

# HPLC 测定注射用亚锡依替菲宁的含量

陈志明, 虞燕华, 吴二明, 李卫一, 汪洋(江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063)

**摘要:** 目的 建立用 HPLC 测定注射用亚锡依替菲宁(EHIDA 药盒)含量的方法。方法 采用 Waters C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm)的色谱柱, 以甲醇-水-磷酸(55:45:0.075)为流动相, 检测波长为 220 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果 依替菲宁在 32~384 μg·mL<sup>-1</sup> 内成线性关系,  $Y=1\ 789\ 041X+91\ 432$ ( $r=0.999\ 92$ )平均回收率为 98.77%, RSD 为 0.43%。结论 本方法操作简便, 结果准确, 可用于 EHIDA 药盒含量的快速定量分析。

**关键词:** 高效液相色谱法; 依替菲宁; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0258-03

## Determination of Etifenin and Stannous Chloride for Injection by HPLC

CHEN Zhiming, YU Yanhua, WU Erming, LI Weiyi, WANG Yang(*Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for determination of etifenin and stannous chloride for injection(EHIDA kit). **METHODS** HPLC was adopted with Waters C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm) column, methanol-water-phosphoric acid (55:45:0.075) was used as the mobile phase. The flow rate and detection wavelength was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 220 nm, respectively. **RESULTS** The linear range of etifenin were 32~384 μg·mL<sup>-1</sup>,  $r=0.999\ 92$ , the average recovery was 98.77%, RSD was 0.43%( $n=7$ ). **CONCLUSION** The method is simple, accurate and suitable for the determination of EHIDA kit.

**KEY WORDS:** HPLC; etifenin; content determination

钨<sup>[99mTc]</sup>标记的乙酰苯胺亚氨二醋酸类化合物经静脉注射可用于肝胆显像<sup>[1]</sup>, 其代表化合物 N-(2, 6-二乙基乙酰苯氨基)亚氨二乙酸(依替菲宁)为中国药典收载品种, 临床主要用于胆囊炎的鉴别诊断<sup>[2]</sup>, 先天性胆道闭锁和婴肝综合症的诊断和疗效观察等<sup>[3]</sup>。中国药典对注射用亚锡依替菲宁的含量测定采用氮测定法<sup>[4]</sup>。笔者通过实验, 建立了高效液相色谱法测定其含量, 操作简便, 结果满意, 提高了含量测定的准确度和专属性。

### 1 仪器与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Waters 2487 紫外检测器、Breeze 化学工作站;

电子天平(型号 BP211D, Sartorius); 超声波清洗器(KH2200DB 型, 昆山禾创超声仪器有限公司); LABCONCO 冷冻干燥机; 依替菲宁对照品[自制, 批号 0903003, 用氮测定法(中国药典 2005 年版附录 VII D 第二法)测定, 纯度 99.6%]; 氯乙酰(2, 6-二乙基)苯胺对照品(江原制药厂, 批号 060314, 纯度 99.9%); 注射用亚锡依替菲宁(江原制药厂, 规格: 40 mg; 批号: 20080809, 20081201, 20090304)。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Waters C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm);

作者简介: 陈志明, 男, 主管药师 Tel: (0510)85516244 E-mail: chenzhiming2002@yahoo.cn

柱温: 室温; 流动相: 甲醇-水-磷酸(55:45:0.075); 检测波长: 220 nm; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 20 μL。理论塔板数按依替菲宁峰计算约为 1 860, 依替菲宁色谱峰的拖尾因子为 1.03, 峰形基本对称。

## 2.2 对照品溶液的制备

取依替菲宁对照品 40 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 超声处理 8 min, 放至室温, 0.45 μm 滤膜过滤, 得含依替菲宁 800 μg·mL<sup>-1</sup> 的标准储备溶液。

精密吸取储备液 5.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成依替菲宁浓度为 160 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

## 2.3 供试品溶液的制备

取本品 1 瓶, 加甲醇溶解, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 超声处理 8 min, 放至室温, 0.45 μm 滤膜过滤。精密吸取 5.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成依替菲宁浓度为 160 μg·mL<sup>-1</sup> 的供试品溶液。

## 2.4 专属性考察

**2.4.1 空白试验** 按处方组成, 取除依替菲宁外的其余组分, 按工艺要求配制无依替菲宁的阴性对照液, 并冷冻干燥, 得冻干品。

按“2.1”色谱条件测定, 结果在依替菲宁峰出现的位置无对应峰出现, 表明其他组分对测定无干扰。

**2.4.2 依替菲宁与中间体的分离** 根据合成工艺, 依替菲宁可能引入的杂质主要是中间体氯乙酰(2, 6-二乙基)苯胺。取依替菲宁对照品和中间体适量, 加甲醇适量使溶解并稀释制成浓度均为 160 μg·mL<sup>-1</sup> 的供试液, 在“2.1”色谱条件下进样测定, 保留时间分别为 5.7 min 和 8.4 min, 分离度为 2.5。结果表明“2.1”色谱条件下依替菲宁与中间体能完全分离。

