

HPLC-ELSD 法测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素的含量

李志得*,张彩云,汪霞(鄂州市食品药品检验检测中心,湖北 鄂州 436099)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4744-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.46

摘要 目的:建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素含量的方法。方法:色谱柱为 Dikma-C₁₈,流动相为乙腈-0.05% 二乙胺(70:30, V/V),流速为 1.0 ml/min,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:琥乙红霉素检测进样量线性范围为 1.216~7.296 μg($r=0.999\ 2$);定量限为 0.304 μg,检测限为 0.076 μg;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%;加样回收率为 97.59%~104.19%(RSD=1.71%, $n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素的含量。
关键词 琥乙红霉素片;高效液相色谱法;琥乙红霉素;含量测定

Content Determination of Erythromycin Ethylsuccinate in Erythromycin Ethylsuccinate Tablet by HPLC-ELSD

LI Zhide, ZHANG Caiyun, WANG Xia(Ezhou Center for Food and Drug Control, Hubei Ezhou 436099, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of erythromycin ethylsuccinate in Erythromycin ethylsuccinate tablet. METHODS: The column of Dikma-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.05% diethylamine(70:30, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of erythromycin ethylsuccinate was 1.216-7.296 μg ($r=0.999\ 2$); limit of quantitation was 0.304 μg, the limits of detection was 0.076 μg, respectively; the RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.0%, the average recoveries was 97.59%-104.19% (RSD=1.71%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate with high sensitivity and reproducibility, and can be used for the content determination of Erythromycin ethylsuccinate tablet.
KEYWORDS Erythromycin ethylsuccinate tablet; HPLC; Erythromycin ethylsuccinate; Content determination

法),目前后者在检验、科研等领域得到了越来越多的应用^[5]。动态浊度法是最常用的定量测定方法之一,通过测定反应溶液达到规定浊度所需时间或测定溶液自身的浊度变化率定量测定样品中细菌内毒素含量。该法操作简单、快速、灵敏度高、检测范围宽。动态浊度法的干扰试验,以样品中加入细菌内毒素的回收率进行判断,若回收率在 50%~200%之间,可认为样品对细菌内毒素测定无干扰^[6]。

凝胶法试验结果表明,复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液样品对细菌内毒素检查有干扰作用,这与相关文献报道一致^[7]。通过进一步探讨干扰作用的原因发现,主要与样品的酸碱性相关。将样品调节 pH 近中性后可基本排除干扰,但其 2 倍稀释液仍存在干扰,说明这种干扰作用也有其他因素参与。

在动态浊度法试验中,干扰情况与凝胶法基本相同,复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液样品调节 pH 近中性后,在 4 倍稀释时对细菌内毒素测定无干扰作用。但该试验中发现一个很奇怪的现象,在 2 倍稀释时样品仍存在明显的抑制作用,但样品在 4 倍稀释时对细菌内毒素测定有一定的增强作用。而试验过程中也出现过回收率超过 200%的情况。同时,样品中测得的内毒素含量远远超出实际值,甚至出现样品不合格的情况。但通过进一步验证,采用 2015 年版《中国药典》(四部)规定的仲裁法凝胶法进行检验,样品中实际内毒素含量<0.25 EU/ml。出现这种现象的原因仍有待于进一步研究。鉴

于此,目前在样品实际检验过程中建议采用凝胶法。

本试验建立的复方氨基酸(15AA)双肽(2)注射液细菌内毒素检查方法如下:取本品,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 近中性,然后用 BET 水稀释至少 4 倍后,依照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 1143 进行检查,本品每 1 ml 中含内毒素的量应<0.50 EU。

参考文献

- [1] 解晓帅,褚燕琦,白向荣,等.复方氨基酸(15)双肽(2)注射液临床用药调查研究[J].药学实践杂志,2014,32(5):58.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:154-157,400-402.
- [3] 中国药品生物制品检定所.中国药品检验标准操作规范[M].2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:310-321.
- [4] 魏霞,韩梅,韩瑶,等.血液滤过置换液的细菌内毒素检查法研究[J].中国药房,2013,24(29):2752.
- [5] 郭萌,李冠民,黄清泉.细菌内毒素研究进展[J].中国实验动物学报,2009,17(5):397.
- [6] 张娟,祝清芬,范治云.动态浊度法测定人參多糖注射液中细菌内毒素的含量[J].药学研究,2014,33(6):334.
- [7] 陈友爱,李鸣.复方氨基酸(15)双肽(2)注射液细菌内毒素检查法建立及方法学研究[J].海峡药学,2007,19(8):71.

