

固相萃取-高效液相色谱法测定复方甲硝唑 阴道栓中甲硝唑和盐酸四环素的含量

黄静, 张毅, 杜增辉

(河北省药品检验所, 石家庄 050011)

摘要 目的: 采用固相萃取-高效液相色谱法分析复方甲硝唑阴道栓中甲硝唑和盐酸四环素的含量。方法: 采用 C_{18} 固相萃取小柱分离除去复方甲硝唑阴道栓中的基质, 高效液相色谱法测定甲硝唑和盐酸四环素的含量。色谱柱为 Luna C_8 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 流动相为 0.1 mol \cdot L⁻¹ 草酸铵溶液-二甲基甲酰胺-0.2 mol \cdot L⁻¹ 磷酸氢二铵溶液 (65:30:5), 检测波长为 270 nm, 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹。结果: 甲硝唑进样量在 0.228~2.28 μ g 盐酸四环素进样量在 0.0121~0.121 μ g 范围内, 线性关系良好; 平均回收率 ($n=9$) 甲硝唑为 98.8%, 盐酸四环素为 98.3%。结论: 本方法灵敏快速, 结果准确, 重现性好, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱; 甲硝唑; 盐酸四环素; 复方甲硝唑阴道栓

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0110-03

SPE-HPLC determination of metronidazole and tetracycline hydrochloride in compound metronidazole vaginal suppositories

HUANG Jing ZHANG Yi DU Zeng-hui

(Institute for Drug Control of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective To establish SPE-HPLC for determination of metronidazole and tetracycline hydrochloride in compound metronidazole vaginal suppositories. **Methods** The sample was purified with C_{18} solid phase column and its content was determined with HPLC method. The Luna C_8 column (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) was used and mobile phase was composed of 0.1 mol \cdot L⁻¹ ammonium oxalate-N, N-dimethylformamide-0.2 mol \cdot L⁻¹ ammonium phosphate dibasic/dimmonium hydrogen phosphate at a flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. The UV detector wavelength was 270 nm. **Results** The linear ranges were 0.228-2.28 μ g for metronidazole and 0.0121-0.121 μ g for tetracycline hydrochloride. The average recoveries ($n=9$) were 98.8% for metronidazole and 98.3% for tetracycline hydrochloride. **Conclusion** The method is simple, quick, sensitive, accurate, repeatable and be used to control the quality of compound metronidazole vaginal suppositories.

Key words SPE; HPLC; metronidazole; tetracycline hydrochloride; compound metronidazole vaginal suppositories

复方甲硝唑阴道栓是由甲硝唑、盐酸四环素、制霉菌素 3 种成分组成的抗滴虫和抗生素类复方制剂, 其中甲硝唑、盐酸四环素为其主要成分。国家药品标准中甲硝唑含量测定采用比色法, 基质的去除采用传统的加热、冷凝方法, 溶液不能澄清, 未设置盐酸四环素的含量测定。本文采用 SPE 小柱去除栓剂基质后, HPLC 法对甲硝唑和盐酸四环素进行了含量测定。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010CHT 全自动高效液相色谱仪, CLASS-VP 色谱工作站, C_{18} 固相萃取柱 (天津富集科技有限公司, 200 mg/3 mL)。

对照品甲硝唑 (滴定法标定含量为 99.7%)、盐酸四环素 (HPLC 法标定含量为 99.6%) 均由河北省药品检验所提供, 复方甲硝唑阴道栓为市场抽验所得 (批号: 061001, 060533, 061208), 二甲基甲酰胺为色谱纯, 草酸铵、磷酸氢二铵为分析纯, 水为超纯化

