

HPLC法测定磷酸伯氨喹片的含量及均匀度

杨颖*,李思源(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)08-0754-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.08.27

摘要 目的:建立测定磷酸伯氨喹片含量及均匀度的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil C₈,流动相为水-乙腈-四氢呋喃-三氟乙酸(90:9:1:0.1, V/V/V/V),检测波长为265 nm,流速为1.5 ml/min,柱温为40 ℃,进样量为10 μl。结果:磷酸伯氨喹检测质量浓度在128.069~384.206 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≤0.5%;平均加样回收率为100.6%,RSD=0.3%($n=9$);含量均匀度的A+1.80S在7.3~11.3之间。结论:该方法操作简单、准确性高、专属性强,适用于磷酸伯氨喹片的质量控制。

关键词 磷酸伯氨喹片;高效液相色谱法;含量;含量均匀度

Content Determination and Content Uniformity of Primaquine Phosphate Tablets by HPLC

YANG Ying, LI Si-yuan (Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination and content uniformity of Primaquine phosphate tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil C₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile-tetrahydrofuran-trifluoroacetic acid (90:9:1:0.1, V/V/V/V) at flow rate of 1.5 ml/min. The detection wavelength was set at 265 nm and column temperature was 40 ℃. The injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of primaquine phosphate was 128.069-384.206 μg/ml ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.5%; average recovery was 100.6% (RSD=0.3%, $n=9$). A+1.80S of content uniformity were between 7.3-11.3. CONCLUSIONS: The method is easy to operate with good accuracy and specificity. It can be used for the quality control of Primaquine phosphate tablets.

KEYWORDS Primaquine phosphate tablets; HPLC; Content; Content uniformity

磷酸伯氨喹是一种抗疟药,用于根治间日疟和控制疟疾传播^[1],易引发疲劳、头晕、恶心、呕吐、腹痛及药物热等不良反应^[2]。目前,在非洲及东南亚等疟疾多发地该药仍被广泛使用,在国内也被作为战略物资,其原料及片剂一直被保留生产。磷酸伯氨喹片在《中国药典》2010年版、《美国药典》35版、

《国际药典》第4版均有收载^[3-5]。笔者在对比各国药典方法的基础上,参照《美国药典》35版所采用的高效液相色谱(HPLC)法建立了磷酸伯氨喹片的含量及均匀度的测定方法。

1 材料

LC-20AT型HPLC仪,包括泵、紫外检测器、自动进样器、

检测波长为222 nm。

3.3 提取溶剂的选择

笔者分别考察了甲醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇作为提取溶剂的提取效率,结果以30%甲醇、50%甲醇为提取溶剂的提取结果偏低,以甲醇、70%甲醇溶液作为提取溶剂的提取结果相近,但甲醇提取杂质较多,而70%甲醇黏度小、易于过滤,因此选定70%甲醇溶液作为提取溶剂。

3.4 提取方法的选择

选定70%甲醇为提取溶剂,分别考察了超声提取法与加热回流法的提取效率,两者结果无差别,因此选定操作简便的超声提取法。同时,考察了不同超声时间(10、20、30 min)对测定结果的影响,结果超声提取20、30 min结果较超声提取10 min略高,但两者之间结果相近。综合考虑,选择超声提取20 min。

综上所述,本方法重复性好、灵敏度高、结果准确可靠,可用于参芪五味子胶囊的质量控制。

* 副主任药师。研究方向:化学药品检验及药品标准。电话:020-26282199。E-mail: elaineyzyty@163.com

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2005年版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 169.
- [2] 金鑫, 辛爱学. 南五味子提取工艺研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(6): 149.
- [3] 楼招欢, 吕圭源, 陈素红. 南、北五味子及其炮制品中木脂素类成分比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 43.
- [4] 周进东, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC测定五味子不同炮制品中6种木脂素类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(17): 1353.
- [5] 李晓亮, 易进海, 刘云华, 等. 南五味子、五味子HPLC指纹图谱研究和木脂素成分测定[J]. 中成药, 2011, 33(6): 920.
- [6] 程敏, 王露, 宋小妹. HPLC法测定五味子品种中木脂素含量[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2011, 41(3): 459.

(收稿日期:2013-09-28 修回日期:2013-12-30)

柱温箱等(日本岛津公司);XS205DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);AS83GTU型超声波清洗器(日本亚速旺公司)。

磷酸伯氨喹对照品(美国药典委员会提供,批号:G0J115);喹西特对照品(美国药典委员会提供,批号:F0K057);磷酸伯氨喹片(某制药公司,规格:13.2 mg,批号:110601、120401、120402);乙腈、四氢呋喃为色谱纯,三氟乙酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil C₈(75 mm×4.6 mm, 3 μm);流动相:水-乙腈-四氢呋喃-三氟乙酸(90:9:1:0.1, V/V/V/V);检测波长:265 nm;流速:1.5 ml/min;进样量:10 μl;柱温:40 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取磷酸伯氨喹对照品适量,加入流动相溶解并定量稀释,制成每1 ml中约含260 μg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 (1)含量测定供试品溶液:取样品20片,研细,精密称取细粉适量,加流动相适量,超声(功率:440 W,频率:30 kHz)处理5 min使溶解,定量稀释,滤过,制成每1 ml中约含260 μg的溶液,即得。(2)含量均匀度测定供试品溶液:取样品1片,置于50 ml量瓶中,加流动相适量,超声(功率:440 W,频率:30 kHz)处理5 min使溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,制成每1 ml中约含264 μg的溶液,即得。

