

HPLC 法检查阿昔洛韦分散片的有关物质

王倩¹ 刘新元² 王桂燕³

(1 天津市医药科学研究所 天津 300070)

(2 天津隆顺榕制药厂 天津 300011)

(3 天津市蓝恒医药化工技术研究所 天津 300074)

摘要 目的:采用高效液相色谱法检查阿昔洛韦分散片的有关物质。方法:色谱柱为 C_{18} , $200 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 以甲醇:水 (8:92) 为流动相, 检测波长为 254 nm 。结果:阿昔洛韦浓度在 $0.5 \sim 7.5 \mu\text{g/mL}$ 范围内 ($r = 0.9996$, $n = 5$), 鸟嘌呤浓度在 $0.5 \sim 8.5 \mu\text{g/mL}$ 范围内 ($r = 0.9996$, $n = 5$), 线性均良好。有关物质测定重复性试验鸟嘌呤 RSD 为 1.0% ($n = 6$); 其他杂质 RSD 为 1.3% ($n = 6$)。结论:方法简便、可靠, 可用于生产的质量控制。

关键词 阿昔洛韦分散片 高效液相色谱 有关物质

阿昔洛韦是一种具有嘌呤母核的广谱抗病毒药物。适用于:(1)单纯疱疹病毒感染;(2)带状疱疹;(3)免疫缺陷者水痘的治疗;(4)尖锐湿疣;(5)慢性病毒性乙型肝炎;(6)EB病毒感染,巨细胞病毒感染及器官移植病人的预防性用药;(7)急性视网膜坏死的治疗;(8)提高突发性耳聋的恢复率。研制的抗病毒药阿昔洛韦分散片,在水中 3 min 内能均匀溶散为混悬液,是老、幼和吞咽困难患者理想的用药剂型。

本文采用 HPLC 法测定阿昔洛韦分散片的有关物质,在生产中控制质量,获得满意结果。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Spectra-Physics 高效液相色谱仪;SP8810 液相色谱泵,Spectral100 紫外检测仪,Anastar 色谱工作站。

1.2 试剂

阿昔洛韦分散片 (031025、031026、031027) 三批样品由天津市蓝恒医药化工技术研究所研制。规格 0.1 g 。阿昔洛韦对照品由中国药品生物制品检定所提供。鸟嘌呤对照品由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 方法

阿昔洛韦分散片有关物质测定方法参考 USP26 版 Acyclovir Tablets 和中国药典 2000 年版二部阿昔洛韦原料含量测定项。采用 HPLC 法。

2.2 色谱条件及系统适应性试验

2.2.1 色谱条件 色谱柱: C_{18} , $200 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (迪马色谱公司提供)。流动相:甲醇:水 (8:92)。流速: 1.0 mL/min 。检测波长 254 nm 。

2.2.2 系统适用性试验 ①理论板数:按阿昔洛韦计算,理论板数为 4038,以鸟嘌呤计,理论板数 3869。②分离度:阿昔洛韦与相邻杂质峰(鸟嘌呤峰)分离度为 2.15。符合要求。③拖尾因子:阿昔洛韦峰拖尾因子在 $0.95 \sim 1.05$ 之间,符合要求(见图 1)。

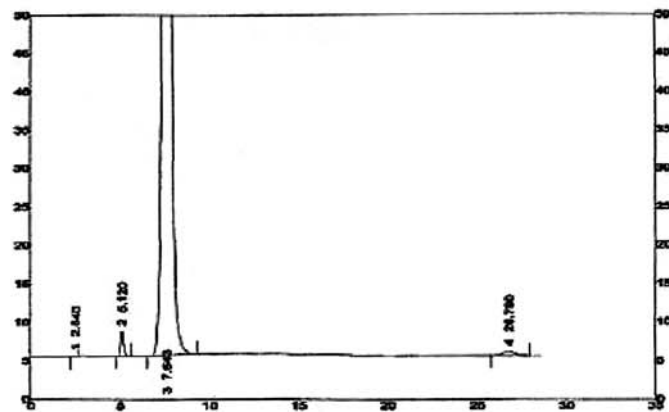


图 1 阿昔洛韦分散片色谱图

2.3 有关物质检查线性试验

精密称取阿昔洛韦对照品 10 mg , 置 100 mL 量瓶中,加 0.4% 氢氧化钠溶液振摇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。分别取此溶液 0.5 mL 、 1.0 mL 、 2.5 mL 、 5.0 mL 、 7.5 mL , 置 100 mL 量瓶中,各加等量 0.1 mol/L 醋酸溶液,摇匀,并用水稀释至刻度,分别取上述溶液各 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。以浓度 (C) 对峰面积 (A) 绘制回归曲线。线性方程: $A = 30010C + 5900$ ($r = 0.9996$, $n = 5$), 结果表明阿昔洛韦浓度在 $0.5 \sim 7.5 \mu\text{g/mL}$ 范围内,线性良好。