水。

2 溶液的制备

2.1 对照品储备液 精密称取甲硝唑对照品 114.16 mg 盐酸四环素对照品 12.14 mg 同置 200 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 对照品溶液 精密量取对照品储备液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液 取固相萃取柱 1 支,用流动相 5 mL 冲洗,待用。取本品 10 粒,精密称定,剪碎混匀,精密称取适量(约相当于甲硝唑 112.5 mg 盐酸四环素 12.5 mg),置 200 mL 量瓶中,加流动相适量,微温使溶解,放置至室温,加流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取 1.0 mL,置上述固相萃取柱上,用流动相洗脱,用 5 mL 量瓶收集洗脱液至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液 精密称取不含甲硝唑和盐酸四环素的空白基质 0.4567 g 按“2.3”项下方法处理,即得。

3 色谱条件

色谱柱: Luna C₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 草酸铵溶液 - 二甲基甲酰胺 - 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二铵溶液 (65:30:5); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 270 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。在本文色谱条件下,色谱图见图 1。

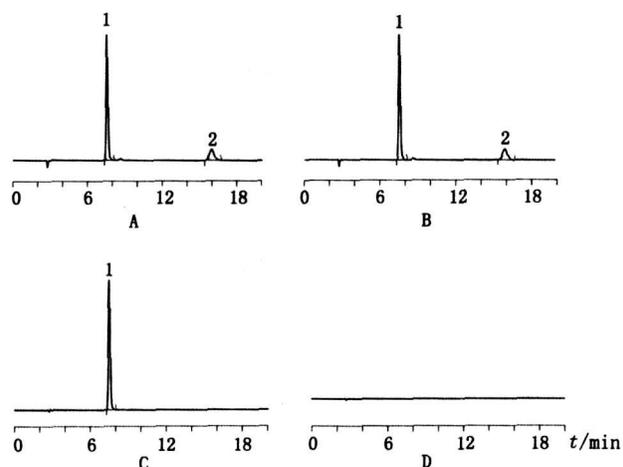


图 1 对照品(A)、样品(B)、甲硝唑(C)、空白辅料(D)色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of chemical reference substances(A), sample(B), metronidazole(C) and blank sample(D)

1 甲硝唑 (metronidazole) 2 盐酸四环素 (tetracycline hydrochloride)

4 方法与结果

4.1 固相萃取回收率 用 C₁₈ 为填充物的固相萃取柱,以“2.3”项下相同的处理条件和洗脱条件试验。

精密量取对照品储备液 1 mL,置处理后的固相萃取柱上,同“2.3”项下的洗脱方法进行洗脱,用 5 mL 量瓶收集洗脱液至刻度,摇匀。分别精密量取该洗脱液与对照品溶液各 10 μL,依次注入液相色谱仪,记录色谱图。甲硝唑萃取回收率为 99.1%,盐酸四环素萃取回收率为 99.0%。表明固相萃取完全。

4.2 线性关系考察 精密量取对照品溶液 2.5, 10, 15, 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,得甲硝唑、盐酸四环素线性回归方程分别为:

$$A = 2.050 + 7.735 \times 10^6 C \quad r = 0.9999$$

$$A = -4.709 + 3.422 \times 10^6 C \quad r = 0.9999$$

结果表明甲硝唑进样量在 0.228~2.28 μg 盐酸四环素进样量在 0.0121~0.121 μg 范围内,线性关系良好。

4.3 精密度试验 精密量取对照品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,测定。结果甲硝唑和盐酸四环素的峰面积积分值的 RSD 均为 0.1%,表明本法精密度良好。

4.4 稳定性试验 精密量取同一批供试品溶液,分别于 0, 4, 8 h 测定。结果峰面积积分值的 RSD 甲硝唑为 0.4%,盐酸四环素为 0.8%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

4.5 重复性试验 取同一批号的样品,分别制备供试品溶液 5 份,分别进样测定。结果甲硝唑和盐酸四环素的含量平均值分别为 455.2 和 27.81 mg·粒⁻¹, RSD 均为 0.2%。

