

文章编号: 1008-9926(2005)05-0383-04 中图分类号: R927.2 文献标识码: A

# 氯霉素甲硝唑洗鼻剂的含量测定及其有关物质检查方法

刘 刚<sup>①</sup>, 汤 晴, 张 捷, 王海涛, 姜 韧, 谭生建

(中国人民解放军第306医院 药学部 北京 100101)

**摘 要:**目的 建立高效液相色谱法测定氯霉素甲硝唑洗鼻剂中氯霉素、甲硝唑含量测定方法及其有关物质氯霉素二醇物、对硝基苯甲醛的定量检查方法。方法 采用高效液相色谱法。Intersil C<sub>18</sub>分析色谱柱(4.6mm ID×250mm, 粒径 5μm), 流动相: 甲醇-水-三乙胺(480:520:7, 含1%磷酸二氢钠, 0.2%庚烷磺酸钠, 磷酸调 pH 值为3.0); 流速1.0ml/min; 检测波长270nm。结果 甲硝唑、氯霉素、氯霉素二醇物和对硝基苯甲醛的理论板数分别为4 700、4 500、4 400、1 500。回归方程分别为:  $Y = 19\,156\,100.5X + 424\,145.7$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 65\,390\,024.2X - 5\,660.6$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 39\,817\,070.9X + 1\,373\,589.3$  ( $r = 0.999\,8$ ),  $Y = 83\,051\,977.5X - 284\,191.7$  ( $r = 0.999\,8$ ); 线性范围分别为0.423 0~2.115μg, 0.450 0~2.250μg, 0.660 0~3.300μg, 0.444 0~2.220μg; 平均回收率和 RSD 分别为100.8%, 1.4%; 99.2%, 1.2%; 101.1%, 1.5%; 99.3%, 1.6%; 最低检测限分别为0.002, 0.002, 0.002和0.003μg。结论 用高效液相色谱法测定氯霉素甲硝唑洗鼻剂中甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素、对硝基苯甲醛的含量, 操作简便, 结果准确。

**关键词:** 高效液相色谱法; 氯霉素甲硝唑洗鼻剂; 甲硝唑; 氯霉素二醇物; 氯霉素; 对硝基苯甲醛

## HPLC Determination of Metronidazole, Chloramphenicol and It's Related Substances in Collunarium by HPLC

LIU Gang, TANG Qing, ZHANG Jie, WANG Hai Tao, JIANG Ren, TAN Sheng-Jian

(Department of Pharmacy, Hospital 306th PLA, Beijing 100101 China)

**ABSTRACT:** **Aim** A quantitative method was established for the determination of Chloramphenicol, Metronidazole, 2-Amino-1-(4-nitrophenyl) propane-1, 3-diol and 4-Nitrobenzaldehyde in Collunarium by means of HPLC. **Method** The chromatographic conditions includes Intersil C<sub>18</sub> column and mobile phase consist of methanol-water-triethylamine (480:520:7, containing 1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% 1-heptanesulfonate, sodium salt, to regulate pH to 3.0 with phosphoric acid). The flow rate is 1.0ml/min. The detective wavelength was 270 nm performed at room temperature. **Results** The number of theoretical plates caculated by metronidazole, chloramphenicol 2-Amino-1-(4-nitrophenyl) propane-1, 3-diol and 4-Nitrobenzaldehyde peak were 4 700, 4 500, 4 400 and 1 500 respectively; the regression equations were  $Y = 19\,156\,100.5X + 424\,145.7$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 65\,390\,024.2X - 5\,660.6$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 39\,817\,070.9X + 1\,373\,589.3$  ( $r = 0.999\,8$ ),  $Y = 83\,051\,977.5X - 284\,191.7$  ( $r = 0.999\,8$ ) respectively, the linear ranges were 0.423 0~2.115μg, 0.4500~2.250μg, 0.6600~3.300μg, 0.444 0~2.220μg respectively; the average recovery RSD were 100.8%, 1.4%; 99.2%, 1.2%; 101.1%, 1.5%; 99.3%, 1.6% respectively; the measurable lowest limit were 0.002, 0.002, 0.002, 0.003μg respectively. **Conclusion** The method is rapid, accurate and reliable.

