

# HPLC-柱前衍生化-双波长法同时测定妥布霉素地塞米松滴眼液中2种主成分的含量

邵顺章<sup>1\*</sup>,袁步娟<sup>1</sup>,巩克民<sup>2</sup>,张婷婷<sup>2</sup>(1.盐城市药品检验所,江苏盐城 224002;2.盐城卫生职业技术学院,江苏盐城 224006)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)33-4731-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.33.44

**摘要** 目的:建立同时测定妥布霉素地塞米松滴眼液中妥布霉素和地塞米松含量的方法。方法:采用高效液相色谱-柱前衍生化-双波长法。色谱柱为Agilent C<sub>18</sub>,流动相为0.25%三羟甲基氨基甲烷-乙腈-0.5 mol/L硫酸(40:59:1, V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为365、220 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:妥布霉素、地塞米松检测质量浓度线性范围分别为18.01~180.09、6.02~60.24 μg/ml( $r=0.999\ 5$ 、 $0.999\ 8$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率分别为98.65%~100.01%、98.92%~100.20%,RSD分别为0.47%、0.50%( $n=9$ )。结论:该方法简便省时、专属性强、重复性好、结果准确可靠,可用于妥布霉素地塞米松滴眼液的质量控制。

**关键词** 妥布霉素;地塞米松;妥布霉素地塞米松滴眼液;高效液相色谱-柱前衍生化-双波长法

## Simultaneous Determination of 2 Main Ingredients in Tobramycin and Dexamethasone Eye Drop by HPLC - Column Derivatization-Dual Wavelength Method

TAI Shun-zhang<sup>1</sup>, YUAN Bu-juan<sup>1</sup>, GONG Ke-min<sup>2</sup>, ZHANG Ting-ting<sup>2</sup>(1.Yancheng Institute for Drug Control, Jiangsu Yancheng 224002, China; 2.Yancheng Health Vocational Technical College, Jiangsu Yancheng 224006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of tobramycin and dexamethasone in Tobramycin and dexamethasone eye drop. METHODS: HPLC-column derivatization-double wavelength method was performed on the column of Agilent C<sub>18</sub> with mobile phase of 0.25% 3-hydroxymethyl aminomethane-acetonitrile-0.5 mol/L sulfuric acid(40:59:1, V/V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 365 nm and 220 nm, column temperature was 30 ℃, and the volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range was 18.01-180.09 μg/ml for tobramycin( $r=0.999\ 5$ ) and 6.02-60.24 μg/ml for dexamethasone( $r=0.999\ 8$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recoveries were 98.65%-100.01% (RSD=0.47%,  $n=9$ ) and 98.92%-100.20% (RSD=0.50%,  $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, time-saving, specific, reproducible, accurate and reliable, and can be used for the quality control of Tobramycin and dexamethasone eye drop.

**KEYWORDS** Tobramycin; Dexamethasone; Tobramycin and dexamethasone eye drop; HPLC-column derivatization-double wavelength

表3 样品残留溶剂测定结果( $n=3$ )

Tab 3 Results of contents determination of residual solvents in samples ( $n=3$ )

待测成分	含量, %		
	100301	100302	100303
乙醇	0.01	0.02	0.01
乙醚	未检出	未检出	未检出
异丙醇	未检出	未检出	未检出
乙腈	未检出	未检出	未检出
二氯甲烷	未检出	未检出	未检出
四氢呋喃	未检出	未检出	未检出
环己烷	未检出	未检出	未检出
甲苯	未检出	未检出	未检出
DMF	未检出	未检出	未检出

\* 副主任药师。研究方向:药物质量分析。E-mail: 417677528@qq.com

溶剂的准确测定。另外,精密度、回收率试验结果也充分说明本试验建立的残留溶剂测定方法简便、准确、重复性好。

### 参考文献

- [1] 胡艳玲,傅得兴.地西他滨的药理作用和临床评价[J].中国药学杂志,2008,43(2):81.
- [2] 敖忠芳.骨髓增生异常综合征(MDS)的病因、诊断及治疗[J].江苏临床医学杂志,2002,6(3):177.
- [3] 国家食品药品监督管理局.化学药物残留溶剂的研究技术指导原则[S].北京:中国医药科技出版社,2010:10、50.
- [4] 周海均.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2000:35-38.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:10、110.

