

# HPLC法同时测定复方甲硝唑克林霉素乳膏中4种成分的含量<sup>Δ</sup>

范义凤\*,王 钦(南通大学附属医院药学部,江苏南通 226001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3418-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.31

**摘要** 目的:建立同时测定复方甲硝唑克林霉素乳膏中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-[0.68%磷酸氢二钾溶液(含1%三乙胺)](梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>检测质量浓度线性范围分别为20.0~120.0 μg/mL( $r=0.999\ 9$ )、10.0~60.0 μg/mL( $r=0.999\ 1$ )、4.0~24.0 μg/mL( $r=0.999\ 4$ )、10.0~60.0 μg/mL( $r=0.999\ 4$ );定量限分别为13.06、7.36、2.43、6.42 μg/mL,检测限分别为4.18、1.82、0.76、1.79 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;回收率分别为98.97%~100.91%(RSD=0.79%, $n=9$ )、99.02%~101.80%(RSD=1.03%, $n=9$ )、98.18%~101.05%(RSD=1.01%, $n=9$ )、98.75%~101.36%(RSD=0.87%, $n=9$ )。结论:该方法简便、快速、结果准确,可用于复方甲硝唑克林霉素乳膏中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>含量的同时测定。

**关键词** 甲硝唑;盐酸克林霉素;螺内酯;维生素B<sub>6</sub>;高效液相色谱法;含量

## Simultaneous Determination of 4 Components in Compound Metronidazole Clindamycin Cream by HPLC

FAN Yifeng, WANG Qin (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of the content of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B<sub>6</sub> in Compound metronidazole clindamycin cream. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-[0.68% dipotassium hydrogen phosphate solution (containing 1% triethylamine)] (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear ranges of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B<sub>6</sub> were respectively 20.0-120.0 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ), 10.0-60.0 μg/mL ( $r=0.999\ 1$ ), 4.0-24.0 μg/mL ( $r=0.999\ 4$ ), 10.0-60.0 μg/mL ( $r=0.999\ 4$ ). The quantitative limits were respectively 13.06, 7.36, 2.43, 6.42 μg/mL. The detection limits were 4.18, 1.82, 0.76, 1.79 μg/mL. RSDs of the precision, stability, repeatability tests were all less than 2%. The recovery rates were respectively 98.97%-100.91% (RSD=0.79%,  $n=9$ ), 99.02%-101.80% (RSD=1.03%,  $n=9$ ), 98.18%-101.05% (RSD=1.01%,  $n=9$ ) and 98.75%-101.36% (RSD=0.87%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and can be used for the determination of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B<sub>6</sub> in Compound clindamycin metronidazole cream.

**KEYWORDS** Metronidazole; Clindamycin hydrochloride; Spironolactone; Vitamin B<sub>6</sub>; HPLC; Content

- [3] 赵旭,周辛波,钟武,等.抗病毒药物:法匹拉韦[J].临床药物治疗杂志,2015,13(4):16-20.
- [4] 裴诗恩,黄颖琦,吴淑曼,等.基于静电势电荷的抗击埃博拉病毒新药物法匹拉韦及其衍生物水溶解度 logS 值预测[J].当代化工,2017,46(1):33-34.
- [5] 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,2015:105-110.
- [6] 李眉,马玉楠.简介 ICH 关于药品中溶剂残留的指导原则[J].中国药师,1998,1(3):119-120.
- [7] 陆焯,夏宇沁,昌军,等.毛细管气相色谱法测定13种有机溶剂残留[J].复旦学报(医学版),2013,40(2):222-226.
- [8] 王建,王红波,王知坚.GC测定盐酸克林霉素棕榈酸酯中的9种溶剂残留[J].中国现代应用药学,2012,29(9):829-833.
- [9] 吴春丽,张俊霞,史云涛,等.顶空毛细管气相色谱法测定来曲唑原料中有机溶剂残留量[J].中国药房,2010,21(17):1601-1603.
- [10] 章为,李文波,李晓燕,等.顶空气相色谱法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星原料药中6种有机溶剂的残留量[J].中国药房,2017,28(6):847-850.
- [11] 张雅军,孙会敏,李科,等.气相色谱法测定阿德福韦酯中的10种残留溶剂[J].药物分析杂志,2005,25(6):660-662.

