

离子对反相高效液相色谱法测定十取代芦丁硫酸钠含量及有关物质

姜迅知¹, 王向军² (1. 浙江中药与天然药物研究院, 杭州 310052; 2. 浙江大学药学院, 杭州 310027)

摘要:目的 建立高效液相色谱测定十取代芦丁硫酸钠含量及有关物质。方法 采用 XDB-C₈ 色谱柱, 流动相: 乙腈-25 mmol • L⁻¹ TBAB 缓冲液 (KH₂PO₄ 10 mmol • L⁻¹, 三乙胺调节 pH 7.5) = 48:52, 流速: 1.0 mL • min⁻¹, 检测波长: λ = 254 nm; 柱温: 25℃。结果 在 2.0 ~ 200.0 μ g • mL⁻¹ 浓度范围内峰面积与浓度呈现良好的线性关系, 回归方程为: $A = 12158.5C + 43.63$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。日内精密度和日间精密度均小于 3.5%。结论 本法专属性良好, 符合十取代芦丁硫酸钠的含量测定和有关物质检查的要求。

关键词: 高效液相色谱法; 十取代芦丁硫酸钠; 含量测定

中图分类号: R917.799.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)03-0227-03

Determination of RDS and Relative Impurities by IP-RP-HPLC

JIANG Xun-zhi¹, WANG Xiang-jun² (1. Zhejiang Institute of TCM&Natural Drug, Hangzhou 310052, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for determination of RDS and relative impurities. **METHODS** Agilent C₈ column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile and 25 mmol • L⁻¹ phosphate buffer solution containing 20 mmol • L⁻¹ TBAB (pH 7.5) (48:52, v/v) with flow rate of 1.0 mL • min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm. **RESULTS** The linear range of calibration curve was 2.0 ~ 200.0 μ g • mL⁻¹, $A = 12158.5C + 43.63$, $r = 0.9999$. The intra-day and inter-day RSD were less than 3.5%. **CONCLUSION** The proposed method was simple, precise and reproducible; the decomposed product can be separated as well. Therefore, the quality of RDS can be effectively controlled.

KEY WORDS: HPLC; RDS; determination

十取代芦丁硫酸钠 (RDS)是抗艾滋病候选药物,由于化学结构的特殊性,在原料药的合成过程中存在九取代芦丁硫酸钠 [Rutin nona (H -) sulfate sodium, RNS],这两个化合物结构相似,具有非常相近的理化性质。本实验建立了分离十取代芦丁硫酸钠和九取代芦丁硫酸钠的离子对反相高效液相色谱 (IP-RP-HPLC)方法,比较了不同 pH 值、离子对浓度和缓冲盐浓度等对分离效果的影响,建立了 IP-RP-HPLC 法测定十取代芦丁硫酸钠原料药含量的方法学。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-2010C液相色谱仪 (岛津,日本),包括:四元梯度泵、双波长紫外检测器、自动进样器、柱温箱等;Shimadzu Class-VP version 6.12数据处理工作站。ZORBAX Eclipse XDB - C₈液相分析柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Agilent, 美国), C₈预柱 (20 mm × 4.6 mm, 5 μm)。Beckman DU 640核酸蛋白分析仪 (紫外扫描) (美国)。

十取代芦丁硫酸钠和九取代芦丁硫酸钠原料为自制,十取代芦丁硫酸钠对照品 (自制)峰面积归一化法含量为 98.7%。四丁基溴化铵 (TBAB, 离子对试剂)、三乙胺 (TEA)、磷酸二氢钾等为分析纯,乙腈 (Fairfield,美国)为色谱纯,水为自制二次去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

岛津 LC-2010C液相色谱仪 (日本),色谱柱: XDB - C₈柱 (Agilent, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈:25 mmol · L⁻¹ TBAB缓冲液 (KH₂PO₄ 10 mmol · L⁻¹, TEA 调节 pH 7.5) = 48:52,流速:1.0 mL · min⁻¹,检测波长: λ = 254 nm;柱温: 25℃。

