

# HPLC法同时测定环孢素注射液的含量和有关物质

庞文哲\*, 宋更申, 王茉莉(河北省药品检验研究院, 石家庄 050000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0399-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.36

**摘要** 目的:建立同时测定环孢素注射液含量和有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Merck Hibar® C<sub>18</sub>,流动相为四氢呋喃-0.05 mol/L磷酸溶液(45:55, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为220 nm,柱温为75 ℃,进样量为10 μl。结果:环孢素C、环孢素B、环孢素、环孢素G、环孢素H、异环孢素H、异环孢素A质量浓度分别在1.95~195.00、2.03~203.00、0.25~9.90、1.83~182.80、1.26~125.80、1.81~180.80、2.02~202.40 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$ );精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤0.3%;环孢素平均回收率为99.94%,RSD=0.10%( $n=3$ )。结论:本方法准确、可靠、灵敏度高、专属性强,可用于环孢素注射液的质量控制。

**关键词** 环孢素;含量测定;有关物质;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of the Content and Related Substances of Cyclosporin Injection by HPLC

PANG Wen-zhe, SONG Geng-shen, WANG Mo-li(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the determination of content and related substances of Cyclosporin injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Merck Hibar® C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of tetrahydrofuran-0.05 mol/L phosphate (45:55, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 220 nm and column temperature was 75 ℃. The injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range were 1.95-195.00 μg/ml for cyclosporine C( $r=0.999\ 9$ ), 2.03-203.00 μg/ml for cyclosporine B( $r=0.999\ 9$ ), 0.25-9.90 μg/ml for cyclosporine( $r=0.999\ 9$ ), 1.83-182.80 μg/ml for cyclosporine G( $r=0.999\ 9$ ), 1.26-125.80 μg/ml for cyclosporine H( $r=0.999\ 9$ ), 1.81-180.80 μg/ml for isocyclosporine H( $r=0.999\ 8$ ) and 2.02-202.40 μg/ml for isocyclosporine A ( $r=0.999\ 9$ ), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were ≤0.3%. The average recovery of cyclosporine for was 99.94% (RSD=0.10%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate and reliable with high sensitivity and strong specificity, and can be used for quality control of Cyclosporin injection.

**KEYWORDS** Cyclosporine; Content determination; Related substances; HPLC

环孢素为免疫抑制剂,可选择性地作用于T淋巴细胞活化初期,临床主要用于防止异体器官或骨髓移植时的排斥等不利的免疫反应。环孢素的出现是近20年来器官移植的最重大进展<sup>[1-2]</sup>。环孢素中含有6种杂质,控制杂质的含量对保证药品质量和用药安全具有重要意义。为此,笔者参考相关文献<sup>[3-7]</sup>,建立了采用高效液相色谱(HPLC)法,对环孢素注射液中主成分的含量和有关物质同时进行了测定,以为其质量控制提供参考。

### 1 材料

1260型HPLC仪,包括1200高性能自动进样器、1200四元泵、1200二极管阵列检测器(美国安捷伦公司);Mettler TOLEDO型电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司]。

环孢素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130495-200202);环孢素C、环孢素B、环孢素G、环孢素H、异环孢素H、异环孢素A对照品(诺华制药有限公司,批号:005-95、518-85、16-85、520-85、210-89、502-88);环孢素注射液(北京双鹭药业股份有限公司,批号:20090601;瑞士Novartis Pharma Stein AG,批号:S036、S042、S043);四氢呋喃为色谱

[4] 段立军,孙博航.黄芪甲苷的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2011,28(5):410.

[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:283.

[6] 邓跃宁,夏厚林,程军,等.川黄芪质量标准研究[J].中药与临床,2010,1(2):18.

[7] 罗文汇,李养学,孙冬梅,等.陈皮配方颗粒质量标准研究[J].中国药业,2010,20(2):32.

[8] 王珍,李鑫.补肾健脾颗粒质量标准研究[J].中成药,2010,32(7):1252.

