

HPLC 测定曲匹布通片的含量与有关物质

孙春艳, 赵亚萍, 陈宁林(湖北省食品药品监督检验研究院, 武汉 430064)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定曲匹布通片的含量和有关物质。方法 采用 Thermo C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.01 mol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 3.0)-甲醇(40:60)为流动相; 检测波长 271 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 进样量 10 μL。结果 曲匹布通在 0.100 5~1.005 2 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 100.5%(RSD=0.5%)。曲匹布通及其有关物质能得到很好分离, 定量限为 0.000 1 ng, 检测限为 0.000 03 ng, 供试品溶液在 8 h 内的稳定性良好(RSD=0.6%)。结论 该方法简便、准确、重复性好, 适用于曲匹布通片的质量控制。

关键词: 曲匹布通片; 高效液相色谱法; 含量测定; 有关物质; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0976-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.019

Determination of the Content of Trepibutone and Related Compounds by HPLC

SUN Chunyan, ZHAO Yaping, CHEN Ninglin(Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of the content of trpibutone and related substances. **METHODS** The HPLC system consisted of Thermo C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, methanol-buffer(0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate, adjusted pH to 3.0 by phosphoric acid) (40:60) was adopted as mobile phase with UV detection at 271 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was 35 ℃, injection volume was 10 μL. **RESULTS** The linear range was 0.100 5–1.005 2 mg·mL⁻¹. The mean recovery was 100.5%(RSD=0.5%). Trepibutone and related substances were separated well. The limit of quantification was 0.000 1 ng, the limit of detection was 0.000 03 ng. The sample solution was stable within 8 h(RSD=0.6%). **CONCLUSION** This method is simple, sensitive and accurate.

KEY WORDS: Trepibutone tablets; HPLC; determination of content; related substances; quality control

曲匹布通又名舒胆通、胆灵、三乙氧苯酰丙酸、三乙丁酮、三醚丁酮, 主要用于胆石症、胆囊炎、胆道运动障碍、胆囊术后综合征及慢性胰腺炎等^[1-2]。至 2014 年, 全国共有曲匹布通片批准文号 96 个, 质量标准收载于国家药品监督管理局国家药品标准: 化学药品地方标准上升国家标准第四册[标准号 WS-10001-(HD-0325)-2002]; 国外药典中的国际药典、BP2013、EP8.0、USP36、JP16 中均无收载。现行的曲匹布通国家标准中无有关物质检查项, 含量测定采用方法为滴定法, 该方法取样量大、辅料干扰终点的判断, 专属性较差。曲匹布通片是 2014 年药典委员会标准提高品种, 也是国家评价抽验品种。本实验参考相关文献^[3-6], 选用甲醇和易挥发的盐作为流动相, 建立 HPLC 测定曲匹布通片有关物质和含量, 并利用该方法对曲匹布通片中杂质结构进行初步推断, 结合大量样品分析数据, 制定合理的限度, 实验证明该方法准确、快速, 可以很好地控制质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260(DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); Dionex Ultimate 3000(DAD 检测器, 美国戴安公司); 岛津 LC-20AT(紫外检测器, 日本岛津); Mettler AG135 天平、Mettler S20 pH 计均购自梅特勒公司。

1.2 试剂与试药

甲醇(美国天地公司, 色谱纯), 醋酸铵(分析纯), 冰醋酸(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。曲匹布通对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100439-200301, 供紫外方法检查溶出度用); 匹布通原料适量(湖南千金湘江药业股份有限公司, 批号: 140102); 曲匹布通对照品(湖南千金湘江药业股份有限公司, 批号: 140401, 纯度: 99.6%)。曲匹布通片(山东仁和堂药业有限公司, 批号: 121001, 120401, 140201, 111101), 规格: 40 mg)。

作者简介: 孙春艳, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (027)87895875

Email: suncy25@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;以 0.01 mol·L⁻¹的醋酸铵溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 3.0)-甲醇(40:60)为流动相;检测波长:271 nm;柱温:35℃;流速:1.0 mL·min⁻¹,进样量:10 μL。调整色谱条件,使主成分峰的保留时间约为 10 min,主峰前各杂质间、主峰与相邻杂质峰间的分离度符合要求。

2.2 有关物质检测方法

2.2.2 方法专属性试验

2.2.2.1 强酸破坏试验 取曲匹布通片(批号:120401)研细粉(约相当于曲匹布通 62.5 mg),置 25 mL 量瓶中,加 1 mol·L⁻¹的盐酸溶液 2 mL 振摇,水浴 2 h,再加 1 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液 2 mL 中和,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤。

2.2.2.2 强碱破坏试验 取曲匹布通片研细粉适量(约相当于曲匹布通 62.5 mg),置 25 mL 量瓶中,加 1 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液 2 mL 振摇,水浴 2 h,再加 1 mol·L⁻¹的盐酸溶液 2 mL 中和,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤。

