 1 ml, 置 100 ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 配制成每毫升含匹多莫德约 5 μg 有关物质检查的对照品溶液。

2.4 注射剂的有关物质测定

2.4.1 最低检测限 精密称取匹多莫德对照品 10.80 mg 置 10 ml 量瓶中制成 1 080 μg/ml 溶液, 逐步稀释后分别进样 20 μl, 当稀释成 0.135 μg/ml 时信噪比为 3:1, 得进样量为检测限, 结果匹多莫德最低检测限为 2.7 ng。

2.4.2 分离度试验 取注射用匹多莫德(批号: 070208)适量分别加入酸、碱、氧化剂进行加速破坏, 考察降解产物是否影响主成分测定。本品在酸、碱和氧化条件下产生了明显的降解且降解产物均与主峰分离良好^[2]。色谱图见图 1。

2.4.3 有关物质测定 取本品, 加流动相制成每毫升含匹多莫德 0.5 mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取供试品溶液适

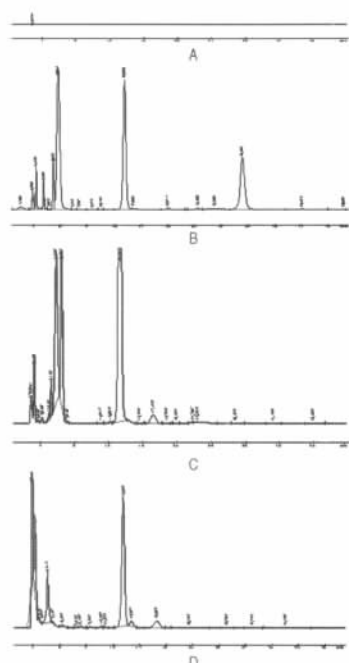


图1 HPLC 色谱图

(A.空白辅料;B.酸破坏样品;C.碱破坏样品;D.氧化破坏样品)

Fig.1 HPLC chromatography

(A.Blank substance; B.Sample spoiled by acid; C.Sample spoiled by alkali; D.Sample spoiled to oxidize)

量,加流动相稀释制成每毫升含匹多莫德 $5 \mu\text{g}$ 的溶液,作为对照溶液。取对照溶液 $20 \mu\text{l}$ 注入液相色谱仪,调节仪器灵敏度,使主成分峰的峰高为满量程的 $10\% \sim 30\%$;再取对照溶液和供试品溶液各 $20 \mu\text{l}$,分别注入色谱仪,记录供试品溶液色谱图至主峰保留时间的3倍,按不加校正因子自身对照法计算,样品(批号:070208)有关物质含量为 0.32 。样品的有关物质含量在 1.0% 以内。

2.5 注射剂的含量测定

2.5.1 线性关系考察 取匹多莫德对照品约 27.32 mg 置 100 ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制成贮备液。精密量取 0.5 、 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 、 5.0 、 6.0 、 8.0 ml 分别置 10 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,制成供试液 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 ,按浓度由低到高取上述各供试液及贮备液 $20 \mu\text{l}$ 注入色谱仪,测定峰面积。以浓度 $[C/(\text{mg} \cdot \text{L})]$ 为横坐标,峰面积 $(A/\mu\text{Vs})$ 为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $A = 2.204 \times 10^3 C + 4.414 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),可见匹多莫德在 $0.273 \sim 4.371 \mu\text{g}$ 的浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系^[3]。

2.5.2 稳定性试验 精密称取注射用匹多莫德(批号:20070208)适量,用流动相溶解并稀释摇匀,配制成每毫升含匹多莫德 0.1 mg 的对照品溶液。于 0 、 1 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 h 时取 $20 \mu\text{l}$ 注入色谱仪,记录色谱图,结果匹多莫德峰面积基本保持一致, $RSD = 0.63\%$,结果表明本品溶液在 12 h 内基本稳定^[4]。

2.5.3 中间精密度和重复性试验 取同一批样品(批号:20070208),由不同的操作者在不同的时间按“含量测定”项下的方法进行测定,得平均标示百分含量为 99.7% , $RSD = 0.37\%$

($n = 6$),结果表明中间精密度良好。另取同一批号样品(批号:20070208)按“含量测定”项下的方法平行测定3次,得平均标示百分含量为 99.63% , $RSD = 0.80\%$ ($n = 6$),含量基本一致,重复性好。

2.5.4 回收率试验 精密称取匹多莫德原料适量按10倍处方量的 80% 、 100% 、 120% 浓度3个梯度3份分别加入研钵中,分别加入按10倍处方量空白辅料,研磨均匀,制成模拟制剂。精密称取模拟制剂适量置 50 ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。精密称取匹多莫德对照品适量,用流动相溶解并稀释成每毫升含匹多莫德 0.1 mg 的对照品溶液。取对照品溶液和供试品溶液各 $20 \mu\text{l}$ 分别注入色谱仪,记录色谱图。按外标法计算。结果见表1。

表1 回收率试验结果($n = 9$)Tab.1 Results of recovery test ($n = 9$)

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)
4.06	4.09	100.80	
4.09	4.07	99.36	
4.10	4.08	99.39	
4.56	4.55	99.60	
5.66	5.67	100.30	99.66
5.47	5.44	99.33	
5.92	5.91	99.80	
5.89	5.84	99.22	
5.84	5.79	99.22	

2.5.5 样品含量测定 取注射用匹多莫德制成含量测定供试品溶液,精密量取上述溶液和含量测定对照品溶液各 $20 \mu\text{l}$,注入液相色谱仪,记录色谱图,按“2.3”项下方法以外标法计算含量,测定样品含量为 99.7% 。

3 讨论

匹多莫德是一个安全有效的免疫功能促进剂,为有免疫功能缺陷的患者提供一个安全有效的治疗药物。注射用匹多莫德,适用于不便口服给药的患者,起效快,生物利用度高且稳定性较好。

通过稳定性实验证明溶液在 12 h 内基本稳定;通过分离度实验证明匹多莫德与其有关物质分离较好;而且采用高效液相色谱法测定注射用匹多莫德中的匹多莫德的含量具有操作简便、结果准确可靠、重现性好、专属性强等优点,故确定采用高效液相色谱法控制注射用匹多莫德的质量。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].二部.北京:化学工业出版社,2005:81.
- [2] 田新平,曾小峰.新型合成免疫调节剂——匹多莫德[J].中国新药杂志,2005,14(1):111-114.
- [3] 杨莉萍,傅得兴.新型免疫调节剂匹多莫德[J].中国新药杂志,2004,13(4):300-304.
- [4] 安鲁凡,单世明,余书勤.匹多替莫[J].中国新药杂志,1997,6(2):110-111.
- [5] 尚海巍,孙英华,何仲贵.pH值对匹多莫德氯化钠注射液稳定性的影响[J].中国药剂学杂志,2007,5(6):312-316.
- [6] 林冬杰.中药退黄外洗液中 大黄酸的含量测定[J].中国当代医药,2009,16(4):42-43.
- [7] 周岐勋,李健和,徐幸民.高效液相色谱法测定盐酸甲氧氟芬分散片含量及有关物质[J].中国当代医药,2009,16(4):73-76.

(收稿日期:2009-12-08)