*副主任技师。研究方向:抗菌药物及中药检验。电话:0711-3863027。E-mail:Lzd-5@163.com

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-09-14)
(编辑:周 簪)

琥乙红霉素属大环内酯类抗菌药物,为红霉素的琥珀酸乙酯,具有广谱抗菌作用。2015年版《中国药典》(二部)采用水解琥乙红霉素后,用微生物检定法测定其含量^[1],此试验过程复杂、操作烦琐、影响因素多、重复性较差^[2]。目前,现有文献多采用高效液相色谱法(HPLC)测定琥乙红霉素的含量^[3-6],均采用紫外检测器,检测波长为210 nm左右;而琥乙红霉素仅在紫外末端有吸收,因此此试验灵敏度低。为尽量减小紫外末端吸收引起的基线干扰,笔者采用HPLC-蒸发光散射检测器(ELSD)法,建立了测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素含量的方法,以期控制该制剂的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2424蒸发光散射检测器、e2695泵、Empower 2色谱工作站(美国Waters公司);KQ-3000型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz);BS21S型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

琥乙红霉素片(西安利君制药有限责任公司,批号:1402052、1311474、1403016,规格:0.125 g/片);琥乙红霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130425-200002,纯度>98%);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:Dikma-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.05% 二乙胺(70:30,V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取琥乙红霉素对照品0.030 40 g,置于25 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容,制成每1 ml含琥乙红霉素1.216 mg的溶液,作为对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液4.0 ml,置于10 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容,制成每1 ml含琥乙红霉素0.486 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品10片,精密称定,研细,混匀,精密称取适量(约相当于琥乙红霉素35 mg),置于100 ml量瓶中,加乙腈溶解,超声处理10 min,放冷,加乙腈定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方工艺和配方比例,取不含琥乙红霉素的辅料制备阴性样品,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

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,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,琥乙红霉素与其他杂质峰均能达到基线分离,分离度>2.0;理论板数以琥乙红霉素峰计>5 000,保留时

间为10 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

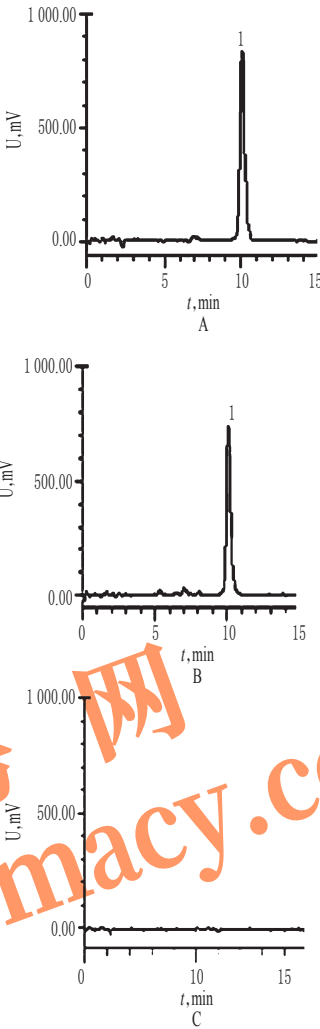


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.琥乙红霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance;B.test sample;C.negative control;1.erythromycin ethylsuccinate

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加乙腈定容,摇匀,即得系列对照品溶液。分别精密量取上述系列对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以琥乙红霉素进样量的对数值为横坐标(x)、峰面积的对数值为纵坐标(y)进行线性回归,得琥乙红霉素对数值的回归方程为 $y=1.100\ 5x+6.606\ 1$ ($r=0.999\ 2$)。结果表明,琥乙红霉素峰面积的对数值与进样量的对数值线性关系良好,琥乙红霉素检测进样量线性范围为1.216~7.296 μg。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,琥乙红霉素的定量限为0.304 μg,检测限为0.076 μg。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,琥乙红霉素峰面积的RSD=0.92%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液(批号:1402052)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,琥乙红霉素峰面积的RSD=1.08%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:1402052)适量,精密称定,共6份,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。结果,琥乙红霉素的平均含量为98.4%,RSD=0.84%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:1402052)6份,研细,精密称取适量(约相当于琥乙红霉素9 mg),分别精密加入琥乙红霉素对照品9 mg,置于50 ml量瓶中,加乙腈适量,超声处理10 min,放冷,加乙腈定容,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

