

# HPLC-DAD 多波长法同时测定丁氯麻滴眼剂中 3 种成分的含量<sup>Δ</sup>

杨平\*, 曾蔚欣, 孙路路<sup>#</sup>(首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4698-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.30

**摘要** 目的:建立同时测定丁氯麻滴眼剂中氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因含量的方法。方法:采用高效液相色谱-二极管阵列检测器多波长法。色谱柱为 ZORBAX SB-C<sub>18</sub>, 流动相为 pH 3.0 磷酸盐缓冲溶液-乙腈(梯度洗脱), 柱温为室温, 流速为 1.0 ml/min, 进样量为 20 μl, 检测波长为 277 nm(氯霉素)、210 nm(盐酸麻黄碱)、310 nm(盐酸丁卡因)。结果:氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因的检测质量浓度线性范围分别为 12.56~125.6 μg/ml( $r=0.999\ 8$ )、25.55~255.5 μg/ml( $r=0.999\ 9$ )、25.25~252.5 μg/ml( $r=0.999\ 9$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%; 回收率分别为 98.39%~100.44%(RSD=0.79%,  $n=9$ )、100.40~101.74%(RSD=0.66%,  $n=9$ )、98.83~100.67%(RSD=0.70%,  $n=9$ )。结论:该方法灵敏度高、定量准确、专属性强,可用于丁氯麻滴眼剂的质量控制。

**关键词** 高效液相色谱-二极管阵列检测器;丁氯麻滴眼剂;氯霉素;盐酸麻黄碱;盐酸丁卡因;含量测定

## Simultaneous Determination of 3 Components in Dinglyuma Eye Drop by HPLC-DAD at Multi-wavelength

YANG Ping, ZENG Weixin, SUN Lulu (Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of chloramphenicol, ephedrine hydrochloride and tetracaine hydrochloride in Dinglyuma eye drop. METHODS: HPLC-DAD at multi-wavelength was performed on the column of ZORBAX SB-C<sub>18</sub> with mobile phase of pH 3.0 Phosphate buffer-acetonitrile (gradient elution), column temperature was room temperature, flow rate was 1.0 ml/min, injection volume was 20 μl, and the detection wavelength was 277 nm for chloramphenicol, 210 nm for ephedrine hydrochloride and 310 nm for tetracaine hydrochloride. RESULTS: The linear range was 12.56-125.6 μg/ml for chloramphenicol ( $r=0.999\ 8$ ), 25.55-255.5 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ) for ephedrine hydrochloride and 25.25-252.5 μg/ml for tetracaine hydrochloride ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.39-100.44% (RSD=0.79%,  $n=9$ ), 100.40-101.74% (RSD=0.66%,  $n=9$ ) and 98.83-100.67% (RSD=0.70%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and specific, and can be used for the quality control of Dinglyuma eye drop.

**KEYWORDS** HPLC-DAD; Dinglyuma eye drop; Chloramphenicol; Ephedrine hydrochloride; Tetracaine hydrochloride; Content determination

丁氯麻滴眼剂为法定医院制剂,收载于《医疗单位制剂规程》中,其处方中的有效成分为氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因,该药具有消炎、止痛的作用,可用于治疗电光性眼炎<sup>[1]</sup>。原质量标准的含量测定法中仅测定了盐酸丁卡因与盐酸麻黄碱中的总氯量及盐酸丁卡因的含量,无氯霉素的定量方法,且质量标准偏低<sup>[1]</sup>。目前,有研究报道了同时测定这 3 种成分的方法,但仅为单波长<sup>[2]</sup>。由于这 3 种成分的紫外吸收特性有较大差异,故笔者参考 2015 年版《中国药典》(二部)中氯霉素及盐酸丁卡因的含量测定方法<sup>[3]</sup>和相关参考文献<sup>[4-7]</sup>,建立了采用高效液相色谱(HPLC)-二极管阵列检测器(DAD)多波长法同时测定丁氯麻滴眼剂中 3 种成分含量的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 型 HPLC 仪,包括 DAD 二极管阵列检测器、1260 四

元泵、在线脱气机(美国 Agilent 公司);AG240 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

### 1.2 药品与试剂

丁氯麻滴眼剂(本院制剂室提供,批号:20150710、20150717、20150806,规格:每 100 ml 含氯霉素 0.25 g,盐酸麻黄碱 0.5 g,盐酸丁卡因 0.5 g);氯霉素对照品(批号:30555-200602,纯度:99.4%)、盐酸麻黄碱对照品(批号:171241-201007,纯度:99.7%)、盐酸丁卡因对照品(批号:100456-200301,纯度:99.6%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、三乙胺均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:pH 3.0 磷酸盐缓冲溶液(流动相 A,取磷酸二氢钾 6.8 g,加水至 1 000 ml,再加三乙胺 5 ml,混匀,用磷酸调节 pH 至 3.0)-乙腈(流动相 B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);柱温:室温;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;检测波长:277 nm(氯霉素)、210 nm(盐酸麻黄碱)、310 nm(盐酸丁卡因)。