(收稿日期:2015-03-03 修回日期:2015-10-14)

(编辑:周 箐)

妥布霉素地塞米松滴眼液为混悬型滴眼剂,可用于治疗各种急慢性结膜炎、外周性角膜炎、泪囊炎、化学灼伤,及预防各种眼部手术后感染。妥布霉素为氨基糖苷类抗菌药物,是一种无紫外吸收的化合物,现行标准采用抗生素微生物检定法<sup>[1-3]</sup>和高效液相色谱(HPLC)衍生化法<sup>[4-6]</sup>测定其含量;同时也有采用旋光法、衍生化紫外分光光度法、HPLC-ELSD法和薄层色谱定量法等测定其含量的文献报道<sup>[7-16]</sup>。地塞米松为糖皮质激素类药物,在甲醇中略溶,在水中几乎不溶,有紫外吸收,具旋光性,现行标准多采用HPLC法测定其含量<sup>[1-6]</sup>。目前,该制剂尚未见采用紫外检测器同时测定2种主成分含量的报道。为快捷、有效控制妥布霉素地塞米松滴眼液的质量,本试验对采用HPLC-柱前衍生化-双波长法同时测定该制剂中2种主成分含量的方法进行了研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包含CTO-20A型柱温箱、SPD-20A型紫外检测器、LC-20AB型真空脱气机、SIL-20A型自动进样器和LC-20A色谱工作站(日本岛津公司);XS205DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 药品与试剂

妥布霉素地塞米松滴眼液(杭州国光药业有限公司,批号:140312、140315、140708;齐鲁制药有限公司,批号:131163PG、140623PG、140671PG,规格均为5 ml中含妥布霉素15 mg和地塞米松5 mg);妥布霉素对照品(批号:130527-200402,纯度:91.4%)、地塞米松对照品(批号:100129-201105,纯度:99.7%)均购自中国食品药品检定研究院;三羟甲基氨基甲烷(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:20100925);2,4-二硝基氟苯(分析纯,成都艾科达化学试剂有限公司,批号:201203211);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司,批号:142605);乙腈(色谱纯,美国TEDIA公司,批号:1205078);其他化学试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.25%三羟甲基氨基甲烷-乙腈-0.5 mol/L硫酸(40:59:1, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长365、220 nm(在检测过程中切换波长:0~3.5 min检测波长为365 nm,3.5~6.0 min检测波长为220 nm);柱温:30℃;进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液 精密称取妥布霉素对照品49.26 mg和105℃干燥2 h的地塞米松对照品15.06 mg,置于50 ml量瓶中,加水适量和0.5 mol/L硫酸1 ml使溶解,并用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液5 ml,置于50 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,精密量取10 ml,置于50 ml量瓶中,各加入2,4-二硝基氟苯乙腈溶液10 ml和三羟甲基氨基甲烷溶液10 ml,摇匀,置于(60±2)℃的水浴中加热50 min,放至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2.3 供试品溶液 取本品适量,摇匀后精密量取3 ml,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取10 ml,置于50 ml量瓶中,各加入2,4-二硝基氟苯乙腈溶液10 ml和三羟甲基氨基甲烷溶液10 ml,摇匀,置于(60±2)℃的水浴中加热50 min,放至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 精密量取水10 ml,置于50 ml量瓶中,加入2,4-二硝基氟苯乙腈溶液10 ml和三羟甲基氨基甲烷溶液10 ml,摇匀,置于(60±2)℃的水浴中加热50 min,放至室温,用乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

