

高效液相色谱法测定醋托酚的有关物质

王丽萍,封淑华,鄢冰冰,武国芳(河北省药品检验所,河北 石家庄 050011)

摘要:目的 建立 HPLC测定醋托酚原料的有关物质。方法 使用 Hypersil C18(4.6mm×150mm,5μm);流动相:甲醇-0.05mol·L⁻¹磷酸(75:25)并用三乙胺调 pH为 4.0;流速:1.0mL·min⁻¹;紫外检测波长:231nm。进样量 20μg。结果 醋托酚、中间体及未知有关物质均可有效分离,方法的专属率高,最低检测量为 4ng。结论 本方法可用于醋托酚原料中有关物质的检查。

关键词:高效液相色谱法;醋托酚;有关物质

中图分类号:R917.798.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2005)05-0403-02

Determination of related substances in acetorphan by HPLC

WANG Li-ping, FENG Shu-hua, QIE Bing-bing, WU Guo-fang(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of the related substances of acetorphan. **METHOD** HPLC method was carried on a column of Hypersil C₁₈ (4.6×150mm, 5μm), with the mobile phase of methanol: 0.05mol·L⁻¹ H₃PO₄ solution, adjust the pH to 4.0 with triethylamine, at the flow rate of 1mL·min⁻¹ and the detection wavelength of 231nm. **RESULTS** Acetorphan and its related substances were good separated. **CONCLUSION** This method is simple, quick and accurate for testing the related substances of this product.

醋托酚是抗腹泻药, 化学名为 (±) N-[2-(乙酰硫) 甲基]-1-0-3-苯基丙基] 甘氨酸苯甲酯, 国外药典未见收载, 目前在国内外尚属二类新药。本实验建立了 HPLC 法测定醋托酚原料的有关物质, 考察了色谱条件、线性范围、主成分与有关物质的分离情况及原料经破坏处理后的降解情况等。结果表明该方法可有效分离有关物质, 专属性高, 操作简便。

1 仪器与试剂

Waters 515 泵, Waters 2487 型检测器, GS2010 化学工作站。

醋托酚原料及对照品由河北省药物研究所提供, 甲醇为色谱纯, 磷酸为优级纯, 三乙胺为分析纯。

2 色谱条件

2.1 紫外检测波长的确定 取对照品、中间体 I 和中间体 II 适量, 加流动相溶解并制成每 1 mL 约含 50 μg 的溶液, 在 210~400 nm 紫外区扫描, 醋托酚在 231 nm 的波长处有最大吸收, 中间体 I 在 220 nm 波长处有最大吸收, 中间体 II 在 223 nm 波长处有最大吸收, 且百分吸收系数与醋托酚接近, 故选定波长为 231 nm。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

2.2.1 色谱条件的确定 首选 C₁₈ 柱并对三种流动相进行优选: 流动相 (1) 甲醇-水 (7:3); 流动相 (2) 甲醇-磷酸二氢钾缓冲液 (75:25); 流动相 (3) 甲醇-磷酸三乙胺系统 (75:25)。经试验, 流动相 (1) 只能得到前舌峰, 再增大甲醇量也不能改善峰形; 流动相 (2) 可得到峰形对称的色谱峰, 分离效果良好, 但对粗品测定时记录完整的图谱需主峰保留时间的 4 倍, 分析时间太长, 见图 1。流动相 (3) 可得到峰形对称的色谱峰, 分离效果良好, 对粗品测定时记录完整的图谱需主峰保留时间的 3 倍, 分析时间合适, 见图 2。

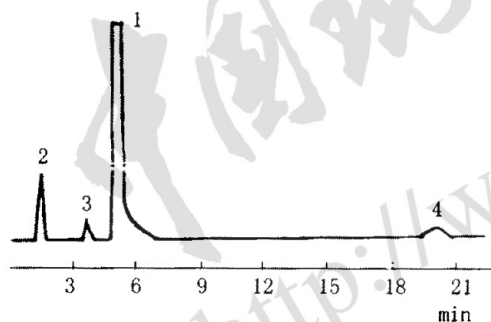


图 1 醋托酚在流动相 (2) 的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of acetophan in mobile phase (2)