**2.4.3 依替菲宁与分解降解产物的分离** 取本品适量, 分别经强酸(6 mol·mL<sup>-1</sup> 盐酸)90 °C 水浴 2 h、强碱(6 mol·mL<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液)90 °C 水浴 2 h、过氧化氢溶液(6%, 60 °C)3.5 h、高温(170 °C)3 h 破坏处理, 中和后分别加甲醇稀释成约为 160 μg·mL<sup>-1</sup> 的供试液, 进行 HPLC 分析。结果本品对酸、碱和氧化条件下比较稳定, 在高温破坏下降解, 降解产物在“2.1”色谱条件下的保留时间分别为 13.4 min, 22.4 min 和 25.5 min, 和依替菲宁峰的分度均大于 1.5。试验表明在“2.1”选定的

色谱条件下, 依替菲宁与分解降解产物色谱峰分离良好。

## 2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2”项下依替菲宁储备液 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 12.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成依替菲宁浓度为 32, 64, 96, 160, 224, 320, 384 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列溶液。在“2.1”色谱条件下, 取 20 μL 进样分析, 以被测物峰面积为纵坐标(Y), 相应浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 得回归方程:  $Y = 1\ 789\ 041X + 91\ 432 (r = 0.999\ 92)$ , 线性范围 32~384 μg·mL<sup>-1</sup>。

## 2.6 精密度实验

依替菲宁对照品溶液, 在“2.1”色谱条件下重复进样 6 次, 依替菲宁平均峰面积为 5 891 401, RSD 为 0.35%, 仪器精密度良好。

中间精密度试验, 不同分析人员(n=5)进样操作, 依替菲宁峰平均峰面积为 5 900 305, RSD 为 0.42%。分别采用 Symmetry C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)、SunFine C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)和 Inertsil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行分析, 依替菲宁色谱峰峰形无明显变化, 保留时间基本一致。

## 2.7 重复性实验

取同一批号的依替菲宁样品 5 份, 按样品测定方法操作。结果依替菲宁的平均含量为 37.9 mg·mL<sup>-1</sup>, RSD 为 0.36%, 重复性良好。

## 2.8 稳定性实验

依替菲宁供试品溶液, 分别在室温下放置 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后, 按“2.1”色谱条件进样分析, 依替菲宁平均峰面积为 5 515 845, RSD 为 0.82%, 表明被测样品溶液在 24 h 内基本稳定。

## 2.9 回收率实验

按处方组成, 在空白辅料中加入对照品, 加入依替菲宁分别为处方量的 80%, 100% 和 120%, 按工艺要求配制, 并冷冻干燥, 得冻干品。

按“2.3”项下方法, 以“2.1”项下色谱条件测定, 每个浓度测定 3 份, 每份重复 5 次, 计算回收率, 结果见表 1。

## 2.10 样品测定

样品 3 批, 每个批号取 3 瓶, 每瓶均照“2.3”项下方法配制供试品溶液, 分别取配制的对照品溶液和供试品溶液按“2.1”色谱条件进样, 以峰

面积按外标法计算样品含量，并将测定结果与氮测定法进行比较，结果见表 2。

表 1 注射用亚锡依替菲宁的加样回收率( $n=5$ )

Tab 1 Results of recovery test ( $n=5$ )

加入对照 品量/mg	实测量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
32.0	31.9	99.54		
32.0	31.6	98.81		
32.0	31.7	99.16		
40.0	39.6	98.99		
40.0	39.5	98.76	98.77	0.43
40.0	39.4	98.58		
48.0	47.1	98.15		
48.0	47.3	98.59		
48.0	47.2	98.34		

表 2 样品中依替菲宁的含量测定结果

Tab 2 Results of determination of sample

样品批号	HPLC 测 定值/mg	HPLC/%	RSD/%	氮测定法/ %
20080809	37.0	92.5	0.46	92.2
20081201	36.0	90.1	0.48	89.6
20090304	37.9	94.8	0.46	94.4

### 3 讨论

从依替菲宁的紫外吸收图谱可见在 220 nm 波

长附近有一最大吸收峰，故选择 220 nm 为检测波长。在确定色谱分析条件时，对甲醇-水-磷酸的不同比例进行了多次选择比较，特别是磷酸的比例和峰形有关。最终确定本实验的流动相，使依替菲宁峰形好，保留时间适中。

和药典方法比较，本方法操作简便，影响因素少，提高了含量测定的准确度和专属性，可用于 EHIDA 药盒含量的快速定量分析。

### REFERENCES

- [1] BROWN P H, JUNI J E, LIEBERMAN D A, et al. Hepatocyte versus biliary disease: a distinction by deconvolutional analysis of Technetium-99m IDA time-activity curves [J]. J Nucl Med, 1988, 29(5): 623-630.
- [2] ZHANG Y Y, CHEN M, KONG H H, et al. A research on cholecystitis and cholelithiasis by radionuclide hepatobiliary imaging [J]. Chin J Nucl Med(中华核医学杂志), 2001, 21(5): 288-290.
- [3] YANG J G, LI CH L, ZOU L F et al. Value of  $^{99m}\text{Tc}$ -EHIDA hepatobiliary scintigraphy on diagnosis of congenital biliary atresia [J]. J Appl Clin Pediatr(实用儿科临床杂志), 2005, 20(10): 1050-1051.
- [4] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005: 364.

收稿日期: 2009-05-12