

高效液相色谱法同时测定复方盐酸林可霉素凝胶中尿囊素和林可霉素的含量

黄巧玲¹, 陈理² (1. 杭州市第三人民医院, 杭州 310009; 2. 杭州市药品检验所, 杭州 310017)

摘要:目的 建立复方盐酸林可霉素凝胶中尿囊素和林可霉素的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Zorbax Sax (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (40:60), 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 20℃, 检测波长为 214 nm。结果 尿囊素和林可霉素浓度分别在 7.87 ~ 78.72 mg·L⁻¹ 和 12.63 ~ 88.41 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, *r* 分别为 0.999 9 和 0.999 2; 平均回收率分别为 101.7%, 97.5%, RSD 分别为 1.68%, 1.65% (*n* = 9)。结论 该方法操作简便、快速、准确, 可用于同时测定复方盐酸林可霉素凝胶中尿囊素和林可霉素的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 尿囊素; 林可霉素; 复方盐酸林可霉素凝胶

中图分类号: R917.101; R978.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)06-0507-03

Simultaneous Determination of Allantoin and Lincomycin in Compound Lincomycin Hydrochloride Gel by HPLC

HUANG Qiao-ling¹, CHEN Li² (1. The Third Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009, China; 2. Institute for Drug Control of Hangzhou, Hangzhou 310017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for the determination of allantoin and lincomycin in Compound Lincomycin Hydrochloride Gel. **METHODS** A high-performance liquid chromatography method was used with a Zorbax Sax (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile-water (40:60), the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, with temperature at 20℃ and detection wavelength at 214 nm. **RESULTS** A good linearity was obtained by Allantoin and Lincomycin in the range of 7.87 ~ 78.72 mg·L⁻¹ and 12.63 ~ 88.41 mg·L⁻¹, *r* = 0.999 9 and 0.999 2, respectively. While the average recovery rate were 101.7% and 97.5%, RSD = 1.68%, 1.65% (*n* = 9). **CONCLUSION** This method is simple, rapid, accurate and suitable for the simultaneous determination of allantoin and lincomycin in Compound Lincomycin Hydrochloride gel.

KEY WORDS: HPLC; allantoin; lincomycin; compound lincomycin hydrochloride gel

复方盐酸林可霉素凝胶是我院皮肤科外用制剂,尿囊素和盐酸林可霉素为其主要成分,其中尿囊素具有促进皮肤细胞组织生长,促进伤口愈合及镇痛作用^[1]。盐酸林可霉素对大多数革兰阳性菌和某些厌氧的革兰阴性菌有抗菌作用^[2]。临床主要用于痤疮、脂溢性皮炎、酒糟鼻和细菌性皮肤病的治疗。本制剂原质量标准中只有盐酸林可霉素的含量测定,对另一有效成分尿囊素尚未建立含量测定方法。本实验参考相关文献^[1,3-5]采用高效液相色谱法,通过摸索测试参数和条件,建立了可同时测定复方盐酸林可霉素凝胶中2组分的含量,并进行了方法学研究,回收率高,精密度好。

1 仪器与试剂

HP1100高效液相色谱仪及其化学工作站(美国Agilent公司);尿囊素对照品(中国生物制品检验所,编号:100431-200401),林可霉素对照品(中国生物制品检验所,编号:130432-20407);复方盐酸林可霉素凝胶(批号:0611101,0611102,0611103 杭州市第三人民医院制剂室制备);空白基质(杭州市第三人民医院制剂室制备);乙腈(色谱纯);水(蒸馏水)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