**KEY WORDS:** HPLC; Collunarium; Metronidazole; Chloramphenicol; 2-Amino-1-(4-nitrophenyl) propane-1, 3-diol, 4-Nitrobenzaldehyde

氯霉素甲硝唑洗鼻剂主要由甲硝唑和氯霉素组成, 具有抗菌、消炎、促进鼻腔术后恢复等作用, 用于鼻窦炎、鼻息肉等鼻腔手术后的创面冲洗。一般情况下, 氯霉素的液体制剂在生产和长期储藏过程中, 可发生水解、光降解反应。水解产物主要为1-对硝基苯基-2-氨基-1, 3-丙二醇(简称: 氯霉素二醇物),

光解产物主要为对硝基苯甲醛。甲硝唑和氯霉素及其制剂的含量测定方法报道有紫外分光光度法<sup>[1~3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4,5]</sup>等。氯霉素二醇物的检查报道有薄层色谱法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7]</sup>。氯霉素甲硝唑洗鼻剂中氯霉素、甲硝唑含量测定方法及其有关物质氯霉素二醇物、对硝基苯甲醛的检查

① 作者简介: 刘 刚(1961- ), 男, 北京人, 理学学士, 副主任药师。研究方向: 医院药学。Tel: (010)66356187

方法未见报道。本文研究建立了氯霉素甲硝唑洗鼻剂中氯霉素、甲硝唑含量测定方法及其有关物质氯霉素二醇物、对硝基苯甲醛的定量检查方法。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 高效液相色谱仪, 包括: 2800 液相色谱泵(BIO-RAD 公司), 7215 型手动进样器(USA), BIO-DIMENSION 紫外可见分光光度检测器, TL 9900 色谱数据工作站(均为北京泰乐公司)。

**1.2 试剂** 氯霉素、甲硝唑、氯霉素二醇物对照品(均购自中国药品生物制品检定所)。对硝基苯甲醛对照品(北京化学试剂公司, 纯度大于 98.5%)。甲硝唑对照品储备液为  $141.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 氯霉素对照品储备液为  $150.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 氯霉素二醇物对照品储备液为  $220.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 对硝基苯甲醛对照品储备液为  $148.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 溶剂均为甲醇。

甲硝唑氯霉素洗鼻剂原料(北京市药品公司, 符合中国药典 2000 年版二部标准)。实验用样品(由本院制剂室制备, 批号见表 2)。甲醇、庚烷磺酸钠为色谱纯, 三乙胺、磷酸和磷酸二氢钠为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 系统适用性试验

**2.1.1 色谱条件** 理论板数和分离度 Intersil C<sub>18</sub> 分析色谱柱(4.6mm ID×250mm, 粒径 5 $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(480:520:7, 含 1% 磷酸二氢钠, 0.2% 庚烷磺酸钠, 磷酸调 pH 值 3.0); 流速 1ml/min; 检测波长 270nm。在此色谱条件下, 测得甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素、对硝基苯甲醛混合对照品色谱图、甲硝唑氯霉素洗鼻剂阴性样品色谱图(该色谱图为一 条直线, 图略)、甲硝唑氯霉素洗鼻剂色谱图和甲硝唑氯霉素洗鼻剂室内自然条件放置(无色玻璃输液瓶, 不避光)12 个月的样品(批号 20040204)的色谱图, 见图 1。

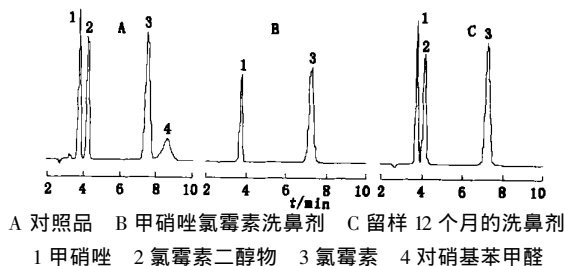


图 1 混合对照品 甲硝唑氯霉素洗鼻剂和留样

12 个月的洗鼻剂的色谱图

Fig 1 Chromatograms of chemical reference substance (A), sample (B)

and the Chloramphenicol been reserved for 12 months (C)

在图 1 中, 甲硝唑保留时间约 3.7min, 氯霉素二醇物保留时间约 4.2min, 氯霉素保留时间约 7.4min, 对硝基苯甲醛保留时间约 8.6min, 理论板数分别约为 4700、4500、4400 和 1500, 各峰与其相邻峰的分度均大于 1.5。

**2.1.2 对照品溶液进样重复性** 取甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素、对硝基苯甲醛混合对照品溶液(用流动相溶解)重复进样 5 次, 记录色谱峰面积, RSD 分别为 1.4%、1.4%、0.71% 和 1.2%。证明对照品溶液进样符合中国药典(2000 年版二部)附录 VD(高效液相色谱法)系统适用性项下重复性试验的要求。

