论著

文章编号:1000-5404(2013)23-2542-05

HPLC法测定盐酸贝那替秦原料药及其注射剂的含量和有关物质

管海燕,李卓恒,于彩平,金 竹,卢来春 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所药剂科)

[摘要] **目的** 建立HPLC测定盐酸贝那替秦原料药及其注射剂的含量和有关物质的方法。**方法** 以乙腈-磷酸二氢钾溶液(每1 000毫升含6.80 g磷酸二氢钾、0.556 g庚烷磺酸钠)35∶65为流动相;采用反相C_{18}色谱柱,以1.0 mL/min流速,210 nm检测波长,30 ℃柱温,20 μL进样量为色谱条件进行测定。**结果** 盐酸贝那替秦原料药及注射液中各杂质峰峰面积之和不超过对照溶液主峰面积的1%;盐酸贝那替秦在浓度1~200 μg/mL范围内具有良好线性关系(r=0.999 5),高、中、低浓度的平均回收率分别为98.99%(RSD=0.67%)、99.96%(RSD=0.10%)、101.21%(RSD=0.11%);日内(n=3)及日间精密度(n=5)RSD均小于2%,定量限1.7 ng,检测限0.4 ng。**结论** 本实验方法专属性强、准确度高,可用于盐酸贝那替秦原料药和注射液的质量控制。

[关键词] 盐酸贝那替秦;含量测定;有关物质;HPLC
[中图法分类号] R927.2; R944.11; R971.92 [文献标志码] A

HPLC determination of benactyzine hydrochloride and related substances in the injection

Guan Haiyan, Li Zhuoheng, Yu Caiping, Jin Zhu, Lu Laichun (Department of Pharmacy, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method for detecting benactyzine hydrochloride and its related substances in the injection. **Methods** HPLC was performed to detect benactyzine and its related substances under the wave length of 210 nm under 30 ℃. The chromatographic conditions were as follow: the mixed solvent of acetonitrile and buffer of potassium dihydrogen phosphate (each 1 000 mL containing 6.80 g of potassium dihydrogen phosphate, 0.556 g sodium heptanesulfonate) (35∶65) was used as mobile phase, flow rate was 1 mL/min, injection volume was 20 μL. **Results** The total peak areas of related substances did not exceed 1% of the main peak area of reference solution. The linear ranges of benactyzine hydrochloride were 1 to 200 μg/mL (r=0.999 5). The average recoveries of high, medium and low concentrations were 98.99% (RSD=0.67%), 99.96% (RSD=0.10%), and 101.21% (RSD=0.11%) respectively. The RSD of intra-day (n=3) and inter-day assay (n=5) were less than 2%. The limit of quantitation was 1.7 ng, and the limit of detection was 0.4 ng. **Conclusion** Our HPLC method is proved to be highly selective, accurate and suitable for the quality control of benactyzine hydrochloride injection.

[**Key words**] benactyzine hydrochloride; content determination; related substance; high performance liquid chromatography

Supported by the Major Project of National New Drugs Innovation of Ministry of Science and Technology (2011ZXJ09102-01B). Corresponding author: Lu Laichun, Tel: 86-23-68757092, E-mail: lulaicq@163.com

近年来有机磷中毒事件逐年递增,国内外相关研究涉及急救药物应用、中毒护理、损伤研究及经济评价等[1-8]多方面内容。盐酸贝那替秦{benactyzine hydrochloride,N-甲基-N,N-二乙基-2-[(羟基二苯乙酰胺)氧]乙胺盐酸盐}作为已有国家标准的复方解磷定注射液中的成分之一,与硫酸阿托品、氯解磷定合用,对解救有机磷中毒有明确的临床应用价值。盐酸贝那替秦为抗胆碱药,又名苯那辛,主要用于胃及十二指肠溃疡、胃炎、胃痉挛、胆石症等治疗。现有盐酸贝那替秦质量标准[化学药品地标升国标,标准号:WS-10001-(HD-1067)-2002]中盐酸贝那替秦含量测定方法为滴定法,采用毒性试剂醋酸汞,不利于环境保护和人文保

[基金项目] 国家科技重大专项课题"重大新药创制"(2011ZXJ09102-01B)
[通信作者] 卢来春,电话:(023)68757092,E-mail:lulaicq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131012.1717.003.html(2013-10-12)

