

HPLC法同时测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素和醋酸可的松的含量

刘映倩^{1*}, 曾杰¹, 邓贵福¹, 李绪伦¹, 伍彬^{2#}(1.重庆市食品药品检验所/重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121; 2.重庆医药高等专科学校, 重庆 401331)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4274-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.35

摘要 目的:建立同时测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素和醋酸可的松含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex C₁₈和Shimaduz GL C₁₈,流动相为0.01 mol/L十二烷基硫酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.5)-乙腈(60:40, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:盐酸四环素、醋酸可的松检测质量浓度线性范围分别为11.36~227.18、11.11~222.21 μg/ml(*r*均为0.999 9);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD≤1.2%;回收率分别为96.89%~100.67%、100.04%~101.02%,RSD分别为1.1%、0.3%(*n*=9)。结论:该方法简便快速,分离度和专属性好,可准确测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素和醋酸可的松的含量。

关键词 四环素可的松眼膏;高效液相色谱法;盐酸四环素;醋酸可的松;含量

Simultaneous Determination of Tetracycline Hydrochloride and Cortisone Acetate in Cortisone Tetracycline Eye Ointment by HPLC

LIU Ying-qian¹, ZENG Jie¹, DENG Gui-fu¹, LI Xu-lun¹, WU Bin²(1.Chongqing Institute for Food and Drug Control/Chongqing Research Center for Medicine Process and Quality Control Technology, Chongqing 401121, China; 2.Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of tetracycline hydrochloride and cortisone acetate in Cortisone tetracycline eye ointment. METHODS: HPLC was performed on the column of Phenomenex C₁₈ and shimaduz GL C₁₈ with mobile phase of 0.01 mol/L Sodium dodecyl sulfate solution (adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid)-acetonitrile(60:40, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 11.36-227.18 μg/ml for tetracycline hydrochloride(*r*=0.999 9) and 11.11-222.21 μg/ml for cortisone acetate(*r*=0.999 9);RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.2%; recoveries were 96.89%-100.67%(RSD=1.1%, *n*=9) and 100.04%-101.02%(RSD=0.3%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can accurately determine the contents of tetracycline hydrochloride and cortisone acetate in Cortisone tetracycline eye ointment.

KEYWORDS Cortisone tetracycline eye ointment; HPLC; Tetracycline hydrochloride; Cortisone acetate; Content

四环素可的松眼膏是以盐酸四环素和醋酸可的松为主要原料的眼膏剂,临床上主要用于治疗砂眼、结膜炎、病毒性角膜炎以及化学性烧伤和热灼伤等,疗效较好^[1]。其质量标准收载于《中华人民共和国卫生部抗菌素标准》^[2]。由于原标准中2种成分分别用2种方法进行测定,操作比较烦琐,影响因素较多,含量测定结果准确性及重复性均较低。故本试验采用高效液相色谱法(HPLC)法,建立了同时测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素和醋酸可的松含量的方法,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260型HPLC仪,含G1311C型泵、G1329B自动进样器、G1314F紫外检测器(美国安捷伦公司);Waters 2695型HPLC仪,含e2695型泵、2489紫外检测器(美国Waters公司);

* 副主任药师。研究方向:药品质量分析。E-mail: wening8081@sina.com

通信作者:副教授。研究方向:药物包合技术。E-mail: wubin3412@163.com

KQ2200DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AX205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

四环素可的松眼膏(国内A厂家提供,批号:744001、744002;国内B厂家提供,批号:X1006、X1007、X1008);四环素原料(批号:120718-62)、醋酸可的松原料(批号:C0252)均由国内A厂家提供;醋酸可的松对照品(批号:100123-201204,纯度:99.1%)、盐酸四环素对照品(批号:130488-200403,纯度:98.7%)、4-差向四环素对照品(批号:130401-200209,供检查用)、脱水差向四环素对照品(批号:130403-201206,供检查用)、脱水四环素对照品(批号:130402-200203,供检查用)、盐酸金霉素对照品(批号:130489-200202,纯度:95.3%)均来源于中国食品药品检定研究院;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 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phe-

nomenex C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shimaduz GL C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 十二烷基硫酸钠溶液 (用磷酸调节 pH 至 2.5)-乙腈 (60:40, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 取醋酸可的松、盐酸四环素、4-差向四环素、脱水差向四环素、脱水四环素和盐酸金霉素各适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 ml 中各约含 50 μg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 对照品贮备液 取盐酸四环素对照品适量, 精密称定, 加少量水溶解后, 加甲醇稀释制成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 摇匀, 作为对照品贮备液 1; 取醋酸可的松对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释制成每 1 ml 中约含 0.5 mg 的溶液, 摇匀, 作为对照品贮备液 2。

