

HPLC法同时测定磺胺醋酸钠滴眼液中磺胺醋酸钠和杂质磺胺的含量

郭旭光^{1*},郭晓娟²,郭海波³(1.河南省食品药品检验所,郑州 450003;2.南阳理工学院张仲景国医学院,河南南阳 473004;3.河南省药品审评认证中心,郑州 450004)

中图分类号 R927.2;R978.2;R988.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2389-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.31

摘要 目的:建立同时测定磺胺醋酸钠滴眼液中磺胺醋酸钠及其杂质磺胺含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent C₁₈,流动相为甲醇-0.625%三乙胺水溶液(磷酸溶液调pH至3.0)(10:90),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,检测波长为254 nm。结果:磺胺醋酸钠和磺胺的保留时间分别为7.1、4.3 min,磺胺醋酸钠和磺胺检测质量浓度线性范围分别为6~60、2~20 μg/ml($r=0.999\ 6$ 、 $0.999\ 7$),平均回收率分别为100.06%、99.90%,RSD分别为1.1%、0.9%,检测限分别为4.26、3.14 ng,定量限分别为12.54、9.39 ng。结论:建立的含量测定方法操作简便,准确可靠,专属性强,可以更好地控制该制剂的质量。

关键词 高效液相色谱法;磺胺醋酸钠滴眼液;磺胺;含量测定

Simultaneous Determination of Sulfacetamide Sodium and Impurity Sulfanilamide in Sulfacetamide Sodium Eye Drops by HPLC

GUO Xu-guang¹, GUO Xiao-juan², GUO Hai-bo³(1.Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2.Zhang Zhongjing College of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Henan Nanyang 473004, China; 3.Henan Center for Drug Evaluation and Certification, Zhengzhou 450004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of sulfacetamide sodium and impurity sulfanilamide in Sulfacetamide sodium eye drops. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent C₁₈ with mobile phase consisted of methanol-0.625% triethylamine water solution (pH adjusted to 3.0 using phosphoric acid) (10:90) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 °C and the detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: The retention time of sulfacetamide sodium and sulfanilamide were 7.1 min and 4.3 min, respectively. The linear range of sulfacetamide sodium was 6-60 μg/ml ($r=0.999\ 6$) with average recovery of 100.06% (RSD=1.1%); that of sulfanilamide was 2-20 μg/ml ($r=0.999\ 7$) with an average recovery of 99.90% (RSD=0.9%). The detection limits were 4.26 ng and 3.14 ng, and the quantification limits were 12.54 ng and 9.39 ng, respectively. CONCLUSIONS: The developed method is simple, accurate, reliable and specific, which can be used for the quality control of Sulfacetamide sodium eye drops.

KEY WORDS HPLC; Sulfacetamide sodium eye drops; Sulfanilamide; Content determination

磺胺醋酸钠滴眼液被广泛用于治疗眼部的细菌感染、沙眼以及某些病毒感染。磺胺醋酸钠滴眼液质量标准收载于2010年版《中国药典》(二部)中^[1],其含量测定采用永停滴定法,专属性较差;有关物质项下磺胺限度检查为薄层色谱法,操作烦琐、灵敏度低,且未对总杂质进行限度检查。笔者参考相关文献^[2-3],采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定了磺胺醋酸钠滴眼液中磺胺醋酸钠、磺胺及其所含总杂质的含量。结果表明,本方法操作简便,结果准确可靠,专属性强,可以更好地控制该制剂的质量。

1 材料

1100型HPLC仪、G1314A VWD可变波长检测器、Chem-Station色谱工作站(美国Agilent公司)。

磺胺醋酸钠对照品(批号:100819-200601,纯度:100%)、磺胺对照品(批号:100024-198702,纯度:100%)均来源于中国食品药品检定研究院;15%磺胺醋酸钠滴眼液(河南同源制药有限公司,批号:120201、120202、120203);甲醇为色谱纯,三乙胺为分析纯,水为重蒸水。

*主管药师,硕士。研究方向:化学药品分析及质量标准。电话:0371-63388290。E-mail:gxg0371@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.625%三乙胺水溶液(磷酸溶液调pH至3.0)(10:90),流速为1.0 ml/min;检测波长为254 nm;柱温为30℃;进样量为10 μl;溶剂为水-甲醇(90:10)。

