

· 药物分析 ·

反相高效液相色谱法定量分析二甲胺四环素

陈桂良* 陈从恒 (上海市药品检验所, 上海 200233)

蒋建兰 (上海市环境保护科学研究所, 上海 200233)

摘要 利用反相高效液相色谱法测定二甲胺四环素含量, 该法使用 200×5 mm 内径的色谱柱, 内装 YWG- $C_{18}H_{37}$, 柱温 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 流动相为 0.002 mol/L EDTA- Na_2 溶液(用草酸调节 pH 3.0 ± 0.1): 甲醇: 乙腈(3:1:1 V/V/V), 流速为 1 ml/min, 紫外检测波长为 280 nm, 测定了15批国内外厂家生产的二甲胺四环素胶囊的含量, 结果与用美国药典(22版)法所测结果一致。

关键词 二甲胺四环素 反相高效液相色谱法

二甲胺四环素(Minocycline, 简称 Mino)为四环素类药物中应用最广的药物之一^[1], 其含量分析, 各国药典均采用微生物测定法和 HPLC 法, 微生物测定法^[2]分析周期较长, 方法的准确度不高, 且在测定条件下(温度 $36-37^\circ\text{C}$, 培养时间 $16-18$ h)有可能发生差向异构化而使结果产生误差; 目前使用较多的为 HPLC 法^[3], 其色谱条件为: C_{18} 柱; 流动相, 0.2 mol/L 草酸铵: 二甲基甲酰胺: 0.1 mol/L EDTA- Na_2 (5.5:2.5:2)(用 0.4 mol/L 氢氧化四丁铵调节 pH $6.2-7.0$), 缓冲液中盐浓度高, 在分析过程中常析出盐份而堵塞系统流路, 并损伤色谱柱, 中断分析过程; 本文用甲醇—乙腈— 0.002 mol/L EDTA- Na_2 溶液为流动相, C_{18} 柱为固定相, 建立了二甲胺四环素定量分析的 HPLC 法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津 LC-6A), 紫外吸收检测器(SPD-6AV), 数据色谱处理机(岛津 C-R4A), K_{501} 六通进样阀和 $10 \mu\text{l}$ 定量管(上海分析仪器厂)。

二甲胺四环素标准品(LEDERLE LAB DIV, 13035B-134-100), 二甲胺四环素胶囊(分别为美国 LEADERLE 和上海美优制药厂产品,

本所留样); 甲醇、乙腈均为光学纯, 草酸、EDTA- Na_2 均为分析纯, 所有用水均为蒸馏水。

表二甲胺四环素^[5]; 二甲胺四环素标准品在浓盐酸中水浴加热 30 min, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.0 , 用乙醚提取, 吹干乙醚即得。

2 色谱条件和色谱图

色谱柱为 200×5 mm(i.d.), 内装 YWG- $C_{18}H_{37}$, 柱温 $25^\circ \pm 0.5^\circ\text{C}$, 流动相为 0.002 mol/L EDTA- Na_2 溶液(用草酸调节 pH 3.0 ± 0.1): 甲醇: 乙腈(3:1:1 V/V/V), 流速 1 ml/min, 检测波长为 280 nm。在此色谱条件下, 进样 mino 标准品及表二甲胺四环素的流动相溶液, 得色谱图如图 1 a; 按美国药典22版色谱条件, 进样, 得色谱图 1 b。

3 线性范围与回归方程

使用流动相, 分别配制 50 、 100 、 200 、 300 、 400 和 $500 \mu\text{g/ml}$ 的 mino 标准溶液, 用积分峰面积 $A \times 10^{-6}$ 作 Y 项, mino 浓度作 x 项, 回归, 其方程为:

$$Y = 0.0215x + 0.830, \quad r = 0.9992 \quad (n = 5)$$

4 专一性

用流动相配制 $150 \mu\text{g/ml}$ 的 mino 溶液, $100 \mu\text{g/ml}$ 的表二甲胺四环素溶液, 进样, 数据处理

* 陈桂良, 男, 29岁。1990年上海医科大学药剂专业硕士研究生毕业, 主管药师。

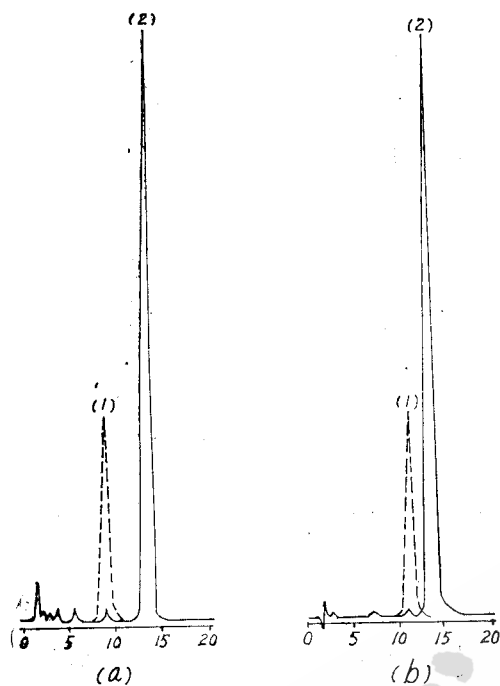


Fig 1. Chromatograms of (1) Mino, (2) Epi-minocycline, obtained from (a) this method, (b) USP XXII method.

