

HPLC 梯度洗脱法同时测定鼻炎喷剂中 3 种组分的含量

吕冠欣^{1*}, 龚越强¹, 严静², 欧景仪²(1. 佛山市顺德区药品检验所, 广东佛山 528300; 2. 佛山市顺德区桂州医院, 广东佛山 528300)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2371-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.25

摘要 目的: 建立同时测定鼻炎喷剂中盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙 3 种组分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱梯度洗脱法。色谱柱为 SHIMADZU Shim-pack VP-ODS, 流动相为甲醇-乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(含 0.25% 三乙胺, pH 3.0), 流速为 1.0 ml/min, 变换紫外检测波长分别为 207、278、247 nm, 柱温为 40 °C。结果: 盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙检测质量浓度线性范围分别为 99.93~799.44、46.38~371.00、5.39~43.12 μg/ml ($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 8$), 平均回收率为 100.4% (RSD=1.2%, $n=3$)、101.1% (RSD=1.3%, $n=3$) 和 101.0% (RSD=1.5%, $n=3$)。结论: 建立的方法简便、灵敏、准确, 可用于制订鼻炎喷剂的质量标准并为产品质量控制提供支持。

关键词 高效液相色谱法; 鼻炎喷剂; 盐酸麻黄碱; 环丙沙星; 醋酸泼尼松龙; 含量测定

Simultaneous Determination of 3 Components in Rhinitis Spray by HPLC with Gradient Elution

LYU Guan-xin¹, GONG Yue-qiang¹, YAN Jing², OU Jing-yi²(1. Foshan Shunde District Institute for Drug Control, Guangdong Foshan 528300, China; 2. Foshan Shunde District Guizhou Hospital, Guangdong Foshan 528300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of ephedrine hydrochloride, ciprofloxacin and prednisolone acetate in Rhinitis spray. METHODS: HPLC with gradient elution method was adopted. The determination was performed on SHIMADZU Shim-pack VP-ODS column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (containing 0.25% triethylamine, pH 3.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 207 nm, 278 nm and 247 nm and column temperature was 40 °C. RESULTS: The linear ranges were 99.93-799.44 μg/ml for ephedrine hydrochloride, 46.38-371.00 μg/ml for ciprofloxacin and 5.39-43.12 μg/ml for prednisolone acetate ($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 8$); their average recoveries were 100.4% (RSD=1.2%, $n=3$), 101.1% (RSD=1.3%, $n=3$) and 101.0% (RSD=1.5%, $n=3$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, accurate, and can be used for the formulation of quality standard and quality control of Rhinitis spray.

KEYWORDS HPLC; Rhinitis spray; Ephedrine hydrochloride; Ciprofloxacin; Prednisolone acetate; Content determination

溶液主峰面积 0.1 倍的峰可忽略不计。3 批样品有关物质检查结果见表 4。

表 4 3 批样品有关物质检查结果 (%)

Tab 4 Results of related substances in 3 batches of samples (%)

样品批号	杂质 I	杂质 II		单个最大杂质	杂质总量
		外标法	加校正因子法		
20110941	0.10	0.10	0.10	0.03	0.3
20110942	0.08	0.10	0.10	0.05	0.4
20110943	0.07	0.14	0.13	0.03	0.3

3 讨论

(1) 本试验中取系统适用性试验溶液进样, 用二极管阵列检测器(DAD)检测, 环戊丙酸雌二醇、杂质 I 及单个杂质的最大吸收波长为 280 nm, 杂质 II 的最大吸收波长为 263 nm。拟定标准采用 280 nm 作为检测波长。由于杂质 I 与杂质 II 的相对保留时间重现性较好, 杂质 I 与杂质 II 的相对响应因子受参数变化影响较小, 故杂质 I 按不加校正因子的主成分自身对照法计算, 以相对主峰的保留时间进行定性。杂质 II 采用加校正因子的主成分自身对照法与外标法计算的结果一致, 由于杂质 II 易于获得, 且经结构确证且纯度大于 98.5%, 故拟