护,而且该方法原理为化学反应,指示剂终点颜色需凭肉眼观察,具有一定的主观因素,导致该法误差较大;复方氯解磷定注射液质量标准[化学药品地标升国标,标准号:WS-10001-(HD-0964)-2002]和文献[9]中含量测定方法虽为HPLC法,但该标准为复方制剂检测方法,且以氯解磷定为主要研究对象。课题组对该方法进行了精密度、重复性等方法学验证,同时采用同一盐酸贝那替秦样品在该标准的色谱条件下峰面积显著低于本实验方法,证明该标准的色谱条件用于盐酸贝那替秦含量测定的灵敏度较差。本研究拟对盐酸贝那替秦测定色谱条件进行优化,完善盐酸贝那替秦检测方法,可用于含量测定,同时对盐酸贝那替秦有关物质的检查方法进行探索。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试药

色谱仪:Agilent Technologies 1200 series HPLC(美国安捷伦公司);色谱柱:Diamonsil Technology C18柱(4.6 mm×250 mm,5.0 μm);电子分析天平:Sartorius BT 25S(德国赛多利斯公司,0.000 01)。盐酸贝那替秦对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号:100505-200601,99.9%),盐酸贝那替秦原料药(济南川成医药科技开发有限公司,98.9%,批号:20120101),甲醇、庚烷磺酸钠(色谱纯),其余试剂为分析纯。

1.2 溶液的制备

盐酸贝那替秦对照品溶液:精密称取盐酸贝那替秦对照品10.0 mg,置于25 mL容量瓶中,加适量水溶解并稀释至刻度,即得浓度为400 μg/mL对照品溶液。盐酸贝那替秦样品溶液:精密称取盐酸贝那替秦原料药,以盐酸贝那替秦注射液制备工艺制备为2 mg/mL注射液,从中取适量,加水稀释至刻度,摇匀,制备400 μg/mL待测液。阴性样品溶液:按盐酸贝那替秦注射液制备工艺制备不含盐酸贝那替秦的阴性样品,过滤即得。

1.3 色谱条件

分别取1.2中盐酸贝那替秦对照品溶液、盐酸贝那替秦样品溶液适量配制为100 μg/mL溶液,采用Diamonsil TC C_{18}(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)色谱柱;以乙腈-磷酸二氢钾溶液(每1 000毫升含6.8 g磷酸二氢钾、0.556 g庚烷磺酸钠)35∶65为流动相;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

1.4 有关物质检测

1.4.1 破坏实验 酸破坏实验:取盐酸贝那替秦注射液5 mL,置25 mL容量瓶中,加浓盐酸3滴,40 ℃加热15 min,放置冷却后1.0 mol/L氢氧化钠溶液调节至中性,用流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,续滤液注入HPLC仪,记录色谱图。

碱破坏性实验:取盐酸贝那替秦注射液5 mL,置25 mL容量瓶中,加0.01 mol/L氢氧化钠溶液5 mL,40 ℃加热15 min,放置冷却后0.2 mol/L盐酸调节至中性,用流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,续滤液注入HPLC仪,记录色谱图。

氧化破坏性实验:取盐酸贝那替秦注射液5 mL,置25 mL容量瓶中,加0.6%过氧化氢5 mL,40 ℃加热15 min,放置室温冷却,流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,续滤液注入HPLC仪,记录色谱图。

热破坏性实验:取盐酸贝那替秦注射液5 mL,置50 mL锥形瓶中加水20 mL,100 ℃加热5 min,全部转移至25 mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,续滤液注入高效液相仪,记录色谱图。

光破坏性实验:取盐酸贝那替秦注射液5 mL,至25 mL容量瓶中,流动相稀释至刻度,摇匀,放置在(4 500±500)Lx环境中10 d后,取20 μL注入高效液相仪中,记录色谱图。

1.4.2 溶液稳定性 取1.2下盐酸贝那替秦样品溶液适量,分别于0、1、4、8、12 h精密量取20 μL注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.4.3 最低检出限 取1.2中盐酸贝那替秦对照品溶液适量,流动相稀释制成0.02 μg/mL溶液,取20 μL注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.4.4 耐用性实验 采用不同品牌的色谱柱,BECKMAN C18(5 μm,4.6 mm×250 mm)、Diamonsil C18(5 μm,4.6 mm×250 mm)对方法学的耐用性进行考察。

