

# 2,4-二硝基氟苯柱前衍生化HPLC法测定注射用帕米磷酸二钠的含量

林慧菁 杨乐 柯欢  
(广东省东莞市药品检验所 东莞 523109)

**摘要:**目的:建立2,4-二硝基氟苯柱前衍生化HPLC法测定注射用帕米磷酸二钠的含量。方法:碱性条件下供试品与2,4-二硝基氟苯进行衍生化反应,采用Ultimate XB-C18柱,流动相A为乙腈,流动相B为0.01mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾缓冲液(用三乙胺调节pH值至7.0),以1.0mL/min的流速进行梯度洗脱(0~5.10min,A为10%;5.10~5.11min,A为10%~25%;5.11~7.20min,A为25%;7.20~7.21min,A为25%~10%;7.21~12.0min,A为10%),检测波长为365nm。结果:帕米磷酸二钠浓度在0.05~2.00mg/mL浓度范围内与峰面积呈良好关系( $r=0.9997$ ),平均回收率为100.1%( $n=9$ )。结论:该方法专属性好,准确、灵敏,适用于注射用帕米磷酸二钠的含量测定。

**关键词:**注射用帕米磷酸二钠;柱前衍生化;高效液相色谱法;含量

中图分类号:R978

文献标识码:A

文章编号:1674-098X(2010)09(c)-0007-02

帕米磷酸二钠(Pamidronate Disodium)为3-氨基-1-羟基丙叉-1,1-二磷酸二钠五水合物,在临床上广泛应用的具有氨基的第二代双磷酸盐类药物<sup>[1]</sup>。注射用帕米磷酸二钠目前已收载于国家药品标准<sup>[2]</sup>,利用的是本品结构中含有伯胺,与荧光胺衍生反应后产生荧光,采用荧光检测器检测的RP-HPLC法;即将执行的《中国药典》2010年版二部,采用离子色谱法<sup>[3]</sup>。帕米磷酸二钠无紫外吸收基团,而高效液相色谱仪在我国已很普及,常配置紫外检测器,但无法分析没有紫外吸收的样品。为了克服此不足,本实验通过2,4-二硝基氟苯柱前衍生化HPLC法<sup>[4-6]</sup>,采用化学衍生技术接入强紫外吸收基团,转化成强紫外吸收衍生物,以此建立注射用帕米磷酸二钠的含量测定方法,操作方便准确、方法灵敏,具有很大的实用价值。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:Waters 515泵,Waters 2996 PDA检测器,Waters Empower软件;Sartorius BP211D电子分析天平。

帕米磷酸二钠工作对照品(深圳某药业有限公司提供,批号为20090501-1,150减压干燥至恒重后使用,含量100.0%)、注射用帕米磷酸二钠(深圳某药业有限公司,批号20080402、20080403、20080404,标示量:0.015g),空白辅料为甘露醇;2,4-二硝基氟苯(东京化成工业株式会社,批号:900280000);乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC色谱条件

色谱柱为Ultimate XB-C18柱,流动相A为乙腈,流动相B为0.01mol/L磷酸二氢钾缓冲液

(用三乙胺调节pH值至7.0),以1.0mL/min的流速进行梯度洗脱(0~5.10min,A为10%;5.10~5.11min,A为10%~25%;5.11~7.20min,A为25%;7.20~7.21min,A为25%~10%;7.21~12.0min,A为10%),检测波长为365nm,进样量10 $\mu$ L。

### 2.2 测定方法

2.2.1 衍生化溶液的配制称取2,4-二硝基氟苯约3.0g,置100mL量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,即得。

2.2.2 供试品溶液的配制取5瓶样品的细粉,精密称定,精密称取适量(约相当于帕米磷酸二钠10mg),置20mL量瓶中,加0.05mol/L碳酸钠溶液适量,振摇使溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2.3 对照品溶液的配制取帕米磷酸二钠工作对照品约10mg,精密称定,置20mL量瓶中,同法制成每1mL中含帕米磷

