

分析测试

HPLC 法测定药物共晶中茶碱和对乙酰氨基酚的研究

刘海芬, 厉爱凤, 刘晓敏*, 沈晓冬

(南京工业大学材料科学与工程学院, 江苏 南京 210009)

摘要:建立了高效液相色谱法分离茶碱和对乙酰氨基酚双组分体系的最佳条件是: C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 120 Å), 以十八烷基键合硅胶为固定相; 流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸溶液调节 pH 至 3.05) (A)-甲醇(B) (体积比为 80:20); 检测波长为 245 nm 和 270 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25°C; 进样量为 20 μL。实验结果表明: 对乙酰氨基酚回归方程为 $y = 0.651 1x + 6.610 4$, $R^2 = 0.994 5$; 茶碱回归方程为 $y = 0.939 2x - 5.575 1$, $R^2 = 0.998$, 他们的线性范围是 5 ~ 500 μg/mL。该方法为茶碱、对乙酰氨基酚双组分体系研究提供依据, 为其溶解度的测定提供方法支撑, 作为高效液相色谱分离方法, 分析快速, 灵敏度高, 重现性好。

关键词: 高效液相色谱; 茶碱; 对乙酰氨基酚; 药物共晶; 流动相

中图分类号: O657.7+2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)10-0167-02

Determination of theophylline and acetaminophen in pharmaceutical co-crystals by HPLC

LIU Hai-fen, LI Ai-feng, LIU Xiao-min*, SHEN Xiao-dong

(College of Materials Science and Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

Abstract: High-performance liquid chromatography (HPLC) is used to determine the theophylline and acetaminophen in pharmaceutical co-crystals. The optimal conditions are shown as follows: C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 120 Å), octadecyl bonded silica as stationary phase, 0.01 mol/L of potassium dihydrogen phosphate (pH 3.05)/methanol (80/20 of volumetric ratio) as mobile phase, 245 nm and 270 nm as detection wavelength, 1.0 mL/min of flow rate, 25°C of column temperature and 20 μL of injection volume. The results show that the regression equations of acetaminophen and theophylline are $y = 0.651 1x + 6.610 4$ and $y = 0.939 2x - 5.575 1$, respectively. Their corresponding R^2 are 0.994 5 and 0.998, respectively. Furthermore, there is a linear relationship within 5 - 500 μg/mL. This method provides the basis for investigating theophylline-acetaminophen binary system and affords the feasibility of their solubility domination.

Key words: HPLC; theophylline; acetaminophen; pharmaceutical co-crystal; mobile phase

药物有效成分(API)和共晶形成物(CCF)以固定的化学计量比通过非共价键如氢键结合形成的晶体 $mAPI \cdot nCCF$ 称为药物共晶, 并且所用单体在实验室下是固体^[1-2]。目前药物共晶作为药学领域研究的前沿^[3-5], 因固体形态不同从而导致溶解度等相关理化性质的差异^[6], 建立可信、便捷的分析方法必将为科研提供有力保障。而现有文献中未见对药物共晶组分的高效液相色谱分析方法的报道, 那么对于广大的药物共晶研究者可根据其他相关报道分析多组分的液相分离结果^[7-8]。笔者建立了高效液相法分离茶碱和对乙酰氨基酚共晶双组分体系的最佳条件。该方法能为其溶解度的测定

提供方法支撑, 而且分离效果好, 准确度高, 重现性好^[9-10]。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

对乙酰氨基酚(质量分数为 99%), sigma 公司生产; 茶碱(质量分数为 99%), sigma 公司生产; 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司生产); 磷酸二氢钾(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司生产); 磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产); 实验用水为超纯水。

Ultimate -3000 型高效液相色谱(戴安中国有限

收稿日期: 2014-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(21206069)

作者简介: 刘海芬(1989-), 女, 硕士生, 主要从事药物共晶研究, 544153960@qq.com; 刘晓敏(1976-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药物固体形态选择与药物结晶研究, 通讯联系人, liuxm@njtech.edu.cn。

公司生产);TU-1800SPC 型紫外可见分光光度计(北京普析通用公司生产);KQ-300DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产);BSA124S 型电子天平(德国赛多利斯集团生产)。

1.2 色谱条件

C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 120 Å);流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸溶液调节 pH 至 3.05)(A)-甲醇(B)(体积比为 80:20);检测波长为 254 nm;流速为 1.0 mL/min;柱温为 25℃;进样量为 20 μL。在此色谱条件下,对乙酰氨基酚出峰时间为 6.293 min,面积为 18.558 4 mAU·min;茶碱出峰时间为 8.773 min,面积为 22.242 7 mAU·min。

