

HPLC法测定盐酸阿莫地喹片的含量和有关物质

冯 国*(广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

中图分类号 R927.2;R978.61 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-2007-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.31

摘要 目的:建立测定盐酸阿莫地喹片含量和有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法,并与该制剂国家标准中的薄层色谱(TLC)法检测有关物质和紫外-可见分光光度法(UV)测定含量的结果进行比较。色谱柱为 Insteril ODS-3,流动相为缓冲溶液[水-三乙胺-磷酸(100:1:0.5)]-甲醇(75:25),流速为1.0 ml/min,检测波长为342 nm,柱温为30℃。结果:盐酸阿莫地喹检测质量浓度线性范围为10.06~100.55 μg/ml($r=0.999\ 9$),平均回收率为99.56%,RSD=0.87%($n=9$),定量限和检测限分别为6.7、0.4 ng。2种含量测定方法结果相似,RSD分别为0.60%、0.71%;2种有关物质测定方法中TLC法未检出杂质,HPLC法测定总杂质质量为0.10%~0.13%。结论:所建立的方法准确、简便、可靠,能有效控制盐酸阿莫地喹片的质量,可考虑代替国家标准方法。**关键词** 盐酸阿莫地喹片;有关物质;含量测定;高效液相色谱法

Content Determination of Amodiaquine Hydrochloride Tablets and Related Substances by HPLC

FENG Guo(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of Amodiaquine hydrochloride tablets and related substances. METHODS: HPLC method was adopted and compared with results of TLC and UV in national standard. The determination was performed on Insteril ODS-3 C_{18} column with mobile phase consisted of water-triethylamine-phosphoric acid (100:1:0.5)-methanol (75:25) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 342 nm, and column temperature was 30℃. RESULTS: The linear range of amodiaquine hydrochloride was 10.06-100.55 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with mean recovery of 99.56% (RSD=0.87%, $n=9$). The limit of quantitation and detection were 6.7 and 0.4 ng. The content results by 2 methods were similar and their RSD were 0.60% and 0.71%. No impurity was found by TLC detection, and the amount of impurity were 0.10%-0.13% detected by HPLC. CONCLUSIONS: The method is accurate, simple and reliable for the quality control for Amodiaquine hydrochloride tablets. It can be considered to replace national standard method.

KEY WORDS Amodiaquine hydrochloride tablets; Related substances; Content determination; HPLC

盐酸阿莫地喹(别名氨酚喹、氨酚喹啉, Amodiaquine hydrochloride, AH)于1934年合成成功,1940年起广泛使用^[1]。我国于20世纪90年代开始对AH治疗疟疾进行研究,2005年10月由桂林南药股份有限公司生产上市,目前该药有单组分及与其他抗疟疾类药制成的复方片剂。AH片的国家标准^[2]中有关物质检测采用薄层色谱(TLC)法,含量测定采用紫外-可见分光光度(UV)法。两项检测均使用三氯甲烷提取,而三氯甲烷属第二类溶剂,应限制使用;其有关物质检查的灵敏度不高,其中供试品溶液配制的质量浓度为20 mg/ml;在测定含量时三氯甲烷与酸碱须交互洗脱净化,操作烦琐,人若长期接触或吸入也会对身体产生损害。为提高该制剂的质量标准、简化操作,笔者参考有关文献^[3],采用高效液相色谱(HPLC)法测定其中AH的有关物质和含量,现报道如下。

1 材料

2695型HPLC仪、2487型紫外检测器、2996型二极管阵列检测器(美国Waters公司);XS205DU电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Milli-Q超纯水机(美国密理博公司)。

AH对照品(批号:AQ-006,纯度:100.0%,水分:8.4%)、AH片(批号:AQ12041、AQ12042、AQ12043,规格:含阿莫地喹每片0.15 g)均由桂林南药股份有限公司提供;甲醇为色谱纯,