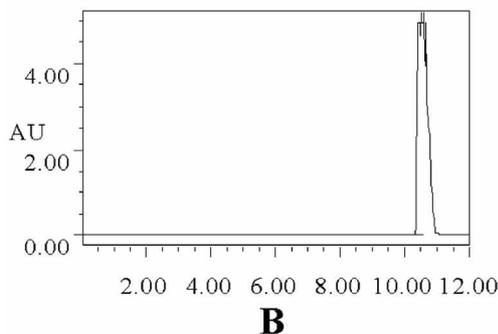
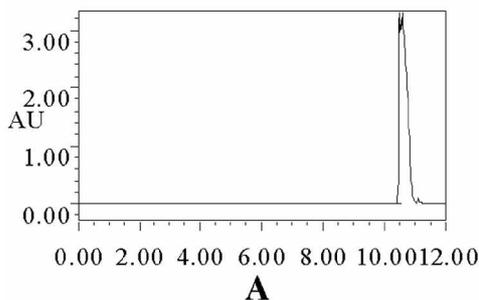


图1 阴性对照溶液(A)、空白溶液(B)、

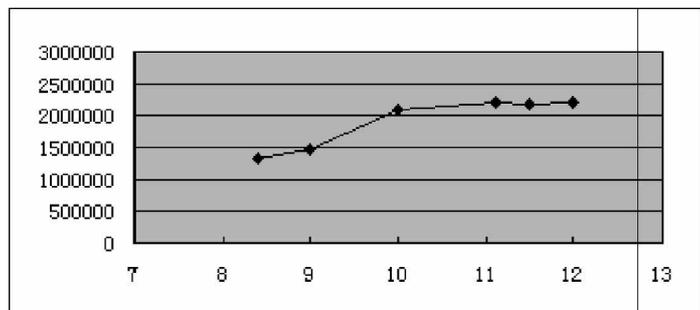


图2 pH值对衍生反应的影响

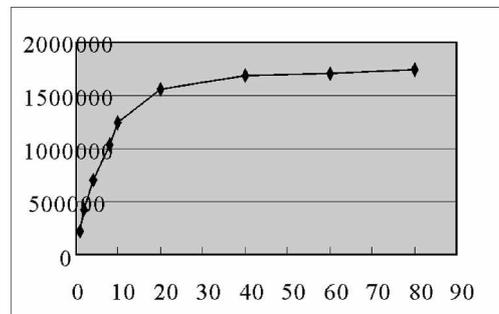


图3 样品与衍生剂反应的重量比的影响

酸二钠0.5mg的对照品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液取空白辅料约0.13g,精密称定,置20mL量瓶中,加0.05mol/L碳酸钠溶液适量,超声处理15min,并稀释至刻度,摇匀。

2.2.5 空白溶液的配制0.05mol/L碳酸钠溶液

2.2.6 衍生化反应 取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和空白溶液各3mL,置25mL量瓶中,加衍生化溶液2mL,置40℃中水浴反应20分钟,取出,放冷,用0.05mol/L碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,作为反应后的对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和空白溶液。

### 2.3 专属性试验

分别精密量取反应后的对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液和空白溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图(见图1)。在该色谱条件下,帕米膦酸二钠的保留时间约为4.0min,理论板数大于2000,空白辅料及空白溶液无干扰,反应后的衍生物主峰与相邻峰的分度符合度符合要求(图1)。

### 2.4 线性关系考察

精密称取帕米膦酸二钠对照品适量,加0.05mol/L碳酸钠溶液分别配制成0.05,0.125,0.25,0.50,1.00,2.00mg/mL的系列对照品溶液,依法操作,取衍生后溶液,各进样10μL,以进样浓度(C,mg/mL)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线得到回归方程: $Y=3.739 \times 10^7 C - 1.331 \times 10^6$ , $r=0.9997$ ( $n=6$ ),结果表明在0.05~2.00mg/mL浓度范围内与峰面积呈良好关系。

### 2.5 精密度试验

取“线性关系考察”项下系列4的对照品溶液(0.5mg/mL),连续进样6次,记录色谱图,测得帕米膦酸二钠峰面积相对标准偏差(RSD)为1.3%( $n=6$ ),结果表明,方法的精密度良好。

### 2.6 重复性试验

按“2.2”项下方法配制供试品溶液6份,依法操作,记录色谱图,测得帕米膦酸二钠含量为103.7%,RSD为1.0%。结果表明,方法的重复性良好。

### 2.7 稳定性试验

取“线性关系考察”项下系列4的对照品溶液(0.5 mg/mL),分别在0、2、4、6、8、12、18 h进样10 μL,记录色谱图,测得帕米膦酸二钠峰面积相对标准偏差(RSD)为1.2%( $n=7$ ),结果表明,溶液在18h内稳定性良好。

