

HPLC 法测定尼可刹米中有关物质

孙 卫, 刘 珠¹, 赵秀红¹, 高振强² (华北制药股份有限公司, 石家庄 050015; ¹ 河北省药品检验所; ² 河北医科大学第三医院)

摘要: 建立 HPLC 法测定尼可刹米中有关物质。采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-水 (30:70) 为流动相; 检测波长 263nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹。高效液相色谱法测定尼可刹米中有关物质, 降解产物与主峰达到有效分离, 样品测定符合规定。该法操作简便, 结果准确, 专属性强, 可用于尼可刹米原料中的有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 尼可刹米; 有关物质

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2008) 06-0481-03

Determination of Related Substance in Nikethamide by HPLC

Sun Wei, Liu Zhu¹, Zhao Xiuhong¹ and Gao Zhenqiang² (North China Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050015; ¹ Hebei Provincial Institute for Drug Control; ² Third Hospital, Hebei Medical University)

ABSTRACT A HPLC method was established to determine related substance in Nikethamide. The analysis was conducted with Diamonsil C₁₈ column at room temperature, the mobile phase was consisted of methanol-water (30:70), the detecting wavelength was 263nm, the flow was 1.0 mL · min⁻¹. Nikethamide WAS Separated with its related substance thoroughly. The sample was analysed. The method is proved to be accurate and reliable could be use for anlysis of the related substance in Nikethamide.

KEY WORDS HPLC; Nikethamide; related substance

尼可刹米为中枢性呼吸兴奋剂, 其分析方法有分光光度法^[1]、GC^[2]、磷光分析^[3]、间接原子吸收法^[4]等, 用 HPLC 法分析尼可刹米的方法未见报道, 《中国药典》2005 年版二部^[5]采用薄层色谱法测定尼可刹米中有关物质检查, 考虑到本品主要供静脉注射使用, 薄层色谱法检查的灵敏度低于高效液相色谱法, 本文建立了尼可刹米中有关物质的高效液相色谱测定法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010AHT 型全自动高效液相色谱仪 (日本), Millipore 超纯水仪; sartorius BP 211D 电子天平; TU-1901 双紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)。尼可刹米原料药 (天津药业集团新郑股份有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6nm

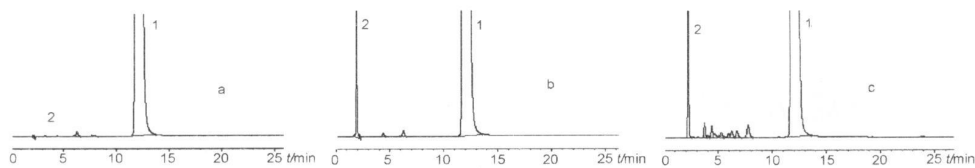
× 200nm, 5μm); 流动相: 甲醇-水 (30:70), 检测波长: 263nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样体积: 10μL; 柱温: 室温。

2.2 系统适用性

2.2.1 分离度试验 取尼可刹米 40mg, 共 2 份, 1 份加 1mol · L⁻¹ 盐酸溶液 2mL, 置水浴上加热 1 小时, 另 1 份加 1mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2mL, 置水浴上加热 10 分钟, 分别用水稀释使成约含尼可刹米 4mg · mL⁻¹, 各进样 10μL, 按上述色谱条件测定, 降解产物与主峰达到有效分离, 见图 1。按尼可刹米计理论板数为 4025。

2.2.2 最低检出限 取本品稀释成一系列浓度, 进样, 当主峰高为噪音峰高的 3 倍时的进样量即为最低检出限, 本品最低检出限为 2ng。

2.2.3 最低定量限 取本品稀释成一系列浓度, 进样, 当主峰高为噪音峰高的 10 倍时的进样量即为最低定量限, 本品最低定量限为 7ng。



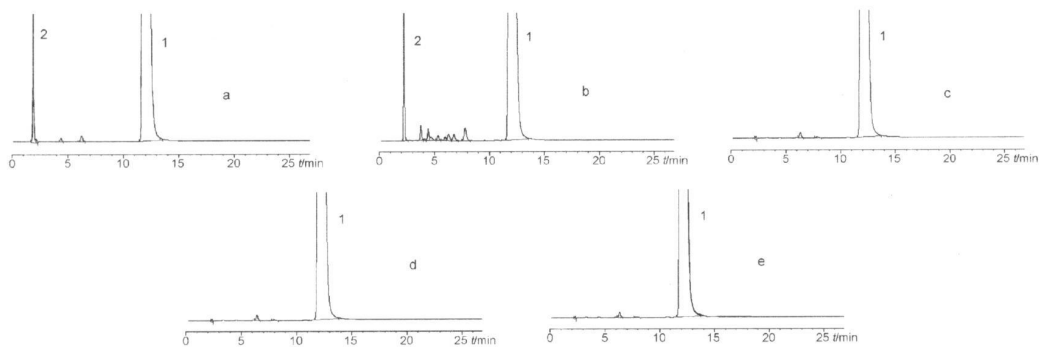
a 无破坏样品; b 酸破坏样品; c 碱破坏样品; 1 尼可刹米; 2 有关物质。

