

离子对RP-HPLC法测定美沙拉嗪栓的含量及有关物质

马 郑*,董 煜,彭 涛(大连市食品药品检验所,辽宁大连 116021)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)44-4209-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.44.28

摘要 目的:建立测定美沙拉嗪栓含量及有关物质的方法。方法:采用离子对反相高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Hypersil gold,流动相A为磷酸盐缓冲液(pH 7.2)-四丁基氢氧化铵(TBAH)-甲醇-水(250:50:100:600, V/V/V/V),流动相B为磷酸盐缓冲液(pH 7.2)-TBAH-甲醇-水(250:50:500:200, V/V/V/V)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为235 nm,柱温为40 ℃,进样量为20 μl。结果:4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪检测质量浓度分别在0.039~0.79、0.04~0.81、36.12~48.16 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.998\ 7$ 、 $0.999\ 7$ 、 $0.999\ 2$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.5%;4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸平均加样回收率分别为102.91%、102.33%,RSD分别为1.5%、1.3%($n=9$)。结论:该方法准确、简便、灵敏度高、专属性好,可用于美沙拉嗪栓的质量控制。

关键词 美沙拉嗪栓;离子对反相高效液相色谱法;有关物质;含量测定

Content Determination of 5-aminosalicylic Suppository and Its Related Substances by Ion-pair RP-HPLC MA Zheng, DONG Yu, PENG Tao (Dalian Institute for Food and Drug Control, Liaoning Dalian 116021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 5-aminosalicylic suppository and its related substances. METHODS: Ion-pair RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo Hypersil GOLD column with mobile phase A consisted of phosphate buffer (pH 7.2)-TBAH-methanol-water (250:50:100:600, V/V/V/V) and mobile phase B consisted of phosphate buffer (pH 7.2)-TBAH-methanol-water (250:50:500:200, V/V/V/V) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 235 nm and column temperature was 40 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The liner range were 0.039-0.79 μg/ml for 4-aminophenol ($r=0.998\ 7$), 0.04-0.81 μg/ml for 2, 5-dihydroxybenzoic ($r=0.999\ 7$) and 36.12-48.16 μg/ml for 5-aminosalicylic ($r=0.999\ 2$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.5%. Average recovery rates of 4-aminophenol and 2, 5-dihydroxybenzoic were 102.91% (RSD=1.5%, $n=9$) and 102.33% (RSD=1.3%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is accurate, simple, sensitive and specific, and can be used for the quality control of 5-aminosalicylic suppository.

KEYWORDS 5-aminosalicylic suppository; Ion-pair RP-HPLC; Related substance; Content determination

美沙拉嗪化学名为5-氨基水杨酸,临床上常用于治疗溃疡性结肠炎。其作用机制为:通过抑制血小板激活因子和抑制结肠黏膜脂肪氧化,来改善结肠黏膜炎症。国内新药转正标准中收录了美沙拉嗪肠溶片的质量标准^[1],但并未对其有关物质进行质量控制。国内外文献报道了其原料药中的有关物质控制的方法^[2-5],对灌肠剂和微丸制剂的含量测定也有报道^[6-8],但是美沙拉嗪栓剂中主成分和有关物质的检测方法尚未有报道。为此,笔者采用离子对反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对美沙拉嗪栓的含量及有关物质进行了测定,以为其质量控制提供参考。

1 材料

2695型HPLC仪,包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、Empower工作站、2489型紫外检测器(美国Waters公司);MSA225S-100-DA型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

美沙拉嗪对照品、2,5-二羟基苯甲酸对照品、4-氨基苯酚对照品(德国福克制药股份有限公司,批号:BX2013、SCF2013、1243893);美沙拉嗪栓(德国福克制药股份有限公司,批号:13B50、12K19、10B11);甲醇为色谱纯,四丁基氢氧化铵(TBAH)、磷酸二氢钾均为分析纯,水为超纯水。

*主管药师,博士。研究方向:药品质量标准建立与方法。电话:0411-84250531。E-mail:mazhengdl@gmail.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo hypersil gold(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相A:磷酸盐缓冲液(pH 7.2)-TBAH-甲醇-水(250:50:100:600, V/V/V/V),流动相B:磷酸盐缓冲液(pH 7.2)-TBAH-甲醇-水(250:50:500:200, V/V/V/V),梯度洗脱程序见表1;流速:1.0 ml/min;检测波长:235 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	90	10
28	10	90
35	10	90
36	90	10
48	90	10