**2.2 线性关系** 分别取甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素、对硝基苯甲醛对照品储备液 3、6、9、12、15 $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 计算回归方程。

$$\text{甲硝唑: } Y = 19156100.5X + 424145.7, r = 0.9999$$

$$\text{氯霉素二醇物: } Y = 65390024.2X - 5660.6, r = 0.9999$$

$$\text{氯霉素: } Y = 39817070.9X + 1373589.3, r = 0.9998$$

$$\text{对硝基苯甲醛: } Y = 83051977.5X - 284191.7, r = 0.9998$$

结果显示甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素和对硝基苯甲醛分别在 0.423 0~2.115 $\mu\text{g}$ , 0.450 0~2.250 $\mu\text{g}$ , 0.660 0~3.300 $\mu\text{g}$ , 0.444 0~2.220 $\mu\text{g}$  范围, 呈良好的线性关系。

**2.3 检测限** 分别取甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素和对硝基苯甲醛对照品溶液用流动相稀释至峰高约为基线噪音的 3 倍, 测得检测限依次为 0.002、0.002、0.002 和 0.003 $\mu\text{g}$ 。

**2.4 重复性** 精密制备含甲硝唑、氯霉素、氯霉素二醇物(含量约相当氯霉素标示量的 5%)和对硝基苯甲醛(含量约相当氯霉素标示量的 5%)的氯霉素甲硝唑洗鼻剂, 分别测定 9 次, 考察重复性。甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素和对硝基苯甲醛含量测定结果的 RSD ( $n = 9$ ) 依次为 1.4%、1.8%、1.3% 和 1.9%。

**2.5 加样回收率试验** 精密制备含甲硝唑、氯霉素、氯霉素二醇物(含量约相当氯霉素标示量的 5%)和对硝基苯甲醛(含量约相当氯霉素标示量的 5%)的氯霉素甲硝唑洗鼻剂, 作为回收率测定用样品。精密量取 4、5 和 6ml, 各 3 份, 分别置 100ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 按样品测定项下方法分别测定含量, 计算回收率。

甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素和对硝基苯甲醛回收率测定结果见表 1。

表 1 甲硝唑 氯霉素二醇物 氯霉素 对硝基苯甲醛回收率测定结果

Tab 1 Analytical recovery of Metronidazole 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)

propane-1-Chloramphenicol 4-Nitrobenzaldehyde in Collunarium

| 被测成分<br>名称 | 加入量<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) | 测得量<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) | 回收率<br>(%) | $\bar{x}$<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|------------------|------------|
| 甲硝唑        | 80.96                                         | 81.4                                          | 100.6      | 100.8            | 1.4        |
|            | 80.96                                         | 82.5                                          | 101.9      |                  |            |
|            | 80.96                                         | 81.8                                          | 101.0      |                  |            |
|            | 101.2                                         | 102.2                                         | 101.0      |                  |            |
|            | 101.2                                         | 100.2                                         | 99.0       |                  |            |
|            | 101.2                                         | 100.2                                         | 99.0       |                  |            |
|            | 121.4                                         | 123.1                                         | 101.4      |                  |            |
|            | 121.4                                         | 121.3                                         | 99.9       |                  |            |
|            | 121.4                                         | 125.7                                         | 103.6      |                  |            |
| 氯霉素二醇物     | 5.112                                         | 5.17                                          | 101.1      | 101.1            | 1.5        |
|            | 5.112                                         | 5.25                                          | 102.8      |                  |            |
|            | 5.112                                         | 5.16                                          | 100.9      |                  |            |
|            | 6.390                                         | 6.49                                          | 101.5      |                  |            |
|            | 6.390                                         | 6.37                                          | 99.7       |                  |            |
|            | 6.390                                         | 6.52                                          | 102.1      |                  |            |
|            | 7.668                                         | 7.91                                          | 103.2      |                  |            |
|            | 7.668                                         | 7.62                                          | 99.3       |                  |            |
|            | 7.668                                         | 7.59                                          | 99.0       |                  |            |
| 氯霉素        | 101.3                                         | 102.1                                         | 100.8      | 99.2             | 1.2        |
|            | 101.3                                         | 100.9                                         | 99.6       |                  |            |
|            | 101.3                                         | 99.8                                          | 98.5       |                  |            |
|            | 126.6                                         | 127.4                                         | 100.6      |                  |            |
|            | 126.6                                         | 126.7                                         | 100.0      |                  |            |
|            | 126.6                                         | 124.6                                         | 98.4       |                  |            |
|            | 151.9                                         | 148.0                                         | 97.5       |                  |            |
|            | 151.9                                         | 148.7                                         | 97.9       |                  |            |
|            | 151.9                                         | 151.1                                         | 99.5       |                  |            |
| 对硝基苯甲醛     | 5.104                                         | 5.1                                           | 99.2       | 99.3             | 1.6        |
|            | 5.104                                         | 5.0                                           | 97.2       |                  |            |
|            | 5.104                                         | 5.2                                           | 102.4      |                  |            |
|            | 6.380                                         | 6.2                                           | 97.9       |                  |            |
|            | 6.380                                         | 6.3                                           | 98.8       |                  |            |
|            | 6.380                                         | 6.4                                           | 100.6      |                  |            |
|            | 7.656                                         | 7.6                                           | 99.6       |                  |            |
|            | 7.656                                         | 7.5                                           | 97.9       |                  |            |
|            | 7.656                                         | 7.6                                           | 99.8       |                  |            |