[9] 项秀娣,吕圭源,陈素红,等.莪术油质量控制及药理研究进展[J].中国现代应用药学,2010,27(11):979.

[10] 肖峰,万明.蒸发光散射检测器测定黄芪甲苷参数的优化[J].湖北中医杂志,2014,8(36):72.

[11] 唐丽香.ELSD-HPLC法测定前列通胶囊中黄芪甲苷的含量[J].海峡药学,2010,22(8):105.

(收稿日期:2014-06-03 修回日期:2014-09-28)

(编辑:孙冰)

\* 药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0311-85212008。  
E-mail:pangwenzhe123@aliyun.com

纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Merck Hibar® C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:四氢呋喃-0.05 mol/L 磷酸溶液(45:55, V/V);柱温:75 ℃;流速:1.0 ml/min;检测波长:220 nm;进样量:10 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 分别精密称取环孢素 C、环孢素 B、环孢素 G、环孢素 H、异环孢素 A 和异环孢素 H 对照品各 3 mg、环孢素对照品 100 mg,置于同一 50 ml 量瓶中,加入四氢呋喃-水(80:20)溶解并稀释至刻度,即得系统适用性溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取环孢素对照品约 50 mg,置 25 ml 量瓶中,加入四氢呋喃-水(80:20)溶解并稀释至刻度;精密量取 1 ml,置于 200 ml 量瓶中,加入四氢呋喃-水(80:20)溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密量取本品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,加入四氢呋喃-水(80:20)溶解并稀释至刻度,电磁搅拌或强力振摇 5~10 min,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液 取不含环孢素的阴性样品适量,按“2.2.3”项下方法制备,即得阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下系统适用性溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱见图,详见图 1。结果,各杂质相邻峰的分度度均大于 1.5。

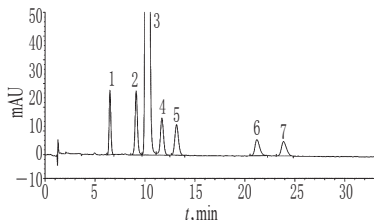


图 1 高效液相色谱图

1.环孢素 C;2.环孢素 B;3.环孢素;4.环孢素 G;5.环孢素 H;6.异环孢素 H;7.异环孢素 A

Fig 1 HPLC chromatograms

1.cyclosporine C;2.cyclosporine B;3.cyclosporine;4.cyclosporine G;5.cyclosporine H;6.isocyclosporine H;7.isocyclosporine A

### 2.4 专属性试验

(1)精密量取样品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,加 1 mol/L 盐酸溶液 1 ml,室温放置 0.5 h,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和至中性,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,备用;(2)精密量取样品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml,室温放置 0.5 h,用 1 mol/L 盐酸溶液中和至中性,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,备用;(3)精密量取样品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,加 30% 过氧化氢 1 ml,室温放置 0.5 h,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,备用;(4)精密量取样品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,于 100 ℃ 水浴中加热 1 h,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,备用;(5)精密量取样品 2 ml,置于 50 ml 量瓶中,置 4 500 lx 条件下照射 72 h,加四氢呋喃-水(80:20)稀释至刻度,摇匀,备用。精密量取上述 5 种溶液各 10 μl,分别注入 HPLC 仪,记录色谱,详见图 2。由图 2 可见,本品在强酸、强碱、氧化、高温、光照条件下,均被破坏产生降解产物,所产生

