

图 1 利培酮与降解产物分离图谱

Fig 1 Separation of risperidone from its degraded products

2.9 溶出曲线的测定及参数提取

取批号分别为 20011012, 20011013, 20011014 的 3 批国产样品和一批进口样品,照中国药典 2000 年版二部附录 C 溶出度测定法第一法,以盐酸溶液 500mL 为溶出介质,转速为 $50\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,依法操作,于 5, 10, 20, 30, 45, 60min 取样 5mL,滤过,及时补充相同体积的溶出介质,取续滤液 20 μL

进行测定;另精密称取经 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的利培酮对照品约 10mg,精密称定,置 100mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取适量,加盐酸溶液制成含利培酮 $2\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,同法测定。按外标法以峰面积计算出不同时间的累积溶出百分率数据,并对数据进行单指数模型拟合,提取溶出参数,结果见表 1。

表 1 三批利培酮国产片与 1 批进口片累积溶出百分率及溶出参数

Tab 1 Cultivated dissolution of three batches of risperidone domestic tablets and imported tablets and dissolution parameters

	不同时间 (min) 累积溶出百分率 (%)						溶出参数	
	5	10	20	30	45	60	t_{50} (min)	t_d (min)
20011012	34.7 \pm 1.0	72.5 \pm 1.2	90.3 \pm 0.6	96.6 \pm 0.6	97.8 \pm 1.8	98.2 \pm 0.4	5.9 \pm 1.5	8.5 \pm 2.1
20011013	40.2 \pm 1.0	74.0 \pm 4.7	91.4 \pm 2.4	95.8 \pm 1.1	96.9 \pm 1.0	98.1 \pm 0.0	5.6 \pm 1.0	8.0 \pm 1.4
20011014	38.1 \pm 9.2	70.7 \pm 12.2	90.2 \pm 7.1	97.4 \pm 2.3	98.6 \pm 1.4	99.2 \pm 1.7	5.6 \pm 1.5	8.1 \pm 2.2
进口片	57.6 \pm 6.9	79.3 \pm 5.2	90.6 \pm 4.1	93.4 \pm 2.8	95.9 \pm 2.8	97.3 \pm 1.8	5.6 \pm 0.6	8.1 \pm 0.9

经统计分析,国产片与进口片的溶出曲线无明显差异,溶出参数无显著性差异 ($P < 0.05$)。

量小 (1mg) 的利培酮片的溶出度测定。同时方法简便易行,结果准确,重现性好,适合于利培酮片的质量控制。

3 讨论

采用的 HPLC 外标法,专属性强、灵敏度高,适用于含药

收稿日期: 2003-06-03

高效液相色谱法测定盐酸米诺环素的含量及有关物质

高燕霞¹, 刘铁钢¹, 牛长群² (1. 河北省药品检验所, 石家庄 050011; 2. 华北制药集团新药研究开发中心, 石家庄 050015)

摘要:目的 本文建立了盐酸米诺环素含量及有关物质的 HPLC 测定方法,并同时考察了全国数批盐酸米诺环素原料的含量及有关物质。方法 使用 C_{18} 柱,以 0.2mol/L 醋酸铵-N,N-二甲基甲酰胺-四氢呋喃 (600:398:2, 内含 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠) 为流动相,检测波长为 280nm。结果 盐酸米诺环素的线性范围为 0.1 mg/ml ~ 2.0 mg/ml, r 为 0.9999,盐酸米诺环素的平均加样回收率为 100.7%, RSD 为 0.5% ($n=9$)。结论 方法准确、灵敏度高,本方法可有效地控制药品质量。

关键词: 盐酸米诺环素; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R512.62

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2006) 01-0064-04

Determination and Related Substances of Minocycline Hydrochloride by HPLC

GAO Yan-xia¹, LU Tie-gang¹, NIU Chang-qun² (1. The Institute for Drug Control of HeBei Province, Shijiazhuang, 050011; 2. R&D Drug Centre, North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang, 050015)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of Minocycline Hydrochloride by HPLC. And we inspected the assay and relative substances of many batches of Minocycline Hydrochloride in the country. **METHODS** An C_8 column was used. The mobile phase was 0.2mol/L ammonium acetate-dimethylformamide-tetrahydrofuran (600:398:2, including 0.01mol/L disodium edetate), The wavelength of UV detector was 280nm. **RESULTS** The average recovery of Minocycline Hydrochloride was 100.7% (RSD = 0.5%, $n=9$). **CONCLUSION** The method was convenient and accurate. As the same time, the method can intendant and control the related substance in production.