4.6 回收率试验 取固相萃取柱 1 支,用流动相 5 mL 冲洗,待用。根据处方,取空白基质 9 份,按样品标示量的 80%, 100%, 120% 各 3 份,分别精密加入甲硝唑和盐酸四环素,置 200 mL 量瓶中,按“2.3”项下方法制备溶液。照含量测定项下方法测定。结果甲硝唑低、中、高浓度回收率 (n=3) 分别为 99.6% (RSD=0.4%), 98.7% (RSD=0.6%), 98.1% (RSD=0.4%); 平均值 (n=9) 为 98.8%。盐酸四环素低、中、高浓度回收率 (n=3) 分别为 97.5% (RSD=0.2%), 98.5% (RSD=0.4%), 98.9% (RSD=0.2%); 平均值 (n=9) 为 98.3%。本方法回收率良好。

4.7 含量测定 分别精密量取“2.2”对照品溶液和“2.3”供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,按外标法以峰面积计算。结果 3 批样品中甲硝唑和盐酸四环素含量分别为 455.4, 36.42 mg·粒⁻¹; 458.1, 20.42 mg·粒⁻¹; 452.1, 23.58 mg·粒⁻¹。

5 讨论

5.1 取甲硝唑和盐酸四环素对照品适量,加流动相溶解,用紫外分光光度计,在 200~300 nm 波长范围内扫描,甲硝唑和盐酸四环素分别在 277 nm 和 270 nm 波长处有最大吸收。因为盐酸四环素含量较低,故选取其最大波长为测定波长。

5.2 国家药品标准甲硝唑含量测定采用比色法,且基质的去除采用传统的加热、冷凝,溶液不能澄清。测定时,要求用除甲硝唑以外的样品作空白对照,方法不可操作。采用 SPE-HPLC 法,能有效去除基质干扰,减少基质对色谱柱的不利影响,专属性强,回收率好,样品处理简单,可用于复方甲硝唑阴

道栓的质量控制。

5.3 国家药品标准未设置盐酸四环素的含量测定,笔者共测定了 3 个不同厂家的样品,结果发现盐酸四环素含量均偏低。本法的建立,有利于更好地控制产品质量。

参考文献

- 1 ChP(中国药典).2005.VolII(二部):483
- 2 Drug Specifications Promulgated by State Drug Administration(国家药品标准).WS-10001-(HD-1483)-2003

(本文于 2007 年 11 月 22 日收到)

本刊编委林瑞超研究员当选为法国国家药学院外籍院士

2008 年 11 月 5 日,在法国召开的法国国家药学院会议上,中国药品生物制品检定所中药室主任、本刊编委林瑞超研究员,当选为法国国家药学院通讯院士(外籍院士)。

林瑞超 1978 年毕业于北京中医药大学;1985 年由国家教育部派往法国巴黎第五大学攻读博士学位;1989 年获得博士学位后,在该校及法国国家科学中心(科学院)进行了两期博士后研究工作;1991 年被法国教育部正式录用为公务员并聘用为副教授,并任教于法国第戎大学;1994 年获法国第戎大学“指导研究资格文凭”,具应聘教授和指导博士生资格;1997 年被原国家人事部批准为“回国定居专家”回国工作,并被聘任为中国药品生物制品检定所中药室主任。

林瑞超研究员回国后,主要从事中草药有效成分、中药化学标准物质、中药质量控制和标准、天然产物化学等研究。他先后承担并负责完成了多项国家科技部、教育部、国家中医药管理局和国家“九五”、“十五”科技攻关或重大课题,并多次获得北京市科学技术奖、中华中医药科学技术奖等奖项。

林瑞超研究员在国内外学术杂志发表论文 190 余篇;培养了博士、硕士生数十名;作为世界卫生组织、香港卫生署的专家或顾问,积极参与了其有关政策和学术指南的制定;先后被聘为《药物分析杂志》等多家专业杂志的编委。

林瑞超研究员现为中药学专业博士生导师,兼任中山大学、西北大学、沈阳药科大学等校的客座教授或兼职教授、世界卫生组织传统医学专家、北京市政府顾问及国家药典委员会委员、世界卫生组织(亚太区)植物药协调论坛常设委员会委员,同时参与国家食品药品监督管理局与法国卫生产品安全局的交流合作。

详情请访问: nicpbp.org.cn