

中图分类号: R927.2; R988.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0075-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.016



# 反向离子对高效液相色谱法测定地夸磷索钠含量

张小平<sup>1,2</sup>, 魏渊<sup>1△</sup>, 朱永星<sup>2</sup>

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏恒新药业有限公司, 江苏 镇江 212009)

**摘要:**目的 建立测定地夸磷索钠含量的反向离子对高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Thermo Scientific™ C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 4.6 mm, 3 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液(pH 6.8) - 乙腈(85:15, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 262 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 地夸磷索钠质量浓度在 3.23~646.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.9999, n=6$ ); 检测限为 0.01 μg/mL, 定量限为 0.03 μg/mL; 日内及日间精密密度、中间精密密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均 ≤ 2.0%; 平均加样回收率为 98.54%, RSD 为 0.30% ( $n=9$ )。3 批地夸磷索钠平均含量分别为 99.84%, 99.97%, 99.35%, RSD 分别为 0.13%, 0.06%, 0.20% ( $n=2$ )。结论 该方法专属性强, 重复性和稳定性均较好, 结果准确, 可用于地夸磷索钠的含量测定。

**关键词:**反向离子对高效液相色谱法; 地夸磷索钠; 含量测定

## Content Determination of Diauafosol Sodium by Reverse Phase Ion - Paired HPLC

ZHANG Xiaoping<sup>1,2</sup>, WEI Yuan<sup>1</sup>, ZHU Yongxing<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, China 212013; 2. Jiangsu Hengxin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhenjiang, Jiangsu, China 212009)

**Abstract: Objective** To establish a reverse phase ion - pair high - performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of diauafosol sodium. **Methods** The chromatographic column was Thermo Scientific™ C<sub>18</sub> column (100 mm × 4.6 mm, 3 μm), the mobile phase was phosphate buffer (pH 6.8) - acetonitrile (85:15, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 262 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of diauafosol sodium was 3.23 - 646.00 μg/mL ( $r=0.9999, n=6$ ). The limit of detection (LOD) was 0.01 μg/mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.03 μg/mL. The RSDs of intra - day and inter - day precision, intermediate precision, repeatability, and stability test results were not higher than 2.0%. The average recovery of diauafosol sodium was 98.54% with an RSD of 0.30% ( $n=9$ ). The average content of three batches of diauafosol sodium was 99.84%, 99.97%, and 99.35% with RSDs of 0.13%, 0.06%, and 0.20% ( $n=2$ ), respectively. **Conclusion** The method has strong specificity, good repeatability and stability, and accurate results, which can be used for the content determination of diauafosol sodium.

**Key words:** reverse phase ion - pair HPLC; diauafosol sodium; content determination

干眼症的发病原因包括泪液质和量异常, 动力学异常的内膜稳定性下降, 眼部神经异常, 眼部炎症导致角膜、结膜细胞损伤等, 我国发病率为 21%~30%<sup>[1]</sup>, 且趋于年轻化、大众化<sup>[2-3]</sup>。目前, 治疗干眼症的常规方法是运用人工泪液或联合抗炎药物滴眼<sup>[4]</sup>, 常用药物有聚乙二醇<sup>[5]</sup>、普拉洛芬联合玻璃酸钠<sup>[6]</sup>、石斛夜光丸联合玻璃酸钠<sup>[7]</sup>、环孢素 A<sup>[8]</sup>等。3% 地夸磷索钠滴眼液于 2010 年在日本上市, 2017 年 10 月进入中国市场, 临床治疗干眼症疗效良好<sup>[9-13]</sup>。地夸磷索钠作用于眼结膜上皮及杯状细胞膜上的 P2Y2 受体, 通过上调细胞内的钙离子浓度, 促进水分及黏蛋白的分泌, 进而改善干眼症症状, 是一种治疗干眼症的新型药物<sup>[14-17]</sup>。截至 2022 年 5 月 25 日, 国内尚无药品生产企业取得地夸磷索钠滴眼液批准文号, 也无其含量测定的相关报道。本研究中采用反向离子对高效液相色谱法测定了地夸磷索钠的含量<sup>[18]</sup>。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司, 精度为十万分之一); UV-2600i 型紫外可见分光光度计, LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪, LC-20 AD 型高效液相色谱仪, 均购自日本岛津公司; Agilent 1220 infinity LC 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); DL-204 型电热恒温干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司); KQ-800DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 1 600 W, 频率为 40 kHz)。