1.4.5 样品测定 精密量取3个批号的盐酸贝那替秦注射液各5 mL,置25 mL容量瓶中,用流动相稀释为400 μg/mL溶液,作为对照溶液,从中吸取1 mL至100 mL容量瓶中,用流动相稀释为4 μg/mL溶液,作为供试品溶液,精密量取对照溶液和供试品溶液各20 μL,注入色谱仪,记录色谱图至主成分保留时间的2倍。杂质限量=(总杂质峰面积×100/对照溶液峰面积)×100%。

1.5 含量测定

1.5.1 线性关系考察 精密量取1.2中盐酸贝那替秦对照品溶液25 mL至50 mL容量瓶,加水稀释至刻度,摇匀得200 μg/mL溶液,从中分别取适量,加水稀释至刻度,摇匀,得浓度为150、120、100、80、20、4、1 μg/mL,依法分别进样20 μL。记录色谱图,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标作图,拟合回归方程。

1.5.2 日内精密度实验 配制110、100、90 μg/mL的高、中、低3个浓度盐酸贝那替秦样品溶液,各3份。按1.3中色谱条件测定,记录色谱峰面积。

1.5.3 稳定性实验 精密量取1.2中盐酸贝那替秦样品溶液,于0、2、4、8、12 h分别进样测定,记录色谱峰面积。

1.5.4 重复性实验 取1.2中盐酸贝那替秦样品溶液,配制为100 μg/mL,连续进样6次测定,记录色谱峰面积。

1.5.5 日间精密度 配制110、100、90 μg/mL的高、中、低3个浓度盐酸贝那替秦样品溶液,各3份进样5 d进行测定,记录色谱峰面积。

1.5.6 加样回收率实验 取1.2中盐酸贝那替秦对照品溶液1 mL共9份,分别至10 mL量瓶中,分为3组,每组分别加入已测定浓度为194.04 μg/mL的样品溶液5.0、3.8、3.4 mL,用水稀释至刻度,摇匀,得高、中、低3个浓度,依法测定,记录色谱峰面积,计算回收率。

1.5.7 定量限、检测限 精密量取1.2中盐酸贝那替秦对照品溶液,用水稀释为0.02、0.08 μg/mL,摇匀,依法测定。

1.5.8 样品测定 注射液样品测定:取3个批号的盐酸贝那替秦注射液,用流动相稀释为100 μg/mL供试品溶液,按1.3中色谱条件进样测定峰面积,计算含量,同时取3个批号的盐

酸贝那替秦注射液,用流动相稀释为400 μg/mL供试品溶液,用现行复方氯解磷定注射液质量标准方法检测。

原料药样品测定:精密称取3个批号的盐酸贝那替秦原料药,用流动相稀释为100 μg/mL供试品溶液,按1.3中色谱条件进样测定峰面积,计算含量,同时取3个批号的盐酸贝那替秦原料药,用现行盐酸贝那替秦质量标准方法检测。

2 结果

2.1 色谱条件

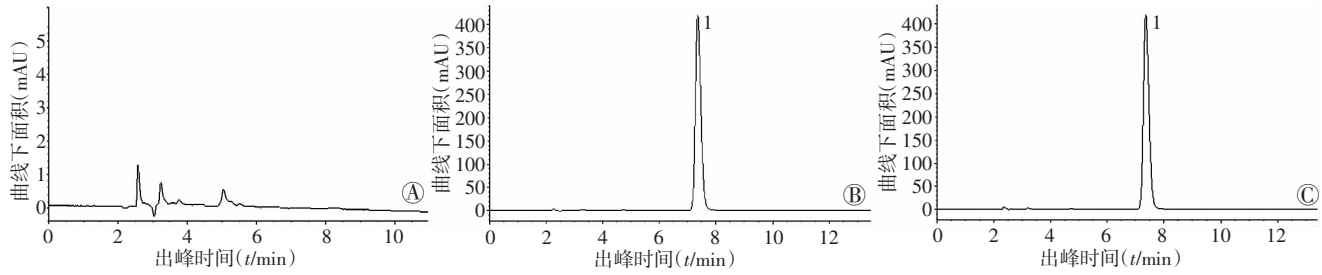
盐酸贝那替秦对照品溶液、盐酸贝那替秦样品溶液、阴性样品溶液色谱图见图1,可得色谱条件流动相干扰较小,盐酸贝那替秦峰与相邻杂质峰分离度、峰型良好。可作为盐酸贝那替秦含量测定及有关物质检查色谱条件。