2.4 鸟嘌呤线性试验

精密称取鸟嘌呤对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液振摇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。分别取此溶液 0.5mL、1.0mL、2.5mL、5.0mL、8.5mL, 置 100mL 量瓶中, 各加等量 0.1mol/L 醋酸溶液, 摇匀, 并用水稀释至刻度, 分别取上述溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以浓度 (C) 对峰面积 (A) 绘制回归曲线。线性方程: $A = 28882C + 4734$, $r = 0.9996$ ($n = 5$), 结果表明鸟嘌呤浓度在 0.5~8.5 μ g/mL 范围内, 线性良好。

2.5 有关物质检查重复性试验

取本品, 研细, 精密称取适量 (约相当于阿昔洛韦 25mg) 共 6 份, 分别置 50mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液 10mL, 振摇使溶解, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 10mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 精密量此溶液 1.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。另精密称取鸟嘌呤对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取此溶液 5.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 5.0mL, 摇匀, 加水稀释至刻度, 作为鸟嘌呤对照品溶液。各取 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。鸟嘌呤 RSD 为 1.0% ($n = 6$), 其他杂质 RSD 为 1.3% ($n = 6$)。结果表明, 本品有关物质检查重复性良好。

2.6 样品放置时间稳定性检查

取本品, 分别于 0h、2h、4h、6h、8h 取样 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果测定溶液在 8h 内稳定 (见表 1)。

表 6 有关物质检查溶液放置稳定性结果

| 放置时间 (h) | 鸟嘌呤峰面积 | 其他杂质峰面积 |
|----------|--------|---------|
| 0 | 32500 | 23535 |
| 2 | 33123 | 23424 |
| 4 | 33886 | 23736 |
| 6 | 33560 | 23726 |
| 8 | 33570 | 23769 |
| 平均峰面积 | 33327 | 23535 |
| RSD (%) | 1.6 | 1.4 |

2.7 有关物质检查精密度试验

按试验方法配制同一批样品 5 份, 依法测定, 结果鸟嘌呤日间、日内 RSD 分别为 1.2% 和 1.6%, 其他杂质日间、日内 RSD 分别为 1.4% 和 1.7%。

2.8 鸟嘌呤溶液放置时间稳定性试验

精密称取鸟嘌呤对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液使溶解, 并用稀释至刻度, 摇匀, 取此溶液 10.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加

0.1mol/L 醋酸溶液 10mL, 摇匀, 并用水稀释至刻度, 分别于 2h、4h、6h、8h 各取 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果表明, 鸟嘌呤溶液在 8h 内稳定 (RSD = 0.2%)。

2.9 有关物质检查最低检出限

经测定, 阿昔洛韦最低检出限为 1ng, 鸟嘌呤最低检出限为 1ng, 信噪比不低于 3:1。

2.10 样品有关物质检查

取本品, 研细, 精密称取适量 (约相当于阿昔洛韦 25mg), 置 50mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液 10mL, 振摇使溶解, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 10mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 精密量此溶液 1.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。另精密称取鸟嘌呤对照品 10mg, 置 100mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取此溶液 5.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 5.0mL, 摇匀, 加水稀释至刻度, 作为鸟嘌呤对照品溶液。

分别取上述溶液 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 阿昔洛韦分散片的有关物质检查均符合规定 (见表 1)。

表 1 样品有关物质检查

| 批号 | 1 | 2 | 3 |
|------------|------|------|------|
| 鸟嘌呤 (%) | 0.24 | 0.24 | 0.24 |
| 其他杂质总量 (%) | 0.18 | 0.19 | 0.19 |

结果表明, 用 HPLC 法检查阿昔洛韦分散片的有关物质。方法简便、可靠, 可用于本品的质量控制。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

精密称取阿昔洛韦 10mg, 置 10mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液适量, 振摇使溶解, 并用 0.4% 氢氧化钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。取此溶液 1.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 1mL, 摇匀, 加水稀释至刻度, 取此溶液照分光光度法 (中国药典 2005 年版二部附录 IV A), 于 200~400nm 波长处扫描, 结果表明, 本品在 252nm 波长处有最大吸收。