### 2.2 溶液的制备

Δ 基金项目:首都卫生发展科研专项项目(No.首发 2011-2008-01);北京市卫生和计划生育委员会科技成果和适宜技术推广项目

\* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学、药物分析。电话:010-63926353。E-mail:guoguokate@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:临床药学。电话:010-63926362。E-mail:sunlulu@263.net

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0.00~5.00	90	10
5.01~6.00	90→75	10→25
6.01~25.00	75	25

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因对照品适量,置于50 ml量瓶中,加乙腈:水(10:90, V/V)溶解并稀释至刻度,制成每1 ml约含氯霉素250 μg、盐酸麻黄碱500 μg、盐酸丁卡因500 μg的混合贮备液。精密量取上述混合贮备液2 ml,置于10 ml量瓶中,加乙腈:水(10:90, V/V)溶解并稀释至刻度,制成每1 ml约含氯霉素50 μg、盐酸麻黄碱100 μg、盐酸丁卡因100 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取丁氯麻滴眼剂1 ml,置于50 ml量瓶中,加乙腈:水(10:90, V/V)稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按丁氯麻滴眼剂处方比例制备不含氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因的阴性对照样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因的保留时间分别为13.7、4.1、15.8 min,理论板数分别为34 863、7 777、20 724。结果表明,辅料与溶剂对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合贮备液0.5、1、2、3、4、5 ml,分别置于10 ml量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,制成系列浓度对照品溶液。取上述系列浓度对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因峰面积的RSD分别为0.39%、0.44%、0.22%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品(批号:20150710)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因峰面积的RSD分别为1.02%、0.66%、0.84%,表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20150710)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因的含量占标示量的百分含量分别为98.25%、

100.43%、99.62%,RSD分别为0.68%、0.55%、0.49%(n=6),表明本方法重复性良好。

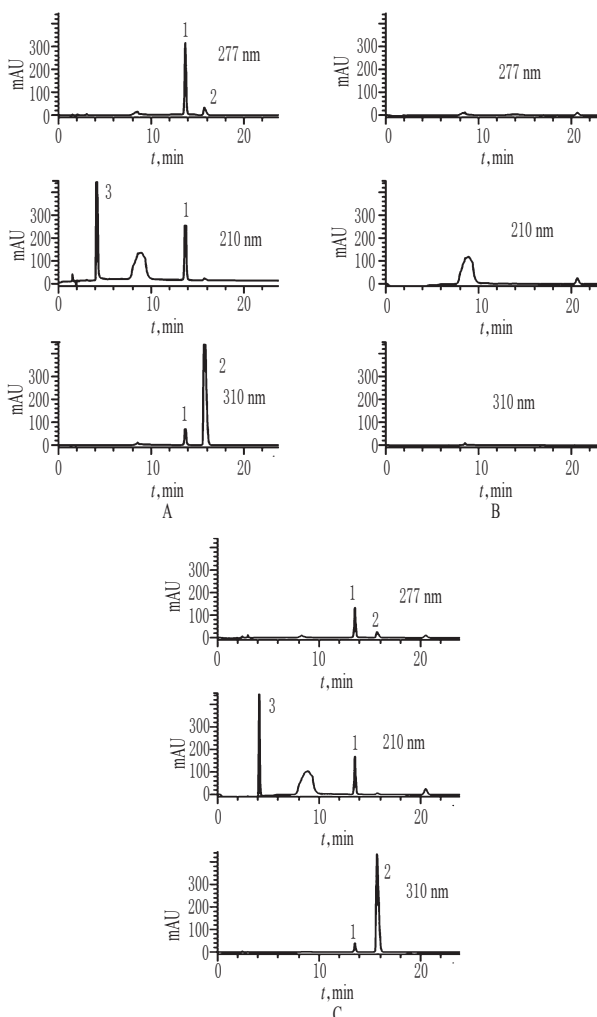


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品溶液;B.阴性对照溶液;C.供试品溶液;1.氯霉素;2.盐酸丁卡因;3.盐酸麻黄碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance solution; B.negative control solution; C.test sample; 1.chloramphenicol; 2.tetracaine hydrochloride; 3.ephedrine hydrochloride

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
氯霉素	y=31.51x-21.34	r=0.999 8	12.56~125.6
盐酸麻黄碱	y=39.90x+34.08	r=0.999 9	25.55~255.5
盐酸丁卡因	y=75.43x+11.85	r=0.999 9	25.25~252.5

2.8 回收率试验

取氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因对照品适量,各自按处方量的80%、100%、120%精密称定,加入处方比例量的其他成分,搅匀,作为模拟样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表3。

2.9 样品含量测定

取3批样品,按“2.2.2”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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表3 回收率试验结果(n=9)