2.2 有关物质检查

2.2.1 破坏试验 酸破坏性试验、碱破坏性试验、氧化破坏性试验、热破坏性试验、光破坏性试验结果见图2,表明盐酸贝那替秦注射液在碱性环境中不稳定,在酸、氧化、高温环境中较稳定,该色谱条件下盐酸贝那替秦主峰与相邻杂质峰分离度为酸破坏3.54,碱破坏3.21,氧化破坏3.49,热破坏2.69,光破坏2.39,分离度均大于2.3,满足国家化学药品分析方法要求,说明该条件可将主峰与杂质有效分离。

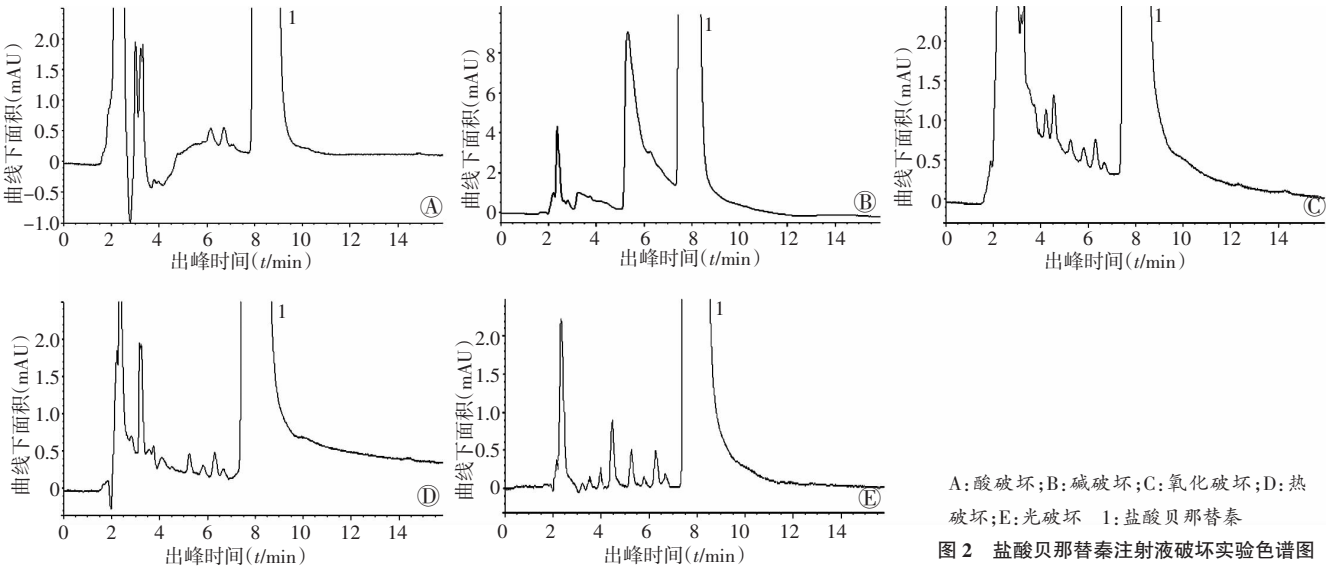
2.2.2 溶液稳定性 盐酸贝那替秦样品溶液12 h稳定性结果见图3,表明供试品溶液于12 h内,总杂质峰面积无明显变化,RSD为0.04%。