### 1.2 试剂

地夸磷索钠对照品(广东先强药业有限公司, 批号为 211002, 纯度为 99.8%); 地夸磷索钠(批号分别为 220301, 220302, 220303), 纯化水, 均由江苏恒新药业有限公司自制; 乙腈(德国默克集团); 磷酸二氢钾、氢氧化钾(国药集团化学试剂有限公司); 四丁基硫酸氢

第一作者: 张小平, 女, 硕士研究生在读, 助理工程师, 研究方向为化学制药, (电子信箱)215596566@qq.com。

△通信作者: 魏渊, 男, 博士, 教授, 研究方向为药理学, (电子信箱)ywei@ujs.edu.cn。

铵(上海麦克林生化科技股份有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

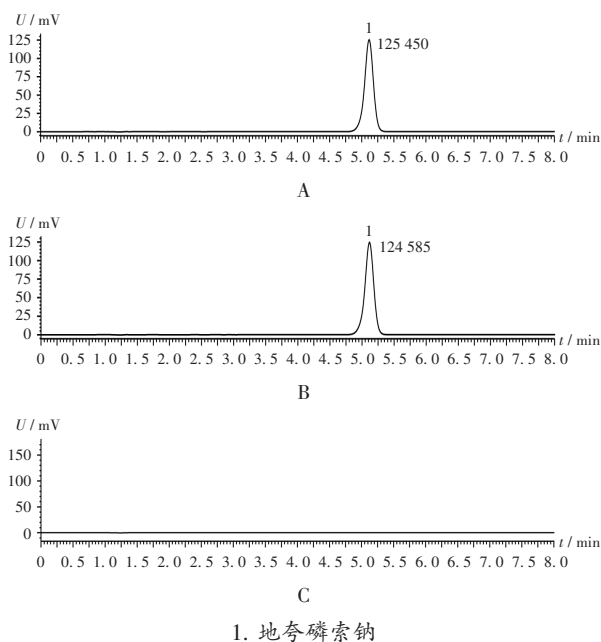
色谱柱: Thermo Scientific™ C<sub>18</sub>柱(100 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液(pH 6.8) - 乙腈(85:15, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 262 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液制备

取地夸磷索钠样品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加纯化水适量, 超声(功率为 1 600 W, 频率为 40 kHz) 20 min 使其彻底溶解, 加纯化水定容, 摇匀, 即得供试品溶液。取地夸磷索钠对照品适量, 置电热恒温干燥箱中干燥至恒重, 取 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加纯化水适量, 超声使溶解, 加纯化水稀释并定容, 即得对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液, 以纯化水为阴性对照品溶液, 各 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 结果对照品溶液在此色谱条件下的理论板数按地夸磷酸钠峰计为 6 237, 拖尾因子为 0.909。地夸磷索钠理论板数不低于 4 000, 拖尾因子应不大于 1.5, 按外标法以峰面积计算。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰。色谱图见图 1。



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Diauafosol sodium

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

破坏性试验: 取地夸磷索钠样品 100 mg, 精密称

定, 置 100 mL 容量瓶中, 按 2.2 项下方法制备浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液, 平行 6 份, 除 1 份溶液未经破坏外, 其余溶液分别经强酸(2 mol/L HCl 溶液、室温 3 h)、强碱(2 mol/L NaOH 溶液、室温 3 h)、强氧化(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、室温 3 h)、热(100 °C 水浴 0.5 h)、强光[(4 500 ± 500)Lx 照射 1 d] 条件破坏, 破坏后, 调 pH 至中性, 加纯化水稀释为质量浓度为 100 μg/mL 的溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 结果供试品溶液经酸破坏后峰面积减小, 热破坏后峰面积增大, 对碱、氧化、强光破坏相对稳定, 各降解产物均能较好分离, 且对地夸磷索钠主峰无干扰。