2.6 供试品溶液稳定性 分别配制甲硝唑、氯霉素二醇物、氯霉素和对硝基苯甲醛的供试品溶液, 6h 内重复进样测定 6 次, 记录各色谱峰面积,  $RSD$  ( $n = 6$ ) 分别为 1.2%、1.4%、0.92% 和 1.6%。显示供试品溶液至少在 6h 内稳定。

## 2.7 样品测定

2.7.1 对照品溶液制备 分别取甲硝唑对照品 100mg、氯霉素对照品和 125mg、氯霉素二醇物 5mg 和对硝基苯甲醛 5mg, 精密称定, 置 100ml 量瓶中, 流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5ml, 置 50ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1ml 含甲硝唑 100 $\mu\text{g}$ 、含氯霉素 125 $\mu\text{g}$ 、含氯霉素二醇

物 5 $\mu\text{g}$  和含对硝基苯甲醛 5 $\mu\text{g}$ )。

2.7.2 供试品溶液制备 精密量取氯霉素甲硝唑洗鼻剂 5ml, 置 100ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1ml 含甲硝唑和氯霉素分别为 100、125 $\mu\text{g}$ )。

2.7.3 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪, 记录氯霉素色谱峰面积, 按外标法以峰面积计算, 即得。

测定了 3 批甲硝唑氯霉素洗鼻剂常温留样的样品, 结果见表 2。

表 2 3 批甲硝唑氯霉素洗鼻剂样品中甲硝唑、氯霉素和有关物质含量测定结果

Tab 2 Determination result of Metronidazole, Chloramphenicol and its related substances in Collunarium

| 批号       | 甲硝唑含量<br>相当标示量<br>(%) | 氯霉素含量<br>相当标示量<br>(%) | 氯霉素<br>二醇物<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) | 对硝基<br>苯甲醛<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) |
|----------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 20040204 | 102.5                 | 66.5                  | 28.6                                                 | 未检出                                                  |
| 20040310 | 99.2                  | 67.8                  | 28.0                                                 | 未检出                                                  |
| 20050222 | 101.0                 | 99.5                  | 未检出                                                  | 未检出                                                  |

## 3 讨论

3.1 以流动相为溶剂, 光谱扫描确认甲硝唑在 312nm 波长处有最大吸收, 在 270nm 波长处有较强吸收且吸收曲线平滑。氯霉素在 275nm 波长处有最大吸收, 氯霉素二醇物在 271nm 波长处有最大吸收, 对硝基苯甲醛在 268nm 波长处有最大吸收。为同时测定甲硝唑、氯霉素及其分解产物氯霉素二醇物和对硝基苯甲醛的含量, 选用 270nm 作为测定波长, 方法验证证明选用 270nm 波长测定可行。

3.2 本方法专属性强、精密度好、准确性高, 可用于氯霉素甲硝唑洗鼻剂中甲硝唑、氯霉素的含量测定及其有关物质氯霉素二醇物和对硝基苯甲醛的定量检查。

3.3 由表 1 结果可以看出, 氯霉素甲硝唑洗鼻剂中氯霉素的稳定性差, 有待改进处方或改变储藏条件, 以延缓氯霉素的分解。

参考文献:

- [1] 刘志邦, 梁君, 余谨发. 双波长紫外分光光度法测定复方氯霉素醇溶液含量[J]. 药学实践杂志, 1996, 14(4): 241
- [2] 费寿耆. 紫外分光光度法测定痤疮搽剂中甲硝唑和氯霉素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 1994, 14(2): 75
- [3] 陈爱玲, 李枝端, 林秋英. 紫外分光光度法测定氯霉素氯化可的松滴耳液的含量[J]. 海峡药学, 1997, 9(2): 18
- [4] 张玲, 梅志英, 陆小平. 高效液相色谱法测定氯雷叮中氯霉素

