

# HPLC-ELSD 测定妥布霉素滴眼液的含量

刘咏梅(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

**摘要:**目的 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测法(HPLC-ELSD)测定妥布霉素滴眼液的含量。方法 选用耐酸性的 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250mm, 5 μm)色谱柱; 流动相为 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 三氟乙酸溶液-甲醇(92:8), 柱温为 35 ℃, 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积为 10 μL; ELSD 检测器漂移管温度为 45 ℃, 雾化气体压力为 3.5 bar, 信号增益(GAIN)为 5。  
**结果** 妥布霉素在 55.6~1396.7 μg·mL<sup>-1</sup> 内, 其峰面积的对数与浓度的对数呈良好的线性关系( $r=0.9997$ ), 检测限和定量限分别为 0.15 μg·mL<sup>-1</sup> 和 0.45 μg·mL<sup>-1</sup>。  
**结论** 方法专属性强, 准确可靠, 适用于妥布霉素滴眼液产品质量控制。  
**关键词:** 妥布霉素; 滴眼液; 含量测定; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器  
**中图分类号:** R917.101      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1007-7693(2009)07-0590-04

## Determination of Tobramycin Eye Drops by HPLC-ELSD

LIU Yongmei(Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To establish an HPLC - ELSD method for the content determination of tobramycin eye drops.  
**METHODS** In this method, the column was Agilent Zorbax SB - C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm); The mobile phase consisted of 0.2 mol·L<sup>-1</sup> trifluoroacetic acid solution-methanol (92 : 8) at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The drift tube temperature was set at 45 ℃, and the pressure of nebulizing gas was 3.5 bar. **RESULTS** The linear range was 55.6-1396.7 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.9997$ ). The limit of detection and quantification was 0.15 μg·mL<sup>-1</sup> and 0.45 μg·mL<sup>-1</sup> respectively. An average recovery of 99.0% with a RSD of 1.05% ( $n=9$ ) was obtained. The precision for content determination of tobramycin was good (RSD = 0.8%,  $n=9$ ).  
**CONCLUSION** The method is simple, accurate and reliable. It is suitable for the routine quality control of tobramycin eye drops preparations.  
**KEY WORDS:** tobramycin; eye drops; content determination; HPLC; ELSD

妥布霉素(tobramycin)是从黑暗链霉菌(*Streptomyces tenebrarius*)发酵液中提取得到的具有广谱抗菌活性的氨基糖苷类抗生素,其含量测定方法主要有微生物效价测定法<sup>[1-3]</sup>、旋光法<sup>[3]</sup>、UV 衍生化法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱-间接光度检测法(HPLC-IPD)<sup>[4]</sup>、HPLC 衍生化法<sup>[5-7]</sup>、HPLC 电化学检测器法<sup>[8]</sup>及 TLC<sup>[3]</sup>,但常用的微生物效价测定法测定误差较大,衍生化法影响因素较多,而电化学检测法使用不易,较难普及。近年来国内外有文献报道采用蒸发光散射检测技术(ELSD)分析氨基糖苷类抗生素<sup>[9-14]</sup>,中国药典 2005 年版也已收载该检测技术和部分相关品种;以 HPLC-ELSD 测定妥

布霉素及其制剂的方法<sup>[15-17]</sup>也陆续见诸报道。本试验建立了 HPLC-ELSD 分析妥布霉素滴眼液中妥布霉素含量的方法,为该技术的进一步推广和应用提供了实验基础。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Dikma SEDEX 75 型 ELSD 检测器(美国安捷伦科技有限公司)。

水为重蒸水;三氟乙酸、甲醇均为色谱纯。妥布霉素标准品(批号:0340-200002,标示含量 880 μg·mg<sup>-1</sup>)由中国药品生物制品检定所提供;妥布霉素原料药 1 批(批号:020501)、硫酸妥布霉素原料药 1 批(批号:021003)及妥布霉素 B 组分杂质对照

作者简介:刘咏梅,女,主管药师 Tel:(0571)86453171 E-mail:lym5008@sina.com

品(无批号)均由浙江海正药业股份有限公司提供;妥布霉素滴眼液样品 5 批,分别为宁波唯森制药有限公司(批号:20050301、20050302、20050303)、杭州易舒特药业有限公司(批号:20041201)及眼力健(杭州)制药有限公司(批号:2H0249)上市或长期留样至今样品,规格均为 5 mL : 15 mg。