取“2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液进样,在上述条件下磺胺醋酸钠、磺胺与相邻的杂质峰均达到基线分离,磺胺醋酸钠、磺胺峰理论板数分别为14 062、11 614,两者分离度为11.2,色谱见图1A、B。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液。分别精密称取磺胺醋酸钠和磺胺对照品各约30、10 mg,置于同一100 ml量瓶中,加溶剂适量使溶解,稀释至刻度,摇匀;再精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 空白辅料干扰试验

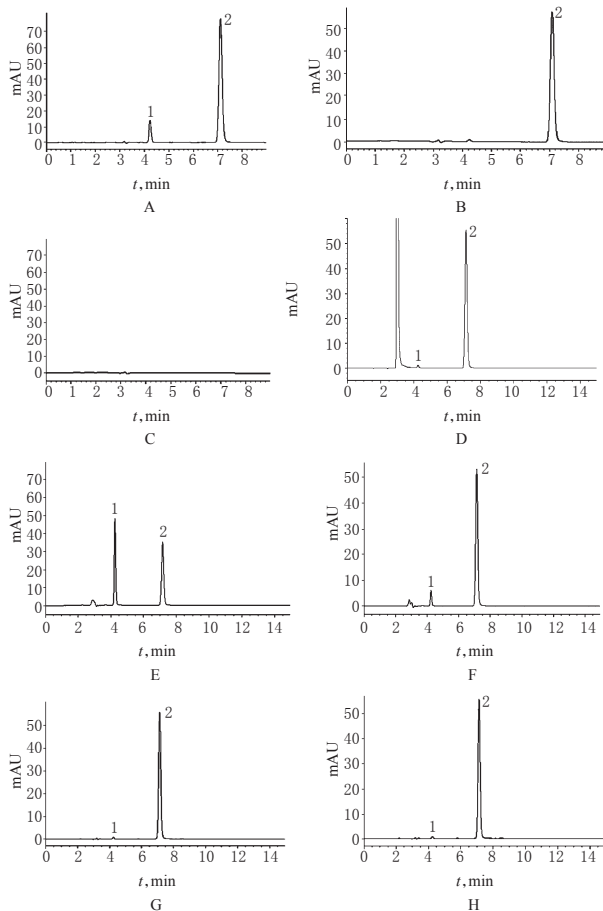


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.空白辅料;D.氧化破坏样品;E.酸破坏样品;F.碱破坏样品;G.高温破坏样品;H.强光破坏样品;1.磺胺;2.磺胺醋酰钠

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; C. blank excipients; D. samples destroyed by oxidation; E. samples destroyed by acid; F. samples destroyed by alkali; G. samples destroyed by high-temperature; H. samples destroyed by highlight; 1. sulfanilamide; 2. sulfacetamide sodium

取按处方比例混合的空白辅料(依地酸二钠、无水亚硫酸钠、山梨酸、水)适量,照“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备空白辅料试验溶液,进样10 μ l。结果辅料不干扰本品中磺胺醋酰钠及杂质磺胺的测定,色谱见图1C。

2.4 专属性试验

以下试验样品批号均为120201。

2.4.1 氧化破坏。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,加30%的过氧化氢溶液1 ml放置1 h后,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,进样测定。结果氧化破坏后的磺胺醋酰钠与其杂质峰分离良好,色谱见图1D。

2.4.2 酸破坏。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,加1 mol/L的盐酸溶液10 ml,室温放置1 h,再加1 mol/L的氢氧化钠溶液10 ml中和,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,进样测定。结果酸破坏后样品中磺胺醋酰钠与其杂质峰分离良好,色谱见图1E。

2.4.3 碱破坏。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,加1

mol/L的氢氧化钠溶液10 ml,室温放置1 h,再加1 mol/L的盐酸溶液10 ml中和,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,进样测定。结果碱破坏后的样品中磺胺醋酰钠与其杂质峰分离良好,色谱见图1F。

2.4.4 高温破坏。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,100 $^{\circ}$ C水浴24 h,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,进样测定。结果高温破坏后样品中磺胺醋酰钠与其杂质峰分离良好,色谱见图1G。

2.4.5 强光破坏。精密量取样品2 ml,置于100 ml量瓶中,强光(4 500 lx)下照射24 h,加溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,进样测定。结果光破坏后样品中磺胺醋酰钠与其杂质峰分离良好,色谱见图1H。