2.2.2.3 强光破坏试验 取曲匹布通片研细粉(约

相当于曲匹布通 62.5 mg),置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,置阳光下照射 1 d,过滤。

2.2.2.4 高温破坏试验 取曲匹布通片研细粉(约相当于曲匹布通 62.5 mg),置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,水浴 5 h,取出放冷,补足挥发掉的溶剂,摇匀,过滤。

2.2.2.5 氧化破坏试验 取曲匹布通片研细粉(约相当于曲匹布通 62.5 mg),置 25 mL 量瓶中,加 3%过氧化氢溶液 2 mL,振摇,放置 16 h,再加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤。

2.2.2.6 未破坏样品溶液 取上述同批号曲匹布通片研细粉,用流动相配制浓度约为 2.5 mg·mL⁻¹的供试品溶液。

分别取上述破坏试验的溶液、空白溶剂、未破坏样品溶液、空白辅料溶液在拟定的色谱条件下进样 10 μL,记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍,考察主峰与各杂质的分离情况。结果在拟定的色谱条件下,各有关物质和降解产物均可以与曲匹布通主峰有效分离,采用 DAD 检测器对上述溶液的主成分峰纯度进行检测,各主峰的峰纯度因子均>990。专属性试验色谱图见图 1。

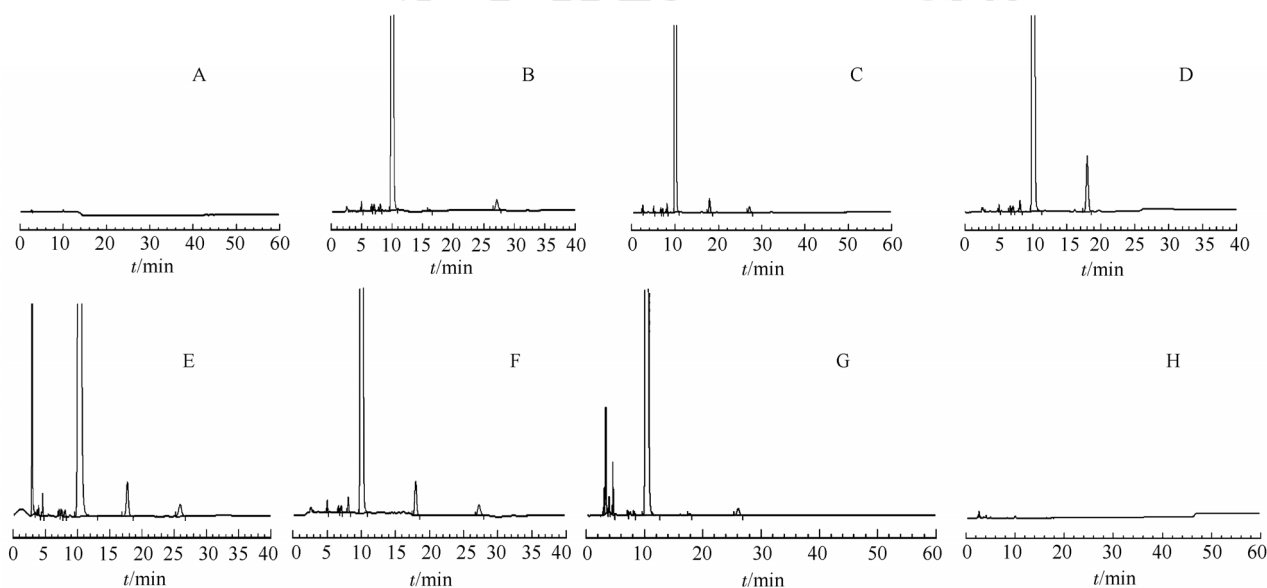


图 1 专属性试验色谱图

A-空白溶剂; B-样品; C-酸破坏; D-碱破坏; E-氧化破坏; F-高温破坏; G-光照破坏; H-空白辅料。

Fig. 1 Specificity test chromatogram

A-blank solvent; B-sample solution; C-acid damage; D-bases damage; E-oxidative damage; F-heat damage; G-light damage; H-excipients solution.