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液的制备 精密称取美沙拉嗪对照品9.63 mg、4-氨基苯酚对照品10.01 mg、2,5-二羟基苯甲酸对照品10.13 mg,置于同一25 ml量瓶中,加入甲醇适量溶解后,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液1 ml,置于100 ml

量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,即得系统适用性溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取美沙拉嗪对照品 40.13 mg,置于 100 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)溶解并稀释制成每 1 ml 中含美沙拉嗪 401.3 μg 的溶液。精密量取上述溶液 1 ml,置于 10 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,即得每 1 ml 中含美沙拉嗪 40.13 μg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品 250 mg,置于 50 ml 量瓶中,加入稀盐酸 2.5 ml,微热熔化,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)适量,放至室温,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,冰浴冷却 1 h,放至室温,滤过,精密量取续滤液 2 ml,置于 25 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 ml 置于 10 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.4 空白对照溶液的制备 取不含主药的空白样品适量,按“2.2.3”项下方法制成空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下空白对照溶液、系统适用性溶液、供试品溶液各 20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,美沙拉嗪出峰时间为 10~12 min,理论板数按美沙拉嗪峰计算应不低于 10 000,各峰之间分离度均大于 1.5。

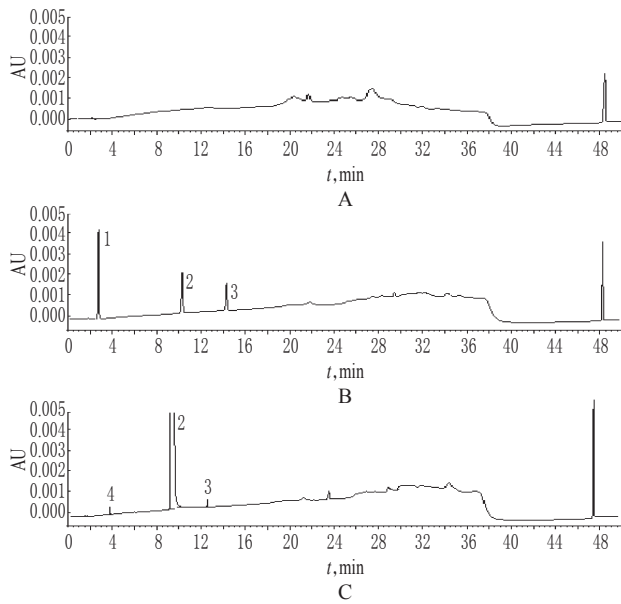


图 1 高效液相色谱图

A. 空白对照; B. 系统适用性溶液; C. 供试品; 1. 4-氨基苯酚; 2. 美沙拉嗪; 3. 2,5-二羟基苯甲酸; 4. 未知杂质

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank control; B. system suitability; C. test samples; 1. 4-aminophenol; 2. 5-aminosalicylic; 3. 2,5-dihydroxybenzoic; 4. unknown impurity

2.4 专属性试验

(1)酸破坏:精密称取样品 250 mg,置于 50 ml 量瓶中,加入稀盐酸 2.5 ml,微热熔化,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)适量,放至室温,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,冰浴冷却 1 h,放至室温,滤过,精密量取续滤液 2 ml,置于 25 ml 量瓶中,加入稀盐酸 2 ml,80 °C 水浴加热 20 min,放至室温,加入

磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,备用;(2)碱破坏:精密量取“(1)”项下的续滤液 2 ml,置于 25 ml 量瓶中,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 ml,室温放置 10 min,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,备用;(3)氧化破坏:精密量取“(1)”项下的续滤液 2 ml,置于 25 ml 量瓶中,加入 0.3% 过氧化氢溶液 2 ml,冷凝回流加热 45 min,放至室温,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,备用;(4)高温破坏:精密量取“(1)”项下的续滤液 2 ml,80 °C 水浴加热 20 min,放至室温,置于 25 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,备用;(5)光照破坏:精密量取“(1)”项下的续滤液 2 ml,(4 500 ± 500) lx 条件下照射 2 h,置于 25 ml 量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,备用。取上述 5 种溶液各 20 μl,分别注入 HPLC 仪,记录色谱,详见图 2。由图 2 可知,在酸性、碱性、氧化、高温、光照条件下样品均被破坏并产生降解产物,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,且均不干扰 4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪的测定。