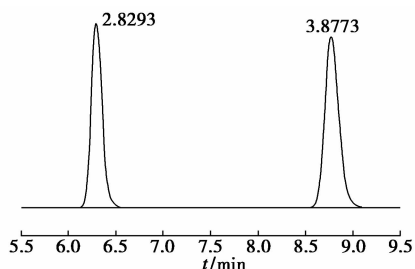


图 1 对乙酰氨基酚和茶碱高效液相色谱图

1.3 溶液的配置

1.3.1 对乙酰氨基酚溶液的配置

准确称取对乙酰氨基酚(APAP)0.25 g,用流动相溶解并定容到 500 mL 容量瓶中,质量浓度为 0.5 mg/mL。充分混匀后,先超声脱气 15 min 左右,再用 0.45 μm 的针头滤膜过滤后备用。

1.3.2 茶碱溶液的配置

准确称取茶碱(THEO)0.25 g,用流动相溶解并定容到 500 mL 容量瓶中,质量浓度为 0.5 mg/mL。充分混匀后,先超声脱气 15 min 左右,再用 0.45 μm 的针头滤膜过滤后备用。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析条件选择

2.1.1 流动相的选择

分别选用不同体积比的磷酸二氢钾溶液/甲醇体系为流动相,分析试样的分离效果。结果发现,V(0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液):V(甲醇)为 80:20 时,茶碱和对乙酰氨基酚双组份的出峰时间都较短,并且分离效果也很好。同时在单一变量的条件下对比了 pH 为 5.86 和 3.05(加磷酸调节)时的分离效果,发现 pH = 3.05 的效果较好。

2.1.2 检测波长的选择

分别将一定质量浓度的对乙酰氨基酚和茶碱溶液在波长 200 ~ 500 nm 范围内进行紫外光谱扫描,结果显示,对乙酰氨基酚在 245 nm 处有最大吸收,茶碱在 270 nm 处有最大吸收。故选择 245 nm 作为对乙酰氨基酚的检测波长,270 nm 作为茶碱的检测波长。

2.1.3 柱温的选择

通过对比 25、40℃ 柱温时的色谱图发现,在 25℃ 柱温下的峰形和半峰宽相对都比较好,因此选择 25℃ 作为检测对乙酰氨基酚和茶碱双组分的分析柱温。

2.2 线性相关性

分别量取 80、60 mL 0.5 mg/mL 的对乙酰氨基酚溶液,用流动相定容至 100 mL 容量瓶中,配制成质量浓度为 400、300 μg/mL 的对乙酰氨基酚溶液,再依次稀释成质量浓度为 240、120、100、50、25、10、5 μg/mL 的溶液,摇匀。分别取上述对乙酰氨基酚溶液 20 μL 进样,按照上述色谱条件测定对乙酰氨基酚溶液的峰面积(mAU·min)。以溶液的进样质量浓度 x (μg/mL) 为横坐标,其峰面积 y (mAU·min) 为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,对乙酰氨基酚在 5 ~ 500 μg/mL 范围内与其峰面积呈现良好的线性关系,回归方程为: $y = 0.651 1x + 6.610 4$, $R^2 = 0.994 5$ 。

分别量取 80、60 mL 0.5 mg/mL 的茶碱溶液,用流动相定容至 100 mL 容量瓶中,配制成质量浓度为 400、300 μg/mL 的茶碱溶液,再依次稀释成质量浓度为 240、120、100、50、25、10、5 μg/mL 的溶液,摇匀。分别取上述茶碱溶液 20 μL 进样,按照上述色谱条件测定茶碱溶液的峰面积(mAU·min)。以溶液的进样质量浓度 x (μg/mL) 为横坐标,其峰面积 y (mAU·min) 为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,茶碱在 5 ~ 500 μg/mL 范围内与其峰面积呈现良好的线性关系,回归方程为: $y = 0.939 2x - 5.575 1$, $R^2 = 0.998$ 。

2.3 精密度实验

精密吸取上述溶液 20 μL,连续进样 6 次,测定对乙酰氨基酚、茶碱峰面积的相对标准偏差 RSD 分别为 1.41%、1.09% ($n = 6$),结果表明对多组分的测定精密度良好。

2.4 稳定性实验

准确量取对乙酰氨基酚溶液 20 μL,在上述色谱条件下分别在 1、2、4、7、11、24 h 进样,记录保留

(下转第 170 页)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

银电极;双盐桥饱和甘汞电极;电位测定仪;微量滴定管。

硝酸银,分析纯,质量分数为 99%;双氧水,分析纯,质量分数为 30%;浓硝酸,分析纯,质量分数为 65%。

1.2 实验方法

精确称取有机磷酸水处理剂适量,氨水中和并调节溶液的 pH 至 7~9,加入适量双氧水置于温度为 50~90℃ 的恒温水浴锅内,保温 30 min,并不断搅拌,以除去样品中残余亚磷酸;将溶液缓慢加热并煮沸至多余的双氧水分解完全,使双氧水不干扰反应,再以银电极为指示电极,双盐桥饱和甘汞电极为参比电极,用硝酸银标准滴定溶液电位滴定至终点,按二级微商法之规定确定终点。