三乙胺、磷酸为分析纯。

2 含量测定

2.1 色谱条件

色谱柱:Insteril ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:缓冲溶液[水-三乙胺-磷酸(100:1:0.5)]-甲醇(75:25),流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl;检测波长:342 nm;柱温:30℃。理论板数按AH计算应不低于4 000,分离度应符合要求。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取AH对照品约132.27 mg,置于100 ml量瓶中,加磷酸溶液(1→1 000)溶液(以下简称溶剂)超声振摇10 min,放冷至室温,定容至刻度,摇匀,得AH对照品贮备液;精密量取上述贮备液3 ml,置于100 ml量瓶中,加溶剂定容至刻度,摇匀,制成约含阿莫地喹30 μg/ml的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品20片,精密称定,研细;精密称取细粉53 mg(约相当于阿莫地喹30 mg),置于100 ml量瓶中,加溶剂适量,振摇溶解并定容至刻度,摇匀,过滤;精密量取续滤液2 ml,置于20 ml量瓶中,加溶剂定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 空白样品溶液的制备

取不含AH全处方其他成分按“2.3”项下方法制备,即得。

2.5 检测波长的确定

取“2.2”和“2.4”项下的溶液进样,用二极管阵列检测器进

* 主管药师。研究方向:药品、食品、化妆品的检验。电话:0771-2611940。E-mail:ffggg365@163.com

行扫描,结果AH分别在198、223、342 nm波长处有最大吸收,空白样品在上述波长处未见干扰吸收。考虑到198、223 nm波长接近末端吸收,将检测波长定为342 nm,详见图1。

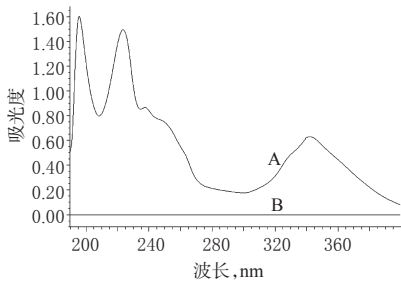


图1 紫外扫描光谱图

A.对照品;B.空白样品

Fig 1 UV scanning spectrum

A. substance control; B. blank sample

2.6 干扰试验

分别取“2.2”、“2.3”、“2.4”项下的溶液及流动相、溶剂进样,记录阿莫地喹色谱图的保留时间并进行峰纯度测定,结果其他成分对阿莫地喹峰无干扰,详见图2。

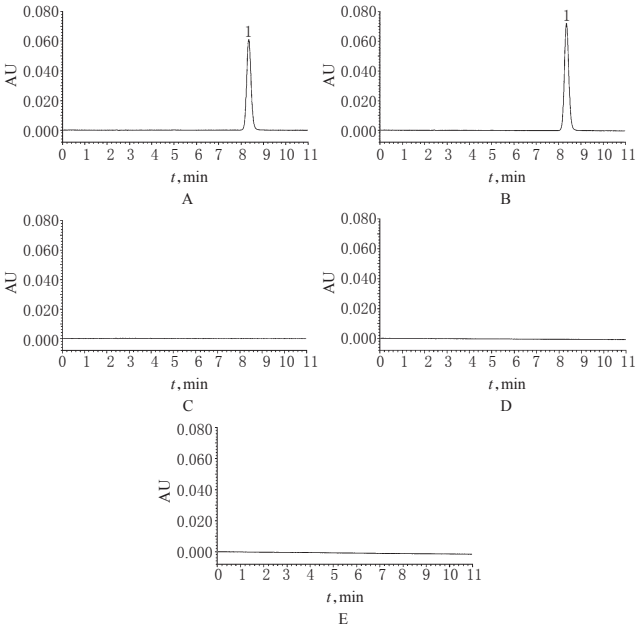


图2 系统适用性试验色谱图

A.供试品;B.对照品;C.空白样品;D.溶剂;E.流动相;1.阿莫地喹

Fig 2 Chromatograms of system applicability test

A. test sample; B. substance control; C. blank sample; D. solvent; E. mobile phase; 1. amodiaquine

2.7 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下对照品贮备液适量,加溶剂稀释至含AH质量浓度分别为10.06、20.11、30.17、50.28、100.55 μg/ml的系列溶液,进样测定。以峰面积(y)对进样质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程 $y=20\,429x-18\,486$ ($r=0.999\,9$),表明AH检测质量浓度线性范围为10.06~100.55 μg/ml。

2.8 定量限及检测限考察

取“2.2”项下的溶液加溶剂分别制成约含AH 0.3、0.03 μg/ml的溶液,进样10 μl,考察定量限、检测限,结果分别为6.7、

0.4 ng。

2.9 精密度试验

精密吸取“2.2”制备的对照品溶液10 μl,连续进样6次,计算得峰面积的RSD=0.52% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.10 重复性试验