Δ 基金项目:江苏省药学会—奥赛康医院药学基金立项课题(No.A201616)

\* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:0513-85052282。  
E-mail:fyfeng606@126.com

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-29)  
(编辑:刘 柳)

复方甲硝唑克林霉素乳膏为我院自行研制的院内制剂,其主要成分为甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>,主要用于青少年寻常型痤疮的治疗。寻常型痤疮主要由体内雄性激素水平过高、皮脂腺功能亢进、痤疮丙酸杆菌感染等引起<sup>[1]</sup>。甲硝唑和盐酸克林霉素可有效抑制痤疮杆菌的生长<sup>[2-4]</sup>,螺内酯可干扰皮肤雄激素受体使皮脂腺分泌明显减少<sup>[5]</sup>,维生素B<sub>6</sub>在治疗寻常型痤疮方面也具有一定的疗效<sup>[6-7]</sup>。且目前尚无同时测定该制剂中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub> 4种主要成分含量的报道。鉴于此,本课题组参考相关文献<sup>[8-11]</sup>,采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定该制剂中上述4种成分含量的方法,以期完善该制剂的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括四元泵、紫外检测器、手动进样器、色谱工作站、在线真空脱气机(美国Agilent公司);Cary-300型紫外分光光度计(美国Varian公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

### 1.2 药品与试剂

复方甲硝唑克林霉素乳膏(南通大学附属医院自制,批号:160407、160412、160510,规格:20 g/盒);甲硝唑对照品(批号:0191-9804,纯度:99.6%)、盐酸克林霉素对照品(批号:130422-200702,纯度:99.9%)、螺内酯对照品(批号:100193-14189,纯度:99.8%)、维生素B<sub>6</sub>对照品(批号:100116-13470,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸氢二钾、乙醇为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-[0.68%磷酸氢二钾溶液(含1%三乙胺,B)],梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间, min	A, %	B, %
0~8	20	80
8~10	20→60	80→40
10~20	60	40

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取甲硝唑对照品100 mg、盐酸克林霉素对照品50 mg、螺内酯对照品20 mg、维生素B<sub>6</sub>对照品50 mg,置于同一100 mL量瓶中,加50%乙醇溶液适量,于80℃水浴加热20 min使溶解,放至室温,再加50%乙醇溶液定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。取上述混合对照品贮备液5 mL,置于25 mL量

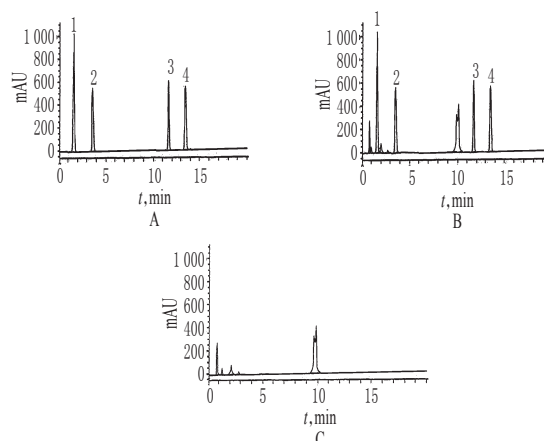
瓶中,加流动相定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品5 g,置于100 mL烧杯中,加50%乙醇溶液于80℃水浴加热20 min,回流提取3次,每次30 mL,提取液转移至100 mL量瓶中,加50%乙醇溶液定容,摇匀,滤过,取续滤液5 mL,置于25 mL量瓶中(测定甲硝唑含量时取续滤液2 mL,置于25 mL量瓶中),加流动相定容,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例,取空白辅料适量,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、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,在该色谱条件下各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>峰计均>3 360,保留时间分别为3.5、11.7、13.5、1.6 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.维生素B<sub>6</sub>;2.甲硝唑;3.盐酸克林霉素;4.螺内酯