2.2.3 系统适用性溶液 取磷酸伯氨喹和喹西特对照品适量,加流动相溶解并稀释制成每1 ml中分别约含260 μg和5 μg的混合溶液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 按处方比例制备不含磷酸伯氨喹的阴性样品,再按“2.2.2(1)”项下制备方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性、阴性干扰及专属性试验

2.3.1 系统适用性及阴性干扰试验 取“2.2”项下的对照品溶液、含量测定供试品溶液、系统适用性溶液及阴性对照溶液各10 μl,分别注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图1。结果,磷酸伯氨喹峰的保留时间约为12 min,喹西特峰的相对保留时间约为0.8;喹西特峰与磷酸伯氨喹峰的分离度大于2.5,理论板数按磷酸伯氨喹峰计算不低于3 000;并且,阴性对照对磷酸伯氨喹的含量测定无干扰。

2.3.2 专属性试验 取供试品溶液5份,每份2 ml,一份置于254 nm光源下照射1 h,作为光破坏试验溶液;一份置于100 °C水浴中加热1 h,作为热破坏试验溶液;一份滴加1 mol/L盐酸溶液0.1 ml,置于60 °C水浴30 min,作为酸破坏试验溶液;一份滴加1 mol/L氢氧化钠溶液0.1 ml,置于60 °C水浴30 min,作为碱破坏试验溶液;一份滴加30%过氧化氢溶液0.1 ml,置于60 °C水浴30 min,作为氧化破坏试验溶液。取上述5种溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图2。结果,(1)各破坏试验溶液均产生一定杂质峰;(2)碱破坏试验溶液在主峰前面会产生一个破坏峰,干扰含量测定;(3)供试品对氧化破坏试验较敏感,主峰面积减少比较严重;(4)除碱破坏试验外,其余破坏试验产生的破坏峰均不会影响主峰的检测。

2.4 线性关系考察

取磷酸伯氨喹对照品适量,用流动相制成质量浓度约为

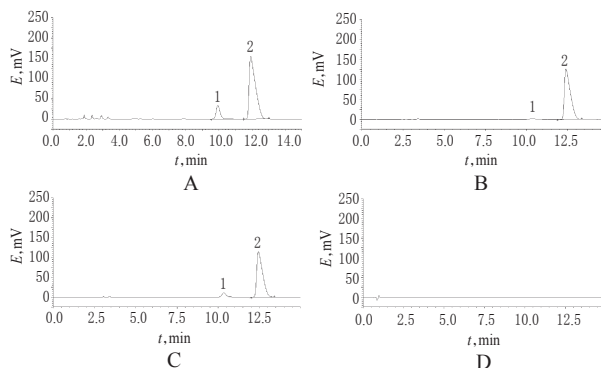


图1 系统适用性及阴性干扰试验高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.对照品溶液;C.含量测定供试品溶液;D.阴性对照溶液;1.喹西特;2.磷酸伯氨喹

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability and negative interference tests

A.system suitability; B.substance control; C.test sample; D.negative control; 1.quinocid; 2.primaquine phosphate

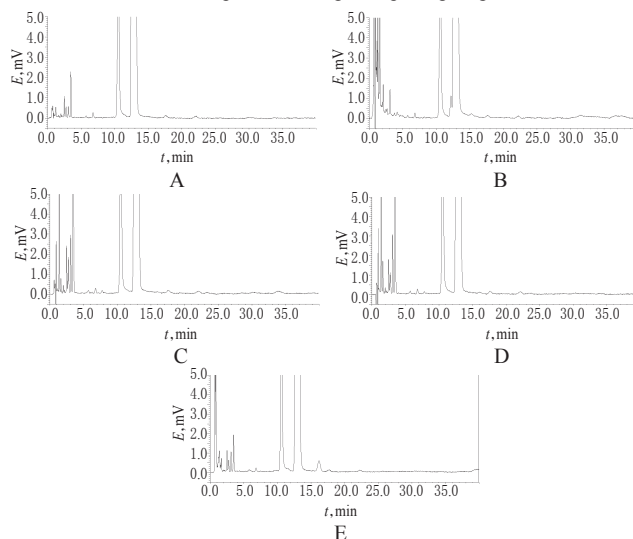


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.光破坏试验溶液;B.碱破坏试验溶液;C.热破坏试验溶液;D.酸破坏试验溶液;E.氧化破坏试验溶液

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A.destroyed by high light; B.destroyed by alkaline; C.destroyed by high temperature; D.destroyed by acid; E.destroyed by oxidation

3.2 mg/ml的贮备液。精密量取此贮备液2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 ml,分别置于50 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程 $y=11\ 994x+22\ 547$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,磷酸伯氨喹检测质量浓度在128.069~384.206 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 定量限试验