2.5 线性关系考察

分别精密称取磺胺醋酰钠对照品30 mg和磺胺对照品10 mg,置于100 ml量瓶中,加溶剂溶解并加至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 ml,分别置于50 ml量瓶中,加溶剂稀释制成混合线性溶液,各进样10 μ l,进样分析,测定峰面积。以对照品质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,得磺胺醋酰钠和磺胺线性回归方程: $A=17.227c+9.0639$ ($r=0.9996$)、 $A=8.2095c+1.581$ ($r=0.9997$)。表明磺胺醋酰钠和磺胺检测质量浓度线性范围分别为6~60、2~20 μ g/ml。

2.6 精密度试验

取磺胺醋酰钠和磺胺质量浓度分别为30.0、10.0 μ g/ml的混合对照品溶液,每次进样10 μ l,记录峰面积,重复6次,结果平均峰面积分别为726.7、84.3,RSD分别为0.2%、0.6%($n=6$)。

2.7 溶液的稳定性试验

取磺胺醋酰钠和磺胺质量浓度分别为30.0、10.0 μ g/ml的混合对照品溶液及“2.2.2”项下的供试品溶液各1份(批号:120201),分别在0、2、6、8、12、24 h注入液相色谱仪,记录峰面积。计算峰面积RSD分别为0.44%和0.72%($n=6$),结果表明对照品及供试品溶液在24 h内均稳定。

2.8 重复性试验

精密量取同一样品(批号:120201)6份,按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,分别进样测定其含量。结果,磺胺醋酰钠的平均含量为100.5%,RSD为0.6%;磺胺的平均含量为0.39%,RSD为1.1%,结果表明本方法重复性良好。

2.9 检测限与定量限试验

取“2.5”项下溶液依次稀释后进样测定,在信噪比约为3时计算检测限,在信噪比约为10时计算定量限。结果,磺胺醋酰钠、磺胺的检测限分别为4.26、3.14 ng,定量限分别为12.54、9.39 ng。

2.10 回收率试验

精密称取磺胺醋酰钠、磺胺对照品和处方比例的空白辅料,配制3种不同质量浓度的溶液各3份,共9份,进样,测定含量,计算回收率,结果见表1。

2.11 样品中有关物质的测定

精密量取样品3批各2 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recovery tests(n=3)

| 组分 | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | 平均回收率,% | RSD,% |
|-------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 磺胺醋酰钠 | 24.28 | 24.18 | 99.59 | 100.06 | 1.1 |
| | 24.01 | 24.04 | 100.13 | | |
| | 23.83 | 23.74 | 99.62 | | |
| | 30.11 | 30.13 | 100.08 | | |
| | 29.81 | 29.91 | 100.34 | | |
| | 29.72 | 29.46 | 99.12 | | |
| | 36.45 | 36.11 | 99.07 | | |
| | 36.28 | 37.28 | 102.77 | | |
| | 36.09 | 36.03 | 99.83 | | |
| | 磺胺 | 7.91 | 7.83 | | |
| | 8.35 | 8.48 | 101.59 | | |
| | 8.02 | 7.96 | 99.20 | | |
| | 10.15 | 10.05 | 99.01 | | |
| | 10.09 | 10.18 | 100.94 | | |
| | 9.86 | 9.81 | 99.52 | | |
| | 11.96 | 11.88 | 99.36 | | |
| | 12.05 | 12.05 | 100.00 | | |
| | 12.44 | 12.51 | 100.54 | | |

释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;再精密量取1 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,作为对照液。精密量取对照液与“2.2.1”项下的混合对照品溶液各10 μl分别注入色谱仪,调节仪器灵敏度,使主成分峰的峰高约为记录仪满量程的20%,记录色谱图;再精密量取供试品溶液10 μl注入色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的3倍。供试品溶液色谱图中如有与对照品溶液中磺胺相应的色谱峰,按外标法计算磺胺的含量,用自身对照法计算其他杂质的含量。结果测得3批(批号:120201、120202、120203)样品磺胺的含量分别为0.39%、0.38%、0.39%,其他杂质含量分别为0.07%、0.07%、0.06%。

2.12 样品中主成分含量测定

分别精密量取“2.2”项下的供试品溶液和混合对照品溶液10 μl注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,结果批号为120201、120202、120203的3批样品中磺胺醋酰钠的含量分别为100.5%、100.8%、101.2%。

3 讨论

(1)取本品流动相溶液,置于UV-260紫外-可见分光光度计上扫描,结果磺胺醋酰钠和磺胺分别在265、257 nm波长处有最大吸收,在254 nm波长处,两者吸收强度也均较大,再参考《美国药典》35版^[13]中磺胺醋酰钠眼膏含量测定的色谱条件,最终选择254 nm为本试验的检测波长。