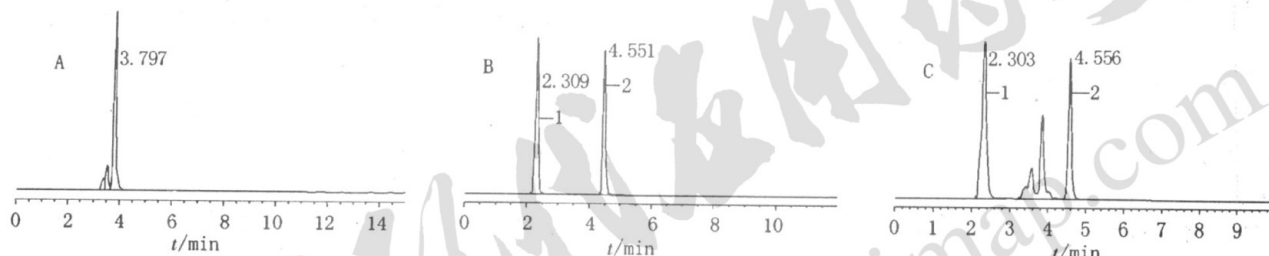


图1 HPLC 色谱图

A. 空白样品; B. 对照品; C. 样品; 1. 尿囊素; 2. 林可霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank sample; B. reference substance; C. sample; 1. allantoin; 2. lincmycin

2.4 线性关系考察

精密量取对照品贮备液 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL, 分置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。分别取 20 μ L 注入液相色谱仪, 以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 得尿囊素回归方程为: $A = 20\,747C + 9\,164$, $r = 0.999\,9$, 林可霉素的回归方程为: $A = 6\,106\,8C + 15\,9$, $r = 0.999\,2$ 。结果表明尿囊素在 7.87~78.72 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 林可霉素在 12.63~88.41 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.5 精密度实验

精密吸取“2.4”项下对照品溶液 20 μ L, 连续进样 6 次, 以尿囊素峰面积计算 RSD 为 0.73% ($n = 6$), 以林可霉素峰面积计算 RSD 为 0.92% ($n = 6$), 表明精密度良好。

2.6 溶液稳定性实验

精密量取“2.4”项下对照品溶液, 分别于 0.1, 2, 3, 4, 5, 6 h 进行测定, 以尿囊素峰面积计算 RSD 为 1.05%, 以林可霉素峰面积计算 RSD 为 0.98%。表明本品溶液在 6 h 内基本稳定。

2.1.1 对照品贮备液的配制 精密称取尿囊素 262.4 mg 和林可霉素对照品 252.6 mg 同置 100 mL 量瓶中, 加水适量使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。

2.1.2 供试品溶液的配制 取样品约 0.75 g 精密称定, 用蒸馏水适量完全转移入 100 mL 量瓶中, 超声 10 min, 再置 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中不断振摇 10 min, 冷却至室温, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 空白基质溶液的配制 取空白基质适量, 精密称定, 按“2.1.2”方法制成空白对照溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Zorbax Sax (强阴离子交换柱) (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (40:60); 流速: 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 20 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 214 nm; 进样量: 20 μ L。

2.3 方法的专属性考察

分别精密吸取供试品溶液、空白基质溶液及“2.4”项下对照品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定结果见图 1, 结果显示, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的色谱峰, 空白基质溶液在相应的位置上无干扰色谱峰, 说明空白基质对测定结果无干扰。

2.7 重复性实验

分别精密称取同一批号样品(批号: 0611102) 6 份, 按“2.9”项下方法测定。结果尿囊素 RSD 为 1.36% ($n = 6$), 林可霉素 RSD 为 1.27% ($n = 6$)。

2.8 回收率实验

按本品制剂处方量, 配制高 (120%)、中 (100%)、低 (80%) 浓度模拟样品, 按“2.9”项下方法测定, 每个浓度测定 3 次, 计算回收率, 结果见表 1。尿囊素和林可霉素的平均回收率分别为 101.7%, 97.5%, RSD 分别为 1.68%, 1.65% ($n = 9$)。

2.9 样品的含量测定

取样品约 0.75 g 精密称定, 用蒸馏水适量完全转移入 100 mL 量瓶中, 超声 10 min, 再置 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中不断振摇 10 min, 冷却至室温, 加蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 滤膜过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。另取尿囊素对照品和林可霉素对照品各适量, 用水溶解并定量稀释成每毫升中含尿囊素 15 μ g 林可霉素 82 μ g 的溶液作为对照品溶液, 取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ L 进样, 按外标法以峰面积计