配制质量浓度为0.260 72 μg/ml的对照品溶液作为定量限试验溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,以信噪比10:1计算定量限为5.894 1 ng。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl,注入HPLC仪,重复进样测定6次。结果,磷酸伯氨喹精密度的RSD=0.3%,表明仪器的精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:110601)适量,分别于放置0、6、12、18、24 h时进样测定。结果,磷酸伯氨喹的RSD=0.5%,表明供试品溶液在24 h内的稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:110601)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,磷酸伯氨喹的RSD=0.5%,表明本方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取磷酸伯氨喹对照品约10、13、16 mg,各3份,分别置于100 ml量瓶中,加少量流动相使溶解,加入适量已知含量的供试品溶液(批号:110601),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, %
13.12	10.08	23.20	100.8		
13.12	10.11	23.23	100.7		
13.12	10.78	23.90	99.9		
13.12	13.15	26.27	100.3		
13.12	13.07	26.19	100.4	100.6	0.3
13.12	13.21	26.33	100.6		
13.12	16.23	29.35	101.0		
13.12	16.12	29.24	100.8		
13.12	16.04	29.16	100.7		

2.10 样品含量测定及含量均匀度测定

取3批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液;另取对照品适量,按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液。精密量取上述两种溶液各10 μl,分别注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算样品含量及均匀度,样品含量测定结果见表2(列出另外两种含量测定方法的结果进行比较);含量均匀度测定结果见表3。

表2 样品含量测定结果(% , n=2)

Tab 2 Result of content determination of samples(% , n=2)

批号	HPLC法	永停滴定法	硝化反应外指示剂法
110601	95.4	98.9	101.7
120401	94.6	97.5	100.6
120402	95.2	97.8	101.5

表3 样品含量均匀度测定结果(n=10)

Tab 3 Result of content uniformity(n=10)

批号	平均值, %	A	S	A+1.80S
110601	95.453	4.547	2.859	9.7
120401	95.489	4.511	3.789	11.3
120402	96.239	3.761	1.941	7.3

3 讨论

3.1 检测波长的选择

将磷酸伯氨喹对照品进行紫外扫描,最大吸收波长为265 nm,故选择265 nm为检测波长。此波长下检测灵敏度高,可

准确地测定磷酸伯氨喹含量。

3.2 HPLC法的优越性

磷酸伯氨喹片的含量测定《中国药典》2010年版是采用亚硝酸钠永停滴定法;《国际药典》第4版采用高氯酸非水溶液滴定法,电位指示终点;《美国药典》35版采用HPLC法测定含量。经研究及查阅文献^[6-7]发现,磷酸伯氨喹存在特定杂质喹西特,由于喹西特与磷酸伯氨喹母核基本一致,故采用容量法(如永停滴定法等)最终测得的磷酸伯氨喹片含量包含了主成分及杂质的含量,使得含量测定结果偏高,方法专属性较差。本试验比较了HPLC法与永停滴定法的测定结果,还参照永停滴定法原理,与采用亚硝酸钠滴定、碘化钾-淀粉作外指示剂的方法(硝化反应外指示剂法)进行比较。结果表明,HPLC法能有效排除特定杂质喹西特的干扰,准确反映样品实际含量,专属性更强、准确性更高^[8]。

3.3 方法的耐用性

笔者曾以Inertsil C₈(75 mm×4.6 mm, 3 μm)色谱柱为固定相,分别用Agilent 1200型和岛津LC-20AT型HPLC仪进行试验。结果,两台仪器所记录的系统适用性溶液色谱磷酸伯氨喹峰与喹西特峰分离度分别为3.5和3.3,灵敏度溶液的信噪比分别为11和3,磷酸伯氨喹峰理论板数分别为4 633和4 029,表明两台仪器均能满足本方法系统适用性要求,本方法的耐用性良好。

综上所述,本方法操作简单、准确性高、专属性强,适用于磷酸伯氨喹片的质量控制。

参考文献

- [1] 孙晓东,王剑,魏春,等.氯喹伍用伯氨喹治疗间日疟引起急性溶血反应1例[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012,30(3):195.
- [2] 胡克章,唐静,何本考,等.氯喹联用伯氨喹的不良反应分析[J].解放军药学学报,2011,27(6):564.
- [3] 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,2010:1 157.
- [4] The United States Pharmacopoeial Convention. USP35-NF30 [S].2012:4 412.
- [5] World Health Organization. The International Pharmacopoeia: Fourth Edition[S].2006:258.
- [6] Dongre VG, Karmuse PP, Rao PP, et al. Development and validation of UPLC method for determination of primaquine phosphate and its impurities[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008,46(2):236.
- [7] Elbashir AA, Saad B, Ali AS, et al. Enantioselective analysis of primaquine and its impurity quinocide by capillary electrophoresis[J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(3):295.
- [8] 杨兆丽,张美义,周娟,等.三种方法测定青蒿素磷酸伯氨喹片中磷酸伯氨喹含量的比较[J].浙江中西医结合杂志,2011,21(8):576.

(收稿日期:2013-06-23 修回日期:2013-12-31)