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. vitamin B<sub>6</sub>; 2. metronidazole; 3. clindamycin hydrochloride; 4. spironolactone

图1 高效液相色谱法

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0 mL,分别置于100 mL量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液,再按“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。

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
甲硝唑	$y=30.94x+160.2$	0.999 9	20.0~120.0
盐酸克林霉素	$y=5.091x+10.81$	0.999 1	10.0~60.0
螺内酯	$y=15.72x-36.07$	0.999 4	4.0~24.0
维生素B <sub>6</sub>	$y=80.00x-139.5$	0.999 4	10.0~60.0

## 2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,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LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表3。

表3 LOQ与LOD测定结果( $\mu\text{g/mL}$ )

Tab 3 Results of LOQ and LOD( $\mu\text{g/mL}$ )

待测成分	LOQ	LOD
甲硝唑	13.06	4.18
盐酸克林霉素	7.36	1.82
螺内酯	2.43	0.76
维生素B <sub>6</sub>	6.42	1.79

## 2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>峰面积的RSD分别为0.71%、0.59%、0.42%、0.87%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

精密量取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160412)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>峰面积的RSD分别为0.91%、1.23%、0.87%、1.56%( $n=5$ ),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

## 2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:160412)适量,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,甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>峰面积的RSD分别为0.65%、0.89%、0.77%、0.93%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 回收率试验

按样品的处方比例取空白辅料适量,共9份,分别置于100 mL烧杯中,各加入低、中、高质量的甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>对照品,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,记录峰面积并计算回收率,结果见表4。

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,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5。

表4 回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 4 Results of recovery test( $n=9$ )

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%			
甲硝唑	80.65	79.93	99.11	99.98	0.79			
	79.32	80.02	100.88					
	79.84	80.17	100.41					
	100.60	99.56	98.97					
	101.30	100.60	99.31					
	99.76	100.30	100.54					
	120.30	121.40	100.91					
	118.60	117.80	99.33					
	119.70	120.90	100.36					
	盐酸克林霉素	40.96	40.56			99.02	100.39	1.03
		39.65	40.23			101.46		
		39.34	39.78			101.12		
		50.33	50.05			99.44		
		48.26	49.13			101.80		
		49.17	49.68			101.04		
61.22		60.84	99.38					
59.65		60.03	100.64					
58.34		58.11	99.61					
螺内酯		16.88	16.69	98.87	99.61	1.01		
		16.23	16.40	101.05				
		15.64	15.77	100.83				
		20.45	20.28	99.17				
		19.33	19.47	100.72				
		19.75	19.39	98.18				
	24.73	24.52	99.15					
	23.61	23.40	99.11					
	24.55	24.40	99.39					
	维生素B <sub>6</sub>	40.76	40.25	98.75			99.78	0.87
		39.58	40.12	101.36				
		39.69	39.34	99.12				
		50.34	49.88	99.09				
		50.68	50.34	99.33				
		49.12	49.32	100.41				
60.46		60.67	100.35					
59.59		59.17	99.30					
59.12		59.33	100.36					

表5 样品含量测定结果( $n=3$ ,%)

Tab 5 Results of contents determination of samples ( $n=3$ ,%)

样品批号	甲硝唑	盐酸克林霉素	螺内酯	维生素B <sub>6</sub>
160407	96.7	103.6	96.5	98.3
160412	97.5	104.2	97.6	96.2
160510	95.2	101.8	95.3	97.5

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

在200~400 nm波长范围内进行扫描,发现甲硝唑的最大吸收波长为310 nm,螺内酯的最大吸收波长为237 nm,维生素B<sub>6</sub>的最大吸收波长为290 nm,盐酸克林霉素的最大吸收波长为210 nm,且4种成分均有末端吸收,因此综合考虑选择最靠近末端的210 nm作为本试验的检测波长。

