

RP-HPLC法测定阿加曲班注射液的含量

郭旭光*, 郑子栋(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3141-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.24

摘要 目的:建立测定阿加曲班注射液含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil ASB C₁₈, 流动相为甲醇-0.002 5%冰醋酸溶液(pH值5.0)(50:50), 流速为0.8 ml/min, 柱温为45℃, 检测波长为259 nm。以阿加曲班21位R/S异构体峰面积之和测定其含量。结果:阿加曲班21位R/S异构体的保留时间分别为38.01、40.49 min, 阿加曲班检测质量浓度线性范围为39.84~149.40 μg/ml($r=0.9998$), 平均回收率为99.7%, RSD=0.64%。结论:建立的方法简便、准确、可靠、专属性强, 可用于阿加曲班注射液的含量测定。

关键词 反相高效液相色谱法;阿加曲班注射液;含量测定

Content Determination of Argatroban Injection by RP-HPLC

GUO Xu-guang, ZHENG Zi-dong (Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of Argatroban injection. METHODS: RP-HPLC was adopted. The determination was performed on Venusil ASB C₁₈ column with mobile phase composed of methanol-0.002 5% glacial acetic acid water solution (pH 5.0) (50:50) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was set at 45 °C and the detection wavelength was 259 nm. The content of argatroban was determined by peak area of argatroban 21 R/S isomers. RESULTS: The retention time of argatroban 21 R/S isomers were 38.01 min and 40.49 min respectively. The linear range of argatroban was 39.84-149.40 μg/ml ($r=0.9998$) with an average recovery of 99.7% (RSD=0.64%). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reliable and specific which can be used for the content determination of Argatroban injection.

KEY WORDS RP-HPLC; Argatroban injection; Content determination

阿加曲班是化学合成的低分子化合物,为精氨酸的衍生物,化学名为:(2*R*,4*R*)-4-甲基-1- $\{N$ -[(*R*,*S*)-3-甲基-1,2,3,4-四氢-8-喹啉磺酰基]-*L*-精氨酸基]-2-哌啶羧酸。其能直接与凝血酶的催化活性位点可逆结合,灭活凝血酶,并能进入到血栓内部直接灭活已与纤维蛋白结合的凝血酶,是一种临床用新型抗凝剂^[1],主要用于缺血性脑梗死急性期患者的抗凝治疗。该药最早由日本三菱化学研究所研制,剂型为注射剂,2005年在中国上市。阿加曲班注射液在国家食品药品监督管理局标准(试行)^[2]中是采用分光光度法测定其含量,专属性较差。而采用高效液相色谱(HPLC)法测定阿加曲班的含量国内未见文献报道。笔者参考相关文献^[3-8],采用反相(RP)-HPLC法测定了阿加曲班注射液的含量,结果表明该法操作简便,结果准确可靠、专属性强,可用于该制剂的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 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)。

1.2 药品与试剂

阿加曲班对照品(加拿大TRC公司,批号:12-YM-120-1,纯度:98.0%);4-异丙基苯甲酸(内标,上海晶纯试剂有限公司,批号:19163,纯度:98.0%);阿加曲班注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号:2012060301、2012060302、2012060303,

*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

规格:10 mg:20 ml);甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Venusil ASB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.002 5%冰醋酸溶液(用氨试液调pH值至5.0)(50:50),流速为0.8 ml/min;检测波长为259 nm;柱温为45℃;进样量为10 μl。

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液进样分析,色谱图见图1。

由图1可见,在上述条件下,阿加曲班与相邻的杂质峰均达到基线分离,阿加曲班峰和内标4-异丙基苯甲酸峰的分度度为19.25,阿加曲班21位R异构体和21位S异构体的分度度为1.30,阿加曲班21位R/S异构体峰理论板数分别为6 593和6 806。

2.2 溶液的制备

2.2.1 内标溶液。取4-异丙基苯甲酸1 g,加甲醇稀释至200 ml,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液。取阿加曲班对照品约25 mg,精密称定,置于25 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,精密加入内标溶液0.5 ml,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液。精密量取本品2 ml,置于10 ml量瓶中,精密加入内标溶液0.5 ml,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液。取处方比例混合的空白辅料(山梨醇,

