

法制得供试品溶液,进样 10 μL,分别测定并计算样品含量。结果见表 2。

表 2 样品测定结果 mg · g⁻¹

批号	大黄素	大黄酚	大黄素和 大黄酚	连翘苷
070416	0.017 4	0.027 1	0.044 5	0.008 4
070417	0.017 8	0.027 1	0.044 9	0.009 2
070418	0.018 2	0.028 0	0.046 2	0.011 9

3 讨论

3.1 本品为水包油型乳膏剂 连翘和大黄是本方中的主药,由于处方组分复杂,乳膏中辅料和大量亲水及亲脂性基质干扰测定,因此,检测样本的提取、纯化是影响定量分析灵敏、准确的关键因素。笔者依据各指标成分的特点,选用不同溶剂及配比对样本进行提取方法优化筛选,乳膏以先破乳再提取的方法可以达到最大面积的接触溶剂并充分提取的效果^[3];对于亲脂性强的组分,可利用溶剂极性差异,改变溶解条件以达到减少组分干扰、纯化样品的目的。以 HPLC 法测定

连翘苷、大黄素和大黄酚含量,检测结果准确、方法重复性好。

测定方法依君、臣、佐、使顺序筛选^[4],连翘为本方君药,对其主要成分连翘苷进行定量分析,由于连翘苷紫外检测灵敏度较低,因此,在样本提取、纯化方法上进行细致考察。样本经方法学验证重复性良好,能达到较好分离但检测线较高,在批次生产中乳膏检测易受连翘药材含量差异影响,且样本提取方法较繁琐,故本法建立是验证生产工艺稳定的理论依据,同时对连翘药材和中药提取物进行质量监控。

参考文献

- [1] 中国药科大学. 中药辞海(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 325 - 327, 1756 - 1758.
 - [2] 中国药科大学. 中药辞海(二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 251 - 255, 1219 - 1221.
 - [3] 罗明生, 高天惠, 侯世祥, 等. 药剂辅料大全 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1999: 237, 345, 760
 - [4] 杨云, 冯卫生. 中药化学成分提取分离手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 16 - 21, 177 - 179.
- DOI 10.3870 /yydb.2012.07.032

高效液相色谱法测定佐匹克隆有关物质

李彦¹ 李银峰² 靳朝东²

(1. 天津中医药大学, 300193; 2. 天津药物研究院分析测试中心, 300193)

摘要 目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定佐匹克隆的有关物质。方法 色谱柱为 Welchrom-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.05 mol · L⁻¹磷酸氢二钠(pH = 7.5)(35: 65)为流动相,流速为 1 mL · min⁻¹,检测波长为 303 nm,柱温 30 ℃。结果 佐匹克隆的线性范围为 0.003 3 ~ 0.656 4 mg · mL⁻¹,回归方程: A = 32 991C + 3.672 4, r = 0.999 9。精密度 RSD = 0.13% (n = 6),重复性 RSD = 1.01% (n = 6),最小检出限 0.6 ng,平均回收率 100.16% (RSD = 1.03%)。结论 该方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,可用于佐匹克隆有关物质检查。

关键词 佐匹克隆; 有关物质; 色谱法; 高效液相

中图分类号 R971.3; R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004 - 0781(2012)07 - 0928 - 03

佐匹克隆是新型的非苯二氮䓬类镇定安眠药,其作用于苯二氮䓬受体而结合方式不同于苯二氮䓬药物。本品速效催眠^[1],能显著改善睡眠质量,减少觉

醒次数,具有疗效好、起效快、安全性高、次晨残留作用小、不良反应少^[2]等特点。有关物质含量测定是衡量药品质量的重要检查项目,国家药品标准^[3]用薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)法对佐匹克隆有关物质进行检测,但不能定量检出杂质。而《欧洲药典》佐匹克隆有关物质检查方法^[4]中流动相填加了十二烷基硫酸钠(SDS),对色谱柱损害较大,为此本实验开发研究新的有关物质检查方法。

收稿日期 2011 - 11 - 16 修回日期 2012 - 03 - 01

作者简介 李彦(1983 -),女,山东泰安人,在读硕士,从事药物分析工作。电话: (0) 15222890855, E-mail: liyan12011003@163.com。