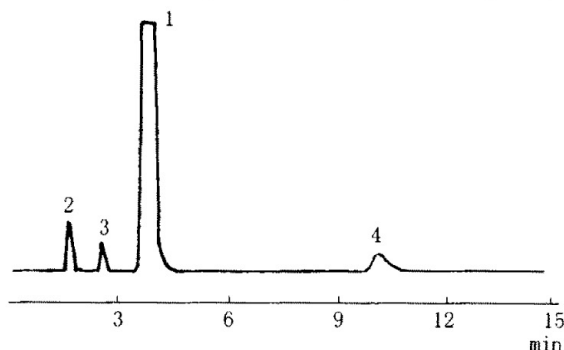


图 2 醋托酚在流动相 (3) 的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of acetophan in mobile phase (3)

进一步选择流动相 (3) 的 pH, 配制甲醇-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸 (75:25) 溶液, 分别用三乙胺调节 pH 为 4.0、5.0、6.0 各作为流动相, 对加入中间体 I、II 的样品溶液进行分离, 结果在 pH 4.0 5.0 时主峰和 2 个中间体的分离良好, 在 pH 6.0 时主要影响中间体 II 的出峰时间, 时间提前到 2 min 接近溶剂峰, 因此确定以尽可能少加入三乙胺又能分离良好的 pH 4.0 为流动相。

2.3 破坏试验

取醋托芬五份, 分别进行如下的处理: (1) 加 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 置 100℃ 水浴中加热破坏 5 h 蒸干; (2) 加 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液, 置 100℃ 水浴中加热破坏 5 h 蒸干; (3) 100℃ 加热 5 h; (4) 加 30% H₂O₂, 室温放置 5 h 蒸干, 分别称取以上样品适量, 用流动相溶解, 稀释成每 1 mL 含 0.4 mg 的溶液; (5) 取本品适量用流动相溶解并稀释成每 1 mL 含 0.4 mg 的溶液, 置强光 (自然光, 约 10 000 lx) 下 10 h 取上述各溶液在本色谱条件下测试。结果表明在强光、加热条件下, 本品仅增加 0.1% 的降解物, 主要是与主成分峰相对保留时间为 2.8 的物质; 在碱性加热破坏条件下主药已完全降解, 在酸性加热破坏条件下大部分降解, 主峰仅剩 10%, 在强氧化条件下绝大部分已降解, 降解物与主峰分离良好。

2.4 最小检出量

取供试品适量, 加流动相制成每 1 mL 中含 200 μg、4 μg 的溶液, 进样不同体积, 按实际进样量计算线性范围, 在 4~4000 ng 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为: A = 1558 + 656C, C 单位为 ng, 最小检出量为 4 ng。

2.5 有关物质的测定

取本品适量, 精密称定, 加流动相制成每 1 mL 中含醋托芬 0.4 mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取 1 mL 于 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照液。取对照液 50 μL 注入液相色谱仪, 调节仪器灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10%~20%; 再取供试品溶液 50 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍, 按外标法计算有关物质的含量。测定样品三批, 结果批号为 0164、0167、0168 的有关物质质量分别为 0.1%, 0.1%, 0.1%。

3 讨论

3.1 从破坏试验结果可知, 醋托芬原料在光照、加热条件下仅有少量的有关物质, 在氧化及酸、碱加热破坏条件下极不稳定, 几乎完全降解, 说明该物质对光、热稳定, 对酸、碱及氧化极不稳定; 同时也说明该色谱条件可有效地检测各强烈破坏条件下所产生的有关物质。

3.2 经对本品粗品的分析, 出现的主要未知有关物质是与主峰的相对保留时间比为 2.8 而中间体 I 的相对保留时间比为 0.4 中间体 II 的相对保留时间比为 0.8 该有关物质经 LC-MS 分析, 分子量约为 610 推测可能是某种二硫化物。

收稿日期: 2004-03-25