* 副主任中药师。研究方向: 药物分析与检验。E-mail: 596962547@qq.com

定标准采用杂质对照品外标法进行定量。

(2) 笔者曾采用梯度洗脱的方式进行有关物质检查, 由于不同的仪器间梯度准确度的差异会导致分离重现性差; 而等度洗脱的方式重现性较好, 各有关物质间的分离度均 > 2.0, 有关物质的定量准确度也不受影响, 因此本试验最终采用等度洗脱的方式。

(3) 环戊丙酸雌二醇是以雌酚酮与环戊丙酰氯为起始原料, 通过一系列酯化及水解后的终产物。环戊丙酰氯中含有微量环戊乙酰氯, 与雌酚酮的反应副产物为杂质 I, 杂质 II 为雌酚酮脱氢物(雌酚酮及雌激素衍生物的合成中使用二氯二氰基苯醌脱氢^[4])与环戊丙酰氯的反应副产物。试验发现 3 批样品中均检出杂质 I、杂质 II, 但未检出另一已知杂质雌二醇。

参考文献

- [1] 雷贞武. 新的激素避孕方法: Lunella 注射避孕针[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(1): 58.
- [2] 唐彦, 朱珠. 月用避孕药: 复方甲羟孕酮[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(11): 285.
- [3] The United States Pharmacopeial Convention. U.S. Pharmacopeia (36)-National Formulary (31) [S]. Baltimore: United Book Press, Inc., 2013: 3 480.
- [4] 景羽. 雌酚酮及雌激素衍生物的合成研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2010: 1-93.

(收稿日期: 2013-09-25 修回日期: 2013-11-05)

鼻炎喷剂是佛山市顺德区桂州医院研发的一种医院制剂(批准文号:粤HB20111414),处方含盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙等,具有抗菌、消炎、收缩血管的作用,临床主要用于治疗急慢性鼻炎、鼻黏膜肿胀等。该制剂目前的质量标准只对处方中环丙沙星进行了含量测定;笔者查阅了相关资料^[1-6],大部分资料只记载该制剂中1种成分的含量测定方法,并无3种组分同时测定的方法。为了提高制剂的质量标准,保障用药安全、有效,本研究参考了类似的多组分同时测定的相关文献^[7-9],建立了同时测定鼻炎喷剂中盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙的高效液相色谱(HPLC)法,经方法学验证,该方法快速、灵敏、准确、可靠,能更好地控制本品质量。

1 材料

1.1 仪器

1260 HPLC仪、G4212B 二极管阵列检测器、EZChrom 色谱工作站(美国Agilent公司);AG135型电子分析天平(德国梅特勒公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸麻黄碱对照品(批号:171241-201007,供含量测定用,纯度:99.7%)、环丙沙星对照品(批号:130451-200302,供含量测定用,纯度:84.9%)、醋酸泼尼松龙(批号:100012-200706,供含量测定用,纯度:99.7%)均来源于中国食品药品检定研究院;鼻炎喷剂(顺德区桂州医院,批号:130601、130602、130605,规格:每瓶15 ml,每1 ml中含盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙分别为10、5、0.5 mg);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SHIMADZU Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm,4.6 μm);流动相A:甲醇,B:乙腈,C:0.05 mol/L磷酸二氢钾(含0.25%三乙胺,磷酸调节pH 3.0),梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;随梯度改变紫外检测波长分别为207、278、247 nm;柱温:40℃;进样量:10 μl。理论板数按盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙计分别为5 995、7 208、13 382,拖尾因子分别为1.07、1.13、1.03,色谱峰与其他峰分离度不低于2.0。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	A,ml	B,ml	C,ml	检测波长,nm
0→10	15	5	80	207
10→20	15	5	80	278
20→35	5	33	62	278
35→50	5	33	62	247
50→60	15	5	80	207

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品盐酸麻黄碱100.23 mg、环丙沙星109.25 mg、醋酸泼尼松龙10.81 mg,分别置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得质量浓度分别为0.999 3、0.927 5、0.107 8 mg/ml的对照品贮备液。分别精密量取上述贮备液10、5、5 ml置于25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取鼻炎喷剂1 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,以0.45 μm的微孔滤膜过滤,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按处方量取辅料,制备不含盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙的阴性样品(空白基质),按“2.3”项下方法操作制得阴性样品溶液。