KEY WORDS: Minocycline Hydrochloride; Relative Substances; HPLC

盐酸米诺环素 (minocycline hydrochloride) 又名二甲胺四环素是七十年代初开发的化学半合成四环素类抗生素, 其抗菌谱与四环素类抗生素相似, 主要用于衣原体、支原体、立克次体引起的感染, 其抗菌作用强度比其他四环素类抗生素强, 本品与四环素间有交叉耐药性。由于它具有较广的抗菌谱、较高的脂溶性, 在许多抗生素难以透入的组织 and 体液中, 均可达到较高的浓度, 并能维持较长的时间, 而且口服效果良好, 因此, 盐酸米诺环素是目前临床使用最广泛的一种四环素类抗生素。本文所采用的流动相系统, 对盐酸米诺环素及有关物质实行了很好的分离。实验结果表明, 该方法准确、可靠、灵敏度高, 可同时检测有关物质。本方法将收载到中国药典 2005 年版二部。

1 材料和方法

1.1 试剂及样品

盐酸米诺环素暂行对照品^[1], 含量: 84.6%; 盐酸米诺环素原料为国内药厂产品。

醋酸铵、乙二胺四乙酸二钠、二甲基甲酰胺、四氢呋喃均为国产分析纯。

1.2 仪器及实验条件

Waters 系列高效液相色谱仪 (515 泵, 2487 紫外检测器, 717 自动进样器, 大连依利特色谱工作站)。

流动相: 0.2mol/L 醋酸铵-N,N-二甲基甲酰胺-四氢呋喃 (600:398:2, 内含 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠); 检测波长: 280nm; 进样量: 10 μ l

表 1 各国药典方法比较

Tab 1 The comparison of pharmacopoeia

药典名称	本方法	局颁方法	USP25 版	BP2002 版	日抗基 2000 版
色谱柱	C_8	C_8	C_8	$C_8, 5\mu, 20 \times 4.6$	C_8
流动相	0.2mol/L 醋酸铵、二甲基甲酰胺及 0.01mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 不调 pH	0.2mol/L 草酸铵、二甲基甲酰胺及 0.1mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 调 pH 6.2~6.5	0.2mol/L 草酸铵、二甲基甲酰胺及 0.1mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 调 pH 6.2~6.5	0.2mol/L 草酸铵、二甲基甲酰胺及 0.1mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 调 pH 7.0	0.2mol/L 草酸铵、二甲基甲酰胺及 0.1mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 调 pH 6.2
流速	1.0ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min
检测波长	280nm	280nm	280nm	280nm	280nm
分离度 R	>2.5	>2	>2	>2	>2
理论板数	>3000			>3000	
拖尾因子	0.9~1.35	0.9~1.35	0.9~1.35		
相对偏差	<2.0	<2.0	<2.0	<1.5	<2.0

2.2.1 差向米诺环素的制备: 取样品适量溶于水中, 制成每 1ml 含 2 μ g 米诺环素的溶液, 吸取 5ml 转移到 25ml 容量瓶

中,水浴(100)60min,冷却,用水定容,摇匀即得。

2.2.2 实验表明:在所试验的6种色谱柱上,理论塔板数均达到3000以上;差向米诺环素和米诺环素的分离度R均大于2.5,拖尾因子T均在0.9~1.35之间,重复进样的相对标准偏差均小于2%,根据上述系统适用性的结果,制订本标准的分离度R为2.5,拖尾因子为0.9~1.35,其理由为一杂质的出峰时间恰好在主峰和4差向米诺环素峰之间,分离度只有达到2.5,才能将该杂质分离开。

2.3 方法的专属性考察

将样品在酸、碱、氧化、高温、高湿及强光下进行破坏,并将处理好的溶液按上述液相色谱条件测定,发现加速破坏所产生的杂质峰与主峰均得到基线分离。

2.4 线性范围与灵敏度

精密称取盐酸米诺环素对照品适量,加水配制成浓度分别为0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 mg/ml溶液,按上述色谱条件测定,结果:盐酸米诺环素在0.1 mg/ml~2.0 mg/ml的浓度间有良好的线性关系, r 为0.9999。

2.5 回收率试验

精密称取盐酸米诺环素对照品及盐酸米诺环素原料供试品,加水配制成浓度为含米诺环素0.4、0.5、0.6 mg/ml的溶液,在选定的色谱条件下测定,测得回收率结果为平均加样回收率为100.7%,RSD为0.5% ($n=9$)。

由测定结果可见:在上述三种浓度下的回收率都比较高,说明该方法的准确度高。

2.6 中间精密度

在不同日期、不同分析人员及不同设备,对同一批样品进行测试,结果样品均值为84.4%,RSD%为0.5%。

2.7 检测限和定量限

根据ICH对检测限和定量限的定义:DL=3.3 σ /S, QL=10 σ /S,并采用校正曲线求得响应值的标准差 σ 和校正曲线的斜率S,测得检测限和定量限分别为0.9 ng和3.0 ng。