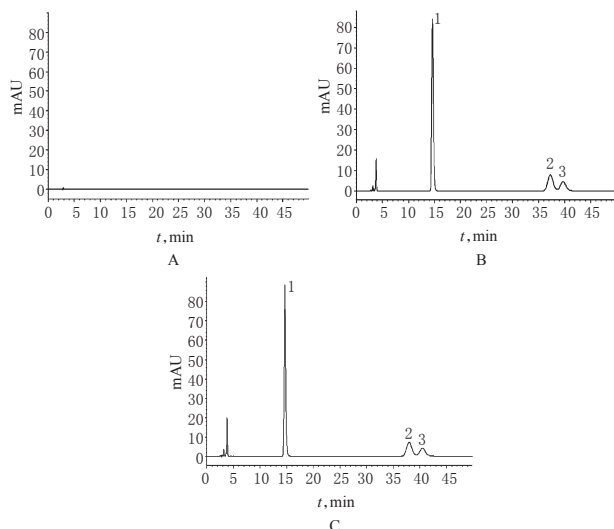


图1 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 内标; 2, 3. 阿加曲班 21 位 *R/S* 异构体

Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative control; B. reference substance; C. test sample; 1. internal standard; 2, 3. argatroban 21 *R/S* isomers

注射用水),按“2.2.3”项下方法制备成不含阿加曲班和内标的阴性对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密称取阿加曲班对照品 25.05 mg,置于 25 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 ml,分别置于 10 ml 量瓶中,精密加入内标溶液 0.5 ml,加流动相稀释制成混合溶液,各进样 10 μ l,测定。以对照品质量浓度(c)为横坐标,阿加曲班与内标峰面积的比值(A)为纵坐标,得阿加曲班线性回归方程: $A=0.005c+0.0049(r=0.9998)$,表明阿加曲班检测质量浓度线性范围为 39.84~149.40 μ g/ml。

2.4 空白辅料干扰试验

取“2.2.4”项下阴性对照溶液,进样 10 μ l,结果辅料不干扰本品中阿加曲班的测定,色谱图见图 1。

2.5 精密度试验

取“2.3”项下阿加曲班质量浓度为 99.60 μ g/ml 的溶液,每次进样 10 μ l,记录峰面积,重复 6 次,结果平均峰面积为 955.3, $RSD=0.8\%$ ($n=6$)。

2.6 稳定性试验

取“2.2.3”项下的供试品溶液(批号:2012060301),分别在 0、2、4、6、8、12 h 注入色谱仪,记录峰面积,计算峰面积的 $RSD=0.58\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密量取同一样品(批号:2012060301)6 份,按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液,进样,分别测定其含量。结果,阿加曲班的平均含量为 99.6%, $RSD=0.7\%$,表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称取阿加曲班对照品和处方比例的空白辅料,置于 100 ml 量瓶中,精密加入内标溶液 5 ml,用流动相稀释至刻度,摇匀,制备 3 种不同质量浓度的溶液各 3 份,共 9 份,照“2.9”项

下方法测定含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=3$)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
8.05	8.02	99.63	99.7	0.64
7.95	7.90	99.37		
8.19	8.05	98.29		
10.42	10.45	100.29		
10.05	10.02	99.70		
9.81	9.79	99.80		
11.77	11.78	100.08		
12.32	12.28	99.68		
12.11	12.17	100.50		

2.9 样品含量测定

取样品按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样 10 μ l,记录色谱,按内标法以阿加曲班 21 位 *R/S* 异构体峰面积之和测定并计算含量;同时与国家食品药品监督管理局标准(试行)^[3]所采用的分光光度法(检测波长 332 nm)测定结果比较,结果两种方法结果基本一致,见表 2。

表 2 2 种方法含量测定结果比较

Tab 2 Comparison of results of content determination by two kinds of methods

批号	本法,%	分光光度法,%
2012060301	99.6	99.3
2012060302	99.8	99.6
2012060303	99.8	99.5

3 讨论

取本品适量用流动相稀释后,置于紫外-可见分光光度计上测定,结果阿加曲班分别在 259、332 nm 波长处有最大吸收,参考相关文献^[2-5]中阿加曲班含量和有关物质测定的色谱条件,最终选择 259 nm 为检测波长。

笔者参考相关文献^[2-5]考察和比较了 3 种流动相:①甲醇-0.5%醋酸铵-0.01 mol/L 醋酸钠-冰醋酸(400:80:120:3.0)^[2];②流动相 A:冰醋酸缓冲液(取冰醋酸 2.5 ml 用水稀释至 1 000 ml 并用氨试液调节 pH 值至 5.0)-甲醇,流动相 B:冰醋酸缓冲液-甲醇(20:80),梯度洗脱^[5];③甲醇-0.002 5%冰醋酸溶液(用氨试液调 pH 值至 5.0)(50:50)。经试验:流动相①条件下阿加曲班 2 个主峰完全重合;流动相②条件下阿加曲班 2 个主峰的分离度为 0.118,分离度不好;流动相③条件下阿加曲班 2 个主峰分离度约为 1.3,分离较良好,理论板数分别为 6 593、6 806,拖尾因子分别为 0.987、0.983,分离效果均较满意。故选择流动相③为本品含量测定方法的流动相组成。