取批号为AQ12041的样品按“2.3”项下方法制备6份供试品溶液,测定。结果其平均含量为每片148.3 mg, RSD=0.41% ($n=6$),表明本法重复性良好。

2.11 稳定性试验

取供试品溶液在室温放置0、2、6、8、12、24 h后分别进样测定,结果峰面积的RSD=0.64%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.12 加样回收率试验

精密称取按标准方法已测定含量的批号为AQ12041样品细粉27 mg(约相当于阿莫地喹15 mg)共9份,按“2.2”项下方法精密加入AH对照品15.8、19.8、23.6 mg ($n=3$),溶解、定容、过滤后测定,以外标法计算加样回收率,结果平均回收率为99.56% (RSD=0.87%)。

2.13 样品含量测定

取3批样品,按“2.1”项下条件和“2.3”项下制备方法进行含量测定,每批平行测定3份,并与标准方法^[9](UV法,检测波长342 nm)结果比较,详见表1。

表1 2种方法测定3批样品含量结果($n=3$)

Tab 1 Results of content determination in 3 batches of samples by 2 kinds of methods($n=3$)

批号	编号	HPLC法		UV法	
		含量,mg/片	RSD,%	含量,mg/片	RSD,%
AQ12041	1	148.6	0.60	151.1	0.71
	2	149.2		150.7	
	3	150.8		149.7	
AQ12042	1	150.1		149.3	
	2	151.4		150.5	
	3	150.7		148.6	
AQ12043	1	149.7		151.2	
	2	150.0		148.2	
	3	151.4		149.5	

3 有关物质的测定

3.1 供试品溶液的制备

取批号为AQ12041的样品20片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于阿莫地喹150 mg)置于100 ml量瓶中,加溶剂适量,超声振摇10 min,放冷至室温后,定容至刻度,摇匀;用0.45 μm的滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液(约含阿莫地喹1.5 mg/ml)。

3.2 对照溶液的制备

精密量取“3.1”项下供试品溶液1 ml,置于200 ml量瓶中,加溶剂定容至刻度,摇匀,得对照溶液(约含阿莫地喹7.5 μg/ml)。

3.3 专属性试验

取批号为AQ12041的样品20片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于阿莫地喹150 mg)5份,各置于10 ml量瓶中,备用。(1)酸破坏:加入2 ml稀盐酸,混匀,置于60 ℃水浴2 h,取出放冷至室温,加10%氢氧化钠溶液2 ml中和。(2)碱破坏:加入2 ml 10%氢氧化钠溶液,混匀,置于60 ℃水浴2 h,取

出放冷至室温,加稀盐酸2 ml中和。(3)氧化破坏:加入30%双氧水2 ml,混匀,于30℃水浴中放置6 h。(4)光照破坏:于5 000 lx照度下连续照射24 h。(5)高温破坏:于150℃烘烤2 h。破坏后的样品均按“3.1”项下方法制备后进样10 μ l,记录至主成分峰保留时间5倍的色谱图。结果,主成分峰与经各种破坏所产生的杂质峰均能有效分离,表明方法的专属性强,详见图3。

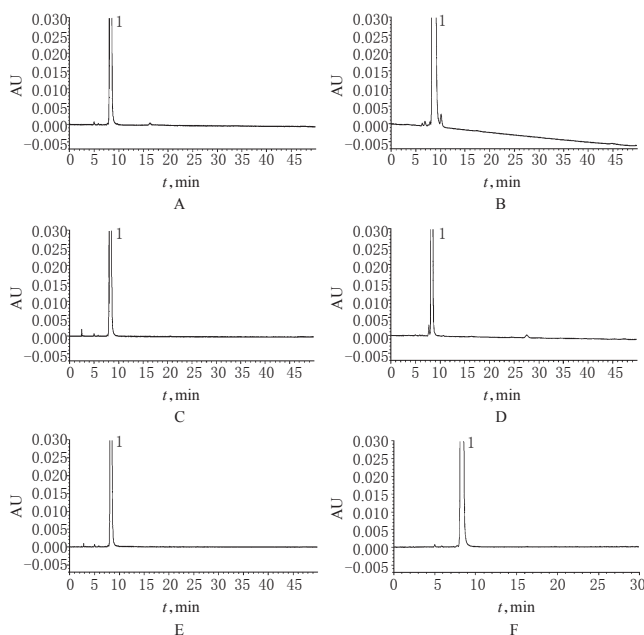


图3 专属性试验色谱图

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;F.未破坏样品;1.阿莫地喹

Fig 3 Chromatograms for the specificity tests

A. samples destroyed by acid; B. samples destroyed by alkali; C. samples destroyed by oxidation; D. samples destroyed by high temperature; E. samples destroyed by light; F. undestroyed sample; 1. amodiaquine