2.2 溶液的制备

对照品溶液:取经干燥至恒重的 RDS对照品约 50 mg,精密称定后置 100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,作为对照品的储备液,然后精密量取此储备液 1.0 mL至 10 mL量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

供试品溶液:取 RDS样品或粗品约 50 mg,精密称定后置 100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,精密量取 1.0 mL至 10 mL量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 测定方法

分别取 RDS对照品溶液和样品溶液,进样 20 μL,测定峰面积,按外标法定量。

2.4 方法专属性考察

取对照溶液 (A)、样品溶液 (B)、样品加热破坏溶液 (C)、酸破坏溶液 (D)、碱破坏溶液 (E)、氧化破坏溶液 (F)、光照溶液 (G)、样品 + RNS (H)和溶剂 (I),按上述色谱条件进样,样品主峰保留时间为 12.3 min,样品主峰与不同条件下的杂质峰的分度大于 1.5,且 RDS和 RNS达到基线分离,分度大于 1.5。

2.5 线性关系考察

分别精密量取 0.5 mg · mL⁻¹的 RDS对照品储备液适量,分置 10 mL量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,分别得到浓

度为 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0和 200.0 μg · mL⁻¹,进样测定,记录色谱图。按照最小二乘法原则,以 RDS的峰面积为纵坐标 (A),以相应的浓度 (C)为横坐标进行线性回归,得回归方程为: A = 12158.5C + 43.63,相关系数 r = 0.9999。结果表明 RDS在 0.5 ~ 200.0 μg · mL⁻¹浓度范围内有良好的线性关系。

2.6 精密度试验

分别精密量取高、中、低 (5.0, 20.0, 100.0 μg · mL⁻¹)三种不同浓度的 RDS对照品溶液,进样测定,记录色谱图。试验结果表明,不同浓度 RDS日内精密度和日间精密度均小于 3.5%。

表 1 精密度试验结果 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

样品浓度 /μg · mL ⁻¹	精密度 /%	
	日内	日间
5.0	2.5	3.4
20.0	1.4	2.2
100.0	1.8	1.9

2.7 样品溶液的稳定性考察

取 RDS供试品适量,用水溶解,然后放置于不同的温度条件下,分别为冷藏 (4℃)、室温 (25℃)和体温 (37℃),于不同时间点取样 (0, 4, 8, 24 h),按照以上色谱条件进样测定,按峰面积定量,测定结果表明, RDS供试品水溶液在低温条件 (<25℃)下比较稳定。

表 2 不同温度条件下稳定性考察结果

时间 /h	4℃	25℃	37℃
0	622525	622525	622525
4	624357	622721	607968
8	618214	619002	596213
24	613875	602461	569625
RSD /%	0.76	1.6	3.7

2.8 样品含量测定

取 RDS原料药样品 3批,每批取三份,按照测定方法测定含量,测定结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 % (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

批号	含量 /%	RSD /%
X030401	96.78 ± 0.46	0.4
X030402	94.62 ± 0.61	0.5
X030403	97.60 ± 0.20	0.2

2.10 有关物质检查

按照含量测定项下的色谱条件进行有关物质测定条件的试验,记录色谱图至主成分保留时间的 2.5倍,用峰面积归一化法计算有关物质的含量。由于本品在合成工艺上的原因, RNS成为其主要的有关物质。实验测定了 3批样品的有关物质,测定结果见表 4。

表 4 有关物质检查结果 ($n=3$)

Tab 4 Determination of related substance in RDS by HPLC($n=3$)

批号	有关物质总量 /%	RNS /%	RSD /%
X030401	3.56	2.58	0.4
X030402	6.02	4.53	0.5
X030403	2.78	1.92	0.2

3 讨论

3.1 检测波长的选择

RDS在 254 nm和 326 nm处有最大吸收,254 nm处的吸收度约为 326 nm处的 1.2倍,为了提高 RDS和有关物质测定的检测灵敏度,实验选择 254 nm为检测波长。