## 2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB - C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 三氟乙酸溶液-甲醇(92 : 8); 流速: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; ELSD 漂移管温度: 45 °C; 雾化气体压力: 3.5 bar; 灵敏度(信号增益 GAIN 值): 5; 进样体积: 10 μL。

## 3 方法与结果

### 3.1 强力破坏试验

取妥布霉素原料药 5 份,各约 58 mg,分别置 4 个 50 mL 量瓶中,前 3 份分别加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 冰醋酸溶液 1 mL、1 mol·L<sup>-1</sup> 氨溶液 1 mL 与 3% 过氧化氢溶液 1 mL,第 4 份置 120 °C 恒温箱中放置,第 5 份不作任何破坏。各放置 3 h 后,分别加流动相溶解并稀释至刻度。按“2”项下的色谱条件,取上述各溶液的混合液 10 μL 进样测试,记录色谱图。结果各受试样品中经极端条件破坏后产生的几种较大未知物峰与妥布霉素主组分峰均能良好分离。见图 1。

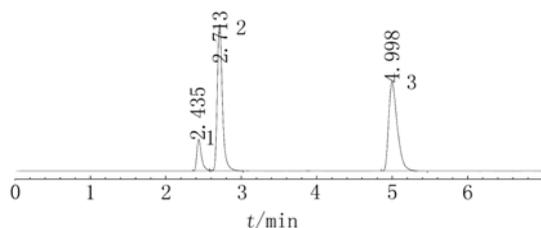


图 1 强力破坏试验的 HPLC-ELSD 图(1.0 mL·min<sup>-1</sup>, GAIN = 6)

1-未知物 1; 2-未知物 2; 3-妥布霉素

Fig 1 The HPLC-ELSD chromatogram of stress test (1.0 mL·min<sup>-1</sup>, GAIN = 6)

1-unknown substance 1; 2-unknown substance 2; 3-tobramycin

### 3.2 系统适用性试验

取妥布霉素原料药和妥布霉素 B 杂质对照品各适量,用流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中含妥布霉素 1 mg 和妥布霉素 B 约 0.05 mg 混合溶液,取 10 μL 进样测试,记录色谱图,结果妥布霉素主组分和妥布霉素 B 组分两峰之间的分离度达 6.54,表明本法建立的色谱条件可以达到系统适用性试验要求。见图 2。

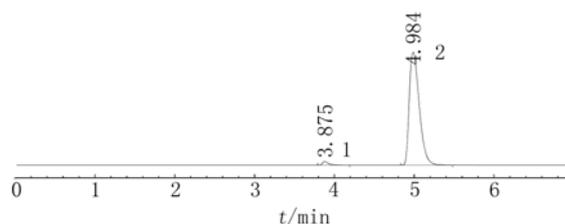


图 2 系统适用性试验的 HPLC-ELSD 图(1.0 mL·min<sup>-1</sup>, GAIN = 6)

1-妥布霉素 B 组分; 2-妥布霉素

Fig 2 The HPLC-ELSD chromatogram of system suitability test (1.0 mL·min<sup>-1</sup>, GAIN = 6)

1-tobramycin B; 2-tobramycin

### 3.3 线性关系试验

取妥布霉素标准品,分别精密称取适量,加流动相溶解并稀释制成 55.546, 111.091, 277.728, 555.456, 777.568, 1 012.000, 1 230.592, 1 396.736 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度的系列溶液,分别进样 10 μL,记录色谱图。以妥布霉素主组分峰面积的常用对数为纵坐标,进样浓度(μg·mL<sup>-1</sup>)的常用对数为横坐标,以最小二乘法进行线性回归,得回归方程为:  $Y = 1.29569 X + 7.61388$ ,  $r = 0.9997$ 。结果表明,妥布霉素浓度在 55.55 ~ 1396.74 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性良好。