取样量/g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.013 3	0.175	0.172	0.349	101.16	98.93	1.71
0.015 2	0.199	0.191	0.398	104.19		
0.015 7	0.206	0.184	0.386	97.83		
0.014 3	0.188	0.166	0.350	97.59		
0.014 6	0.192	0.189	0.382	100.53		
0.016 2	0.213	0.173	0.385	99.42		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“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,记录峰面积并按两点外标法计算样品含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,%)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,%)

批号	平均含量	RSD
1402052	98.5	1.06
1311474	99.6	0.71
1403016	96.7	0.78

3 讨论

3.1 检测方法的选择

目前,琥乙红霉素的测定方法主要有生物检定法^[1]、HPLC法^[3-6]、紫外分光光度法^[7-10]、电化学法^[11-12]等。亦有用HPLC法测定琥乙红霉素中游离红霉素^[13]、HPLC-串联质谱法测定琥乙红霉素颗粒体内活性代谢物的报道^[14],但上述方法灵敏度低。因此,笔者采用ELSD,可提高检测的灵敏度。

3.2 溶剂和流动相的选择

试验中曾用流动相作为溶剂溶解对照品和样品,但稳定性较差。笔者参考相关文献^[4]经过多次试验比较,发现采用乙腈作为溶剂溶解样品,在24 h内具有良好的稳定性。故本试验选择乙腈作为溶剂。关于流动相的选择,笔者曾用乙腈-水、乙腈-乙酸铵缓冲液等作为流动相,结果色谱不出峰或峰形极差,改用乙腈-0.05% 二乙胺(70:30, V/V)后,色谱峰形理想,保留时间合适,理论板数按琥乙红霉素峰计达到5 000以上。因此,本试验最终选择乙腈-0.05% 二乙胺(70:30, V/V)作为流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于测定琥乙红霉素片中琥乙红霉素的含量。

参考文献

[1] 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,2015:1 246.

[2] 李夏林,张丽英.管碟法测定琥乙红霉素含量的不确定度分析[J].中国医药导报,2011,8(12):42.

[3] 宋金春,于龙环.HPLC法测定琥乙红霉素静脉乳剂的含量[J].中国药师,2013,16(5):675.

[4] 陈燕,刘虹,赵海鹏.高效液相色谱法测定琥乙红霉素片的含量[J].中国药品标准,2015,16(2):130.

[5] 刘雅琴,赵晓昀,王伟娜,等.琥乙红霉素片含量测定方法的改进[J].中国药师,2012,15(4):510.

[6] 简永耀,靳龙文.HPLC法测定琥乙红霉素片的含量[J].安徽医药,2008,12(8):692.

[7] 王红专,林冰,袁竹青,等.电荷转移分光光度法测定琥乙红霉素[J].河南化工,2015(6):52.

[8] 王晓玲,张萍,陈燕.甲基红褪色光度法测定琥乙红霉素[J].应用化工,2014,43(9):1 712.

[9] 胡小明,彭勤龙.琥乙红霉素与甲基红的荷移反应研究[J].分析科学学报,2015,31(5):701.

[10] 陈莲惠,谢梦,叶莉,等.甲基绿褪色光度法测定琥乙红霉素[J].分析实验室,2014(2):187.

[11] 任艳艳,金根娣,胡效亚.琥乙红霉素在碳糊电极上的电化学测定方法[J].应用化学,2011,28(6):704.

[12] 王伟峰,潘玉莹,杨梅霞,等.毛细管电泳-化学修饰电极电致化学发光法测定琥乙红霉素[J].药物分析杂志,2010,30(10):1 900.

[13] 罗慧萍,易秋艳,王灿,等.HPLC法测定琥乙红霉素中游离子红霉素的含量[J].药物分析杂志,2014,34(12):2 264.

[14] 王爱华,刘天扬,杨杨,等.HPLC-MS/MS法测定琥乙红霉素颗粒体内活性代谢物[J].药物分析杂志,2011,31(3):448.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-05-16)

(编辑:刘 柳)