机参数最小面积 $MA=500$, 斜率 $PT=70$, 色谱系统能检出 8 个峰, 其中主峰 (mino) $R_t=13.06$ min, 主要杂质峰 (表二甲胺四环素) $R_t=9.96$ min, 其余峰的 R_t 都小于 8 min, 用流动相配制四环素、土霉素、金霉素、强力霉素的适应浓度溶液, 在本色谱条件下进样, 其保留时间见 Tab. 1。

Tab 1. Retention time of some Tetracyclines in the same liquid chromatographic condition

Drugs	Rt(min)
Minocycline	13.06
Doxycycline	10.32
Tetracycline	8.74
Oxytetracycline	6.23
Chlorotetracycline	5.70

5 样品的测定(外标法)

精密称取一定量 mino 标准品, 配成 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的流动相溶液, 进样, 求出响应因子; 取整粒 mino 胶囊, 用水溶解后, 过滤, 滤液用流动相稀释至 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 左右, 进样, 根据响应因子求其标示量, 结果见 Tab. 2。

Tab 2. Determination results of mino capsule in 15 batches sample (Percent of the labeled amount)

No.	Lot.	Content (%)	
		This method (n = 5)	USP xxII method (n = 2)
1	326-443	106.2 ± 1.02	107.4
2	331-304	95.3 ± 1.39	95.0
3	331-443	102.4 ± 0.67	102.3
4	334-370	104.2 ± 0.89	105.3
5	334-486	107.5 ± 0.23	107.4
6	338-321	106.4 ± 0.54	106.8
7	334-409	104.2 ± 0.40	104.0
8	348-365	103.1 ± 0.53	103.5
9	344-454	102.9 ± 1.00	102.9
10	348-365	99.8 ± 0.72	100.8
11	342-456	104.8 ± 0.89	104.6
12	348-358	103.4 ± 0.90	104.0
13	911101	99.8 ± 1.45	96.9
14	911102	98.8 ± 1.05	98.8
15	911103	101.9 ± 1.11	102.8

6 讨论

6.1 流动相的选择

四环素类药物极易与金属离子络合, 形成附着于烷基反相键合柱上的螯合物^[4], 故流动相中水相使用 EDTA 溶液; 在 pH 值较大时, mino 色谱峰保留时间较大, 峰形较宽, 精密度将降低, 原因在于 mino 在 pH 5~7 时, 具有极高的亲脂性^[7], 分别用硫酸、磷酸、草酸调节流动相中 EDTA- Na_2 溶液的 pH 值, 发现 pH 为 3.0 时, mino 色谱峰的 R_t 值、对称性及与表二甲胺四环素的分离情况最为理想, 其中用草酸调节 pH 值时, 色谱峰特别尖锐, 所形成的色谱峰与美国药典 22 版得到的明显相似, 使用本文流动相不仅使主峰与表二甲胺四环素峰的分离度更为理想, (明显优于美国药典 22 版法), 而且使 mino 峰与金霉素峰的分离度达到 4.62。

(美国药典要求其 $R > 3.0$)。

6.2 本法能将 mino 的异构体表二甲胺四环素从 mino 峰中分离出来,其分离度大于美国药典 22 版法;同时,测定了十五批国内外厂家生产的 mino 胶囊,结果与美国药典 22 版法一致;本法不仅解决了美国药典法存在的缓冲液中盐浓度高的问题,而且由于用甲醇、乙腈代替了二甲基甲酰胺(DMF)(易透皮吸收而产生呼吸道毒性),减少了毒性,降低了成本。

致谢: 本文承陈执中教授指导,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Hlavka J.J. and Boothe J. H. The Tetracyclines, Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 78, 1985. Springer-Ver-

log Berlin Heidelberg New York Tokyo. 393.

- 2 日本抗生物质医药品基准1992, 367.
- 3 USP XXII, 1990, 900.
- 4 Oka H, Ikai Y, Kawamura N, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics, X, Determination of eight tetracyclines using thin-layer and high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1987, 393, 285—296.
- 5 Weng N., Thuranira J, Vermeulen K, et al. Quantitative analysis of minocycline by liquid chromatography on Poly(styrene-divinylbenzene). J Liq Chromatogr, 1992, 15(14): 2529—2549.
- 6 同1, P 234.

收稿日期: 1993—06—18

Quantitative Analysis of Minocycline with RP-HPLC

Chen Guiliang, Chen Congheng

(Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai 200233)

Jiang Jianlan

(Shanghai Research Institute of Environmental Protection, Shanghai 200233)

Abstract A RP-HPLC method was established for analysing minocycline. The HPLC conditions were: 200×5 mm ID column containing YWG-C18H37, held at $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, mobile phase of 0.002 mol/L EDTA- Na_2 buffer solution (adjust $\text{pH} = 3.0 \pm 0.1$ with oxalic acid): methanol: acetonitrile (3:1:1 v/v/v) at a flow rate of 1 ml/min, the column effluent monitored at 280 nm. Fifteen batches of minocycline capsules produced in domestic and foreign pharmaceutical factories were determined, and the results were the same as those obtained by USPXXII method.

Key words Minocycline RP-HPLC