检测限与定量限确定: 取 2.2 项下对照品溶液适量, 加纯化水逐级稀释, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 分别以信噪比(S/N)为 3 和 10 时待测成分的质量浓度作为检测限和定量限。结果地夸磷索钠检测限为 0.01 μg/mL, 定量限为 0.03 μg/mL。

线性关系考察: 取地夸磷索钠对照品 0.032 36 g, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加纯化水适量, 逐级稀释成质量浓度分别为 3.23, 32.30, 161.50, 323.00, 484.50, 646.00 μg/mL 的系列溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。以地夸磷索钠质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $Y = 11\,346X + 35\,924$  ( $r = 0.999\,9, n = 6$ )。结果表明, 地夸磷索钠质量浓度在 3.23 ~ 646.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取地夸磷索钠对照品适量, 加纯化水分别制成质量浓度为 40, 100, 400 μg/mL 的溶液, 在日内各重复进样 5 次, 并连续测定 5 d。结果地夸磷索钠低、中、高质量浓度的对照品溶液日内及内间精密度试验结果的 RSD 均 ≤ 2.0% ( $n = 5$ )。取同一批(批号为 220301)样品适量, 按 2.2 项下方法配制成质量浓度为 100 μg/mL 的供试品溶液, 在同一试验室的不同时间, 由不同操作人员分别用岛津 LC-2030 Plus 型、Agilent 1220 infinity LC 型、岛津 LC-20 AD 型高效液相色谱仪测定样品含量, 结果中间精密度试验结果的 RSD 为 0.52%。上述结果表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取样品(批号为 220301)适量, 按 2.2 项下方法配制成质量浓度为 100 μg/mL 的供试品溶液, 平行 5 份, 按 2.1 项下色谱条件各进样测定 2 次, 记录色谱图。结果地夸磷索钠的平均含量为 99.60%, RSD 为 0.36% ( $n = 10$ ), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取样品(批号为 220301) 0.010 05 g, 精密称定, 按 2.2 项下方法配制成质量浓度为 100 μg/mL 的供试品溶液, 分别于室温放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果的 RSD 为 0.69% ( $n = 8$ ), 表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为220301)适量,共9份,分别置100 mL容量瓶中,分别加入质量浓度为0.401 0 mg/mL的对照品溶液20, 25, 30 mL,各3份,如纯化水适量,超声使溶解,加纯化水定容,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见表1。

表1 地夸磷索钠加样回收试验结果(n=9)

Tab. 1 Results of the recovery test of diauafosol sodium (n=9)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
9.527	8.020	17.421	98.43		
9.569	8.020	17.447	98.23		
9.588	8.020	17.460	98.15		
10.015	10.025	19.914	98.74		
10.341	10.025	20.228	98.62	98.54	0.30
10.473	10.025	20.333	98.35		
10.568	12.030	22.411	98.45		
10.624	12.030	22.517	98.86		
10.728	12.030	22.644	99.05		

## 2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为220301, 220302, 220303)样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别进样测定2次,记录峰面积,并计算含量。结果平均含量分别为99.84%, 99.97%, 99.35%, RSD分别为0.13%, 0.06%, 0.20%(n=2)。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长选择

前期试验中,取对照品10 mg,精密称定,加纯化水,制成每1 mL溶液中含地夸磷索钠50  $\mu$ g的溶液,采用紫外分光光度计于200~400 nm波长范围内进行扫描。结果地夸磷索钠溶液约在205 nm及262 nm波长处有最大吸收,由于205 nm只检测到该峰末端部分,属紫外末端吸收,故检测波长选择262 nm。

### 3.2 色谱柱选择

C<sub>18</sub>或C<sub>8</sub>反相色谱柱常用于分离弱极性、中性、非极性化合物,用C<sub>18</sub>或C<sub>8</sub>短柱(100 mm×4.6 mm, 3  $\mu$ m)分离地夸磷索钠,保留时间为1.0 min,换为长柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)保留时间仅延长至2.0 min,由于地夸磷索钠显极性,故在反相色谱柱中的保留时间极短。