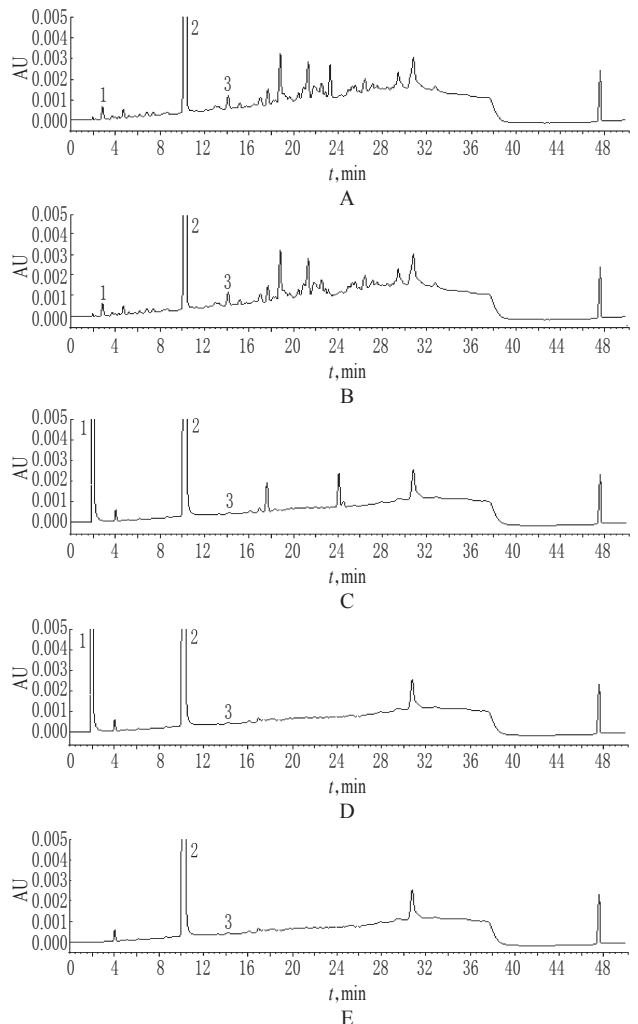


图 2 破坏性试验高效液相色谱图

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. 4-氨基苯酚; 2. 美沙拉嗪; 3. 2,5-二羟基苯甲酸

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

A. treated with acid; B. treated with alkali; C. treated with oxidation; D. treated with high temperature; E. treated with light; 1. 4-aminophenol; 2. 5-aminosalicylic; 3. 2,5-dihydroxybenzoic

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下的系统适用性溶液各1、3、5、8、10、15、20 ml,分别置于100 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,即得有关物质线性关系考察溶液。精密量取“2.2.3”项下对照品溶液3、2.5、2 ml,分别置于25 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,即得主成分线性关系考察溶液I、II、III;精密量取“2.2.3”项下对照品溶液11、9 ml,分别置于100 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,即得主成分线性关系考察溶液V、IV。分别精密量取上述各溶液20 μ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以检测质量浓度(x , μ g/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2。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and liner range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μ g/ml
4-氨基苯酚	$y=16\ 957x-135$	0.998 7	0.039~0.79
2,5-二羟基苯甲酸	$y=21\ 514x-220$	0.999 7	0.04~0.81
美沙拉嗪	$y=25\ 550x-312$	0.999 2	36.12~48.16

2.6 检测限和定量限

精密量取“2.2.1”项下系统适用性溶液逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,按信噪比 $S/N=3$ 计算4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸的检测限均为0.014 μ g/ml;按信噪比 $S/N=10$ 计算4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸的定量限均为0.040 μ g/ml。

2.7 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下系统适用性溶液20 μ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,测定。结果,4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪峰面积的RSD分别为0.9%、1.1%、0.8%,表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取样品(批号:13B50)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别放置0、2、4、6、8、10、12 h时进样测定。结果,2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪峰面积的RSD分别为1.3%、1.0%(4-氨基苯酚未检出),表明12 h内供试品溶液稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:13B50)适量,共6份,分别按“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,2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪峰面积的RSD分别为1.5%、1.1%(4-氨基苯酚未检出),表明本方法重复性良好。