### 2.3 系统适用性和阴性干扰试验

分别精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各20 μl,注入HPLC仪测定,记录色谱图,详见图1。由图1可见,供试品溶液与对照品溶液中妥布霉素和地塞米松色谱峰保留时间一致,理论塔板数以妥布霉素峰计应不低于3 000,分离度大于3.0。

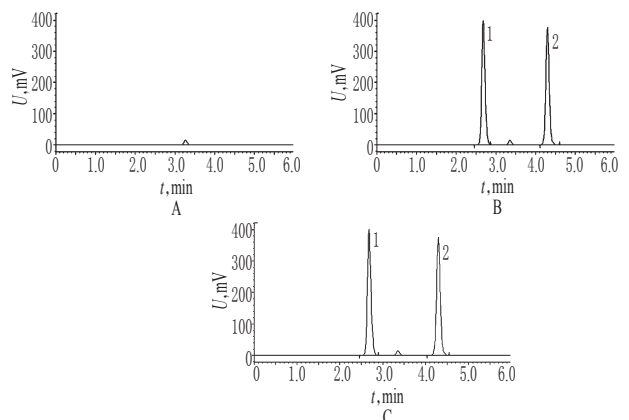


图1 高效液相色谱图

A.阴性对照;B.对照品;C.供试品;1.妥布霉素;2.地塞米松

### Fig 1 HPLC chromatograms

A.negative control; B.reference substance; C.test sample; 1.tobramycin; 2.dexamethasone

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液1、3、5、7、10 ml,置于50 ml量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备系列对照品溶液,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,得妥布霉素回归方程为 $y=2.5701 \times 10^4 x - 1.19859 \times 10^5$  ( $r=0.9995$ ),地塞米松回归方程为 $y=8.5818 \times 10^4 x - 2.21981 \times 10^5$  ( $r=0.9998$ )。结果表明,妥布霉素、地塞米松检测质量浓度线性范围分别为18.01~180.09、6.02~60.24 μg/ml。

### 2.5 精密度的试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,妥布霉素和地塞米松峰面积的RSD分别为0.59%、0.25% ( $n=6$ ),表明仪器精密度的良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:140312)适量,分别于室温(25℃)下放置0、3、6、9、12、15 h时进样测定,记录峰面积。结果,妥布霉素和地塞米松峰面积的RSD分别为0.74%、0.62% ( $n=6$ ),表明供试品溶液室温放置15 h内稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

取批号为140312的样品适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算样品含量。结果,妥布霉素和地塞米松含量的RSD分别为0.67%、0.22%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:140312)3 ml,置于100 ml量瓶中,共9份,每3份一组分别加入“2.2.1”项下对照品贮备液8、10、12 ml,混合后按“2.2.3”项下方法处理和制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

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

待测成分	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, %
妥布霉素	9.038 0	7.203 8	7.182 6	99.71	98.58	0.47
	9.038 0	7.203 8	7.106 2	98.65		
	9.038 0	7.203 8	7.153 1	99.30		
	9.038 0	9.004 7	9.005 2	100.01		
	9.038 0	9.004 7	8.996 4	99.91		
	9.038 0	9.004 7	9.002 3	99.97		
	9.038 0	10.805 7	10.805 8	100.00		
	9.038 0	10.805 7	10.743 1	99.42		
	9.038 0	10.805 7	10.721 6	99.22		
	地塞米松	2.996 6	2.409 6	2.411 5		
2.996 6		2.409 6	2.386 2	99.03		
2.996 6		2.409 6	2.383 6	98.92		
2.996 6		3.012 0	3.008 9	99.90		
2.996 6		3.012 0	3.010 2	99.94		
2.996 6		3.012 0	3.005 6	99.79		
2.996 6		3.614 4	3.606 8	99.79		
2.996 6		3.614 4	3.621 5	100.20		
2.996 6		3.614 4	3.578 6	99.01		

## 2.9 样品含量测定

取6批样品各适量,分别按“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,记录峰面积,代入回归方程计算2种主成分的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=2$ )