### 3.4 灵敏度试验

取“3.3”项下较低浓度的梯度测试溶液 1 份,用流动相逐级稀释,精密量取 10 μL 进样测试,结果测得本法的检测限按信噪比 3 : 1 计算时为 0.15 μg·mL<sup>-1</sup>,定量限按信噪比 10 : 1 计算时为 0.45 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 3.5 稳定性试验

取妥布霉素滴眼液样品 1 批(批号:2H0249),加流动相稀释制成每 1 mL 中含妥布霉素 1 mg 的溶液,于 24 h 内分别在 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样测试。结果妥布霉素主组分峰面积与硫酸根的峰面积的 RSD 分别为 1.4% 和 2.2%,表明样品在 24 h 内稳定。

### 3.6 回收率试验

为考察滴眼液辅料对含量测定方法准确性的影响,按处方制备不含主药的空白基质用于加样回收率测定。

分别以标示规格(15 mg)的 80%、100% 及 120% 精密称取妥布霉素标准品适量,按处方规定加入常量的空白基质,涡旋混匀,即制成模拟的妥布霉素滴眼液,依法测定,按随行标准曲线法计算妥布霉素的加样回收率。结果 3 组 × 3 份试样的回收率依

次为 100.7%、97.5%、99.2%、98.7%、98.2%、99.5%、97.9%、99.1%及 100.1%，平均回收率为 98.99% (RSD=1.05%， $n=9$ )，表明本法具有较好的准确性。

### 3.7 重复性试验

取妥布霉素滴眼液样品一批(批号：20050301)，加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含妥布霉素 1 mg 的溶液，共平行制备 9 份，依法测定，按随行标准曲线法计算样品中妥布霉素的含量。结果该批样品中妥布霉素的平均含量为 103.5%，RSD 为 0.77%，表明本法具有良好的重复性。

### 3.8 样品测定

取妥布霉素滴眼液 5 个批次样品，分别加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含妥布霉素 1 mg 的溶液，依法测定妥布霉素的含量；同时取上述各批样品，照妥布霉素滴眼液现行国家标准制订的微生物效价检定法测定主药妥布霉素的含量。结果见表 1 与图 3。

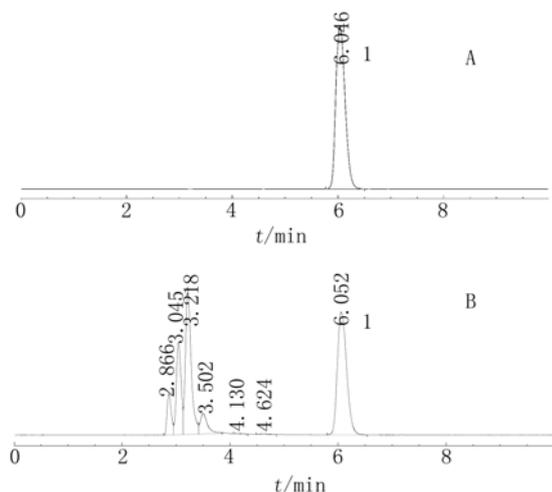


图 3 妥布霉素标准品溶液(A)和供试品溶液(B)的 HPLC-ELSD 图( $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , GAIN = 6)

1-妥布霉素(6.05 min)

Fig 3 The HPLC-ELSD chromatogram of standard preparation (A) and sample(B) ( $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , GAIN = 6)

1-tobramycin (6.05 min)

表 1 妥布霉素滴眼液 HPLC-ELSD 法与微生物检定法含量测定结果的比较( $n=3$ )

Tab 1 Comparison of results of HPLC-ELSD method and antibiotic microbial method( $n=3$ )

生产厂家	批号	随行标准曲线法	微生物检定法
宁波唯森	20050301	103.5%	107.8%
	20050302	104.6%	108.2%
	20050303	103.8%	107.0%
杭州易舒特	20041201	99.0%	101.5%
眼力健杭州	2H0249	96.4%	100.9%

## 4 讨论

### 4.1 ELSD 的技术优势

我国药典和国际药典标准中一般采用微生物法或生化法测定妥布霉素的含量，方法往往步骤繁杂，工作量大，耗时长，影响因素也较多。采用 ELSD 法检测具有简便、快速，样品无须处理及衍生化的优势，可以控制误差来源，提高分析精度，测定结果准确，方法经进一步改进和验证后并可同时进行样品的有关物质分析，有利于控制产品质量，提高药品生产水平。