2.8 耐用性

2.8.1 流动相的组成对系统适用性的影响

通过试验,发现0.2 mol/L醋酸铵溶液比例增加,使柱效降低;EDTA浓度增加,使柱效增高。

2.8.2 不同厂家色谱柱对系统适用性的影响

考察了不同厂家、不同填料的6种色谱柱,发现从分离度、理论板数以及拖尾因子考虑,以大连化物所, Kromasil C₈柱为最适用于本品的色谱柱。

2.8.3 结论

通过各种因素对系统适用性影响的考察结果表明:小幅度测试条件的变化,该色谱系统还能通过所制订的系统适用性试验,说明本方法的耐用性较好,对测试条件的要求不苛刻。

2.9 溶液的稳定性

将一样品的溶液,在0、1、2、3、4、5、6、7、8、9h分别进样,考察溶液的稳定性。结果表明:在室温(20)情况下,溶液放置9h,其主峰面积变化较小;但随着放置时间,差向米诺

环素的量逐渐增加,在3h内差向米诺环素的量基本没有变化,因此,配制的溶液在3h内稳定,所配制的溶液应在3h内使用。

2.10 样品测定

按上述供试品溶液制备方法制得样品溶液,依法测定,计算,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(%)

批号	010701	010702	020401	020601	020602	020603
本方法含量(%)	93.30	93.53	91.42	91.80	93.61	93.65
局颁方法含量(%)	93.21	93.16	91.50	91.74	93.25	93.77

2.11 有关物质

2.11.1 可能的有关物质种类

根据我国现有的生产工艺,在成品的盐酸米诺环素原料中,可能会有反应初始物为去甲基金霉素,反应的中间体有4种,分别为6去甲四环素、6去甲-6去氧四环素、11a-氯-6去甲-6去氧四环素、7-氨基-6去甲-6去氧四环素(ADMDOTC);反应副产物主要为9-异构米诺环素。另外由于米诺环素的5位没有羟基,不能和二甲胺基形成氢键,所以盐酸米诺环素中降解物4差向米诺环素为主要杂质。

2.11.2 方法的专属性考察

起始物及中间体样品溶液的制备:取去甲金霉素、6去甲四环素(DMTC)、6去甲-6去氧四环素(DMDOTC)、11a-氯-6去甲-6去氧四环素(11a-CHDMDOTC)及7-氨基-6去甲-6去氧四环素(ADMDOTC)适量,用乙醇溶解后备用。

将配制好的溶液按上述液相色谱条件测定,发现起始物及中间体与主峰均得到基线分离。

2.11.3 方法制定

实际样品检查结果表明,降解物4差向米诺环素为主要杂质,其量在0.5~1.0%范围内,反应初始物、反应副产物以及其它降解物单个的含量相对较少,其总和也只是在2.0%以内。因此,我们参照国家药品监督管理局国家药品标准中有关物质的检查方法,配制每1ml中含米诺环素0.5mg的溶