图 1 尼可刹米 HPLC 色谱图

2.3 专属性试验 取尼可刹米 40mg, 共 5 份, 分别以下列条件试验: ①酸破坏: 加 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2mL, 置水浴上加热 1h; ②碱破坏: 加 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2mL, 置水浴上加热 10min; ③氧化破坏: 加 3% 过氧化氢溶液 1mL, 50°C 水浴加热 2h; ④光破坏: 置照度为 4000Lx 的灯光下照

24h; ⑤高温破坏: 置 105°C 烤箱中加热 1h。

分别取上述破坏样品, 加水溶解并稀释至 50mL, 各进样 $10\mu\text{L}$ 测定, 结果除酸碱破坏产生新杂质外, 其余破坏均无新杂质产生, 所产生的新杂质均能与主峰完全分离, 见图 2。表明本色谱条件专属性良好。



a 酸破坏样品; b 碱破坏样品; c 氧化破坏样品; d 光破坏样品; e 高温破坏样品; 1 尼可刹米; 2 有关物质。

图 2 尼可刹米的专属性色谱图

2.4 稳定性试验 取尼可刹米 40mg, 加水溶解并稀释至 10mL, 在上述色谱条件下, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 小时进行测定, 结果显示供试品溶液的峰面积基本一致, RSD 为 0.8%, 说明溶液在 24 小时内稳定。

2.5 重复性试验 取稳定性项下的供试品溶液, 按上述色谱条件平行测定 6 份, 求得尼可刹米的平均峰面积为 4069130, RSD 为 0.5% ($n=6$)。

2.6 有关物质测定 精密称取尼可刹米 40mg, 加水溶解并稀释成 $4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

取对照溶液 $10\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 调节检测器灵敏度, 使主峰的峰高约为记录仪满量程的 20%, 再取供试品溶液 $10\mu\text{L}$ 注入色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。供试品溶液的色谱图中如显杂质峰, 则计算出各杂质峰峰面积的总和, 以不加校正因子的主成分自身对照法计算单一杂质质量和杂质总量。主要杂质是相对保留时间为

0.6 的杂质, 杂质质量为 0.1%, 杂质总量为 0.1%。

2.7 结果比较 HPLC 法与药典法比较照《中国药典》2005 年版二部尼可刹米项下有关物质检查^[5]。供试品显一个斑点, 不深于对照溶液 (2) 的主斑点 (小于 0.1%)。两种方法检测结果一致。

3 讨论

参考文献^[1-7] 进行流动相的选择, 考虑到文献^[6] 是用于生物样品中尼可刹米的检测, 该样品中杂质成分较多, 而我们的样品较单一, 故尝试在流动相中不加二乙胺和冰醋酸。我们分别考察了不加二乙胺和冰醋酸的情况下甲醇: 水的不同比例, 结果发现当甲醇: 水为 30: 70 时主峰的峰形良好, 保留时间适宜, 所以选为流动相。

本文用三根不同的色谱柱: DiamonsilC₁₈ (4.6mm × 200mm, 5 μm); IntersilODS-3C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5 μm); PhenomenexC₁₈ (4.6mm × 150mm, 5 μm) 对上述供试品溶液进行试验, 结果表明三种色谱柱对试验结果及峰形无显著性差异。(下转第 495 页)

表 2 样品中芍药苷加样回收率结果 (n= 6)

样品中的量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0 01824	0 01841	0 03621	97.61		
0 01815	0 01841	0 03631	98.15		
0 01814	0 01841	0 03681	101.41	98.06	1.62
0 01816	0 01841	0 03604	97.12		
0 01810	0 01841	0 03602	97.34		
0 01820	0 01841	0 03601	96.74		

表 3 养血当归糖浆中阿魏酸和芍药苷的含量测定结果 mg·mL⁻¹

批号	阿魏酸含量	芍药苷含量
050101	0 00120	0 03742
051101	0 00260	0 03430
060101	0 00110	0 03491
060501	0 00150	0 04783
061101	0 00410	0 04521
060605	0 00120	0 04920

