

RP-HPLC 法测定注射用甲砒霉素甘氨酸酯 盐酸盐的含量和有关物质

张 蓓, 王东凯, 宋 涛, 杨秀丽, 王海凤
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 采用反相高效液相色谱法测定注射用甲砒霉素甘氨酸酯盐酸盐(TGH)含量及有关物质。方法: 采用色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 三氟乙酸-乙腈(88:12); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长: 223 nm; 进样体积: 20 μL; 柱温: 40 ℃。结果: 含量测定的线性范围为 40 ~ 400 μg·mL⁻¹, $r=0.9999$ ($n=5$), 注射用 TGH 的加样回收率为 98.4% ~ 100.3%; RSD 在 0.29% ~ 1.08%。结论: 本法简便快速、准确, 专属性好。

[关键词] 甲砒霉素甘氨酸酯盐酸盐; 反相高效液相色谱法; 含量测定; 有关物质

[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2006)17-1473-03

RP-HPLC quantification of thiamphenicol glycinate hydrochloride for injection and the related substances

ZHANG Bei, WANG Dong-kai, SONG Tao, YANG Xiu-li, WANG Hai-feng
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for quantification of thiamphenicol glycinate hydrochloride (TGH) for injection and the related substances. **Methods:** The RP-HPLC condition was consisted of a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a column temperature at 40 ℃, mobile phase of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid (88:12) with a flow rate of 1.2 mL·min⁻¹, and detection wavelength at 223 nm. The loading volume of the TGH was 20 μL. **Results:** The linearity of the TGH concentration was in a range of 40 ~ 400 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$, $n=5$). The recoveries of TGH were in the range of 98.4% ~ 100.3% with RSD of 0.29% ~ 1.08%. **Conclusion:** The specific, reliable and accurate RP-HPLC method is applied to quality control of TGH and the related substances.

[Key words] thiamphenicol glycinate hydrochloride; reversed phase high-performance liquid chromatography; quantification; related substance

甲砒霉素为合成的广谱抗生素, 是氯霉素的替代物, 体内抗菌作用强于氯霉素, 而毒性却比氯霉素小。但甲砒霉素水溶性差, 剂型和临床应用受到限制, 故将其酯化得到盐酸甲砒霉素甘氨酸酯(thiamphenicol glycinate hydrochloride, TGH)。TGH 由甲砒霉素经氯乙酰化、胺化与成盐而合成^[1]。朱平^[2]研究表明该药可作为甲砒霉素的前体药物, 制成各种制剂(注射剂、冲剂、口服液等), 体内经酶水解后释放出甲砒霉素而发挥药理作用。目前, 有关的定量分析方法比较少, 本实验采用合适的液相条件测定了 TGH 的含量和有关物质, 在本实验的液相条件下, 杂质峰和主峰能良好分离, 方法简单可靠。

仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(LC-10AT 泵, SPD-

10A 紫外检测器); N2010 工作站(浙江大学智达信息工程有限公司); 90-1 型恒温磁力搅拌器(上海精科实业有限公司);

TGH 原料(纯度 > 99.5%, HPLC 法测定, 实验室自制); 乙腈(色谱纯, 含量 ≥ 99.9%, 山东禹王实业有限公司); 三氟乙酸(分析纯, 含量 > 99%, 中国医药(集团)上海化学试剂公司), 三乙胺(分析纯, 含量 > 99%, 天津市博迪化工有限公司)。

方法与结果

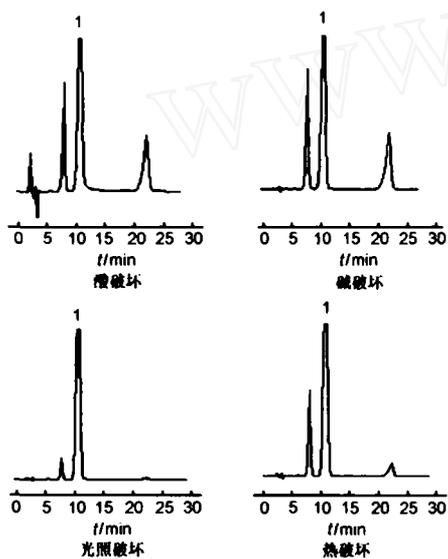
1 色谱条件和系统适用性要求

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 三氟乙酸-乙腈(88:12), 用三乙胺调 pH3.0; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测