的降解产物在“2.1”项色谱条件下均能达到较好的分离。

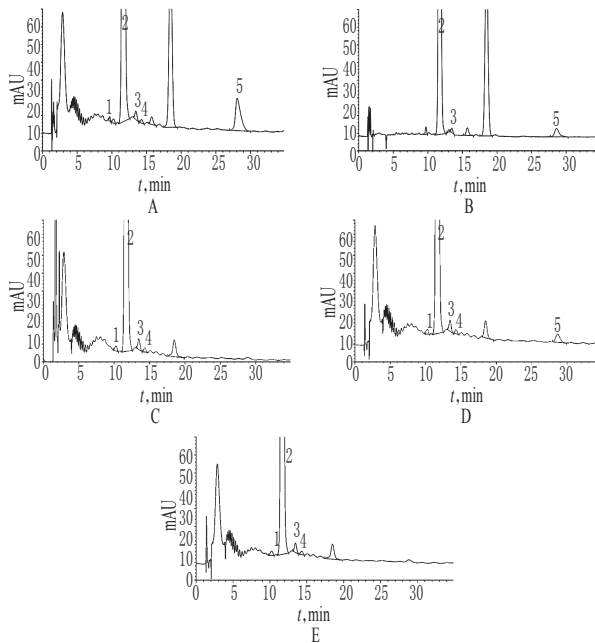


图 2 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.氧化破坏样品;D.高温破坏样品;E.光照破坏样品;1.环孢素 B;2.环孢素;3.环孢素 G;4.环孢素 H;5.异环孢素 A

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity tests

A.sample treated with acid;B.sample treated with alkali sample;C.treated with oxidation;D.sample treated with high temperature;E.sample treated with light;1.cyclosporine B;2.cyclosporine;3.cyclosporine G;4.cyclosporine H;5.isocyclosporine A

### 2.5 线性关系考察

分别精密称取环孢素 C、环孢素 B、环孢素、环孢素 G、环孢素 H、异环孢素 H、异环孢素 A 对照品适量,分别置于 50 ml 量瓶中,加四氢呋喃-水(80:20)溶解并稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件分别吸取 10 μl 进样测定,记录色谱。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程和线性范围见表 1。

表 1 回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equations and linear range

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r
环孢素 C	$y=6.055x-0.7264$	1.95~195.00	0.9999
环孢素 B	$y=7.8763x+0.6048$	2.03~203.00	0.9999
环孢素	$y=10.304x+1.2175$	0.25~9.90	0.9999
环孢素 G	$y=9.2279x-3.5932$	1.83~182.80	0.9999
环孢素 H	$y=8.5659x+0.9425$	1.26~125.80	0.9999
异环孢素 H	$y=5.088x-3.1535$	1.81~180.80	0.9998
异环孢素 A	$y=5.2146x-3.758$	2.02~202.40	0.9999

### 2.6 定量限和检测限

取“2.2.2”项下对照品溶液,采用逐步稀释法,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,以信噪比 10 计算环孢素、环孢素 C、环孢素 B、环孢素 G、环孢素 H、异环孢素 H、异环孢素 A 的定量限,结果分别为 9.90、19.50、20.30、18.28、31.30、45.20、50.60 ng;以信噪比 3 计算环孢素的检测限为 3 ng,其他 6 种杂质含量极低。

### 2.7 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液 10  $\mu$ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次。结果,环孢素峰面积的RSD为0.1%,其他6种杂质含量极低,表明仪器精密度高。

## 2.8 稳定性试验

取样品(批号:20090601)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、2、4、6、8 h时进样测定。结果,环孢素峰面积的RSD为0.3%,其他6种杂质含量极低,表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

## 2.9 重复性试验

取样品(批号:20090601)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,环孢素峰面积的RSD为0.1%,其他6种杂质含量极低,表明本方法重复性良好。

## 2.10 回收率试验

精密称取环孢素对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备对照品溶液,用四氢呋喃-水(80:20)稀释制成低、中、高浓度的溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定并计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=3$ )

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
环孢素	40.03	40.01	99.95	99.94	0.10
	40.12	40.08	99.90		
	40.08	40.06	99.95		
	50.05	50.01	99.92		
	50.19	50.16	99.94		
	50.08	50.05	99.94		
	60.12	60.11	99.98		
	60.36	60.32	99.93		
	60.19	60.17	99.97		

## 2.11 样品含量测定

取4批环孢素注射液样品,按“2.2”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法以峰面积计算含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(% , $n=9$ )

Tab 3 Results of content determination of sample(% , $n=9$ )