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取阿魏酸和芍药苷对照品适量，用流动相配成一定浓度，采用紫外-分光光度计进行紫外扫描。结果，阿魏酸和芍药苷在 230nm 波长处吸收度接近，因此选择 230nm 作为检测波长。

3.2 样品提取环境和保存方法的选择

阿魏酸为弱有机酸，在放置过程中极不稳定，出现分解峰，并且在光、热、强酸和强碱的条件下极易分解，因此在实验提取过程中所用的提取溶液环境为弱酸环境。并采用低温冷藏保存，样品在 48h 内无分解峰。

3.3 供试品溶液制备方法的考察

对提取方法、提取溶剂的用量和提取时间进行了考察。提取方式分别采用加热回流和超声处理。采用加热回流的方法对样品中阿魏酸的影响较大，

且杂质峰多，峰型较小，不利于色谱分析。而超声提取的方法对有效成分的影响很小，并且能缩短提取时间，达到方法简便易行，高效的效果。提取溶剂乙醇的浓度分别选用 45%，50%，70%，95%，提取时间分别选用 15，20，30min，比较数据结果，选用乙醇浓度为 45%，超声提取 20min，即可将样品中阿魏酸和芍药苷提取完全。

3.4 流动相的选择

本实验根据文献报道，在选择流动相时，试验了多种比例的流动相系统，如乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (15:85)^[2]，系统进行了比较，结果表明：乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (10:90) 为流动相系统时，养血当归糖浆中阿魏酸和芍药苷的分离完全，峰形稳定，其他成分不干扰。

参考文献:

[1] 中国药典 [S]. 一部, 2005: 68

[2] 喻志标, 李后如. HPLC 法测定当归南枣颗粒中咖啡酸含量 [J]. 药品评价, 2006, 3 (2): 108

[3] 张玉爱, 吴泽榕, 郑起平, 等. HPLC 法测定养血当归胶囊中阿魏酸的含量 [J]. 中成药, 2006, 28 (4): 599

[4] 石上梅. HPLC 法测定当归康妇胶囊中阿魏酸的含量 [J]. 中国药事, 2006, 18 (1): 37

[5] 古丽萍, 盛杰, 邹建国, 等. HPLC 法测定红花当归合剂中阿魏酸的含量 [J]. 解放军药学报, 2004, 20 (6): 468

[6] 欧阳强, 刘义保, 雷茂华. 靖颇口服液液中阿魏酸的含量测定 [J]. 中国新药与临床药理, 1999, 10 (5): 293

[7] 崔晓光, 高玉香. 当归浸膏中阿魏酸含量比较研究 [J]. 药物分析志, 1994, 14 (3): 53

[8] 周坚, 王宓. 养血当归糖浆质量标准的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23 (1): 61

[9] 叶资萍, 苑洪忠, 赵凯. HPLC 测定养血当归胶胶囊中阿魏酸的含量 [J]. 中国现代中药, 2007, 9 (1): 18

[10] 张悦晗, 张爱华, 钟小群. RP-HPLC 法测定复方当归滴丸中阿魏酸的含量 [J]. 药学实践杂志, 2003, 21 (6): 353

(上接第 482 页)

分别考察用水和流动相溶解尼可刹米对色谱图的影响, 结果发现用水作为溶剂的供试品溶液主峰对称, 无拖尾现象; 用流动相作为溶剂的供试液峰形稍差, 故选择用水作为溶剂。

参考文献:

[1] 郑希林, 吴瑞良. 尼可刹米注射液的稳定性考查 [J]. 中国药师, 2000, 3 (6): 380

[2] 侯一斌. 尼可刹米及其代谢产物的气相色谱/质谱法检测

[J]. 质谱学报, 1992, 1 (13): 57.

[3] 黄如衡, 周东, 何长清. 尼可刹米经犬气道给药后的药物动力学与药效学 [J]. 中国药理学报, 1994, 15 (3): 271

[4] 焦更生, 曹惠兰, 祝宝林. 间接原子吸收法测定尼可刹米 [J]. 分析试验室, 2004, 23 (5): 71.

[5] 中国药典 [S]. 二部, 2005: 164

[6] 陈礼莉, 廖林川, 颜有仪. 血液、脑脊液中尼可刹米的 HPLC 法分析 [J]. 刑事技术, 2005, 5: 31

[7] 袁文福. 尼可刹米生产工艺改进 [J]. 安徽医药, 2004, 8 (1): 74