

RP-HPLC 测定立复欣注射液的含量

陶 涛 邢贞建 郭粤霞 何广成(广州 510095 广州市胸科医院药剂科)

摘要 目的: 建立一种快速简便的反相 HPLC 法测定立复欣注射液的含量, 同时考察 25℃ 立复欣注射液在 5% GS, 0.9% NS 和 10% GNS 中的稳定性。方法: 采用 Lichrospher 100(RP-8, 5μm × 250mm) 柱, 以甲醇-乙腈-0.04M KH₂PO₄ 溶液(31.5: 31.5: 37) 为流动相, 流速 1 ml/min, 柱温 40℃, 254nm 紫外检测; 观察溶液的外观并用酸度计测定其 pH 值。结果: 回收率为 100.87%, RSD= 1.4% (n= 5), 在 4~ 120 mg/l 范围内, 峰面积对浓度呈良好的线性关系, $r= 0.99989$; 25℃ 下样品在输液中的 pH 值, 含量及颜色在 0~ 6h 内均无明显变化。结论: 本法简速, 灵敏度高, 准确性好; 25℃ 时, 6h 内样品在上述输液中稳定性好。

关键词 R-HPLC; 利福霉素; 稳定性

Determination of Rifamycin by RP-HPLC

TaoTao (TT), Xing Zhen-jian (XZJ), Guo Yue-xia (GYX), He Guang-cheng (HGC) (Dept. of pharmacy. The Chest Hospital of Guang Zhou, Guang Zhou 510095.)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a RP-HPLC method for assay and evaluate the stability of Rifamycin in 5% GS, 0.9% NS and 10% GNS at 25°C for 6 hours. **METHOD:** HPLC condition column: Lichrospher 100(RP-8, 5 μm × 250 mm), the mobile phase: methanol-acetonitrile-0.04M KH₂PO₄ (31.5: 31.5: 37), the flow rate: 1 ml/min, the column temperature: 40°C, the wavelength of UV detection: 254 nm. The pH was determined with a pH meter. **RESULTS:** the average recovery, were 100.87%, RSD= 1.4% (n= 5), the linear range was 4~120mg/l, r= 0.99989. There was no significant change in pH and Rifamycin concentration at 25°C for 6 hours. **CONCLUSIONS:** The method was simple, rapid, sensitive and accurate, suitable for the quantitation analysis of Rifamycin, and Rifamycin in 5% GS, 0.9% NS and 10% GNS can be used at 25°C for 6 hours.

KEY WORDS: RP-HPLC, Rifamycin, stability

立复欣(利福霉素)注射液混配在输液中进行静脉滴注以抗结核病治疗, 临床效果反映良好, 但目前国内关于该药应用 HPLC 法测定的报道还没有文献记载, 为此, 我们在参考其同类药利福平测定^[1]的基础上建立一种快速检测立复欣的 HPLC 法。

1 仪器、试剂和试样

惠普 1100 色谱仪, 阵列检测器
旋涡混合仪, XW-80A, 上海医科大仪器厂产品。
乙腈、甲醇, 均为 HPLC 级, MERCK 公司产品。
KH₂PO₄, AR 级。
利福霉素钠标准品(SV), 中国药品生物制品检定所提供, 效价: 85IU/mg

立复欣, 沈阳双鼎制药厂产品, 批号: 990902。
水为注射用水。
5% GS(9907272, pH 4.73) 浙江济民制药有限公司产品
0.9% NS(990618, pH 5.34) 广东大冢制药有限公司产品
10% GNS(9908624, pH 3.83) 浙江济民制药有限公司产品

2 色谱条件

色谱柱: Lichrospher, RP-8, 5 μm × 250 mm
流动相: 甲醇-乙腈-0.04M KH₂PO₄ 溶液(31.5: 31.5: 37)
检测波长: 254 nm
进样量: 5.0 μl
柱温: 40°C
流速: 1 ml/min
在此色谱条件下, 系统适用性测试结果见表 1; 色谱图见图 1。

