

法莫替丁注射液中主成分含量和有关物质测定方法改进

苏彦斌^{1*}, 张凤荣², 苏彦文¹(1.吉林化工学院, 吉林 吉林 132022; 2.吉林省食品药品检验所, 长春 130033)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)32-3058-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.32.27

摘要 目的:建立测定法莫替丁注射液中主成分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 Wasters C₁₈ 柱,流动相为醋酸盐缓冲液-乙腈(93:7, V/V),流速为 1.1 ml/min,检测波长为 267 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μl。结果:法莫替丁检测质量浓度在 0.02~0.20 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 $\leq 0.54\%$;平均加样回收率为 99.92%, RSD=1.16%($n=9$);法莫替丁的最低检测限为 0.5 ng,定量限为 2 ng,主成分法莫替丁与杂质分离度良好。结论:该方法专属性强、准确度高、重复性好,可作为法莫替丁注射液的质量控制方法。

关键词 法莫替丁;注射液;有关物质;含量测定;高效液相色谱法

Improvement of the Method for Content Determination of Main Component and Related Substances in Famotidine Injection

SU Yan-bin¹, ZHANG Feng-rong², SU Yan-wen¹(1.Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin Jilin 132022, China; 2.Jilin Institute for Food & Drug Control, Changchun 130033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of main components and related substances in Famotidine injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Wasters C₁₈ column with mobile phases consisted of acetate buffer-acetonitrile (93:7, V/V) at the flow rate of 1.1 ml/min. The detection wavelength was set at 267 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range of famotidine were 0.02-0.20 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 99.92% (RSD=1.16%, $n=9$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 0.54%. The lowest limit of detection was 0.5 ng, and the limit of quantity was 2 ng. The main component famotidine and impurity substances were well separated. CONCLUSIONS: The method is specific, accurate and reproducible for quality control for Famotidine injection.

KEY WORDS Famotidine; Injection; Related substances; Content determination; HPLC

比较。结果显示,以乙腈超声提取 60 min 效果较好,具有提取完全、效率高、能耗低等特点。

3.2 流动相的选择

在参考相关文献^[9]的基础上,分别采用乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙腈-水等不同流动相系统,结果发现乙腈-水流动相系统可较好满足试验需求,故加入 0.1% 的甲酸以改善峰形及分离度。

3.3 波长的选择

经二极管阵列检测器分析,二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 与丹参酮 II_A 分别在 242、245、268、270 nm 波长处有吸收峰。因在 270 nm 波长处,4 种成分紫外吸收均良好,有利于含量测定,故选择 270 nm 为检测波长。

本研究采用 HPLC 法建立了同时测定仙灵骨葆胶囊中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 与丹参酮 II_A 4 种丹参脂溶性成分含量的方法。通过方法学考察,表明本方法快速、准确、重复性好,可用于仙灵骨葆胶囊中丹参的质量控制;同时,本方法对含有丹参相关制剂的含量测定也具有一定的参考价值。

参考文献

* 教授,博士。研究方向:药物活性物质靶向定位及药物质量控制。电话:0432-63083063。E-mail:syb1962@tom.com

- [1] 李国樟,曹庸,卜晓英.丹参活性成分的药效药理作用[J]. 农技服务,2010,27(7):889.
- [2] 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,2010:70.
- [3] 靳风云,梁光义,张智,等.仙灵骨葆胶囊质量标准的研究[J].中国药学杂志,2002,37(5):372.
- [4] 刘永刚,赵保胜,王秀丽,等.HPLC法测定仙灵骨葆分散片中淫羊藿苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):6.
- [5] 王玉萍,郭宝林.仙灵骨葆胶囊中总黄酮及淫羊藿苷的含量测定[J].中草药,2000,31(10):741.
- [6] 李晓龙,梁光义,曹佩雪,等.HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(5):891.
- [7] 李振国,李忠保,王海波.HPLC法测定仙灵骨葆颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J].中医研究,2009,22(1):25.
- [8] 吴燕红,黄鸣清,李卓明,等.HPLC测定冠心七味片中丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮和对甲氧基桂皮酸乙酯的含量[J].中成药,2006,28(4):492.

(收稿日期:2013-02-03 修回日期:2013-06-14)

20世纪70年代,日本山之内制药株式会社中央研究所最早发现并合成了法莫替丁。法莫替丁为组胺H₂受体阻滞药,化学名称为3-[[[2-(二氨基亚甲基)氨基]-4-噻唑基]甲基]硫代]-N-氨磺酰基丙脒,可抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌,保护胃黏膜并预防出血,适用于胃及十二指肠溃疡、反流性食管炎、上消化道出血等症,疗效好且副作用少^[1]。法莫替丁注射液现已收入2010年版《中国药典》(二部)^[2],按药典方法作有关物质检查时,主峰与杂质峰分离不好,分离度<1.5。本研究采用高效液相色谱(HPLC)法,对法莫替丁注射液中主成分含量和有关物质的测定方法进行了改进,以为法莫替丁注射液的质量控制方法提供参考。