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

批号	妥布霉素, %		地塞米松, %
	本法	抗生素微生物检定法	本法
140312	100.4	101.2	99.9
140315	99.2	100.3	98.8
140708	98.3	99.0	99.1
131163PG	97.6	97.2	96.5
140623PG	101.8	100.6	100.2
140671PG	98.1	99.5	99.3

## 3 讨论

妥布霉素是一种无紫外吸收的化合物,采用HPLC紫外检测法时需用2,4-二硝基氟苯和三羟甲基氨基甲烷进行柱前衍生化,而样品中地塞米松不与衍生化试剂反应,柱前衍生化对测定地塞米松含量无影响。

本试验曾分别用乙腈-水(45:55, V/V)、甲醇-水(45:55, V/V)、0.25%三羟甲基氨基甲烷溶液-乙腈-0.5 mol/L硫酸溶液

(40:59:1, V/V/V)作流动相进行考察。结果表明,以0.25%三羟甲基氨基甲烷溶液-乙腈-0.5 mol/L硫酸溶液(40:59:1, V/V/V)为流动相体系时,分离效果较好,能实现对妥布霉素和地塞米松的有效洗脱,且可排除溶剂峰对测定的影响。

本试验曾分别在240、220 nm波长处测定地塞米松的含量。结果表明,在240 nm波长处测定,信号较强,产生信号超载,供试品溶液不能在本方法条件下同时测定2种组分含量;而在220 nm波长处信号较合适。故选用220 nm波长测定地塞米松的含量。

综上所述,本试验建立的方法简便省时、专属性强、重复性好、结果准确可靠,可用于妥布霉素地塞米松滴眼液的质量控制。

## 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准(试行):YBH02182004[S].2004.
- [2] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准:YBH11782005[S].2005.
- [3] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准:YBH11782006[S].2006.
- [4] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准(试行):WS-224(X-197)-2000[S].2000.
- [5] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准:YBH02582007[S].2007.
- [6] 国家食品药品监督管理局.妥布霉素地塞米松滴眼液国家食品药品监督管理局标准:YBH00112008[S].2008.
- [7] 杨莉,潘国洪,易薇.复方妥布霉素滴眼液的含量测定[J].湖北中医学院学报,2010,12(3):44.
- [8] 严汝庆,黄北雄.高效液相色谱法测定妥布霉素滴眼液含量[J].中国医院药学杂志,2008,28(20):1 808.
- [9] 何丹,杨林.柱后衍生化高效液相色谱法测定妥布霉素滴眼液含量[J].中国抗生素杂志,2010,35(10):771.
- [10] 郑妍,高琳.HPLC-ELSD测定妥布霉素滴眼液的含量[J].西北药学杂志,2011,26(4):259.
- [11] 林明世,肖广霞.HPLC-ELSD法测定妥布霉素地塞米松滴眼液中妥布霉素的含量[J].中国药房,2008,19(25):1 977.
- [12] 刘咏梅.HPLC-ELSD法测定妥布霉素滴眼液的含量[J].中国现代应用药学杂志,2009,26(7):590.
- [13] 王巍,刘珂,张亚杰,等.HPLC-ELSD法测定硫酸妥布霉素氯化钠注射液的含量[J].中国药事,2009,23(5):461.
- [14] 洪利娅,陈悦,陈贵斌,等.HPLC-ELSD法测定妥布霉素的含量[J].中国抗生素杂志,2005,30(11):662.
- [15] 吴艳萍,李胜.妥布霉素地塞米松滴眼液的制备工艺及质量研究[J].中国中医药咨讯,2010,2(11):136.
- [16] 杨友田,邵顺章,梁欣.HPLC-UV-ELSD法同时测定复方妥布霉素滴眼液中妥布霉素和地塞米松的含量[J].药物分析杂志,2014,34(2):117.

(收稿日期:2015-02-13 修回日期:2015-10-14)

(编辑:周 箭)