

高效液相色谱法测定环孢菌素口服液的含量

郝曾涓 谢旭一(浙江省药品质量监测站, 杭州 310012)

陈金媛 潘复生(中美华东制药有限公司, 杭州 310011)

环孢菌素(Cyclosporine)口服液由乙醇, 亲油性表面活性剂和植物油等辅料与环孢菌素经适宜工艺配制而成。其分析标准美国药典^[1]采用二碳硅烷键合硅胶柱, 柱型号特殊, 色谱系统试验条件颇苛刻。为此我们对色谱系统作了改进, 采用十八烷基硅烷键合硅胶(10 μm)为填充柱, 并对实验条件逐一考察, 确立了适宜的分析条件。测定方法准确可靠, 样品测定经与美国药典法比较, 无显著性差异。

实验方法

1 仪器与药品

高效液相色谱仪 Waters 510型输液泵, 990型二极管阵列检测器, U6K进样阀, 柱温加热控制器。色谱柱: E(250—020)RP-18 (10 μm) 4.6 \times 250 mm (天津利宝真测试仪器公司); μ Bondapak C₁₈ (10 μm) 3.9 \times 300 mm (Waters公司); Novapak C₁₈ (5 μm) 3.9 \times 200 mm (Waters公司); Spherisorb C₁₈ (5 μm) 4.0 \times 250 mm (中科院大连化物所); RP-2 (5 μm) 4.6 \times 150 mm (All Tech-Applied Science公司)

环孢菌素对照品(华东制药厂精制), 环孢菌素口服液若干批(华东制药厂提供), 乙腈(色谱纯), 其它试剂均为分析纯。

2 溶液制备

环孢菌素对照溶液 取对照品 50 mg, 精密称定, 置于 25 ml 量瓶中, 用乙腈—氯仿(9:1)混合液溶解, 定容。

口服液供试溶液 精密称取口服液适量(按相对密度折算成口服液体积, 相当于含环孢菌素 50 mg)用乙腈—氯仿(9:1)混合溶剂稀释成 0.5 mg/ml 的供试液。进样前经微孔滤膜(0.5 μm)过滤。

3 分析条件

色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶的不锈钢柱(10 μm)。以乙腈—水(62.5:37.5)混合液为流动相(需要时可调节流动相比例, 使环孢菌素色谱峰与口服液中杂质峰分离度 $R \geq 1.5$)。流速 1.5 ml/min, 柱温 $55 \pm 0.2^\circ\text{C}$; 检测波长为 210 nm。理论塔板数按环孢菌素峰计算应大于 700。

结果与讨论

1 流动相的选择

用环孢菌素对照溶液按上述分析条件, 考察不同比例的乙腈水溶液中环孢菌素峰的保留时间。结果表明, 环孢菌素的容量因子(K')随着乙腈的含量减少而增加, 当乙腈的含量小于 65% 时, 环孢菌素与口服液中杂质峰能得到完全分离。为使分析时间不过长, 实验时乙腈百分含量控制在 62% 左右为宜。(见图 1)。

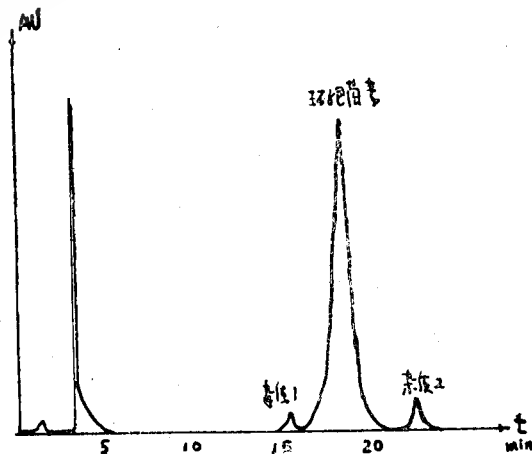


图 1 环孢菌素口服液的色谱图

1. 杂质 1 2. 环孢菌素 3. 杂质 2

在乙腈水溶液中加入0.05—0.2% (V/V)磷酸, 实验结果表明磷酸介质对环孢菌素的容量因子 K' , 理论塔板数 N 及与杂质峰分离度均无影响。

2 柱温对柱效的影响

用环孢菌素对照溶液按上述分析条件考察柱温从15—55°C范围内对环孢菌素色谱峰参数 N 的影响。结果表明提高柱温对环孢菌素的保留时间 t_R 影响甚微, 能明显改善峰形。在常温(25°C)色谱峰宽而不对称, 随柱温升高峰逐渐呈尖锐状, 使峰的柱效明显提高, 本实验选择 $55 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 为分析条件。

3 柱填充剂粒度的选择

用对照品溶液按上述分析条件对用国内外几家生产厂家的十八烷基硅烷键合硅胶填充柱获得的色谱图进行比较, 实验表明各家公司颗粒度为 $10 \mu\text{m}$ 的填充柱在柱效性能上均高于颗粒度为 $5 \mu\text{m}$ 的填充柱。环孢菌素的分子结构具有11个氨基酸, 分子量为1202道尔顿。较大的分子结构有可能影响溶质在流动相和固定相中传质速度, 大颗粒度填料有利传质速度改善, 所以在常规分析中以选择粒度 $10 \mu\text{m}$ 的十八烷基硅烷键合硅胶为宜。

4 线性范围考察

按上述分析条件将环孢菌素对照液稀释成每ml含环孢菌素0.0537、0.1074、0.3222、0.5370、0.7518 mg的标准系列溶液, 精密移取 $10 \mu\text{l}$ 测定。以进样量为横坐标(x), 测得峰面积为纵坐标(A), 实验表明在 $0.5 \mu\text{g}$ 至 $7 \mu\text{g}$ 进样范围内呈良好线性关系, 回归方程为 $A = 262.8x + 1.666$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。

5 进样重现性试验

按上述分析条件用一定浓度的环孢菌素对照液重复进样($n = 5$), 其峰面积的变异系数小于0.5%。

6 回收率试验

取模拟空白口服液(缺环孢菌素)适量, 按配方

比例精密加入环孢菌素对照品, 置 50 ml 量瓶中, 用乙腈—氯仿(9:1)混合溶剂溶解并稀释至刻度, 按上述分析条件测定。测定结果见表1, 其平均回收率为99.9%, 变异系数为0.3%。

表1 回收率试验

编号	对照品加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	9.98	9.99 (n=2)	100.1	
2	12.48	12.46 (n=3)	99.9	99.87 ± 0.25
3	14.97	14.92 (n=2)	99.6	

7 样品测试结果

取不同的生产批号口服液若干, 按上述分析方法测定, 其测定结果与按美国药典测定值比较(表2)对于 $\alpha = 0.05$ 水平, 两法比较 t 检验值 $= 0.183$, $|t_{\text{检}}| < t_{(1-\frac{0.05}{2})} = 2.228$, 故无显著性差异。

表2 样品测试结果

批号	含环孢菌素为标示量的(%)		偏差
	本法	USP法	
92318	104.9	104.4	0.5
92319-A	98.65	97.31	1.34
92319-B	90.78	92.63	-1.85
92320	98.68	97.48	1.20
92430	98.95	100.0	-1.05
92520	95.73	95.17	0.56
92804	97.24	96.15	1.09
911106	96.40	96.63	-0.23
911201	98.67	100.3	-1.63
911202	97.95	97.09	0.86
911203	93.68	93.24	-0.16

参考文献

- 1 美国药典22版

收稿日期: 1994-04-07