通讯作者 靳朝东(1964 -),男,天津人,研究员,硕士,从事药物分析工作。电话: 022 - 23006877, E-mail: tjjinced@163.com。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱系统(紫外检

测器) ,HP8453 紫外分光光度计 ,As3120 超声波清洗机。

1.2 试剂 佐匹克隆(粗品、对照品,批号:110301,110302,110303)、合成中间体 I、II、III、IV、V、VI(I 还原物《欧洲药典》杂质 B、II 合环物、III 缩合物、IV 吡嗪-2,3-二羧酸、V 吡嗪-2,3-酸酐、VI 2-氨基-5-氯-吡啶由天津药物研究院化药合成部提供)及欧洲药典杂质 A、C(Ⅶ杂质 A、Ⅷ杂质 C 购自北京绿百草科技发展有限公司),乙腈色谱纯,磷酸氢二钠、磷酸二氢钠为分析纯,盐酸、磷酸分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom-C₁₈(4.6 mm × 250 mm 5 μm),流动相为 0.05 mol · L⁻¹磷酸氢二钠(用 10% 的磷酸调至 pH = 7.5)-乙腈(65 : 35);流速为 1 mL · min⁻¹;检测波长 303 nm;进样量为 20 μL,柱温 30 °C。

2.2 检测波长的确定 取本品,加 0.1 mol · L⁻¹盐酸制成每毫升含本品 15 μg 的溶液,测定,本品在 216,304 nm 波长处有最大吸收,参照《欧洲药典》^[4]选择有关物质的检测波长,为 303 nm。

2.3 线性关系考察 精密称取佐匹克隆 32.82 mg,置 50 mL 棕色量瓶,加流动相溶解,稀释至刻度、摇匀。逐步稀释为 0.656 4,0.492 3,0.328 2,0.164 1,0.032 82,0.016 41,0.003 282 mg · mL⁻¹作为线性实验溶液。分别量取 20 μL 注入液相色谱仪,测定,记录色谱图,以峰面积(A)为纵坐标、样品浓度(C,mg · mL⁻¹)为横坐标进行线性回归,回归方程为 $A = 32.991C + 3.6724$, $r = 0.9999$ 。佐匹克隆在 0.003 282 ~ 0.656 4 mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.4 最小检出限的测定 将“2.3”项下母液定量稀释成 0.098 46 mg · mL⁻¹ 溶液,照上述色谱条件进样,记录色谱图。按信噪比 3 : 1 计算,佐匹克隆最小检出限为 0.6 ng。

2.5 精密度实验 精密称取佐匹克隆约 3.5 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加流动相溶解,稀释至刻度、摇匀。照上述色谱条件,重复进样 6 次,记录色谱图。计算主峰峰面积相对偏差,RSD 为 0.13% (n = 6)。结果表明精密度良好。

2.6 重复性实验 精密称取佐匹克隆 6 份,每份约 3.5 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加流动相溶解,稀释至刻度、摇匀。照上述色谱条件,分别进样,记录色谱图,计算有关物质相对偏差,RSD 为 1.01%。结果表明重复性良好。

2.7 稳定性实验 取精密度实验下的样品溶液,分别

在 0,2,4,8,12,24 h,照上述色谱条件,分别进样,记录色谱图。杂质峰面积、有关物质的 RSD 分别为 2.15% 和 1.33%。结果表明在棕色瓶中,样品溶液放置 24 h,杂质含量变化不大。

2.8 破坏性实验

2.8.1 未破坏样品实验 精密称取佐匹克隆约 17.5 mg,置 50 mL 棕色量瓶,加流动相溶解,稀释至刻度、摇匀,作为对照溶液,照上述色谱条件进样,记录色谱图,见图 1A。

2.8.2 酸破坏实验 精密称定佐匹克隆约 7 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶解,稀释至刻度、摇匀,静止放置 20 min。再用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至中性,照上述色谱条件进样,记录色谱图,降解产物均可与佐匹克隆峰良好分离,见图 1B。