2.2.3 最低检出限 当S/N≈3时,最低检出限为0.4 ng,图谱见图4。



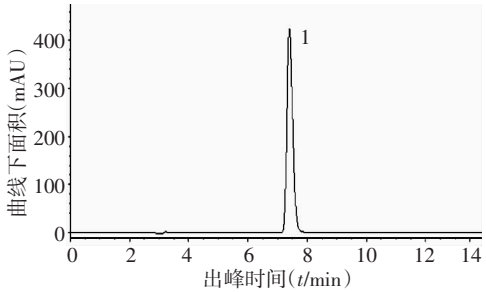
A:阴性样品;B:对照品;C:样品 1:盐酸贝那替秦

图1 盐酸贝那替秦色谱图



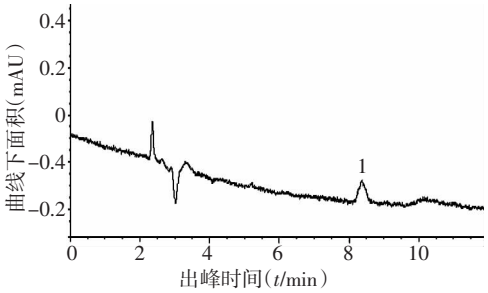
A:酸破坏;B:碱破坏;C:氧化破坏;D:热破坏;E:光破坏 1:盐酸贝那替秦

图2 盐酸贝那替秦注射液破坏实验色谱图



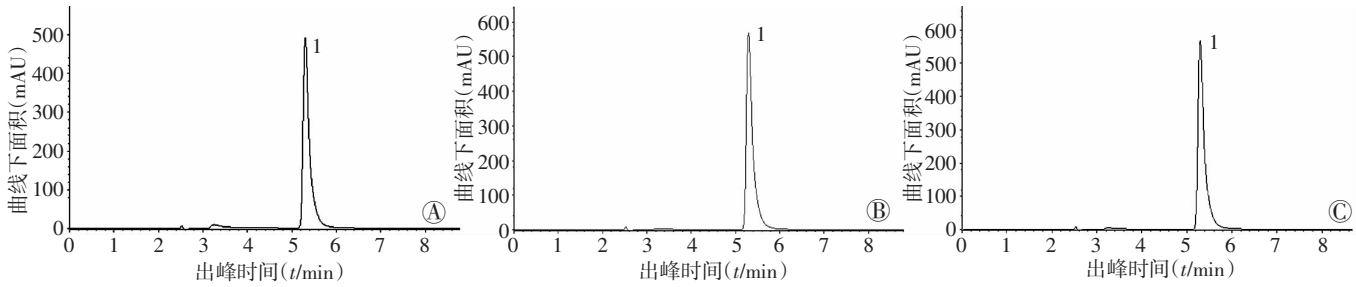
1:盐酸贝那替秦

图3 盐酸贝那替秦样品溶液12 h稳定性图谱



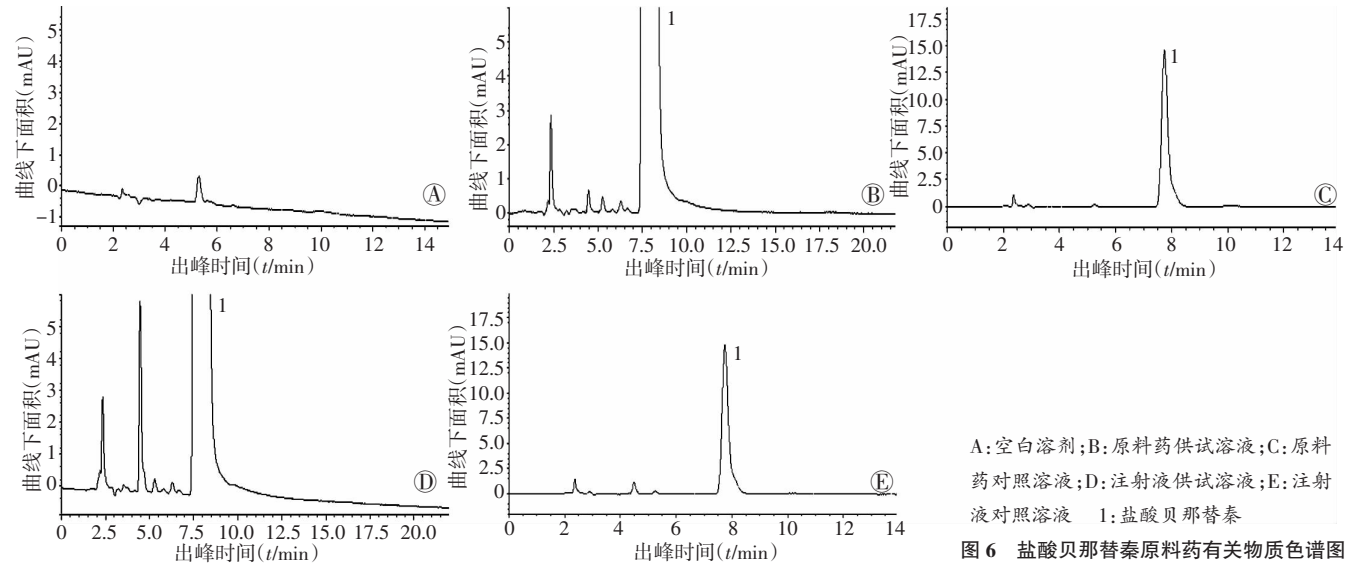
1:盐酸贝那替秦

图4 盐酸贝那替秦对照品溶液最低检出限色谱图



A:对照品;B:原料药;C:注射液 1:盐酸贝那替秦

图5 盐酸贝那替秦耐用性色谱图



A:空白溶剂;B:原料药供试溶液;C:原料药对照溶液;D:注射液供试溶液;E:注射液对照溶液 1:盐酸贝那替秦

图6 盐酸贝那替秦原料药有关物质色谱图

2.2.4 耐用性实验 采用不同品牌的色谱柱进行分析,均能够保证主峰和杂质峰完全分离,分离度 > 1.2,保留时间5 min较为合理,说明本方法的耐用性好,图谱见图5。

2.2.5 样品测定 盐酸贝那替秦原料药、注射液有关物质检测图谱见图6、表1,表明本研究拟定的方法专属性强,适合用于盐酸贝那替秦有关物质检查。测定供试品溶液,除溶剂峰外,各杂质峰峰面积之和不超过对照溶液主峰面积的1%,即杂质限量≤1%。

表1 盐酸贝那替秦原料药有关物质检查分析

测试样品	批次	对照溶液峰面积(mAU)	供试溶液峰面积(mAU)	总杂质峰面积(mAU)	杂质限量(%)
注射液	1	250.6	24 042.3	59.6	0.25
	2	249.2	24 046.8	59.2	0.25
	3	248.4	24 042.8	59.3	0.25
原料药	1	245.5	24 168.3	9.8	0.04
	2	245.9	24 145.3	9.6	0.04
	3	246.6	24 169.4	9.3	0.04

2.3 含量测定

2.3.1 线性关系考察 盐酸贝那替秦浓度在1~200 μg/mL的范围内有良好的线性关系。回归方程 A = 59.59C − 122.19 (r = 0.999 5)。