因阿加曲班 21 位 *R/S* 异构体均有凝血酶抑制作用,且 *S* 型异构体略强于 *R* 型,所以本文用 21 位 *R/S* 异构体峰面积之和测定其含量;本文选择内标法测定阿加曲班的含量,在一定程度上消除了由操作条件等的变化所引起的误差,内标 4-异丙基苯甲酸与阿加曲班(具有嘧啶羧酸的结构)理化性质接近且不发生反应,并且内标峰与主峰及其他峰均分离较好(见图 1),较为理想。

综上所述,本文建立的方法专属性强、灵敏度高、操作简便,与国家标准方法比较可以更好地控制本品的质量。

参考文献

HPLC法测定莫匹罗星喷雾剂的含量

范莹^{1*}, 杨钊²(1. 济南军区青岛第一疗养院, 山东青岛 266071; 2. 青岛市药品检验所, 山东青岛 266071)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3143-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.25

摘要 目的: 建立测定莫匹罗星喷雾剂含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent XB C₁₈, 流动相为 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液-乙腈(75:25), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 230 nm。结果: 莫匹罗星检测质量浓度线性范围为 0.097 8~0.293 4 mg/ml($r=0.999 4$), 平均回收率为 102.08%, RSD=0.86%($n=9$)。结论: 建立的方法简便、快速、重复性好, 可用于莫匹罗星喷雾剂的质量控制。

关键词 莫匹罗星喷雾剂; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Mupirocin Spray by HPLC

FAN Ying¹, YANG Zhao²(1. Qingdao First Sanatorium of Jinan Military Command, Shandong Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Institute for Drug Control, Shandong Qingdao 266071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of Mupirocin spray. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent XB C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1 mol/L NaH₂PO₄ buffer-acetonitrile (75:25) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm. RESULTS: The linear range of mupirocin was 0.097 8-0.293 4 mg/ml ($r=0.999 4$) with an average recovery of 102.08% (RSD=0.86%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and reproducible for the quality control of Mupirocin spray.

KEY WORDS Mupirocin spray; HPLC; Content determination

莫匹罗星喷雾剂是由我院(济南军区青岛第一疗养院)自主研发的新制剂,是以莫匹罗星为主药,加入成膜材料甲壳素和聚乙烯吡咯烷酮等制成,局部外用可治疗各种敏感菌引起的皮肤感染。莫匹罗星为局部外用抗生素,对革兰阳性球菌,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有很高的抗菌活性,具有在低浓度下呈现抑菌的效果,故可作为烧烫伤创面 MRSA 感染,尤其是 MRSA 感染的首选局部抗菌药物。笔者参考文献^[1-3]方法建立了测定莫匹罗星喷雾剂含量的高效液相色谱(HPLC)法,以期能有效地控制其质量。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司); AG204 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司); PB-10 型 pH 计(北

京 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

莫匹罗星对照品[美国药典医药标准物质研发(上海)有限公司,批号:F2C158,纯度:100%];莫匹罗星原料药(江苏沃尔德实业有限公司,批号:090301MP,纯度:95.9%);莫匹罗星喷雾剂(济南军区青岛第一疗养院药剂研究中心提供,批号:20100320、20100321、20100322,规格:每支 20 ml,含量:2%);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,所用水均为纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent XB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液-乙腈(75:25), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μl。

2.2 对照品溶液的制备

[1] 戴晓岚. 阿加曲班联合依达拉奉治疗房颤合并脑栓塞的临床疗效评价[J]. 中国药房, 2011, 22(22): 2 075.

[2] 国家食品药品监督管理局. YBH11142005 阿加曲班[S]. 2005-05-10.

[3] 国家食品药品监督管理局. YBH11152005 阿加曲班注射液[S]. 2005-05-10.

[4] 国家食品药品监督管理局. JX20090312 阿加曲班注射液[S]. 2009-03-12.

[5] 日本公定书协会. 日本药局方[S]. 16 版. 东京: 株式会社, 2011: 359-360.

[6] 张皓, 杨金荣, 高顺昌, 等. HPLC 法测定精氨酸布洛芬喷雾剂的含量[J]. 天津医科大学学报, 2010, 16(2): 229.

[7] 庄苒. 柱前衍生化 HPLC 法测定复方布洛芬缓释胶囊中精氨酸的含量[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(14): 2 300.

[8] 肖昌钱, 廉洪, 金锦, 等. 注射用阿加曲班与 5 种输液配伍的稳定性考察[J]. 海峡药学, 2010, 22(9): 18.

(收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2012-12-20)

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0532-51885535。E-mail: fanry0701@sohu.com