1.3 氨基三甲基磷酸电位滴定曲线的绘制

精密称定氨基三甲基磷酸,按上述方法进行测定,以指示电极的电位(mV)为纵坐标,以滴定管的读数(mL)为横坐标绘制滴定的 $E-V$ 曲线,如图 1 所示。以一次微商($\Delta E/\Delta V$)值为纵坐标,以滴定管的读数(mL)为横坐标绘制滴定的 $\Delta E/\Delta V-V$ 曲线,如图 2 所示。以二次微商($\Delta^2 E/\Delta V^2$)值为纵坐

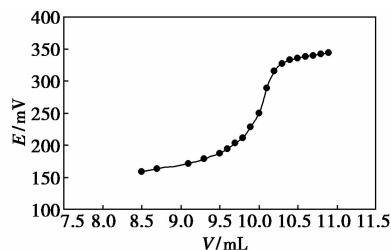


图 1 滴定的 $E-V$ 曲线

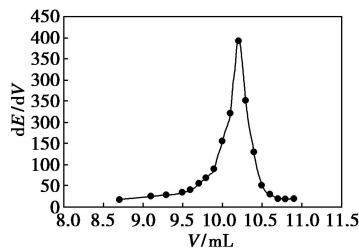


图 2 滴定的 $\Delta E/\Delta V-V$ 曲线

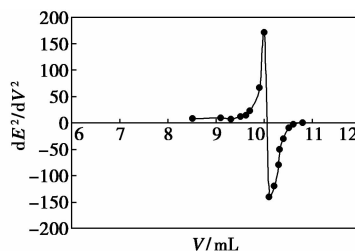


图 3 滴定的 $\Delta^2 E/\Delta V^2-V$ 曲线

(上接第 168 页)

时间和峰面积,其保留时间 RSD 为 0.17%,峰面积 RSD 为 1.55%,结果表明,对乙酰氨基酚溶液在配制后 24 h 内比较稳定。

3 结论

建立了高效液相色谱法分离检测药物共晶中茶碱和对乙酰氨基酚双组分体系的最佳条件: C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 120 Å);流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸溶液调节 pH 至 3.05)(A)-甲醇(B)(体积比为 80:20);检测波长为 254 nm(该波长下可以证实二者分离度较好),但是计算各自线性关系时仍然按照各自的特征吸收波长而定;流速为 1.0 mL/min;柱温为 25℃;进样量为 20 μL。该方法可为茶碱和对乙酰氨基酚药物溶解度测定提供方法支撑,也为后续平衡常数的测定提供间接方法辅助。

参考文献

[1] Zhang G G, Henry R F, Borhardt T B, et al. Efficient co-crystal

screening using solution-mediated phase transformation [J]. J Pharm Sci, 2007, 96(5): 990-995.

[2] Vishweshwar P, McMahon J A, Bis J A, et al. Pharmaceutical co-crystals [J]. J Pharm Sci, 2006, 95(3): 499-516.

[3] Trask A V, Motherwell W D S, Motherwell Jones W. Pharmaceutical co-crystallization; Engineering a remedy for caffeine hydration [J]. Crys Grow Des, 2005, 5: 1013-1021.

[4] Good D J, Rodriguez-Hornedo N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals [J]. Crys Grow Des, 2009, 9: 2252-2264.

[5] Bethune S J, Huang N, Jayasankar A, et al. Understanding and predicting the effect of cocrystal components and pH on cocrystal solubility [J]. Crys Grow Des, 2009, 9: 3976-3988.

[6] Grant D J W, Higuchi T. Solubility behavior of organic compounds [M]. New York: Wiley, 1990.

[7] 陈珠灵, 张兰, 王敏, 等. 高效液相色谱法同时测定诺诺感冒片中扑尔敏、扑热息痛、盐酸伪麻黄碱的含量 [J]. 色谱, 2001, 19(3): 236-237.

[8] 黄晓兰, 许玫英. 高效液相色谱法同时测定制药废水中的交沙霉素、茶碱及扑热息痛 [J]. 色谱, 2005, 23(3): 296-298.

[9] 张瑞, 张志辉, 等. 高效液相色谱法测定皮革中 20 种溴代阻燃剂 [J]. 分析实验室, 2014, 33(1): 73-77.

[10] 陈宏, 陈友存, 等. HPLC 测定阿莫西林胶囊中的有效成分 [J]. 光谱实验室, 2013, 30(6): 2733-2736. ■