2.3.2 日内精密度实验 110、100、90 μg/mL的高、中、低3个浓度,日内精密度RSD分别为0.29%、0.11%、0.12%(n = 3),均小于0.3%,表明本方法日内精密度良好。

2.3.3 稳定性实验 盐酸贝那替秦样品溶液12 h稳定性考察,RSD为1.25%,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.3.4 重复性实验 盐酸贝那替秦样品溶液连续6次测定结果RSD为0.13%,表明本方法重复性良好。

2.3.5 日间精密度 110、100、90 μg/mL的高、中、低3个浓度,日间精密度RSD分别为1.22%、1.49%、0.90%(n = 5),均小于2%,表明本方法日间精密度良好。

2.3.6 加样回收实验 110、100、90 μg/mL的高、中、低3个浓度加样回收,平均回收率分别为98.99%(RSD = 0.67%)、99.96%(RSD = 0.10%)、101.21%(RSD = 0.11%),总体平均回收率为100.05%,RSD为1.11%,回收率在98%~102%范围内,且RSD均小于0.7%,表明本方法符合分析方法学要求。

2.3.7 定量限 当S/N≈10时最低定量限为1.7 ng。

2.3.8 样品测定 3个批号的盐酸贝那替秦注射液、盐酸贝那替秦原料药含量测定结果见表2,可知新拟定方法含量结果明显低于原检查方法,同时新拟定方法测定100 μg/mL的注射

液溶液时峰面积在5 800以上,原检查方法测定400 μg/mL的注射液溶液时峰面积在1 100左右,说明新拟定方法专属性更强、灵敏度更高;采用新拟定方法测定原料药结果明显低于原标准检查方法,说明新拟方法更能排除杂质的干扰,专属性更强。

表2 不同批次的盐酸贝那替秦原料药、注射液含量测定

批次	原料药		注射液			
	本法测得含量(%)	原法测得含量(%)	本法峰面积(mAU)	本法测得含量(%)	原法峰面积(mAU)	原法测得含量(%)
1	98.04	99.89	6 145.8	103.39	1 170.02	104.34
2	98.17	99.95	5 818.9	98.07	1 142.16	101.86
3	97.97	99.92	5 800.7	97.67	1 124.56	100.29