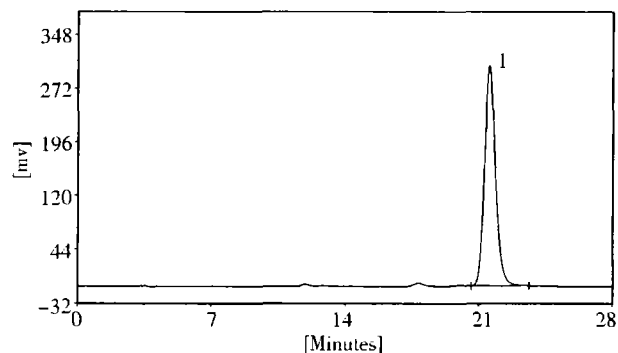


图1 盐酸米诺环素色谱图

Fig 1 The chromatogram of M inocycline Hydrochloride

1. 盐酸米诺环素峰

1. M inocycline Hydrochloride

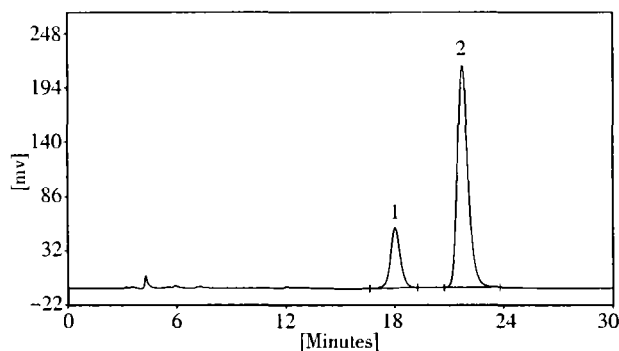


图 2 盐酸米诺环素分离色谱图

Fig 2 The chromatogram of the resolution of Minocycline Hydrochloride

1. 差向米诺环素峰 2 盐酸米诺环素峰

1. 4-ep in inocycline 2 Minocycline Hydrochloride

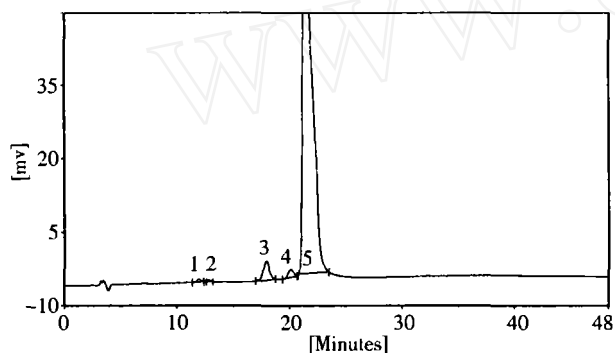


图 3 有关物质色谱图

Fig 3 The chromatogram of related substance

1, 2, 4: 杂质峰 3: 差向米诺环素峰 5: 盐酸米诺环素峰

1. impurity peak 2. 4-ep in inocycline 3. Minocycline Hydrochloride

液作为供试品溶液;精密量取适量,加水稀释成每 1ml 中含米诺环素 10 μ g 的溶液,作为对照溶液。照含量测定项下的方法试验,供试品中差向米诺环素峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.6 倍 (1.2%),其他任一杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积的 0.6 倍 (1.2%),其他杂质峰面积的和不得大于对照溶液的主峰面积 (2.0%)。

2.11.4 标准曲线及线性范围

精密称取盐酸米诺环素峰对照品适量,配制浓度分别为 10, 0.5, 0.2, 5, 1, 0, 0.5 μ g/ml 溶液,按上述色谱条件测定,结果在 0.05% ~ 2.0% 的浓度间有良好的线性关系, $r = 0.9972$ 。

2.11.5 中间精密度见 2.5

2.11.6 检测限和定量限见 2.6

测得检测限和定量限分别为 0.02% 和 0.06%。

2.11.7 溶液的稳定性见 2.8

2.11.8 样品测定

按上述供试品溶液制备方法制得样品溶液,依法测定,计算,结果见表 3。

表 3 有关物质方法结果比较

Tab 3 Result of determination of relate substance

	本方法局 颁方法差 向米诺环 素 (%)	其他任 一最大 杂质峰 (%)	其他杂 质峰面 积总和 (%)	差向米 诺环素 (%)	其他任 一最大 杂质峰 (%)	其他杂 质峰面 积总和 (%)
010701	1.05	0.19	0.70	0.76	0.22	1.02
010702	1.07	0.22	0.66	0.79	0.28	0.98
020401	1.13	0.23	0.67	0.89	0.25	1.18
020601	1.15	0.25	0.48	0.96	0.29	1.26
020602	1.02	0.19	0.55	0.68	0.24	0.99
020603	1.03	0.21	0.52	0.75	0.25	1.03

3 讨论

3.1 盐酸米诺环素的合成路线较多,成品中会含有反应初始物、反应中间体、降解物等多种杂质,作为一种定量分析方法,必须将所有杂质与主成分分离,这样才能保证结果的准确性。本方法可同时含量和有关物质进行测定,方法成熟、完善,具有较高的专属性。

3.2 通过试验,建立的本方法,不仅可以增加米诺环素与降解物的分离效果,更为重要的是,该方法能将降解物与米诺环素之间的杂质分离出来(其他标准均未做到),这样大大提高了作为标准的严谨性。

3.3 原局颁标准中流动相中盐浓度过大,在温度偏低时易析出而损坏色谱柱。本方法经过试验,采用对水溶解性较强的盐,并降低了盐浓度,使本方法具有更好的适用性。

通过对盐酸米诺环素方法的研究,不仅可以进一步提高产品质量标准,同时对盐酸米诺环素的生产过程进行质量监控,对提高产品的质量、产品的安全性及稳定性有重大意义。还使其与国际产品同步,为打开国际市场创造了先决条件,将来可为国家创造更好的经济效益和社会效益。

参考文献

- [1] 高燕霞. 盐酸米诺环素首批暂行对照品的制备和标定 [J]. 中国药业, 2002, 11 (1): 69-70.
- [2] WS-293(X-267)-2001. 盐酸米诺环素局颁标准 (试行) [S].
- [3] The United States Pharmacopoeial Convention Inc. The United States Pharmacopoeia [M]. Published by the Board of Trustees, 2002: 1158.
- [4] Office of the British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2002 [M]. Published on the recommendation of the Medicines Commission, 2002: 1169.
- [5] 日本抗生物质学术协议会. 抗菌性物质医药品 ハンドブック 2000 [M]. 株式会社 じほう, 2000: -240.

收稿日期: 2004-12-30