2.10 有关物质加样回收率试验

精密称取4-氨基苯酚对照品25.33 mg、2,5-二羟基苯甲酸对照品25.19 mg,分别置于100 ml量瓶中,加入甲醇适量溶解后,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,即得有关物质加样回收率试验对照品溶液。取样品(批号:13B50)适量,分别加入低、中、高不同量的上述对照品溶液按“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并计算有关物质的加样回收率,结果见表3。

2.11 样品含量测定

取3批样品适量,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,按外标法以峰面积计算含量,结果见表4。

表3 有关物质加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 The average recovery of related substances($n=9$)

待测成分	所含量, μ g		测得量, μ g		加样回收率, %		平均加样回收率, RSD, %	
	μ g	μ g	μ g	μ g	%	%	%	
4-氨基苯酚	0	7.992	8.390	105.0				
	0	7.992	8.293	103.8				
	0	7.992	8.228	102.9				
	0	9.990	10.253	101.2				
	0	9.990	10.053	103.0		102.91	1.5	
	0	9.990	10.203	105.0				
	0	11.988	12.203	102.6				
	0	11.988	12.353	100.6				
	0	11.988	12.403	102.1				
	2,5-二羟基苯甲酸	2.825	8.053	11.090	102.6			
2.825		8.053	11.228	104.3				
2.825		8.053	11.140	103.3				
2.825		10.066	12.878	103.0				
2.825		10.066	13.053	101.0		102.33	1.3	
2.825		10.066	13.088	103.3				
2.825		12.079	15.028	100.8				
2.825		12.079	15.303	101.6				
2.825		12.079	15.088	102.0				

表4 样品含量测定结果(% , $n=3$)

Tab 4 Results of content determination of samples(% , $n=3$)

批号	美沙拉嗪
13B50	101.4
12K19	101.6
10B11	101.8

2.12 样品有关物质测定

精密称取样品250 mg,置于50 ml量瓶中,加入稀盐酸2.5 ml,微热熔化,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)适量,放至室温,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,冰浴冷却1 h,放至室温,滤过,精密量取续滤液2 ml,置于25 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,作为有关物质测定供试品溶液。精密量取“2.2.1”项下系统适用性溶液1 ml,置于10 ml量瓶中,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.2)稀释至刻度,摇匀,即得美沙拉嗪质量浓度为0.384 3 μ g/ml、4-氨基苯酚质量浓度为0.394 8 μ g/ml、2,5-二羟基苯甲酸质量浓度为0.404 8 μ g/ml的有关物质测定对照品溶液。取上述两种溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,按外标法以峰面积计算有关物质的含量(4-氨基苯酚相对于美沙拉嗪保留时间约为0.14,2,5-二羟基苯甲酸相对于美沙拉嗪保留时间约为1.86),结果见表5。

表5 样品有关物质测定结果(% , $n=3$)

Tab 5 Results of content determination of related substance in samples(% , $n=3$)

批号	4-氨基苯酚	2,5-二羟基苯甲酸	其他单个最大未知杂质
13B50		0.5	0.05
12K19		0.4	0.07
10B11		0.4	0.04

3 讨论

3.1 检测波长的选择

通过紫外扫描可知,4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪在235 nm波长处均有最大吸收,且在该波长处基质的干

局部外用噻吗洛尔治疗婴幼儿血管瘤的研究进展^Δ

王霞^{1,2*}, 胡焰^{1,2}, 王琼³, 武会芝^{1,2}, 江爱³, 李勇⁴, 李健和^{1#}(1.中南大学湘雅二医院药学部,长沙410011;2.中南大学药学院,长沙410013;3.湖南师范大学化学化工学院,长沙410012;4.南华大学附属南华医院,湖南衡阳421000)

中图分类号 R732.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)44-4212-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.44.29

摘要 目的:为促进临床合理使用相关药物治疗婴幼儿血管瘤(IH)提供参考。方法:检索PubMed、Medline、EMBase/EM、IPA及中国期刊全文数据库(CNKI)等数据库收录的2008年5月—2013年12月发表的有关β-受体阻滞药噻吗洛尔局部外用治疗IH的国内外文献,就该方面的研究进展进行综述。结果:针对婴幼儿眼睑、脸部、臀部等多个部位的浅表型血管瘤,局部外用噻吗洛尔溶液剂或凝胶剂等可使血管瘤尺寸、厚度和颜色明显减小和消退,效果显著且不良反应较少。结论:局部外用噻吗洛尔治疗IH简便、安全、有效,可作为增生期浅表型血管瘤的首选外用药物,或者辅助全身口服药物治疗,适合在各级医疗卫生机构推广应用。