2.8.3 碱破坏实验 精密称定佐匹克隆约 7 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液溶解,稀释至刻度、摇匀,静置 20 min。再用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸调至中性,照上述色谱条件进样,记录色谱图,降解产物均可与佐匹克隆峰良好分离,见图 1C。

2.8.4 光照破坏实验 取对照溶液 2 mL 置透明进样瓶中,在日光下照射 8 h 后,照上述色谱条件进样,记录色谱图,降解产物均可与佐匹克隆峰良好分离,见图 1D。

2.8.5 加热破坏实验 取对照溶液 10 mL 置于圆底烧瓶,加热回流 30 min,冷却至室温,照上述色谱条件进样,记录色谱图,降解产物均可与佐匹克隆峰良好分离,见图 1E。

2.8.6 氧化破坏实验 取对照溶液 10 mL 置棕色量瓶,加 6% 过氧化氢 1 滴,静置 20 min,照上述色谱条件进样,记录色谱图,降解产物均可与佐匹克隆峰良好分离,见图 1F。

2.8.7 中间体及杂质的检出 精密称取佐匹克隆约 3.5 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加流动相溶解。再分别加入样品合成中间体及《欧洲药典》杂质 A 和 C,稀释至刻度、摇匀。照上述色谱条件进样,记录色谱图。结果表明:佐匹克隆与合成中间体及其杂质能很好的分离。在样品中 2-氨基-5-吡啶保留时间约 6.0 min,其他杂质为未知物,见图 1G。

2.9 样品有关物质检测 精密称取 3 批样品约 3.5 mg,置 10 mL 棕色量瓶,加流动相溶解,稀释至刻度、摇匀,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 棕色量瓶,加流动相稀释至刻度,作为 1% 自身对照溶液。照上述色谱条件进样,记录色谱图。3 批样品的检测结果见表 1。