2.2.3 供试品溶液 精密称取样品适量 (约相当于盐酸四环素和醋酸可的松各 2.5 mg), 置于 50 ml 碘量瓶中, 精密加入环己烷 5 ml, 振摇, 精密加入甲醇 20 ml, 超声 (功率: 100 W, 频率: 40 kHz, 下同) 处理 15 min, 放冷, 离心, 取上清液作为供试品溶液。

2.2.4 空白对照溶液 取 A 厂家提供的辅料约 1 g, 加环己烷 5 ml, 振摇, 加入甲醇 20 ml, 超声处理 15 min, 放冷, 离心, 取上清液作为空白对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 取“2.2”项下系统适用性溶液、供试品溶液和空白对照溶液各 20 μl, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。结果表明, 理论板数按醋酸可的松峰计应不低于 2 500^[2], 各杂质峰与主成分峰的分度符合规定, 辅料对盐酸四环素和醋酸可的松的测定均无干扰。

2.3.2 专属性试验 碱破坏溶液: 取“2.2.3”项下供试品溶液 5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 混匀, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 ml, 放置 2 min 后用 0.1 mol/L 盐酸溶液中和, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。酸破坏溶液: 取“2.2.3”项下供试品溶液 5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 混匀, 加 1 mol/L 盐酸溶液 2 ml, 放置 2 min 后用 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。氧化破坏溶液: 取“2.2.3”项下供试品溶液 5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 混匀, 加 30% 过氧化氢溶液 2 ml, 放置 2 h, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。紫外破坏溶液: 取“2.2.3”项下供试品溶液 5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 混匀, 在 254 nm 波长紫外光下放置 48 h, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。热破坏溶液: 取“2.2.3”项下供试品溶液 5 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 混匀, 在 60 °C 水浴中加热 30 min, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。取上述 5 种溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱, 详见图 2。结果表明, 上述溶液在破坏后产生的降解产物峰基本相同, 并可与主成分峰完全分离; 在 200~400 nm 波长范围内扫描, 可见盐酸四环素和醋酸可的松峰纯度均大于 990, 说明产生的杂质峰与二主峰的分度良好。

2.4 线性关系考察

取盐酸四环素对照品适量, 加少量水溶解后, 加甲醇配制成质量浓度分别为 11.36、22.72、56.79、113.59、227.18 μg/ml 的系列溶液 1。取醋酸可的松对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 11.11、22.11、55.55、111.10、222.21 μg/ml 的系列溶液 2。分别精密量取上述两组系列溶液各 20 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱。以待测成分峰面积 (y) 为纵坐标、质量浓度 (x, μg/ml) 为横坐标进行线性回归, 得盐酸四环素回归

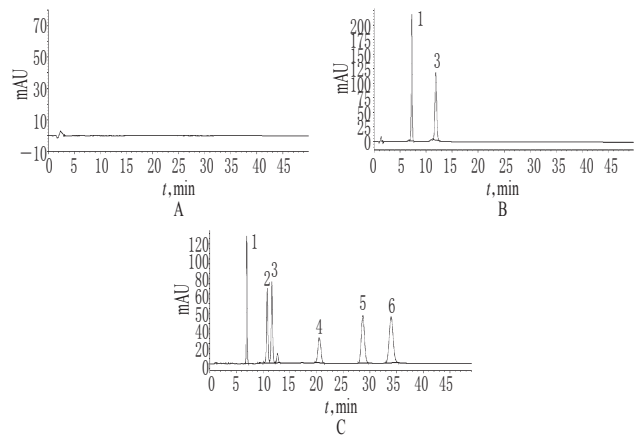


图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

A. 空白对照溶液; B. 供试品溶液; C. 系统适用性溶液; 1. 醋酸可的松; 2. 4-差向四环素; 3. 盐酸四环素; 4. 盐酸金霉素; 5. 脱水差向四环素; 6. 脱水四环素

Fig 1 HPLC chromatograms for system suitability test

A. blank control solution; B. test sample solution; C. solution of system suitability; 1. cortisone acetate; 2. 4-epitetracycline; 3. tetracycline hydrochloride; 4. chlortetracycline hydrochloride; 5. epianhydrotetracycline; 6. anhydrotetracycline