3.2 色谱柱的选择

选用了 C_{18} 柱、 C_8 柱、 C_3 柱、 C_1 柱、PH柱、SB-Aq柱、 NH_2 柱(正、反相)和 CN柱(正相)等不同极性的色谱柱进行了考察,实验发现,由于 RDS为极性化合物,在不加离子对的情况下,改变不同的流动相成分、组成、比例和 pH值,RDS均没有保留。

3.3 离子对试剂类型的选择

为增强 RDS在色谱柱上的保留值,考察比较了四甲基溴化铵(TBAB)、四乙基氯化铵(TEAC)和四丁基溴化铵(TBAB)三种离子对试剂以及不同类型离子对的浓度、pH值、流动相的比例等条件,实验显示当使用 TBAB为离子对试剂时,通过优化流动相比例、离子对试剂的浓度、流动相 pH值、缓冲盐浓度等条件,RDS在 C_8 色谱柱上得到了良好的保留,并且 RDS和 RNS有良好的分离度。

3.4 离子对试剂浓度的选择

设定乙腈与水相的比例为 48:52(v/v),水相不调节 pH,分别以 5、10、15、20、25和 30 $mmol \cdot L^{-1}$ 浓度的 TBAB,以 RDS和 RNS的保留时间(t_R)、柱效(N)和它们之间的分离度(R)为判断标准,进行 TBAB浓度的考察。当 TBAB的浓度低于 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 时,RDS和 RNS在色谱柱上没有保留,而当 TBAB的浓度在 15~25 $mmol \cdot L^{-1}$ 的范围内,随着浓度的升高,供试品的保留时间缩短、柱效增强,两者的分离度增大,当浓度大于 25 $mmol \cdot L^{-1}$ 时,这种改变则不是很明显。

因此,选择 25 $mmol \cdot L^{-1}$ 为离子对试剂 TBAB的浓度。

3.5 流动相 pH值的选择

在乙腈与水相的比例为 48:52(v/v),TBAB的浓度为 25 $mmol \cdot L^{-1}$ 的前提下,用 TEA调节水相的 pH值为 4.4、5.2、6.0、6.8、7.5和 8.0,以 RDS和 RNS的保留时间(t_R)、柱效(N)和它们之间的分离度(R)为判断标准,进行流动相 pH值的考察。随着水相 pH值的增加,RDS和 RNS在色谱柱上的保留时间缩短、柱效增强,两者的分离度增大,但当 pH值大于 7.5时,改变则不明显。因此,实验选择流动相水相的 pH值为 7.5。

3.6 流动相离子强度的选择

实验选择磷酸二氢钾为缓冲盐进行水相离子强度的调节。实验考察了不同的离子强度对供试品保留值和分离情况的影响。离子强度以磷酸二氢钾的浓度来表示。实验在选择乙腈与水相(TBAB的浓度为 25 $mmol \cdot L^{-1}$,TEA调节 pH为 7.5)的比例为 48:52(v/v)的前提下,分别调节水相中磷酸二氢钾的浓度为 5、10、15和 20 $mmol \cdot L^{-1}$,以 RDS和 RNS的保留时间(t_R)、柱效(N)和它们之间的分离度(R)为判断标准,进行离子强度的考察。随着水相中离子强度的增强,RDS和 RNS在色谱柱上的保留时间缩短,两者的分离度增大,但柱效未发生明显改变。实验选择流动相水相中磷酸二氢钾的浓度为 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 。

参考文献

[1] CHEN C E, HAN L H. Acidimetric determination of sodium salts of N-substituted sulfuric acid [J]. Analysis Laboratory(分析试验室), 2002, 21(1): 91-92.

[2] GUO T H, QIAO W H. Study of long chain alkyl naphthalene sodium sulfonates by reversed-phase ion chromatography [J]. Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(8): 985-988.

[3] XIAO X H, LIN X. Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of linear alkylbenzenesulfonate homologues and positional isomers [J]. Chromatography, 2004, 22: 161-164.