2.2.3 定量限与检测限 精密称取曲匹布通原料适量,精密称定,用流动相溶解并稀释制成含曲匹布通 0.100 52 mg·mL⁻¹的溶液,采用逐级稀释的

方式,当样品溶液的浓度为 0.010 052 ng·mL⁻¹时,进样 3 μL,信噪比为 4.4,故检出限为 0.000 03 ng;当进样量为 10 μL 时,信噪比为 10.9,故定量限为

0.000 1 ng($n=3$, RSD 为 3%)。

2.2.4 稳定性试验 取上述未破坏样品溶液, 在拟定的色谱条件下, 分别在配制后 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 考察杂质的检出情况, 结果显示: 稳定性 RSD 为 0.1%, 供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.5 重复性试验 取批号为 120401 的片剂, 重复测定 6 次, 结果 6 批样品中杂质个数均为 6 个; 单个最大杂质分别为 0.08%, 0.08%, 0.09%, 0.09%, 0.08%, 0.08%; 杂质总量分别为 0.15%, 0.17%, 0.18%, 0.17%, 0.16%, 0.16%。

2.2.6 耐用性试验 取专属性试验中破坏样品溶液, 分别采用 Xtimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱和 Dionex Ultimate 3000 HPLC 色谱仪、Dionex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱和岛津 LC-20AT HPLC 色谱仪, 结果显示不同的仪器、不同的色谱柱, 杂质检出及分离情况一致。

2.3 含量测定方法

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取曲匹布通原料 0.251 3 g, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分取 1, 2, 3, 5, 7, 10 mL 分置 6 个 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 曲匹布通在 0.100 5~1.00 52 mg·mL⁻¹ 内, 浓度与峰面积呈良好的线性关系, $y=17\,911x+53.385$, 相关系数 $r=1.000\,0(n=6)$ 。

2.3.2 回收率试验 取曲匹布通原料(批号: 12013) 9 份, 精密称定, 分别置 25 mL 量瓶中, 按照山东仁和堂药业有限公司处方加相应的空白辅料, 加流动相适量使曲匹布通溶解, 再加流动相稀释至刻度, 制成曲匹布通浓度约 0.4, 0.5, 0.6 mg·mL⁻¹ 的溶液各 3 份, 作为回收率测定溶液, 另取同批号曲匹布通原料 0.012 68, 0.0128 1 g, 分别置 25 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 作为对照品溶液, 计算回收率, 结果见表 1。

2.3.3 仪器精密度试验 取曲匹布通对照品 0.012 59 g, 置 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 取此溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 在规定波长处连续进样 5 次, 结果 RSD 为 0.2%, 表明仪器精密度较好。

2.3.4 重复性试验 取样品(批号: 111101, 山东仁和堂药业有限公司)6 份, 分别为 0.053 5, 0.054 5, 0.054 2, 0.054 5, 0.054 9, 0.054 8 g, 分别置 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 取此 6 份溶液注

入液相色谱仪, 根据进样精密度项下对照品结果计算含量, 结果含量均值为 100.4%, RSD=0.3%。

表 1 曲匹布通片回收率试验结果

Tab. 1 Content recovery test results of Trepibutone tablets

加入量/g	测得量/g	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.0100 3	0.0100 5	100.2	100.5	0.5
0.0103 9	0.0104 3	100.4		
0.0115 4	0.0116 0	100.5		
0.0127 6	0.0128 8	100.9		
0.0131 6	0.0133 0	101.1		
0.0140 9	0.0141 4	100.4		
0.0148 7	0.0148 0	99.5		
0.0147 5	0.0148 1	100.4		
0.0147 3	0.0148 3	100.7		

2.4 样品的有关物质及含量测定

按照“2.1”项下色谱条件检测, 有关物质采用自身对照法计算。样品有关物质及含量测定的结果见表 2。

表 2 曲匹布通片有关物质及含量测定结果

Tab. 2 Results of determination of the content of trepibutone and related compounds

批号	杂质个数	单个最大杂质/%	总杂质/%	曲匹布通含量/%
121001	5	0.05	0.09	98.6
120401	6	0.10	0.26	105.5
140201	6	0.09	0.22	99.6
111101	5	0.08	0.18	100.5

3 讨论

3.1 色谱条件的选择及系统适用性试验的确定

曲匹布通 pKa 值为 5.45, 显弱酸性, 且具有较高的脂溶性, 难溶于水。采用甲醇-水系统为流动相体系时, 主峰拖尾。根据文献报道^[4-5], 选择甲醇-磷酸盐、甲醇-醋酸铵、乙腈-磷酸盐的流动相系统进行考察。结果显示, 在这 3 个流动相体系中, 样品中有关物质检出情况基本一致, 为进一步采用液-质的方式对样品中的杂质进行进一步分析, 选择了 0.01 mol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液(用冰醋酸调节 pH 值至 3.0)-甲醇(40:60)为流动相。对有关物质方法筛选过程中, 对梯度洗脱方式进行过考察。结果显示, 各种破坏样品溶液采用梯度洗脱的方式与采用等度洗脱的方式所检出的杂质个数相同, 曲匹布通片的杂质主要有 5 个, 在等度条件下均能检出, 故最终选择相对简单的等度洗脱法。