- 和雷锁辛的含量[J]. 中国药科大学报, 1996, 27(10): 639
- [5] 关彩虹, 姜亚敏. HPLC法同时测定甲硝唑栓和替硝唑栓的含量[J]. 中国现代应用药学, 1997, 14(5): 52
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 931

- [7] 林嘉富, 吴先明. HPLC测定氯霉素注射液的含量及二醇物[J]. 海峡药学, 1997, 9(2): 66

(收稿日期: 2005-03-30; 修回日期: 2005-06-21)

(本文编辑 魏 萍)

文章编号: 1008-9926(2005)05-0386-03 中图分类号: R943 文献标识码: A

## 推理选育林可霉素高产菌株

李红德<sup>①</sup>, 王 冰, 路建同, 宋 秋

(南阳普康药业有限公司 河南 南阳 473053)

**摘 要:**目的 推理选育林可霉素高产菌株。方法 根据林可霉素的生物合成途径, 对其产生菌林肯链霉菌(*Streptomyces Lincolnsis*)进行连续递进推理选育, 出发菌株 SL369 经过 UV 诱变和多次单菌落分离, 筛选林可霉素、L-酪氨酸和  $\alpha$ , D-吡喃半乳糖抗性突变株。结果 获得高产菌株 SL-42, 生产能力提高 48%, 上罐发酵证实, 达  $7\,900\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  以上, 为企业赢得较大经济效益。结论 推理选育可得林可霉素高产菌株, 且高产性能及其遗传特性较为稳定。

**关键词:** 林可霉素; 林肯链霉菌; 推理选育

## Rational Breeding of Lincomycin Producing Strain

LI Hong De, WANG Bing, LU Jian Tong, SONG Qiu

(Nanyang Pukang Pharmaceutical Co. Ltd., Nanyang 473053, Henan China)

**ABSTRACT:** **Aim** To rationally breed lincomycin producing strain. **Methods** According to the metabolic pathway of lincomycin, a continuous and advancing rational selection procedure was performed. With UV mutation and single colony separating of the original strain SL369, selected the mutagenic strain resisting lincomycin, L-tyrosine and  $\alpha$ , D-galactopyranose. **Results** A higher producing strain SL-42 was obtained, whose productivity was 48% higher than that of the original. That was approved by our fermentation producing which lincomycin productivity reached  $7\,900\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , earning great economic benefits for our enterprise. **Conclusion** Rational breeding may obtain higher lincomycin producing strain, its highly yielding ability and hereditary character is steady relatively.

**KEY WORDS:** Lincomycin; *Streptomyces Lincolnsis*; Rational selection

林可霉素(Lincomycin)是林肯链霉菌(*Streptomyces Lincolnsis*)产生的抗生素, 对多数革兰阳性菌有较强抗菌活性, 且耐药性发展较慢, 对呼吸系统、骨骼和软组织的感染有较好疗效<sup>[1,2]</sup>, 已成为临床主要抗生素之一。其结构式见图1, 经三级发酵生产, 菌种性能是提高生产水平的关键。

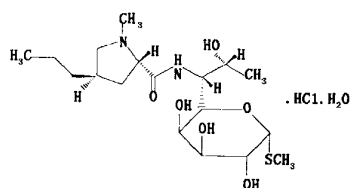


图1 林可霉素结构式

Fig 1 The structural formula of lincomycin

林可霉素属林可胺类抗生素, 组分包括氨基酸和糖<sup>[3]</sup>, 是由 L-酪氨酸和戊糖磷循环(戊糖 5 磷酸和景天糖 7 磷酸)的中间产物缩合而成, 整个生物合成途径包括 2 个分枝: 一个由 L-酪氨酸合成丙基脯氨酸(PPL), 另一个由景天糖 7 磷酸构成  $\alpha$ -甲硫林可胺( $\alpha$ -MTL)<sup>[4]</sup>。本文依据其生物合成途径代谢调节机理对产生菌林肯链霉菌 SL369 进行推理选育。

林可霉素的产生和甲基化 rRNA 的出现, 在功能上是联系着的, 不是林可霉素抗性的细胞就不能进行林可霉素的生物合成, 进一步研究也证明了这种推测。实验证实组成型的 *Streptomyces Lincolnsis* 比

<sup>①</sup> 作者简介: 李红德(1968-), 男, 河南省南阳人, 工程师, 工学士。研究方向: 生物、化学制药技术研究。Tel: (0377) 63136660, Email: lhd0429@sohu.com