(2)本文参考相关文献^[2-13]考察和比较了4种流动相的分析效果:①水-甲醇-冰醋酸(89:10:1)^[13],②磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L磷酸二氢钠溶液,用磷酸调pH为3.0)-甲醇(90:10)^[12],③甲醇-0.25%醋酸水溶液(用氨水调pH至7.0)(7:93)^[11],④甲醇-0.625%三乙胺水溶液(用磷酸调pH至3.0)(10:90)。结果发现,流动相①条件下磺胺醋酰钠多次进样后主峰的保留时间漂移较明显(RSD=2.3%,n=6),且峰面积的RSD为2.6%(n=6),也相对较大;流动相②条件下磺胺醋酰钠和磺胺的峰形均不好(拖尾明显);流动相③条件下磺胺峰形较好,但

磺胺醋酰钠峰形拖尾较明显,且出峰时间较早(2 min左右),易受到甲醇溶剂峰的影响,磺胺醋酰钠和磺胺刚好达到基线分离;流动相④加入三乙胺作为扫尾剂并用磷酸调节至合适的pH值后,磺胺醋酰钠和磺胺不但分离度更好(达到11.2),而且峰形均对称尖锐。降低流动相④的pH,磺胺醋酰钠和磺胺峰均前移,当pH调至3.0时,可得到理想的色谱图,故选择流动相④作为本文方法的流动相。

(3)HPLC法同时测定药物制剂中磺胺醋酰钠和磺胺含量也有相关文献^[11]报道,但经试验并与本文的方法比较发现,本文方法所得色谱图的对称因子(0.99)、分离度(11.2)及保留时间(磺胺约4.3 min、磺胺醋酰钠约7.1 min)均明显优于文献方法所得色谱图的对称因子(0.65)、分离度(2.1)及保留时间(磺胺约2.1 min、磺胺醋酰钠约2.6 min)。

参考文献

- [1] 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,2010:1 148.
- [2] 余钊,史惠,吴文凡,等.HPLC法同时测定兽药粉剂中10种磺胺药及其增效剂含量[J]. 畜牧与兽医,2011,43(7):73.
- [3] 冯学忠,黎华鹏,盘苑芷,等.HPLC同时测定复方二甲硝咪唑可溶性粉中地美硝唑、甲氧苄啶、磺胺对甲氧嘧啶的含量[J]. 动物医学进展,2011,32(7):55.
- [4] 肖白曼,孙艳芳,陈彦凤,等.二极管阵列反相高效液相色谱法测定食品中乙酰磺胺酸钾的含量[J]. 中国卫生工程学,2011,10(6):497.
- [5] 国彬,姚丽贤,何兆桓,等.高效液相色谱法测定畜禽废物中磺胺类、喹诺酮类抗生素[J]. 环境化学,2011,30(12):2 054.
- [6] 马慧萍,贾正平,王立娟,等.10%磺胺醋酰钠滴眼液含量测定方法比较[J]. 医药导报,2008,27(8):989.
- [7] 王文清,汪秋兰,张卫东,等.高效液相色谱法测定复方磷酸哌嗪片中磷酸哌嗪和磺胺多辛的含量[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(2):123.
- [8] 周明莹,马健,高湘萍,等.高效液相色谱法检测海水中磺胺类药物残留[J]. 渔业科学进展,2011,32(2):102.
- [9] 刘贵花,韩德满,梁华定,等.流动注射在线预富集-高效液相色谱法测定水产品中4种磺胺类药物[J]. 分析化学,2012,40(3):432.
- [10] 刘佳,曹卫东,曾闹华.砂质潮土中五种磺胺类药物的高效液相色谱检测方法[J]. 中国土壤与肥料,2010(3):78.
- [11] 徐淑贞,吴丽洋.高效液相色谱法测定烧烫灵软膏中磺胺醋酰钠和磺胺含量[J]. 色谱,1999,17(2):206.
- [12] 岳志华,张红,张娜.HPLC测定磺胺醋酰钠有关物质方法的建立[J]. 中国药品标准,2008,9(6):427.
- [13] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeial-The National Formulary (USP35-NF30)* [S]. Baltimore, Maryland: National Publishing, 2012:4 702.

(收稿日期:2012-08-22 修回日期:2012-10-09)