### 3.2 流动相和洗脱方式的选择

本课题组曾选择乙腈-[0.68%磷酸氢二钾溶液(含1%三乙胺)](20:80, V/V)为流动相进行等度洗脱,结果甲硝唑和维生素B<sub>6</sub>分离度较好,但盐酸克林霉素和螺内酯分离度较差;而调整流动相比例为(60:40, V/V)再进行等度洗脱,盐酸克林霉素和螺内酯出峰时间比较合适且分离度符合要求,但甲硝唑和维生素B<sub>6</sub>出峰时间太快,从而无法将甲硝唑、维生素B<sub>6</sub>分离。最后改变洗脱方式,采用梯度洗脱,结果上述4种成分的色谱分离均较好。因此,本试验以乙腈-[0.68%磷酸氢二钾溶液(含1%三乙胺)]为流动相进行梯度洗脱。

### 3.3 提取溶剂和提取次数的选择

本课题组曾考察了不同体积分数的提取溶剂(20%、30%、40%、50%、70%乙醇溶液),以及提取次数(1、2、3、4、5次),结果发现采用50%乙醇溶液提取3次、40%乙醇溶液提取5次能将4种待测成分提取完全。为了减少提取次数,方便试验操作,本研究最终采用50%乙醇溶液于80℃水浴加热20 min,回流提取3次的方式进行样品的提取。

综上所述,本方法简便、快速、结果准确,可用于复方甲硝唑克林霉素乳膏中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B<sub>6</sub>含量的同时测定。

### 参考文献

[1] Bartlett KB, Davis SA, Feldman SR. Topical antimicrobial acne treatment tolerability: a meaningful factor in treatment adherence[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 71(3): 581-582.

[2] Khodaeiani E, Fouladi RF, Yousefi N, et al. Efficacy of 2% metronidazole gel in moderate acne vulgaris[J]. *Indian J Dermatol*, 2012, 57(4):279-281.

[3] Mokhtari F, Faghihi G, Basiri A, et al. Comparison effect of azithromycin gel 2% with clindamycin gel 1% in patients with acne[J]. *Adv Biomed Res*, 2016, 5(4):72-73.

[4] Schaller M, Sebastian M, Röss C, et al. A multicentre, randomized, single-blind, parallel-group study comparing the efficacy and tolerability of benzoyl peroxide 3%/clindamycin 1% with azelaic acid 20% in the topical treatment of mild-to-moderate acne vulgaris[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016, 30(6):966-973.

[5] Bagherani N. Efficacy of topical spironolactone in treatment of acne[J]. *Dermatol Ther*, 2015, 28(3):176-177.

[6] 戴君来.单纯外用0.1%阿达帕林凝胶与联合内服甲硝唑及维生素B<sub>6</sub>治疗寻常痤疮的疗效比较[J]. *上海医学*, 2002, 25(1):115-116.

[7] 王友志, 亓志鹏, 李永坤.四环素、甲氧咪呱、维生素B<sub>6</sub>治疗170例寻常痤疮疗效观察[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2001, 17(2):146-146.

[8] 张金安, 郭金平, 胡占芳, 等.HPLC法同时测定氯甲酯中氯霉素和甲硝唑的含量[J]. *中国药师*, 2014, 17(9): 1596-1598.

[9] 彭贤东, 唐志立, 龙凤, 等.HPLC法同时测定替硝唑螺内酯乳膏中替硝唑和螺内酯含量[J]. *中国药房*, 2013, 24(5):468-470.

[10] 张带荣.高效液相色谱法测定盐酸克林霉素注射液的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(13):1165-1167.

[11] 陈方剑, 陆松伟, 宋洪杰, 等.用HPLC法测定珍珠维E乳膏中维生素B<sub>6</sub>和维生素E的含量[J]. *药学服务与研究*, 2015, 15(3):201-204.

(收稿日期:2017-01-02 修回日期:2017-05-10)

(编辑:刘柳)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