由于本品主要杂质为鸟嘌呤, 因此, 对此也进行紫外扫描。精密称取鸟嘌呤对照品 10mg, 置 10mL 量瓶中, 加 0.4% 氢氧化钠溶液溶解并用水稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。取此溶液 1.0mL, 置 100mL 量瓶中, 加 0.1mol/L 醋酸溶液 1mL, 摇匀, 加

水稀释至刻度,取此溶液照分光光度法(中国药典2000年版二部附录IV A),于200~400nm波长处扫描,结果表明,鸟嘌呤最大吸收峰为273nm,在254nm有较大吸收。

选定检测波长为254nm。

3.2 流动相的选择

采用流动相:甲醇:水(10:90)。精密称取阿昔洛韦10mg,置10mL量瓶中,加0.4%氢氧化钠溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。取此溶液1.0mL,置100mL量瓶中,加0.1mol/L醋酸溶液1mL,摇匀,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,取此液10 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明,阿昔洛韦保留时间为6.54min,保留时间稍短。

调整此流动相比例,甲醇:水(6:94),取上述供试品溶液10 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明,阿昔洛韦保留时间为9.85min,保留时间合适,但峰形不理想。

继续调整流动相比例,甲醇:水(8:92),取上述供试品溶液10 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明,阿昔洛韦保留时间为9.16min,保留时间合适,且峰形理想。故选择采用此流动相。

3.3 流动相、溶媒和辅料干扰试验

取流动相10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明流动相不干扰有关物质的检查。

取0.4%氢氧化钠溶液5mL,加0.1mol/L醋酸溶液5mL,摇匀,取10 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,溶媒不干扰含量测定。

另精密称取处方量辅料,照供试品溶液制备方

法配制成溶液,滤过,取续滤液10 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明辅料不干扰有关物质检查。

3.4 专属性试验

3.4.1 阿昔洛韦与鸟嘌呤的分离试验 在本色谱条件下,阿昔洛韦与鸟嘌呤的分离度为2.1,理论板数分别为4038和3869。

3.4.2 破坏性试验 日光破坏试验;酸降解试验;碱降解试验;氧化破坏试验(见表7)。

表7 破坏性试验结果

| | | | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 酸降解 | 辅料 | 2.12 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 分散片 | 2.05 | - | 3.05 | 3.23 | - | 4.20 | 5.13 | 6.76 | - |
| 碱降解 | 辅料 | 2.02 | - | - | - | - | 4.22 | - | - | 8.67 |
| | 分散片 | 2.04 | - | - | - | - | - | 5.13 | - | 8.58 |
| 氧化破坏 | 辅料 | 2.39 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 空白 | 2.06 | 2.40 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 分散片 | 2.07 | 2.36 | 2.88 | - | 4.00 | - | 5.34 | - | - |

以上结果表明本品对高温、日光比较稳定,杂质峰数量无明显变化,在强酸性条件下,鸟嘌呤量增加,另有4个降解产物,均与主峰分离良好,在强碱性条件下,只见到鸟嘌呤量杂质峰。氧化破坏,除鸟嘌呤量有增加,另有两个杂质峰,保留时间分别为2.88min和4.00min,均与主峰7.96min分离良好。说明本试验条件下,各杂质峰与主峰分离良好。

参考文献

- 1 USP26版 Acyclovir Tablets
- 2 中国药典2005年版二部阿昔洛韦
- 3 中国药典2005年版二部(附录VD)

HPLC for the determination of relative substances in Acyclovir dispersed tablets

Wang Qian¹ Liu Xinyuan² Wang Guiyan³

(1. Tianjin Institute of medical science, Tianjin 300070)

(2. Tianjin Longshunrong Pharmaceuticals factory, Tianjin 300011)

(3. Tianjin Lanheng Institute of medical and chemical technology, Tianjin 300074)

Abstract Objective To establish HPLC method to determine the relative substances in Acyclovir dispersed tablets. Method In the method C18(200 \times 4.6mm, 5 μ m) as the column and methanol-water(8:92) as the mobile phase and the detection wavelength of 254nm was specified. Result The linear range of Acyclovir was 0.5~7.5 μ g/mL($r=0.9996$, $n=5$) and Guanine was 0.5~8.5 μ g/mL($r=0.9996$, $n=5$). Relative substances repeated experiments: RSD of Guanine was 1.0% ($n=6$), and RSD of other relative substances was 1.3% ($n=6$). Conclusion The method is convenient, reliable. It can be used to quality control.

Keywords Acyclovir dispersed tablets HPLC Relative substances