### 3.3 磷酸盐缓冲液配制方法选择

地夸磷索钠解离常数为6.3,在流动相为pH 6.8的磷酸盐缓冲液中以解离型居多,若选择氢氧化钠调节pH,溶液中的钠离子会对药物中的钠离子形成干扰,降低含量测定的准确度,偏差变大;若将pH调节剂换为氢氧化钾,可避免外源性钠离子对测定结果的干扰。地夸磷索钠为弱酸类物质,流动相中需加入季铵类离子对(四丁基硫酸氢铵)<sup>[19]</sup>等正离子与药物磷酸基团的负离子(反离子)生成不带电荷的中性离子对,增加供试

品在反相色谱柱中的溶解度,增大分配系数,改善分离效果,延长保留时间,实现样品充分分离。故磷酸盐缓冲液配制方法为取磷酸二氢钾6.80 g,氢氧化钾1.316 g,四丁基硫酸氢铵5.0 g,加纯化水1 000 mL,调pH至6.8。同时发现,四丁基硫酸氢铵缓冲盐溶液室温放置8 h以上可见浑浊,故需临用现配。

### 3.4 流动相比比例选择

随着流动相中乙腈浓度的增大,药物出峰时间提前,保留时间变短,为了延长药物在色谱柱中的保留时间,建议流动相中乙腈浓度不超过20%,故选择磷酸盐缓冲液与乙腈体积比为85:15(V/V)。

### 3.5 进样时间选择

样品连续进样时间不宜过长,超过6 h,色谱峰逐渐漂移,峰形走样变形,理论板数变小,拖尾因子变小;超过10 h,单峰变为双峰,理论板数进一步变小,柱效下降,易导致泵和色谱柱损坏。故建议进样时间控制在4 h内,试验结束后需加倍延长冲洗色谱柱的时间。

### 3.6 方法评价

本研究中建立的方法专属性强、结果准确,可为地夸磷索钠原料药及其制剂的研发提供质量评价依据,为其正式标准的拟订提供参考。

## 参考文献

- [1] 亚洲干眼协会中国分会,海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组,中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识:定义和分类(2020年)[J]. 中华眼科杂志,2020,56(6):418-422.
- [2] 孙嘉悦,刘涛. P2Y<sub>2</sub>受体激动剂用于干眼治疗的研究进展[J]. 眼科新进展,2016,36(8):796-800.
- [3] SANTO RM, RIBEIRO - FERREIRA F, ALVES MR, et al. Enhancing the cross-cultural adaptation and validation process: linguistic and psychometric testing of the Brazilian - Portuguese version of a self-report measure for dry eye[J]. Clin Epidemiol, 2015, 68(4):370-378.
- [4] 代淑静,庞彦英,韩艳飞. 重组人表皮生长因子联合0.1%溴芬酸钠治疗儿童干眼症39例疗效评价[J]. 中国药业, 2015, 24(24):126-127.
- [5] 冷光霞,张文娟. 聚乙二醇滴眼液治疗干眼症30例[J]. 中国药业, 2015, 24(7):83-84.
- [6] 范伟杰,赵峰. 普拉洛芬联合玻璃酸钠滴眼液治疗白内障超声乳化术后干眼疗效观察[J]. 中国药业, 2018, 27(21):64-66.
- [7] 朱小敏,唐双军,奚超. 石斛夜光丸联合玻璃酸钠滴眼液及维生素AD软胶囊治疗干眼症临床评价[J]. 中国药业, 2020, 29(8):100-102.
- [8] 曾洁,周渝姣,张传宝. 环孢素A滴眼液治疗干眼症的作用机制和研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(13):1-4.
- [9] XU PF, FENG X, LUAN HY, et al. Current knowledge on the nucleotide agonists for the P2Y<sub>2</sub> receptor[J]. Bioorg Med