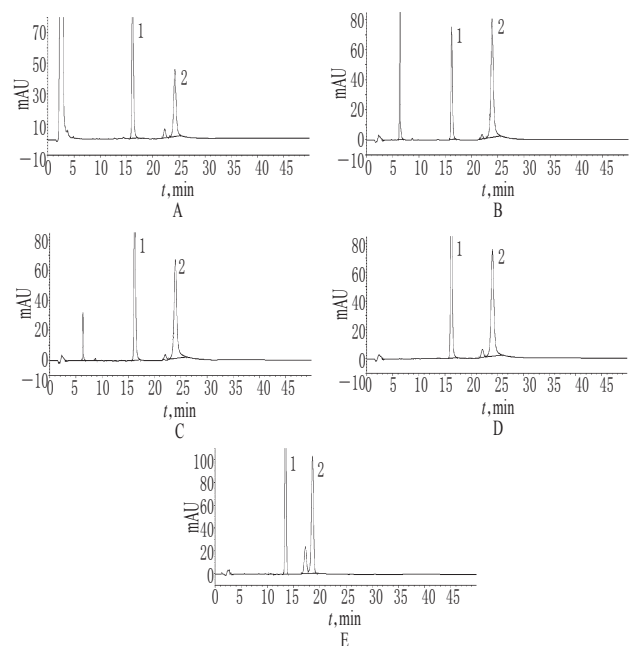


图 2 专属性试验高效液相色谱图

A. 氧化破坏; B. 碱破坏; C. 酸破坏; D. 热破坏; E. 紫外破坏; 1. 醋酸可的松; 2. 盐酸四环素

Fig 2 HPLC chromatograms for specificity test

A. oxidative damage; B. alkali damage; C. acid damage; D. thermal damage; E. UV damage; 1. cortisone acetate; 2. tetracycline hydrochloride

方程为 $y = 29.77x - 7.10$ ($r = 0.9999$), 醋酸可的松回归方程为 $y = 32.04x - 1.24$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 盐酸四环素检测质量浓度线性范围为 11.36~227.18 μg/ml, 醋酸可的松检测质量浓度线性范围为 11.11~222.21 μg/ml。

2.5 检测限与定量限

取盐酸四环素和醋酸可的松对照品各适量, 分别配制成质量浓度约 1 μg/ml 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积,以信噪比为3:1和10:1分别计算二者的检测限和定量限。结果,测得二者检测限和定量限分别为4.6、2.0 ng和14.1、9.3 ng。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下两种对照品贮备液各5 ml,置于同一25 ml量瓶中,混匀,加甲醇稀释至刻度,摇匀,再按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,分别记录峰面积。结果,盐酸四环素、醋酸可的松峰面积的RSD分别为0.8%、0.4% ($n=6$),说明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:X1006)5 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,取适量分别于室温放置0、1、2、4、5、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积。结果,盐酸四环素、醋酸可的松峰面积的RSD分别为0.8%、0.2% ($n=7$),说明供试品溶液室温下放置8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:X1006)适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试液溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果,盐酸四环素、醋酸可的松平均含量分别为83.23%、101.37%,RSD分别为0.4%、1.2% ($n=6$),说明本方法重复性较好。