波长:223 nm;柱温:40 ℃;进样体积:20 μL。理论塔板数按 TGH 峰计算应不低于 6 000。

2 方法的专属性考察^[3]

由于 TGH 的结构比较稳定,故采用了较强烈的破坏条件对其原料进行了酸性、碱性、光照和高热破坏实验。实验条件依次为 ① 酸破坏:供试品约 20 mg 加 1 mol·L⁻¹ 的盐酸 2 mL 溶解,常温放置 30 min,再用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 2 mL 中和。② 碱破坏:供试品约 20 mg 加 1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠 2 mL 溶解,常温放置 5 min,再用 1 mol·L⁻¹ 盐酸 2 mL 中和。③ 光照破坏:供试品于 4 500 lx 照射 3 d。④ 热破坏:供试品于 100 ℃ 煮沸 4 h。色谱峰见图 1。可见 TGH 对酸和碱的破坏比较敏感,在光照和高热的条件下比较稳定,并且图中杂质峰与主峰均有较好的分离,互不干扰。



1 TGH
图 1 专属性试验的 HPLC 图

3 线性关系的考察

取 TGH 原料 40 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,作为储备液。精密量取该储备液 1.0,3.0,4.0,5.0,6.0,8.0,10.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件进样,以峰面积(A)对浓度(C, μg·mL⁻¹)回归,回归方程为 $A = 17\,244C + 51\,008$, $r = 0.999\,8$ 。表明 TGH 在 40 ~ 400 μg·mL⁻¹ (进样体积 20 μL) 范围内呈良好线性。

4 最低检测限和最低定量限

取“3”项下 40 μg·mL⁻¹ 溶液分别稀释成系列溶液,在选定的色谱条件下,进样 20 μL 进行分析,最低检测限以信噪比为 3:1 计,TGH 的检测限为

1.8 ng;最低定量限以信噪比为 10:1 计,TGH 的定量限为 6.0 ng。

5 精密度

为考察方法的精密度,取 TGH 160,200,240 μg·mL⁻¹ 的 3 个浓度,照含量测定项下的方法,分别连续进样 5 次,RSD 分别为 0.88%,1.0%,0.93%。

6 耐用性考察^[4]

通过更换 3 根不同类型的色谱柱 Kromsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), YMG₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 10 μm), Lichrospher ODS - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 对注射用 TGH 进行了有关物质和含量的耐用性考察,柱效、有关物质和含量测定的结果均基本一致。结果见表 1。

表 1 耐用性考察结果

色谱柱型号	柱效	拖尾因子	有关物质/%	含量/%
Kromsil C ₁₈	7 492	1.10	0.4	95.43
YMG ₁₈	8 674	1.04	0.4	95.71
Lichrospher ODS-C ₁₈	8 834	0.98	0.4	95.57

7 供试品溶液的稳定性试验

精密称取样品适量(约相当于 TGH 200 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,作供试品溶液。在 24 h 内取 6 个时间点(0, 2, 4, 10, 16, 24 h)进样,测定结果为:有关物质的 RSD 为 0.87%,含量的 RSD 为 0.98%,实验结果表明样品在流动相中稳定性良好。

8 回收率考察^[5]

取 TGH 原料(HPLC 测得含量 99.8%)约 200 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,作为对照溶液。精密称取样品 9 份,每份约 200 mg,精密称定,分别置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度。精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,分别精密加入上述对照品溶液 1,2,3 mL 各 3 份。加流动相稀释至刻度,摇匀,照含量测定项下的方法测定,每个浓度的回收率依次为 100.3%,98.4%,99.1%;RSD 依次为 1.08%,0.30%,0.29%。

9 注射用 TGH 含量的测定

取装量差异项下的内容物,混匀,精密称取适量(相当于 TGH 200 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,作供试品溶液。取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图;另取 TGH 原料约 200 mg,同法测定。按外标法以峰面积计算出 TGH 的含量。结果 050301,05302 和 050303 的 3 批号含量分别为 95.2%,96.5% 和 94.7%。色谱图见