1 材料

Agilent 1200 HPLC 仪,包括真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、WVD紫外检测器、ChemStation工作站(美国安捷伦公司);A10型超纯水制备器(美国密理博公司);BT-25S型电子天平(德国赛多利斯公司)。

法莫替丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100305-200502,供含量测定用);法莫替丁注射液(江西银涛药业有限公司,批号:1204003;湖北荷普药业有限公司,批号:H20093273;上海信谊金朱药业有限公司,批号:090701,规格均为2 ml:20 mg);乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Wasters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:醋酸盐缓冲液(取醋酸钠13.6 g,置于900 ml水中,用冰醋酸调节pH至6.0±0.1,加水至1 000 ml)-乙腈(93:7,V/V);流速:1.1 ml/min;检测波长:267 nm;柱温:30℃,进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取法莫替丁对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加甲醇适量使溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成0.1 mg/L的溶液,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取样品1 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例制备不含法莫替丁的样品,再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 主成分含量测定的专属性考察 取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,记录色谱,详见图1 A、B、C。由图可见,阴性对照对法莫替丁含量测定无干扰。

2.3.2 破坏试验 (1)精密量取样品2.5 ml,置于100 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液2 ml,放置2 h,用1 mol/L氢氧化钠溶液中和至中性,加流动相稀释至刻度,摇匀,备用;(2)精密量取样品2.5 ml,置于100 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液2 ml,放置1 h,用1 mol/L盐酸溶液中和至中性,加流动相稀释至刻度,摇匀,备用;(3)精密量取样品2.5 ml,置于100 ml量瓶中,加30%过氧化氢溶液2 ml,放置1 h,加流动相稀释至刻度,摇匀,备用;(4)取法莫替丁注射液适量,置于4 500 lx条件下,光照72 h,精密量取此样品2.5 ml,置于100 ml量瓶中,加流动

相稀释至刻度,摇匀,备用;(5)取法莫替丁注射液适量,于100℃加热30 min,精密量取此样品2.5 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,备用。精密量取上述5种溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,记录色谱至保留时间的2倍,详见图1 D、E、F、G、H。由图可见,本品在强酸、强碱、氧化、光照、加热条件下,样品均被破坏产生降解产物,所产生降解产物在“2.1”项色谱条件下均能够达到较好的分离。主峰与降解产物峰分离度均大于2.0,各个杂质峰之间分离度均大于1.7。

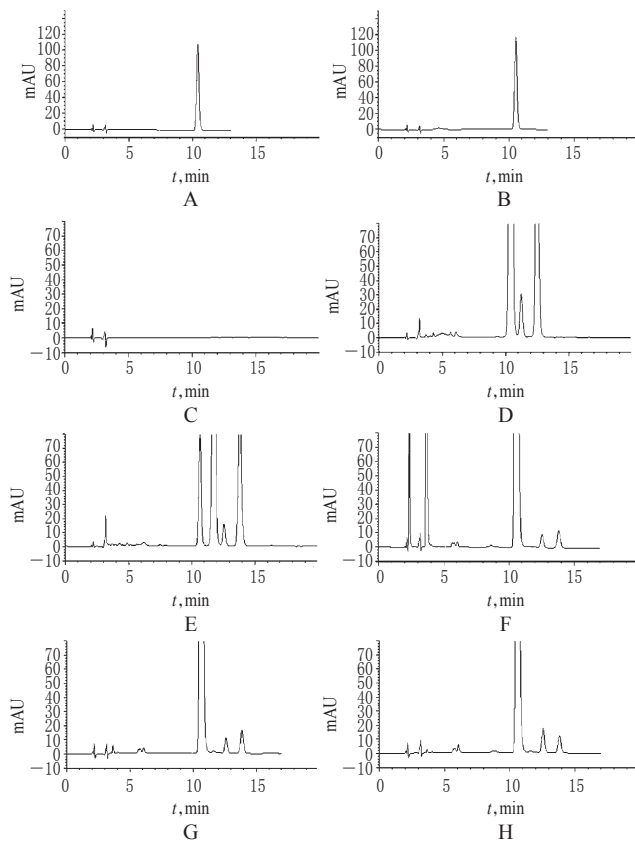


图1 高效液相色谱图

A.法莫替丁对照品;B.供试品;C.阴性对照;D.酸破坏样品;E.碱破坏样品;F.氧化破坏样品;G.光照破坏样品;H.加热破坏样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. famotidine control; B. test sample; C. negative control; D. treated with acid; E. treated with alkali; F. treated with oxidation; G. treated with light; H. treated with heat

2.4 线性关系考察

精密称取法莫替丁对照品10.25 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇适量使溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml约含1.0 mg的溶液。精密量取该溶液1、2.5、5、7.5、10 ml,分别置于50 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。按“2.1”项下色谱条件,分别精密量取上述系列溶液各20 μl,注入HPLC仪,记录色谱。以法莫替丁的检测质量浓度为横坐标(x, μg/ml),以峰面积为纵坐标(y),进行线性回归,得回归方程 $y=40\ 150.45x+18.10$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,法莫替丁检测质量浓度在0.02~0.20 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 最低检测限和定量限