Tab 3 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, %
氯霉素	1.98	1.988 7	100.44	99.11	0.79
	2.01	1.983 7	98.69		
	2.01	1.994 9	99.25		
	2.48	2.444 3	98.56		
	2.51	2.473 1	98.53		
	2.50	2.504 0	100.16		
	2.98	2.932 0	98.39		
	3.01	2.962 7	98.43		
	3.01	2.996 8	99.56		
	4.01	4.078 1	101.70		
	4.09	4.111 3	100.52		
	4.09	4.113 3	100.57		
	5.00	5.026 5	100.53		
5.11	5.198 9	101.74			
5.09	5.189 3	101.95			
6.00	6.024 0	100.40			
6.13	6.231 8	101.66			
6.02	6.051 9	100.53			
盐酸丁卡因	4.00	3.953 2	98.83	99.64	0.70
	4.04	4.007 7	99.20		
	4.04	4.008 5	99.22		
	5.00	4.968 5	99.37		
	5.05	5.048 0	99.96		
	5.04	5.051 1	100.22		
	6.00	5.931 0	98.85		
	6.06	6.086 7	100.44		
	6.04	6.080 5	100.67		

表4 样品含量测定结果(n=3, %)

Tab 4 Results of contents determination of samples (n=3, %)

批号	氯霉素	盐酸麻黄碱	盐酸丁卡因
20150710	98.55	100.52	99.37
20150717	98.53	101.73	95.43
20150806	102.16	97.66	100.22

### 3 讨论

氯霉素的 $\lambda_{max}$ 为277 nm,盐酸丁卡因为311 nm,盐酸麻黄碱为210 nm。有文献报道,可在254 nm波长处同时检测丁氯麻滴眼剂中3种成分<sup>[2]</sup>,但经试验发现,盐酸丁卡因对

照品溶液在254 nm波长处吸收峰极小,盐酸麻黄碱对照品溶液在该波长下吸收峰面积不及在210 nm波长处的1/50,检测灵敏度低,而盐酸丁卡因在210 nm波长处几乎无吸收,但在311 nm波长处盐酸麻黄碱及氯霉素的峰面积很低。故采用210、277、311 nm波长分别检测各成分,且线性范围包括了较低的浓度区域,从而实现样品一次稀释,一次进样,3种成分同时检测。

氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因均在酸性条件下较稳定<sup>[2]</sup>,在碱性条件下可发生中和反应或水解严重,故在分析中将流动相的pH调至酸性,有利于成分的稳定及获得较好的各成分在色谱柱上的保留行为。

由于氯霉素、盐酸麻黄碱、盐酸丁卡因的保留行为相差较大,故本研究采用梯度洗脱方式,既保证3种成分的合理洗脱时间,实现有效分离,又大大缩短了盐酸丁卡因及制剂中辅料羟苯乙酯的出峰时间(分别为15.7、20.6 min),节省了分析时间及成本。

综上所述,本方法灵敏度高、定量准确、专属性强,可用于丁氯麻滴眼剂的质量控制。

### 参考文献

- [1] 北京市卫生局. 医疗单位制剂规程[S]. 1984:267.
- [2] 何咏梅,杜绍礼,赵志刚.HPLC法同时测定丁氯麻滴眼液中三组分的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(3):253.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1 397.
- [4] 毕福钧,林彤.HPLC法测定小儿咳喘灵口服液盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(4):490.
- [5] 王曙东,宋炳生,李汉宝,等.RP-HPLC测定小儿麻甘冲剂水煎液中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(6):458.
- [6] Zhang QJ, Peng T, Chen DD. Determination of chloramphenicol residues in aquatic products using immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *JAOAC Int*, 2013, 96(4):897.
- [7] 李洁.RP-HPLC法测定注射用盐酸丁卡因含量、含量均匀度及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10):1 877.

(收稿日期:2016-01-04 修回日期:2016-09-20)

(编辑:陈宏)

## 国家卫生计生委副主任王培安会见联合国人口基金副执行主任

本刊讯 2016年10月19日,国家卫生计生委副主任王培安在京会见了来华访问的联合国人口基金副执行主任娜塔莉亚·卡内姆(Natalia Kanem)。

王培安高度评价联合国人口基金与中国开展的长期、紧密的合作,感谢人口基金对中国在人口与发展南南合作领域提供的资金和技术支持。2016年是中国与人口基金第八周期国别合作方案的开局之年,国家卫生计生委愿与人口基金共同努力,继续深化在生殖健康、计划生育、青少年健康、性别平等、老龄化等领域的合作。

娜塔莉亚感谢国家卫生计生委对联合国人口基金工作的支持,表示人口基金将继续致力于推进人口与发展领域南南合作,双方一致同意加强在生殖健康、计划生育产品供应链等领域和人口与发展南南合作伙伴组织(PPD)等机构沟通协作,尽快推动《北京行动计划》的落实,共同帮助发展中国家实现人人享有性与生殖健康服务2030可持续发展目标。

国家卫生计生委妇幼司、指导司、家庭司、国际司及人口发展研究中心相关负责同志参加了会见。