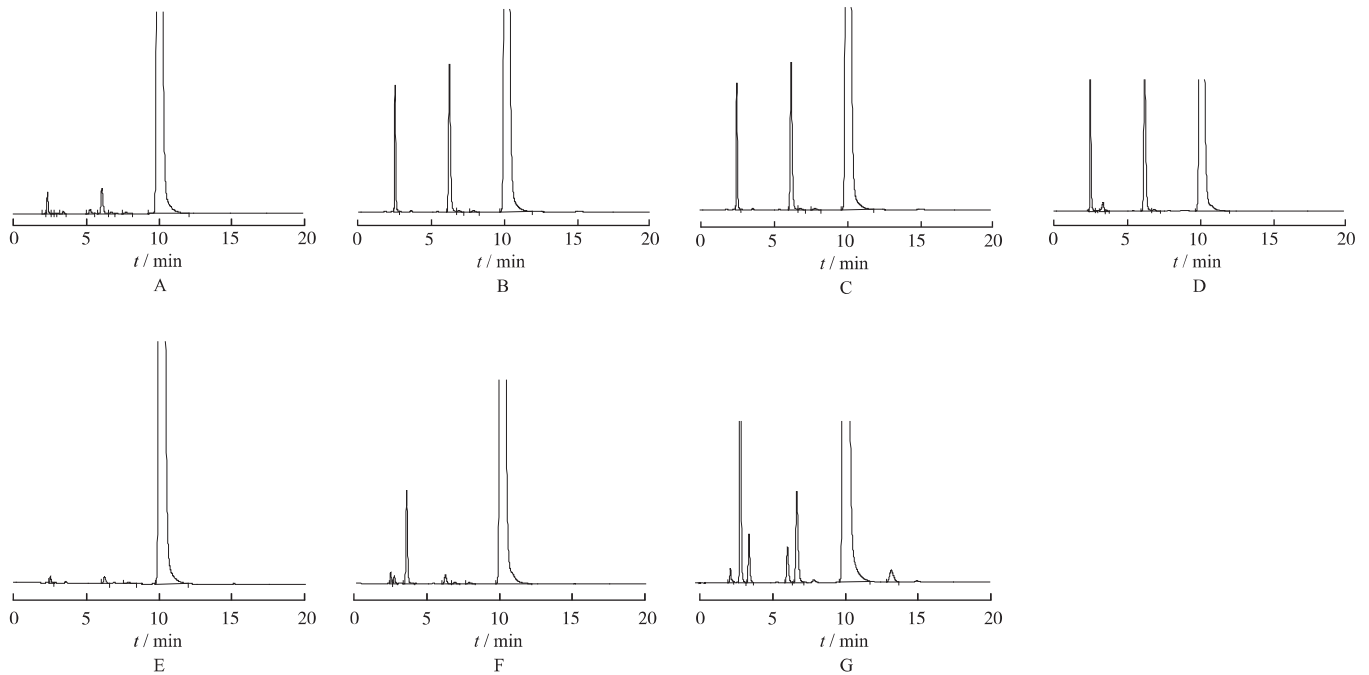


图1 样品经不同处理后杂质的 HPLC 图

A. 原样品; B. 酸破坏; C. 碱破坏; D. 光照破坏; E. 加热破坏; F. 氧化破坏; G. 中间体及杂质

表1 3批样品有关物质检测结果

批号	供试品溶液的 面积	1%自身对照 溶液的面积	有关物质/ %
110301	10 385.7	108.0	0.01
110302	10 362.3	104.6	0.01
110303	10 758.6	107.7	0.01

2.10 加样回收实验 精密称取对照溶液样品用量的80%、100%、120%各3份,照上述色谱条件进样,记录色谱图。结果平均回收率100.16%,RSD=1.03%。

2.11 含量测定 取样品0.3g,精密称定,加冰醋酸20mL溶解,加结晶紫指示液1滴,用0.1mol·L⁻¹高氯酸滴定液照非水滴定法滴定至溶液显蓝色,并将滴定的结果用空白实验校正。结果批号为110301,110302,110303的样品,佐匹克隆平均标示含量分别为99.53%,99.37%,99.44%。

3 讨论

已报道的关于佐匹克隆有关物质检测方法多采用《欧洲药典》中的酸性缓冲液测定法^[5-7],此方法流动相中使用的SDS会影响色谱柱的使用寿命。本实验流动相使用磷酸盐溶液作为缓冲溶液,此缓冲盐容易洗脱。与使用SDS相比,对色谱柱的损害较小。当流动相为0.05mol·L⁻¹磷酸氢二钠-甲醇(65:35)(pH=3.5),佐匹克隆样品出峰时间约在12min,杂质C出峰

时间约在90min,杂质C出峰时间较长。当流动相为0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钠-乙腈(65:35)(pH=3.5),佐匹克隆约4min,杂质C约14min,主峰与合成中间体及其他杂质分离不好。按《欧洲药典》中佐匹克隆、杂质A、B、C保留时间是分别为17.3、10.5min。当选用本方法流动相时,佐匹克隆约9.9min出峰,《欧洲药典》杂质A、B、C出峰时间分别为3.4、6.7、13min,可很好检出各个中间体和杂质A、B、C。

参考文献

- [1] 张晋,林力. 佐匹克隆与氯硝西洋治疗睡眠障碍的临床对照观察[J]. 中国医院药学杂志 2011, 31(1): 63-64.
- [2] 王领军,杨广声,王传升. 右佐匹克隆治疗失眠症92例[J]. 医药导报 2010, 29(10): 1277-1278.
- [3] 国家食品药品监督管理局国家药品标准[S]. WS₁-(X-061)-2004Z: 52-137.
- [4] 欧洲药典委员会. 欧洲药典[M]. 5.0版, 2005: 2735-2736.
- [5] 潘正斐. 高效液相色谱法测定佐匹克隆的有关物质[J]. 中国热带医学 2011, 11(8): 985-986.
- [6] 刘惠军,吴丽红. 佐匹克隆原料及片剂有关物质的HPLC测定[J]. 中国药学杂志 2008, 43(12): 954-956.
- [7] 董莉,陈雨. HPLC法测定佐匹克隆片的含量及有关物质[J]. 中国药品标准 2009, 10(4): 288-290.

DOI 10.3870/yydb.2012.07.033