图 2。

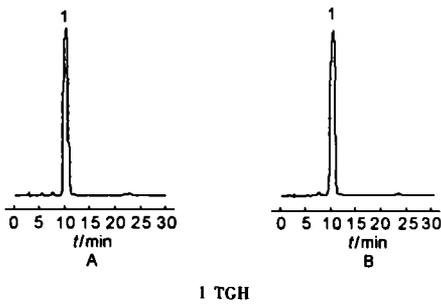


图 2 TGH 对照品(A)和样品(B)的色谱图

10 注射用 TGH 有关物质的测定

取装量差异项下的内容物,混匀,精密称取适量(相当于 TGH 200 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 3 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。照含量测定项下方法,取对照溶液 20 μ L 注入色谱仪,调整色谱图使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 20%;再精密量取上述供试溶液和对照液各 20 μ L 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍,以峰面积计,按自身对照法计算有关物质。结果 050301,050302 和 050303 的 3 批号的有关物质分别为 0.4%,0.6% 和 0.5%。色谱图见图 3。

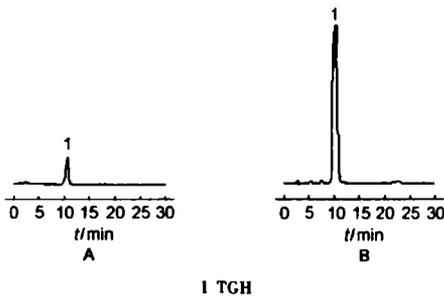


图 3 样品有关物质检测对照液(A)和供试液(B)色谱图

讨 论

本实验将 TGH 的甲醇溶液进行紫外扫描,结果发现在 223 nm 处有最大吸收,且辅料对测定无干

扰,因此本实验选择 223 nm 作为检测波长。

本实验参考文献对流动相进行了选择,发现在文献[6]的色谱条件下,流动相比较复杂,并且主峰的保留时间较短,重复性较差。因此,本实验在经验的基础上采用 0.01 mol·L⁻¹三氟乙酸和乙腈作为流动相,结果表明:在此流动相下主峰与杂质分离良好,重复性好。

由于 TGH 对 pH 值比较敏感^[6],因此,流动相 pH 值的确定是十分重要的影响因素。pH 值过高,药物容易解离,在柱中的保留时间变短,而且药物也容易降解;pH 值过低,药物的保留时间很长,柱效很低,采用适当的 pH 值既能良好的分离主药和杂质,还能获得良好的柱效。

[作者简介] 张蓓(1981-),女,硕士研究生。联系电话:(024)23953340,E-mail:taxuebbz@163.com。

[通讯作者] 王东凯(1962-),男,副教授,主要从事药物新剂型的研究。联系电话:(024)23986310,E-mail:wangdksy62@yahoo.com.cn。

[参 考 文 献]

- [1] 杨瑞虹,丁则荫. 甲磺霉素甘氨酸酯盐酸盐合成工艺概述[J]. 中国兽药杂志,2001,35(6):60-62.
- [2] 朱平. 甲磺霉素甘氨酸酯盐酸盐的合成[J]. 中国医药工业杂志,1997,28(4):157-158.
- [3] 寇晋萍,王国兰,余立. HPLC 法测定甲磺霉素胶囊含量[J]. 首都医药,2004,11(18):52-53.
- [4] 秦峰,陈佳,陈桂良,等. RP-HPLC 法测定甲磺霉素及其胶囊剂的含量和有关物质[J]. 药物分析杂志,2004,24(5):532-535.
- [5] 张哲峰,杨更亮,梁贵键,等. 注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠的 HPLC 分析及其质量研究[J]. 中国药理学杂志,2003,38(6):462-464.
- [6] 范国荣,张正行,安登魁. 甲磺霉素甘氨酸酯盐酸盐合成产品的 RP-HPLC 优化分离与定量分析[J]. 中国药科大学学报,1995,26(4):206-208.

编辑:朱立/接受日期:2005-07-26

(上接第 1472 页)

- [5] 雷同康. 分散片的处方和工艺[J]. 中国医药工业杂志,1999,30(2):87-90.
- [6] CHARABARTI PK, KHODAPE DJ, BHATTACHARYA S, et al. Dispersible tablet dosage forms β -lactum antibiotics[J]. *Indian J Pharm Sci*,1992,54(3):107-114.
- [7] 张莉,夏运岳. 用电子表格 Excel 计算药物溶出度 Weibull 分

布参数[J]. 药学进展,2002,26(1):48-50.

- [8] 邱家学. 充分利用 EXCEL 数据处理功能巧算 Weibull 分布位置参数[J]. 药学进展,2004,28(10):464-466.
- [9] 姚日生,董岸杰,刘永琼. 药用高分子材料[M]. 北京:化学工业出版社,2003:112-114.

编辑:周卓/接受日期:2006-03-10