2.5 干扰试验

取上述3种溶液进样,结果在供试品溶液色谱图中,在对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰,表明空白基质中各成分对测定结果未见影响,见图1。

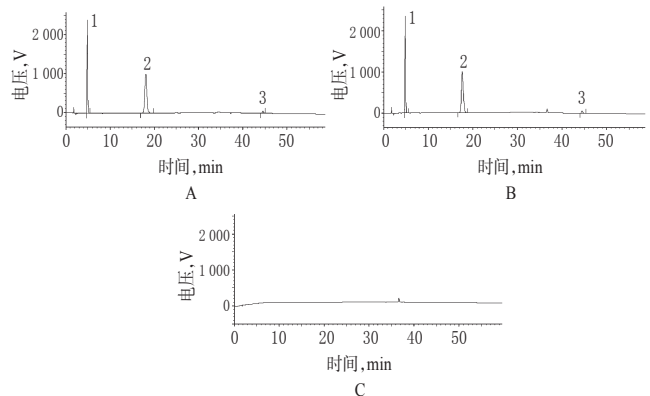


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 盐酸麻黄碱; 2. 环丙沙星; 3. 醋酸泼尼松龙

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative sample; 1. ephedrine hydrochloride; 2. ciprofloxacin; 3. prednisolone acetate

2.6 线性关系考察

分别精密量取“2.2”项下对照品贮备液适量,配制成一系列不同质量浓度的标准溶液,含盐酸麻黄碱为99.93、199.86、399.72、599.58、799.44 μg/ml,环丙沙星为46.38、92.75、185.50、278.25、371.00 μg/ml,醋酸泼尼松龙为5.39、10.78、21.56、32.34、43.12 μg/ml,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归,得回归方程,结果见表2。

表2 3种组分的线性关系(n=5)

Tab 2 Linear ranges of 3 components(n=5)

组分	质量浓度, μg/ml	回归方程	r
盐酸麻黄碱	99.93~799.44	$A=8.09 \times 10^6 c + 4.11 \times 10^6$	0.999 7
环丙沙星	46.38~371.00	$A=2.27 \times 10^7 c + 1.30 \times 10^8$	0.999 8
醋酸泼尼松龙	5.39~43.12	$A=6.88 \times 10^6 c + 1.03 \times 10^6$	0.999 6

2.7 精密度试验

取同一批号(130601)的供试品溶液1份,连续进样6次,结果盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙峰面积的RSD分别为0.8%、0.8%和0.7%(n=6),表明该方法精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一批号(130601)的供试品溶液,分别放置0、2、4、6、8、12 h进样测定,结果盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙含量的RSD分别为0.3%、0.6%和0.8%(n=6),表明供试品在12 h内稳定。

2.9 重复性试验

取同一批号(130601)样品6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定,结果盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙含量的RSD分别为0.9%、1.0%和1.3%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验

分别精密量取盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙对照品适量,加入处方比例的阴性基质,各配制3种组分分别相当于处方量80%、100%、120%的样品各3份,按“2.3”项下方法制备成供试品溶液,进样测定,计算回收率,结果见表3。

表3 回收率试验结果($n=3$)

Tab 3 Results of recovery test($n=3$)

组分	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
盐酸麻黄碱	336.64	340.80	101.24	100.4	1.2
	336.64	332.12	98.66		
	336.64	335.21	99.58		
	420.80	421.11	100.07		
	420.80	432.32	102.74		
	420.80	425.12	101.03		
	504.96	506.51	100.31		
	504.96	508.19	100.64		
	504.96	499.82	98.98		
	环丙沙星	159.36	159.80		
159.36		158.12	99.22		
159.36		163.21	102.42		
199.20		202.85	101.83		
199.20		201.22	101.01		
199.20		205.01	102.92		
239.04		238.22	99.66		
239.04		244.32	102.21		
239.04		239.56	100.22		
醋酸泼尼松龙		16.12	16.22	100.62	101.0
	16.12	16.17	100.31		
	16.12	15.98	99.13		
	20.15	20.25	100.50		
	20.15	20.05	99.50		
	20.15	20.59	102.18		
	24.18	25.01	103.43		
	24.18	24.91	103.02		
	24.18	24.33	100.62		