### 4.2 流动相组成和比例的确

流动相中 TFA(三氟乙酸)作为离子对试剂加入，可延长主峰的保留时间，但其酸性很强，浓度过大会影响色谱柱的使用寿命，经综合比较和试验后，选定浓度为  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

增加流动相中甲醇的比例，可缩短主峰的保留时间，但往往不利于杂质的分离。在综合考虑色谱分离性能并提高分析效率的前提下，经反复调节优化后确定流动相中两相比例为 92 : 8，此时色谱图中各主次色谱峰的分离状况均较为理想。

### 4.3 方法与结果的比对

在对妥布霉素原料药所进行的前期研究<sup>[18]</sup>中，ELSD 随行标准曲线法的含量测定结果与中国药典的微生物效价法测定结果基本一致，不过本试验以 HPLC-ELSD 测得的妥布霉素滴眼液中妥布霉素的含量与效价法测定结果相比均偏低。分析原因应是效价法的测定结果是该药物主成分与其次组分及相关物质抑菌活性的总和，而 HPLC-ELSD 实现了药物主成分与其他并存组分或杂质的分离，测得的结果是主成分含量的真实体现，比效价法更能反应样品的实际情况，因而是更为科学、专属的检测方法。

## REFERENCES

- [1] Ch.P (2005) Vol II. (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 270.
- [2] Japan Antibiotics Research Association. Publisher (Jp). The Minimum Requirement for Antibiotic Products of Japan (in Japanese) (日本抗生物质医药品基准解说) [S]. 2000: 95
- [3] SU Z. A Review on tobramycin analysis methods [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2004, 16 (4): 13-14.
- [4] YUAN C, JIA N, WANG J X, et al. Determination of aminoglycosides in body fluid by high performance liquid chromatographic-indirect photomation determination method [J]. Chin J Pham Anal (药物分析杂志), 1999, 19(2):108-110.
- [5] EP5.1[S]. 2005: 2588.

- [6] XIAO D W, GUO H. Determination of tobramycin in multivitamin B liquid by HPLC [J]. Jiangsu Pharm and Clinical Research (江苏药学与临床研究), 2003, 11(3): 14-15.
- [7] YU H S, CHEN D H, MA S J. Determination of tobramycin by HPLC with precolumn derivatization [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2001, 13(4):28-30.
- [8] USP28[S]. 2005: 1938.
- [9] WANG M J, HU C Q, JIN S H. Analysis of micromycin (Sagamicin) and its related substances by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2002, 22 (3): 205-208.
- [10] WANG M J, HU C Q, JIN S H. A new HPLC method for determination of gentamicin C components with evaporative light-scattering detector [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2002, 22 (6): 461-464.
- [11] YU H S. Determination of netilmicin by HPLC-ELSD method [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2003, 15(5):32-34.
- [12] WANG M J, CHEN S H, ZHANG D S, et al. Determination of isepamicin by HPLC-ELSD method [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2003, 28 (1): 20-22.
- [13] WANG J, HU X J, NI K Y. Determination of netilmicin sulfate and its related substances by HPLC-ELSD and HPLC-MS<sup>n</sup> [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 41(16):1268-1271.
- [14] YU H S, ZHENG Y S, CHEN J. Determination of sisomicin in sisomicin sulfate and sodium chloride injection by HPLC-ELSD method [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2004, 16 (6):41-43.
- [15] CHEN N L, ZHANG H Y. Determination of tobramycin by HPLC-ELSD method [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2007, 27 (9): 1248-1250.
- [16] YAN Y, WANG K J. Determination of tobramycin sulfate injection by HPLC-ELSD method [J]. China Trop Med(中国热带医学), 2007, 7(9): 1674-1675.
- [17] LIN M S, XIAO G X. Determination of tobramycin in tobramycin dexamethasone eye drops by HPLC-ELSD [J]. J China Pharm (中国药房), 2008, 19(25): 1977-1978.
- [18] HONG L Y, CHEN Y, CHEN G B, et al. Content determination of tobramycin by HPLC-ELSD method [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2005, 30(11): 662-664.

收稿日期: 2008-08-14