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,稀释至2 μg/L,按“2.1”项

下色谱条件进样,记录色谱,以信噪比 $S/N=3$ 计算得最低检测限为0.5 ng,以信噪比 $S/N=10$ 计算得定量限为2 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件,重复进样测定6次。结果, $RSD=0.30\%$,表明本方法精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件,分别于0、4、8、12 h进样测定。结果, $RSD=0.54\%$,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批号(1204003)样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定6次。结果, $RSD=0.45\%$,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取法莫替丁对照品约8、10、12 mg,各3份,分别置于200 ml量瓶中,加少量甲醇使溶解,加入1 ml已知含量的样品,加流动相稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
9.93	8.26	18.12	99.15		
9.93	8.35	18.26	99.76		
9.93	8.11	18.20	101.97		
9.93	10.28	20.06	98.54		
9.93	10.25	20.11	99.32	99.92	1.16
9.93	10.30	20.40	101.65		
9.93	12.31	22.25	100.08		
9.93	12.72	22.54	99.14		
9.93	12.42	22.31	99.68		

2.10 样品含量测定

分别取3批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并取对照品按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=2$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=2$)

批号	主成分占标示量百分比, %
1204003	99.32
H20093273	99.27
090701	98.76

2.11 样品有关物质测定

精密量取样品5 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为有关物质测定供试品溶液。精密量取上述溶液1 ml置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为有关物质测定对照溶液。按“2.1”项下色谱条件,精密量取上述对照溶液20 μ l,注入HPLC仪,调节检测器灵敏度,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品溶液与对照溶液各20 μ l,分别注入HPLC仪,记录色谱至主成分峰保留时间的2倍。采用不加校正因子的自身对照法计算样品中有关物质的含量。结果,3批样品含有关物质的量分别为2.5%、2.2%、2.6%。

3 讨论

3.1 流动相的选择

《中国药典》规定法莫替丁注射液测定的流动相为“庚烷磺酸钠溶液(取庚烷磺酸钠2.0 g,加水900 ml溶解后,用冰醋酸调节pH值为3.9,加水至1 000 ml)-乙腈-甲醇(78:19:3)”^[2-3],另有其他文献与此流动相相似^[4-5],还有采用梯度洗脱法的报道^[6]。笔者在本试验中发现,用《中国药典》流动相作有关物质检查时,主峰与杂质峰分不开,增加水相的比例,使法莫替丁的保留时间在30 min以上时,主峰与杂质峰仍不能达到基线分离,且分析时间过长,再提高水相的比例就无法检测到法莫替丁了。由本试验结果可见,采用改进的流动相后,无论用什么方法破坏的样品所产生的杂质峰与主峰均可以得到较好的分离,主峰与杂质峰的分度及杂质峰之间的分度均能达到1.7以上,法莫替丁的理论板数达到10 000以上,且减少了离子对对色谱柱的损害,延长色谱柱寿命,降低了分析成本。

3.2 检测波长的选择

HPLC法测定法莫替丁原料药及制剂含量,检测波长一般选择254、266、267、268 nm^[2-6]。本试验用法莫替丁对照品在350~200 nm范围扫描,发现法莫替丁在267 nm波长处有最大吸收,故选择267 nm为检测波长。

3.3 耐用性

本试验前期分别用了Wasters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)、Shiseido C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)和Unitary C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m)4根色谱柱,分别在不同温度、不同流速下作有关物质的检查,结果均能达到较好的分离,法莫替丁的理论板数均能达到10 000以上。本试验最终选择Wasters C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),分离效果良好。

3.4 样品稳定性

由“2.3.2”项可知,样品在高温、光照状态下会产生杂质,尤其在酸、碱和氧化条件下会产生大量的杂质,所以在贮藏和运输过程中,应注意避免各种因素对样品质量的影响。

综上所述,改进后的方法专属性强、准确度高、重复性好,可用于法莫替丁注射液的质量控制。

参考文献

- [1] 宋济香,秦兰香,孙洪庆,等.法莫替丁治疗消化性溃疡的临床观察[J].中国药房,1992,3(2):33.
- [2] 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,2010:499.
- [3] 黄武军,黄庆,李洁,等.法莫替丁注射液有关物质检查的探讨[J].中国药品标准,2007,8(5):57.
- [4] 冀宛丽,赵家太,吴冬宏. HPLC法测定注射用法莫替丁的有关物质[J].中国药事,2010,24(6):576.
- [5] 颜素华,李健和,曹俊华.高效液相色谱法测定法莫替丁注射液中的有关物质和含量[J].中国现代医学杂志,2010,20(11):1 661.
- [6] 岳志华,黄海伟,李慧义,等.用HPLC法检查法莫替丁氯化钠注射液有关物质时的问题和讨论[J].中国药品标准,2008,9(2):130.

(收稿日期:2013-01-23 修回日期:2013-06-28)