2.9 回收率试验

精密称取四环素可的松眼膏辅料约1 g,置于50 ml碘瓶中,分别精密加入“2.2.2”项下对照品贮备液1和2各适量,混匀,制成相当于标示量80%、100%和120%的样品各3份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%			
盐酸四环素	2.082	2.076	99.71	99.12	1.1			
	2.082	2.073	99.57					
	2.082	2.096	100.67					
	2.602	2.596	99.77					
	2.602	2.577	99.04					
	2.602	2.574	98.92					
	3.122	3.025	96.89					
	3.122	3.089	98.94					
	3.122	3.076	98.53					
	醋酸可的松	2.061	2.082			101.02	100.55	0.3
		2.061	2.078			100.82		
		2.061	2.067			100.29		
2.576		2.583	100.27					
2.576		2.577	100.04					
2.576		2.596	100.78					
3.091		3.117	100.84					
3.091		3.107	100.52					
3.091		3.103	100.39					

2.10 样品含量测定

取5批四环素可的松眼膏样品各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表2。

3 讨论

用流动相配制的盐酸四环素和醋酸可的松溶液紫外扫描图谱(200~400 nm波长范围)中,可发现前者在276 nm,后者

表2 样品含量测定结果($n=2$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=2$)

批号	盐酸四环素标示百分含量,%	醋酸可的松标示百分含量,%
744001	83.2	100.8
744002	84.8	101.3
X1006	86.0	100.7
X1007	86.8	100.1
X1008	86.3	101.1

在245 nm波长处有最大吸收。参照国家食品药品监督管理局国家药品标准WS1-XG-003-2004^[3]中检测波长254 nm,经试验发现在此波长处两主成分峰面积相差较小,基线噪音较小,故选用254 nm作为拟定方法的检测波长。

醋酸可的松为强脂溶性药物,在反相色谱系统中,使用流动相水-甲醇(30:70, V/V)^[4]即可获得理想的色谱图;而盐酸四环素为水溶性药物,微酸性条件下,在反相色谱系统中几乎不保留^[5-6]。在流动相中加入带负电的离子可与盐酸四环素形成离子对,增强其在反相色谱柱上的保留,故本试验在流动相中加入表面活性剂十二烷基硫酸钠。同时发现,随着流动相pH的增高,4-差向四环素与盐酸四环素峰的分度降低,峰形变差。参照相关标准^[3],流动相采用0.01 mol/L十二烷基硫酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.5)-乙腈(60:40, V/V)时分度度较好,可满足试验要求。另外,本试验曾采用3根不同色谱柱对“2.2.1”项下配制的系统适用性溶液分别进行检测。结果显示,4-差向四环素与盐酸四环素峰均达到基线分离,且主成分峰与其他杂质峰也达到基线分离。说明此色谱条件对色谱柱的选择性较小,常用的C₁₈柱均可满足要求。

按“2.2.2”项下方法配制对照品贮备液,按“2.2.3”项下方法配制供试品溶液,选择超声时间分别为10、15、20 min,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果表明,超声15 min即可达到样品完全溶解的要求。

盐酸四环素对照品和四环素可的松眼膏中均检出有4-差向四环素、脱水差向四环素、脱水四环素和盐酸金霉素4个杂质,且均有一定的抑菌作用,采用抗生素微生物检定法测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素含量时,受杂质的干扰会导致其盐酸四环素含量测定结果偏高。而本试验建立的方法对四环素可的松眼膏中盐酸四环素的含量进行测定时,该成分与其他杂质可实现有效分离,故能准确测定其含量。

综上所述,该方法简便快速,分离度和专属性好,可准确测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素和醋酸可的松的含量。

参考文献

- [1] 王蕾,张孝松,徐智秀,等.反相高效液相色谱法测定四环素类抗生素[J].色谱,2002,20(1):49.
- [2] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部抗菌素标准[S].1972:39.
- [3] 国家食品药品监督管理局.WS1-XG-003-2004 盐酸四环素醋酸可的松眼膏[S].2004.
- [4] 陈伟,仇士林,刘谷欲.HPLC法测定四环素可的松眼膏中盐酸四环素的含量[J].中国药品标准,2002,3(4):50.
- [5] 丘淦才,郭智聪.高效液相色谱法测定四环素片的含量[J].中国药业,2010,19(11):23.
- [6] 葛晓明,杭太俊,刘娜,等.反相高效液相色谱法同时测定复方盐酸四环素胶囊中盐酸四环素和甲硝唑的含量及有关物质[J].中国现代应用药学,2006,23(1):44.

(收稿日期:2014-11-01 修回日期:2015-09-17)

(编辑:周 箐)