批号	含量
20090601	97.4
S036	99.3
S042	97.7
S043	104.6

## 2.12 相对保留时间及相对校正因子的测定

取“2.2.1”项下系统适用性溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,测得环孢素C、环孢素B、环孢素G、环孢素H、异环孢素H、异环孢素A相对于环孢素的相对保留时间分别为0.64、0.89、1.15、1.29、2.08、2.34。精密称取环孢素C、环孢素B、环孢素G、环孢素H、异环孢素H、异环孢素A对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备低、中、高浓度的对照品溶液,按 $F=(A_{杂}/c_{杂})/(A_{样}/c_{样})$ 计算各杂质的相对校正因子。式中, $A_{杂}$ 为杂质峰面积; $A_{样}$ 为样品峰面积; $c_{杂}$ 为杂质浓度; $c_{样}$ 为样品浓度。结果,环孢素C、环孢素B、环孢素G、环孢素H、异环孢素H、异环孢素A的相对校正因子分别为:1.5、1.2、1.0、1.1、1.3、1.4。

## 2.13 样品有关物质测定

取4批环孢素注射液样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,并按相对校正因子计算有关物质,结果见表4。

表4 样品有关物质测定结果(% )

Tab 4 Results of the determination of related substances in samples(% )

批号	环孢素C	环孢素B	环孢素G	环孢素H	异环孢素H	异环孢素A
20090601	未检出	0.1	0.1	0.2	未检出	0.2
S036	未检出	0.2	0.3	0.2	未检出	0.3
S042	未检出	0.2	0.3	0.2	未检出	0.3
S043	未检出	0.2	0.3	0.2	未检出	0.3

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

笔者选用二极管阵列检测器,发现各成分在220 nm波长处有较大吸收,且灵敏度较高。故选择220 nm作为本研究的检测波长。

### 3.2 色谱柱的选择

在本研究中,由于系统适用性溶液在不同品牌及同一品牌不同型号的 $C_{18}$ 色谱柱上的出峰顺序和相对保留时间存在较大差异。为了更准确地采用相对保留时间和相对校正因子对已知杂质进行控制,笔者对 $C_{18}$ 柱的品牌和型号加以限制。当色谱柱为Merck Hibar<sup>®</sup>  $C_{18}$ 时,各杂质间色谱峰分离度均符合测定要求,故选择Merck Hibar<sup>®</sup>  $C_{18}$ 为本研究的色谱柱。

### 3.3 流动相的选择

笔者分别比较了以四氢呋喃-0.05 mol/L磷酸溶液(45:55, V/V)、乙腈-水-叔丁基甲醚-磷酸(430:520:50:1, V/V/V/V)、乙腈-pH4.0磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠3.12 g,加水1 000 ml溶解,用磷酸溶液调pH至4.0)-甲醇(675:285:40, V/V/V)为流动相时的分离度。结果显示,以四氢呋喃-0.05 mol/L磷酸溶液(45:55, V/V)为流动相时,环孢素与6种杂质的分离度均较好。

综上所述,本方法准确、可靠、灵敏度高、专属性强,可用于环孢素注射液的质量控制。

## 参考文献

- [1] 秦风华,谢蜀生.环孢素A研究的新进展[J].上海免疫学杂志,1990,10(5):316.
- [2] 黄玉凤,王慧,张国庆,等.环孢素在自身免疫性疾病中的临床应用进展[J].药学实践杂志,2006,24(4):196.
- [3] 叶传华,苏燕.高效液相色谱法测定环孢素胶囊的含量[J].中国抗生素杂志,1999,24(6):466.
- [4] 王延东,唐细兰,叶成添,等.环孢素眼用乳状液的含量测定及稳定性研究[J].中国药房,2010,21(13):1 233.
- [5] 李碧峰,冯惠平,贾晋蓉,等.反相高效液相色谱法测定全血中环孢素的浓度[J].中国药师,2007,10(7):649.
- [6] 余细勇,林曙光.高效液相色谱法测定环孢素A血药浓度[J].现代应用药学,1993,10(7):26.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:85.

(收稿日期:2014-07-18 修回日期:2014-09-19)

(编辑:陈宏)