关键词 噻吗洛尔;局部外用;婴幼儿血管瘤

婴幼儿血管瘤(Infantile hemangioma, IH)是一种儿童时期最常见的良性肿瘤,新生儿发病率为10%~12%,男女比例为1:3~1:5^[1]。通常根据病灶位置分为浅表型、深部型和混合型;根据病变发展过程分为增生期、消退期和消退完成期。其典型临床表现是出生后1年内快速增殖,以后逐渐缓慢消退。自法国医师Leaute-Labreze C等^[2]于2008年6月在《新英格兰医学杂志》上首次报道普萘洛尔用于IH的治疗后,此方法立即引起了各国学者的关注,为血管瘤的治疗开辟了新途径,开创

了β-受体阻滞药治疗血管瘤的先河。近年来,其他β-受体阻滞药如噻吗洛尔、醋丁洛尔、阿替洛尔在治疗IH方面也显示出巨大的潜力,疗效被不断证实。笔者检索PubMed、Medline、EMBase/EM、IPA及中国期刊全文数据库(CNKI)等数据库收录的2008年5月—2013年12月发表的有关β-受体阻滞药噻吗洛尔局部外用治疗婴幼儿血管瘤的国内外文献,就该方面的研究进展进行综述,旨在为促进临床合理使用相关药物治疗IH提供参考。

扰相对较少,故选择235 nm作为本方法的检测波长。

3.2 流动相的选择

4-氨基苯酚、2,5-二羟基苯甲酸、美沙拉嗪均为酸性化合物,故本方法在流动相中添加了离子对试剂TBAH,以保持色谱条件的稳定。

3.3 样品的稳定性

本研究结果发现,本品在酸性、碱性、氧化、高温、光照条件下均不稳定,长期放置易受环境因素影响导致杂质的产生^[9]。因此,本品在贮藏过程中应注意酸、碱、氧化、高温、光照对质量的影响。

综上所述,本方法准确、简便、灵敏度高、专属性好,可用于美沙拉嗪栓的质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会.国家药品标准:WS1-(X-038)-2003Z[S].2003.

[2] 宋冬梅,杨永健.美沙拉嗪中有关物质的HPLC-电化学检

Δ基金项目:湖南省发改委科研项目(No.湘发改高技[2012]1493号)

* 硕士研究生。研究方向:新制剂新剂型。电话:0731-85292093。E-mail:wangxiajn1020@163.com

通信作者:副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:新药开发及药物经济学。电话:0731-85292093。E-mail:lijianhexy@126.com

测法测定[J].中国医药工业杂志,2010,38(6):442.

[3] Brian SK, Tom C, Yury R. Ion-pairing high-performance liquid chromatographic method for the determination of Saminosalicylic acid and related impurities in bulk chemical[J]. *J Chromatogr*, 1991, 588(1/2):187.

[4] 李伟,程传玲,徐桂清.美沙拉嗪中有机杂质的探讨[J].中国医药工业杂志,2002,33(11):554.

[5] 郑小丹,高丽,王锦刚.高效液相色谱法测定美沙拉嗪控释胶囊的有关物质[J].黑龙江医药,2012,25(3):375.

[6] 高青,赵明.离子对色谱法测定颇得斯安灌肠剂中美沙拉嗪的含量及其降解产物[J].中国药科大学学报,1999,30(5):370.

[7] 朱淑芳,李晓华,王耀华.高效液相色谱法测定美沙拉嗪/甲硝唑结肠靶向微丸的含量[J].河北职工医学院学报,2007,24(2):3.

[8] 韩伟,刘瑞丽,张晓坚.反相高效液相色谱法测定美沙拉嗪结肠靶向微丸的含量[J].中国临床保健杂志,2009,12(1):51.

[9] 丁立新,韩宁.美沙拉嗪肠溶片稳定性的研究[J].黑龙江医药科学,2007,30(1):20.

(收稿日期:2014-06-24 修回日期:2014-10-06)