3.2 检测波长的选择

在拟定的色谱条件下,各有关物质和降解产物均可与曲匹布通主峰有效分离,主峰前有3~4个杂质;在氧化、碱、高温、光照条件下均产生保留时间约为组分保留时间2倍的共有杂质。提取供试品溶液主峰及各杂质的紫外吸收图谱,曲匹布通主峰在235.7, 270.5, 328.5 nm处有最大吸收,各杂质在紫外末端有较强吸收,在271 nm附近亦有较大吸收,故选择干扰较小且吸收较强的271 nm作为有关物质检测的波长。

3.3 供试品溶液浓度的选择

分别配制含曲匹布通浓度约为1, 2.5, 4 mg·mL⁻¹的溶液,分别进样10 μL,结果显示,浓度为1 mg·mL⁻¹时仅能检出4个杂质,浓度增加到2.5 mg·mL⁻¹和4 mg·mL⁻¹后均能检出6个杂质。而用4 mg·mL⁻¹的浓度时主峰响应过高,故确定供试品溶液的浓度为2.5 mg·mL⁻¹,进样量为10 μL。

3.4 样品中杂质的结构推断及有关物质限度的制定

比较曲匹布通片和曲匹布通原料药的有关物质检测色谱图发现,曲匹布通片中的杂质大多与原料药中杂质一致,说明片剂中杂质基本是由原料带入。通过考察原料药中的杂质结果显示,样品溶液色谱图中主峰前的3个杂质和主峰后的2个杂质为共有杂质2。按照出峰顺序,对5个杂质进行分析。采用LC-MS联用技术测定样品,推断杂质的结构。解析图谱后显示,曲匹布通的杂质多为化学结构苯甲酰支链上的变化,三乙氧苯结构相对稳定。结合专属性试验色谱图推断,主峰后相对保留时间约为2倍的杂质为降解杂质,且在酸、碱、氧化、加热、光照破坏时均能产生,

其他杂质均为合成杂质。

采用拟定的色谱条件,对6个企业的21批样品有关物质进行了考察,结果显示,单个杂质的量基本能控制在0.2%以内,杂质的总量基本能控制在0.3%以内。对曲匹布通片进行加速试验结果显示,加速后的样品杂质个数略有增加,但杂质量未见明显变化,说明片剂较为稳定,各企业采用的内外包装均不影响药品质量。故拟定限度为杂质不得>0.2%,总杂质不得>0.4%。

3.5 含量测定对照品的选择

目前使用的曲匹布通对照品为供紫外方法检查溶出度用,其有关物质色谱图显示,杂质较多,其杂质质量远高于湖南千金湘江药业股份有限公司提供的原料。故选择企业提供的对照品(批号:140401,纯度99.6%)作为含量测定的对照品。

REFERENCES

- [1] 刘传金. 探讨口服曲匹布通片对超声诊断胆总管结石的应用价值[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 194-195.
- [2] WU Y Y, SONG L, GONG M. To discuss the effect of oral of administration of Trepibutone tablets on detection rate of common bile duct lithiasis [J]. Chin J Ultrasound Med(中国超声医学杂志), 2008, 24(7): 635-637.
- [3] ZHANG N, NIU X H, YUE Z H. HPLC determination of the content of trepibutone tablets and its related tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(11): 1903-1905.
- [4] NIU J Z, ZHOU Z, WEI J. RP-HPLC determination of the content of trepibutone related compounds [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(1): 61-63.
- [5] LI R. Content determination of Trepibutone tablets by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2007, 16(4): 36-37.
- [6] ZHU Y F, LIU H B, YI Y. HPLC determination of content and dissolution of Trepibutone tablets [J]. China Healthcare Innovation(中国医疗前沿), 2007, 2(3): 92-93.

收稿日期: 2015-03-22

LC-MS/MS 同时测定朱砂中掺假染料猩红 808 和玫瑰红 B 的含量

杨建龙¹, 谭纹² (1.长春市食品药品检验所, 长春 130012; 2.通化市食品药品监督管理局, 吉林 通化 134001)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定朱砂中的掺假染料猩红 808 和玫瑰红 B 的含量。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)色谱柱, 流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 离子化方式为 ESI, 检测模式为 MRM, 选择离子对: ①猩红 808 m/z 368.1→275.1, m/z 368.1→219.1, m/z 368.1→77.1; ②玫瑰红 B m/z 443.2→399.2, m/z 443.2→355.0。结果 该方法猩红 808 和玫瑰红 B 的线性范围为 10~200 ng·mL⁻¹ 和 9.69~193.8 ng·mL⁻¹; 检测限分别为 2 ng·mL⁻¹ 和 1.9 ng·mL⁻¹; 回收率($n=6$)分别为 97.86%和 97.34%,

作者简介: 杨建龙, 男, 汉, 硕士 Tel: (0431)85101320 E-mail: 875704972@qq.com