算,结果见表 2。

表 1 回收率试验结果 (n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)					
化学成分	加入量	测得量	回收率	平均	RSD
	/mg	/mg	/%	回收率 /%	/%
尿囊素	1.61	1.67	103.8	101.7	1.68
	1.61	1.68	104.2		
	1.61	1.66	103.4		
	2.12	2.15	101.2		
	2.12	2.13	100.6		
	2.12	2.11	99.5		
	2.44	2.48	101.7		
	2.44	2.46	100.8		
	2.44	2.44	100.1		
林可霉素	8.89	8.84	99.4	97.50	1.65
	8.89	8.81	99.1		
	8.89	8.85	99.6		
	11.1	10.67	96.1		
	11.1	10.58	95.3		
	11.1	10.64	95.9		
	13.22	12.94	97.9		
	13.22	12.81	96.9		
	13.22	11.84	97.1		

表 2 样品含量测定结果 (n=3)

Tab 2 Determination results of samples (n=3)				
批号	尿囊素		林可霉素	
	含量 /%	RSD /%	含量 /%	RSD /%
0611101	97.9	0.56	98.8	0.48
0611102	96.9	0.32	98.0	0.20
0611103	96.4	0.40	97.8	0.38

3 讨论

3.1 检测波长的确定

对尿囊素紫外光谱图进行分析后发现尿囊素在 204 ~ 216 nm 都有吸收,查阅相关文献^[3],林可霉素在 214 nm 处吸收较好,为使两组分有较接近的吸收度值,而且又在最大吸收附近,故而确定 214 nm 为检测波长。

3.2 色谱柱的选择

用 Hypersil ODS(4.6 mm×100 mm,5 μm),尿囊素保留时间较短,在 1 min 左右,这一时间段杂质峰溶剂峰较多,易

受干扰,故此柱子不适合分离此样品。

选用 Zorbax Carbohydrate(4.6 mm×250 mm,5 μm),发现尿囊素的保留时间在 13 min 左右,但过几天重做时发现保留间缩短为 6 min 左右,怀疑柱子受到破坏。

选用 Zorbax Sax(4.6 mm×250mm,5 μm),尿囊素保留时间在 2.2 min 左右,而且两组分峰形都较好,分离度达到要求。

3.3 流动相的选择

用 Zorbax Sax(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,先考察乙腈-0.01%磷酸二氢钠,当乙腈-0.01%磷酸二氢钠(40:60)时尿囊素和林可霉素的保留时间和峰形都较理想;后考察乙腈-水,发现当乙腈-水(40:60)时尿囊素和林可霉素的保留时间和峰形也较理想,由于流动相中含盐越少,越有利于延长色谱柱寿命^[6],故选用不含盐的乙腈-水(40:60)作为流动相。

3.4 复方盐酸林可霉素凝胶中主要成分是尿囊素和盐酸林可霉素,处方中盐酸林可霉素是按林可霉素计的,故本实验选择直接测定林可霉素的含量。

REFERENCES

[1] LI H J, XUE Z R. Research on synthesis of allantoin[J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2004, 33(3): 10-11.

[2] CHEN X Q, JIN Y Y, TANG G. New edition of pharmacognosy(新编药物学) [M]. 15 th. ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 95.

[3] Ch. P(2005) VolIII (中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005: 531.

[4] SHINGFIELD K J, OFFER N W. Determination of allantoin in bovine milk by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1998, 706: 342-346.

[5] GEORGE S K, DIPU M T, MEHRA U R, et al. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine [J]. J Chromatogr B, 2006, 832: 134-137.

[6] PENG J, GE W H, TAN H. S, et al. Simultaneous determination of the contents of oxalate and citrate in human urine by RP-HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(1): 72-74.