3 讨论

本研究采用HPLC方法进行盐酸贝那替秦原料药及注射液的含量测定,同时进行了盐酸贝那替秦的有关物质检查,填补了已有标准空白。与现有盐酸贝那替秦质量标准中采用非水滴定法测定盐酸贝那替秦含量比较,本法不涉及毒性试剂醋酸汞,有利于环境保护和人文保护;与复方解磷定注射液国家标准中的色谱条件比较,原色谱条件缺乏对盐酸贝那替秦的专属性,且重复性较差(RSD = 1.93),检出限为20 ng(S/N ≈ 3)左右,样品峰面积明显降低,说明本研究新拟定方法更适用于盐酸贝那替秦注射液的有关物质检查及含量测定。

盐酸贝那替秦含量测定有关文献报道较少,本实验所采用的流动相乙腈-磷酸二氢钾溶液(每1 000毫升含6.8 g磷酸二氢钾、0.556 g庚烷磺酸钠)与复方解磷定注射液国家标准所采用流动相比较,本法将标准中十二烷基硫酸钠更替为庚烷磺酸钠[10-14],通过调整比例使盐酸贝那替秦出峰时间由11 min提前到7.6 min左右,且色谱条件达到平衡的时间明显缩短,出峰时间更稳定,峰型较好,理论塔板数6 000以上,分离度>10。且本方法离子对试剂用量较小,成本经济,节省试剂和时间。

盐酸贝那替秦在国家标准[6]色谱条件下最大吸收220 nm,在本实验的色谱条件下,最大吸收为200 nm。因大多数有关物质在低波段有较大的吸收,为更好地反映有关物质,本实验选择低波长210 nm为检测波长。

参考文献:

[1] 冯亚芳, 胡亚亚. 有机磷农药中毒的急救与护理[J]. 吉林医学, 2012, 33(5): 1097-1098.

[2] 杨新华. 血浆、阿托品、长托宁联合治疗急性有机磷农药中毒的疗效观察[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(10): 1112-1113.

[3] 郭立峰, 郭囡囡. 长托宁和阿托品治疗有机磷中毒的成本-效果分析[J]. 中国药房, 2011, 22(12): 1106-1108.

[4] 闫长会, 檀德宏, 彭双清. 有机磷农药长期低剂量暴露致认知功能损伤的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(4): 397-401.

[5] 马永海. 应用长托宁联合氯磷定治疗有机磷农药中毒的临床观察[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(2): 234-235.

[6] 王瑞涛. 有机磷农药中毒的急救与心理护理[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 6(2): 72-74.

[7] 胡兴洲, 金辉纯, 徐素萍, 等. 血液灌流联合机械通气治疗急性有机磷农药中毒的疗效观察[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(1): 75-77.

[8] 宋田佳, 李晓岚. 胆碱酯酶监测在有机磷农药中毒诊断治疗中的应用[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(3): 84.

[9] 阎平, 魏君, 倪震宇, 等. 离子对-反相高效液相色谱法同时测定解磷注射液中氯磷定、盐酸苯那辛、硫酸阿托品的含量[J]. 光谱实验室, 2003, 20(3): 419-423.

[10] 王艳丽, 何德云, 赵晓娟, 等. HPLC法测定消痤搽剂中氯霉素和水杨酸含量[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(1): 47-68.

[11] 代秀梅, 于风平, 张启明. 替曲朵辛原料药含量和有关物质的测定及首批国家标准物质的标定[J]. 中国药房, 2013, 24(9): 821-823.

[12] 胡大强, 卢华, 管海燕, 等. 辐照对去甲肾上腺素注射液含量变化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(5): 431-433.

[13] 刘延凤, 任英, 孙建合. HPLC法测定盐酸左西替利嗪搽剂中苯扎溴铵的含量[J]. 药学研究, 2013, 32(3): 148-149.

[14] 郭江红, 赵亚萍, 姜红, 等. RP-HPLC法测定曲安奈德氯霉素溶液的含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 323-326.

(**收稿**:2013-06-17;**修回**:2013-08-21)

(编辑 张 维)