3 流动相的选择

参考文献^[1]选定 0.075M KH₂PO₄-乙腈-甲醇(1: 1: 1)为流动相, 结果发现在基线稳定过程中, 有较大幅度的波动

(0-170 bar), 怀疑是四通比例阀中液相混合时产生瞬时结晶, 经证实, 混合流动相在 25°C 以下静置一段时间后将产生结晶。经反复对比试验, 最后选定甲醇-乙腈-0.04M KH₂PO₄ (31.5: 31.5: 37)为流动相。在此条件下, 进样 5.0 μl 用流动相配制的立复欣溶液, 主峰和杂质峰能得到完全分离, 峰形良好, 且主峰保留时间适宜。见图 2。

表 1 系统适用性测试

SV	
保留时间/min	4.080
理论塔板数	8525
拖尾因子	0.94

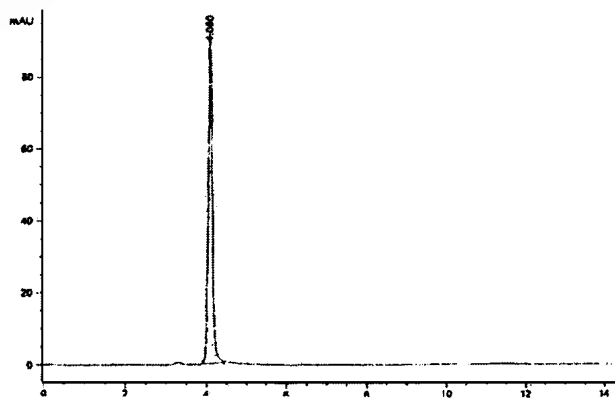


图 1 SV 标准品

4 标准曲线的测定

4.1 标准溶液的配制

精密称定 20.0mg sv 标准品, 置 100 ml 容量瓶中, 加流动相至刻度, 旋涡混匀, 即得。

4.2 方法线性测定

精密量取标准品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0,

8.0 ml, 分别置于 10 ml 容量瓶中用流动相稀释至刻度, 旋涡混匀, 0.20 μm 过滤, 取 5.0 μl 进样, 以主峰面积对溶液浓度作回归。结果表明, 在浓度为 4~120 mg/l 的范围内, 呈良好的线性关系, 其线性回归方程为:

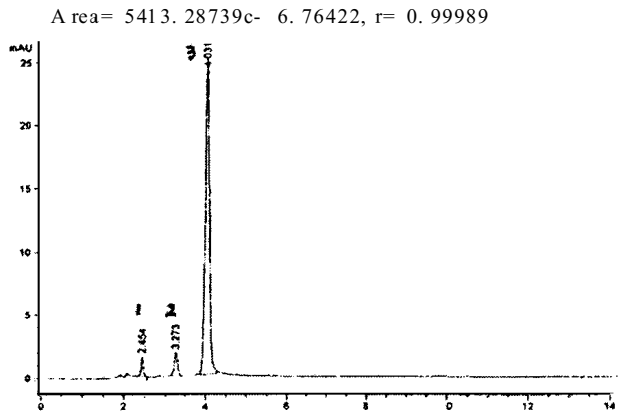


图 2
1, 2—未知杂质 3—立复欣

5 加样回收试验

分别精取 1.0, 3.1, 5.2 mg SV 标准品, 分别置于 50 ml 容量瓶中, 用已知浓度为 0.012 mg/ml 的样品溶液溶解并稀释至刻度, 测定并计算回收率。得平均加样回收率为 100.87%, RSD 为 1.4% (100.87 $\pm$ 1.41, 99.75%, 100.4%, 102.45%)。 (n= 5)。

6 精密度试验

按上述三个浓度分别于 1 日、5 日内测定, 计算日内和日间的误差。结果见表 2。

表 2 立复欣精密度试验

浓度 (mg/ml)	日 内		日 间	
	X $\pm$ S	RSD	X $\pm$ S	RSD
低	1.43 $\pm$ 0.063	4.4	1.41 $\pm$ 0.055	3.9
中	3.34 $\pm$ 0.12	3.6	3.75 $\pm$ 0.097	2.6
高	5.89 $\pm$ 0.068	1.2	6.21 $\pm$ 0.12	1.9