2.11 样品含量测定

取3批样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再分别精密量取供试品溶液和混合对照品溶液注入液相色谱仪,按外标法以峰面积计算含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 4 Content determination of samples($n=3$)

批号	盐酸麻黄碱		环丙沙星		醋酸泼尼松龙	
	占标示量百分比, %	RSD, %	占标示量百分比, %	RSD, %	占标示量百分比, %	RSD, %
130601	99.2	0.7	97.3	0.8	99.8	1.1
130602	98.4	0.1	97.9	1.2	99.2	0.6
130605	98.5	0.3	98.2	1.3	99.7	0.6

3 讨论

(1)将对照品溶液注入色谱仪,以二极管阵列检测器在190~400 nm波长处记录色谱图,高效液相三维图显示,盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙的最大吸收波长分别在207、278、247 nm,因此采用改变检测波长的方法,使得待测物质能得到最灵敏的结果。而且,在本研究的色谱条件下,盐酸麻黄碱、环丙沙星和醋酸泼尼松龙的保留时间分别约为5、18、44 min,各峰出现间隔时间较长,能有足够的时间使改变检测波长后的图谱稳定、基线漂移不明显,因而不会影响分析结果。

(2)经前期试验发现,流动相中水相的pH对组分的峰形有较大影响:pH过高,环丙沙星峰会产生前沿现象;pH过低,盐酸麻黄碱峰会产生拖尾现象。经参阅相关资料^[10],最终确定pH为 3.0 ± 0.1 ,结果较为理想。

(3)该制剂原标准中只有环丙沙星的含量测定,处方中盐酸麻黄碱为限用物质,应有含量标准的规定。因此,笔者建立了同时测定处方中3种组分的含量测定方法,结果表明该方法操作简便、灵敏度高、分离良好。故本方法可为鼻炎喷剂的生产质量控制提供科学的分析方法,从而完善该制剂的质量控制指标。

参考文献

- [1] 张秀梅,袁如彩.HPLC法测定盐酸麻黄碱滴鼻液中盐酸麻黄素的含量[J].中国医药导报,2009,6(34):44.
- [2] 唐双意,钟小斌,梁秋云.高效液相色谱法测定麻黄素祛痰合剂中盐酸麻黄碱的含量[J].广西医科大学学报,2009,26(4):561.
- [3] 徐菊根,邵珠民.高效液相色谱法测定盐酸麻黄碱滴鼻剂中盐酸麻黄碱的含量[J].现代中西医结合杂志,2010,19(19):2426.
- [4] 陆蕴,余青.高效液相色谱法测定复方盐酸麻黄碱滴眼液中盐酸麻黄碱的含量[J].中国药房,2006,17(12):939.
- [5] 武晋考,柴桂珍.高效液相色谱法测定复方环丙沙星各组分含量[J].中国兽药杂志,2002,36(2):43.
- [6] 吕青志,李珂珂,刘德胜,等.HPLC法测定醋酸泼尼松龙微乳中醋酸泼尼松龙的含量[J].中国药房,2012,23(4):373.
- [7] 白林,魏萍,王瑾,等.高效液相色谱法测定复方环丙沙星滴鼻液中3组分的含量[J].解放军药学学报,2002,18(2):79.
- [8] 文为,曾嵘.高效液相色谱法测定强麻滴鼻剂中盐酸麻黄素和泼尼松龙的含量[J].山西医药杂志,2006,35(3):270.
- [9] 林洁.高效液相色谱法同时测定滴鼻剂中盐酸麻黄碱和氢化可的松的含量[J].中国医院药学杂志,2002,22(8):474.
- [10] 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,2010:412.

(收稿日期:2013-09-24 修回日期:2013-11-13)