### 2.8 回收率试验

以供试品溶液的80%、100%、120%作为检测浓度,取同一批已知含量(103.7%)的供试品9份,精密称定,分别精密加入帕米膦酸二钠对照品贮备液(约1.3mg/mL)3、5、7mL各3份,按“2.2”项下方法配制所需溶液,依法测定,结果平均回收率( $n=9$ )为100.1%,RSD为1.8%。

### 2.9 样品测定

取样品3批,分别按“2.2”项下方法配制所需溶液,依法测定含量,结果( $n=4$ )分别为103.7%,98.5%,101.9%;RSD分别为1.0%,1.0%,1.1%。

## 3 讨论

### 3.1 衍生化条件的选择

3.1.1 衍生反应的pH值 2,4-二硝基氟苯在碱性条件下能与含伯或仲胺基的化合物衍生,为确定本实验的反应pH值条件,除了0.05mol/L碳酸氢钠溶液(pH8.4)、0.05mol/L碳酸钠溶液(pH11.1)外,在0.05mol/L碳酸氢钠溶液及0.05mol/L碳酸钠溶液基础上,用氢氧化钠试液配制了pH约为9.0、10.0、11.5、12.0的一系列溶液,同法操作,测定结果发现在pH>10时,帕米膦酸二钠峰面积无明显差异,因此选用0.

05mol/L碳酸钠溶液(图2,图3)。

3.1.2 样品与衍生剂反应的重量比 称取2,4-二硝基氟苯约3.0g,置50mL量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,配制成60mg/mL的衍生化溶液,并逐步稀释成0.75、1.5、3.0、6.0、7.5、15、30、45、60mg/mL的一系列溶液,各取2mL,分别与对照品溶液(0.5mg/mL)9份各3mL,依法操作,进行衍生化反应。精密量取反应后的上述溶液各10μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,衍生化试剂与样品重量比值为40以上时,衍生物峰面积无明显变化,因此选用30mg/mL的衍生化溶液。

### 3.1.3 反应时间

取对照品溶液(0.5mg/mL)9份各3mL,分置25mL量瓶中,加衍生化溶液2mL,置40℃中水浴分别反应2、5、10、20、30、40、60、120分钟,取出,放冷,用0.05mol/L碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀。精密量取反应后的上述溶液各10μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,反应时间在20分钟后衍生物峰面积变化较少,因此选用20分钟为反应时间。

### 3.2 色谱柱与液相色谱仪的影响

笔者先后选用了Kromil100-5C18、Hypersil ODS2柱,以及不同的液相色谱仪(Waters515、岛津LC20AT)结果表明空白辅料无干扰,同样满足系统适用性要求。

## 参考文献

- [1] 钟永祥,张祥斌.帕米膦酸二钠的临床应用进展[J].中华全科医师杂志,2005.
- [2] 国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准[S].北京:人民卫生出版社,2006,58.
- [3] 中国药典[S].二部,2010.

(上接6页)

极化体”非常明显。在13-23线之间的流纹岩、火山角砾岩(集块岩)和凝灰岩几乎都有不同程度的黄铁矿化和其它蚀变;而在13-17线,尤其13-15线的酸性火山熔岩、火山角砾岩、集块岩中之矿化强度最高,矿体出露宽度最大约30m左右,呈30°走向、倾向120°左右,倾角60°~80°(图1)。

## 5 金属因素JS异常与矿体形态的分布规律和几点认识

(1)视极化率、视电阻率与构造带中的多金属矿化有关,当构造带中具有多金属矿化时可形成低阻高极化异常。

(2)异常带与构造带在走向上和倾向上都具有舒缓波状、膨胀收缩之特征,膨胀部位就是构造带的转弯部位且与矿化蚀变带关系密切。

(3)金属因素JS在有效压制高阻低极化体非矿岩层的作用和减弱地形的影响具有重要意义,突出了“低阻高极化体”有意义的矿化异常。

(4)金属因素JS异常的平--面特征显示了本区激电异常长轴为北东方向,与地层或构造方向基本一致。

(5)金属因素JS异常与矿化关系密切,激电异常所反映的矿化蚀变带与已知矿化点(带)相吻合。

## 参考文献

- [1] 张同中,李水平,齐勇攀.内蒙古南王如地西山湾羊场多金属矿产评价项目物探工作报告[R].