7 最低检测浓度

以 2 倍基线噪声衡量, 可求得该法的最低检测浓度为 0.13 $\mu\text{g/ml}$ 。

8 立复欣在输液中的含量测定

精取立复欣注射液 2.0 ml 于 50 ml 容量瓶中, 用输液稀释至刻度, 旋涡混匀。再精取其中 3.0 ml 置于 100 ml 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 混匀, 过滤, 进样 5.0 μl 。结果见表 3。

结果显示 25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 0~ 6 h 内, 立复欣在上述几种输液中含量较为稳定。

9 pH 和外观变化^[2]

精取立复欣 2.0 ml 置于 50 ml 容量瓶中, 用 25 $^{\circ}\text{C}$ 5% GS, 0.9% NS 和 10% GNS 分别稀释至刻度, 摇匀, 得临床用

药浓度。置于测定温度下, 0~ 6 h 内测定 pH, 并在白色背景下观察溶液外观变化。结果: 配制溶液在 6 h 内始终显橙红色, 未见明显的颜色变化; pH 值无明显变化(见表 4)。

表 3 立复欣在三种输液中不同时间的含量测定(mg/ml)

时间(h)	5% GS	0.9% NS	10% GNS
0	55.75	55.75	55.67
2	58.58	55.42	59.42
4	59.25	60.00	58.75
6	55.17	56.42	57.92
X $\pm$ S	57.19 $\pm$ 2.03	56.90 $\pm$ 2.11	57.94 $\pm$ 1.63
RSD(%)	3.6	3.7	2.8

表 4 立复欣在三种输液中不同时间的 pH 值(25 $^{\circ}\text{C}$)

时间(h)	5% GS	0.9% NS	10% GNS
0	6.30	6.69	6.65
2	6.25	6.67	6.61
4	6.20	6.63	6.48
6	5.94	6.58	6.23

备注: 不加立复欣时三种输液的 pH 值分别为 4.73, 3.83, 5.34。

10 讨论

10.1 利福平在此条件下的图谱与立复欣极为相似, 但由于本实验缺乏利福平 N-O 化合物, 故其在图谱中的定性较困难。

10.2 由于完成一次测定(包括杂质出峰)所需时间约为 20 min, 故在含量测定时每个时间点只测定一次, 然后求出 4 个时间点数据的 RSD, 以判断立复欣在输液中含量的变化。

10.3 5% GS 在测定其 pH 值时, 一开始 pH 能升高至 7.10 以上, 然后逐渐下降至某一稳定值, 若稍晃动小烧杯或稍提高电极, pH 计将以较快的频率上升至较大的 pH 值范围, 静置后以慢慢回至以前水平。其原因可能与糖分子的聚集下沉有关, 故静置一段时间后便形成了上层溶液 pH 较高而下层溶液 pH 较低的情况。因而在实验过程中应以电极插入溶液的某一深度为基准。(我们又做了 0~ 4 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 时立复欣在三种输液中 pH 的变化, 发现 0~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 时, 5% GS 的变化最稳定, 而 37 $^{\circ}\text{C}$ 时则变化最大。)

10.4 立复欣注射液厂家提供的说明书上标明只可用 5% GS 稀释后供病人静滴, 但对于结核病合并糖尿病的病人来讲, 使用受到限制, 我们观察了立复欣在 0.9% NS、10% GNS 输液中的稳定性, 认为该药也可用 0.9% NS、10% GNS 稀释, 且在 0~ 6h 内性质稳定, 为临床提供配伍依据。

10.5 稀释立复欣注射液, 用输液配制的保留时间比用流动相配制的保留时间大约延长 0.12 min, 其原因可能是异相洗脱延迟。

10.6 本方法测定条件稳定, 简单迅速, 灵敏度高, 准确性好, 适用于日常的检验工作。

参考文献

- 1 庞青云, 陆 岩, 余 立. HPLC 测定利福平胶囊含量. 药物分析杂志, 1997, 17(4): 256.
- 2 杨继红, 王传芳, 徐丽春. 恩丹西酮注射液与异环磷酰胺在生理盐水中配伍的稳定性. 中国医院药学杂志, 1999, 19(6): 337.

收稿日期: 2000-11-08