3.4 辅料破坏考察

取不含AH的全处方辅料按“3.3”项下方法进行试验,结果在342 nm波长处未见吸收峰。

3.5 杂质漏检与色谱峰纯度考察

为测定主成分峰纯度并分析其他因素对测定的干扰,对“2.3”、“2.4”项下的溶液、溶剂、流动相经二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围进行扫描。结果在210~240 nm波长范围上述溶液均有其他峰出现,在330~350 nm波长范围的峰面积虽小于之前波长的峰面积,但空白样品溶液在此波长范围出现的峰较少且峰面积可忽略不计,溶剂、流动相无峰出现。

3.6 干扰试验

取溶剂、流动相、空白样品溶液进样,记录50 min的色谱图,结果均未见其他峰产生。

3.7 精密度试验

取对照溶液连续进样6次,记录色谱图,结果主成分峰面

积RSD=1.01%,表明对照溶液进样精密度良好。

3.8 稳定性试验

取“3.1”项下供试品溶液室温放置0、2、6、8、12、24 h后分别进样测定,结果24 h内杂质峰个数及其峰面积、总杂质峰面积均未有明显增加。单个最大杂质峰面积的RSD=2.31%,总杂质峰面积的RSD=3.19%。

3.9 样品的有关物质测定

3批样品依法操作,并将测定后的杂质个数、单个最大杂质量、总杂质量并与标准方法^[2](TLC法)比较,结果详见表2。

表2 2种方法测定3批样品有关物质结果

Tab 2 Results of related substances in 3 batches of samples by 2 kinds of methods

批号	HPLC法			TLC法
	杂质数	单一最大杂质质量, %	总杂质质量, %	
AQ12041	3	0.06	0.10	未检出
AQ12042	3	0.06	0.11	未检出
AQ12043	4	0.07	0.13	未检出

4 讨论

对样品、破坏样品和空白样品(辅料)溶液经二极管阵列检测器检测,结果显示在224 nm波长处杂质检查的灵敏度较高,但辅料有干扰;而在342 nm波长处检测样品中的杂质与主成分峰也有基本相同的特征吸收;经破坏产生的杂质对主成分峰无干扰,且杂质峰个数无明显改变;辅料不影响测定。为简化操作,含量与有关物质均在342 nm波长处测定。

按标准^[2]方法在254 nm波长处检测3批有关物质,需选用0.5 mm以上厚度的薄层板,主斑点才未拖尾,但均未检出杂质;TLC法中供试品溶液的质量浓度为20 mg/ml,对照溶液亦需取20 mg对照品配制,较为浪费。按HPLC法则检出杂质,该方法灵敏度高,在无杂质对照品时采用自身对照,亦是可行的方法。测定时根据“3.3”项下的结果定为记录供试品溶液色谱图至主成分峰保留时间的3倍;调节对照溶液灵敏度,使主成分峰高约为满量程的10%~20%为宜。同时本法也可用于其原料相应项下的检测。

本试验曾采用6种色谱柱进行测定,仅有1种色谱柱在测定有关物质时有过载现象;其他色谱柱在理论板数4 000以上时,均能与杂质峰有较好的分离。

参考文献

- [1] Kerb R, Fux R, Morike K, *et al*. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(12): 760.
- [2] 国家食品药品监督管理局.WS₁-(X-112)-2011Z 盐酸阿莫地喹片[S]. 2011-05-16.
- [3] 国家食品药品监督管理局.YBH01962011 青蒿琥酯阿莫地喹片[S]. 2011-05-31.

(收稿日期:2012-08-03 修回日期:2012-10-08)

《中国药房》杂志——《哥白尼索引》(IC)收录期刊, 欢迎投稿、订阅