

HPLC 同时测定复方替硝唑载体栓中 3 组分含量

李博, 杨兴官, 李红玉(辽宁医学院附属第一医院药学部, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定复方替硝唑载体栓中 3 组分含量。方法 采用 Diamonsil C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(60:40:0.5)(用磷酸调 pH 值至 4.0), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 260 nm, 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C。结果 复方替硝唑载体栓中 3 组分替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定的线性范围分别为 40~600, 32~480, 1.6~24 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), 平均回收率分别为 99.81%, 100.2%, 100.3%; RSD 分别为 0.37%, 0.2% 和 0.4%($n=9$)。结论 该方法可同时测定 3 种成分含量, 操作简便、快速, 结果准确、可靠。

关键词: 复方替硝唑载体栓; 替硝唑; 克霉唑; 醋酸氯己定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)11-1015-04

Simultaneous Determination of Three Components in Compound Tinidazole Carrier Suppositories by HPLC

LI Bo, YANG Xingguan, LI Hongyu(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to simultaneous determine three components in compound tinidazole carrier suppositories. **METHODS** A Diamonsil-C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used; the mobile phase was the mixture of methanol-water-triethylamine(60:40:0.5)(adjusted by phosphoric acid to pH 4.0), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the UV detector was operated at 260 nm, injection volume was 20 μL; column temperature was 25 °C. **RESULTS** The linear ranges of three components in compound tinidazole carrier suppositories tinidazole, clotrimazole, chlorhexidine acetate were 40~600, 32~480, 1.6~24 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The average recoveries respectively were 99.81%, 100.2%, 100.3%, and RSDs respectively were 0.37%, 0.2% and 0.4%($n=9$). **CONCLUSION** This method can simultaneously determine three components. It is easy and fast with accurate and reliable results.

KEY WORDS: compound tinidazole carrier suppositories; tinidazole; clotrimazole; chlorhexidine acetate; HPLC

复方替硝唑载体栓是以特殊结构的卫生棉栓作为药物载体形成的一种新型的阴道给药系统, 含有替硝唑、克霉唑和醋酸氯己定 3 种主要成分, 对妇女阴道常见致病菌有较强的抗菌活性, 已有文献^[1]报道, 其抗菌效果优于“妇康载体栓”。本研究通过建立高效液相色谱法同时测定其中 3 种成分, 得到了满意的结果, 为该制剂的质量控制提供了依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

DIONEX 高效液相色谱仪: P680 高压输液泵、UVD 170U 多波长紫外可见检测器、Chromleon 色谱工作站(德国 DIONEX 公司); 可见分光光度计(英国 JENWAY 公司); FC204 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); PHS-25 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); SKQ-2200

超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

复方替硝唑载体栓, 规格: 每枚含替硝唑 0.2 g、克霉唑 0.16 g、醋酸氯己定 0.008 g, 批号: 100604, 100605, 100606, 101001(辽宁医学院药学院实验室); 替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定对照品(批号分别为 100336-200703, 100037-200306, 100183-201003; 含量分别为 99.9%, 99.9%, 99.9%; 均由中国药品生物制品检定所提供); 替硝唑(含量: 99.8%, 天津中安药业有限公司, 批号: TM2010344)、克霉唑(含量: 99.7%, 江苏云阳集团药业有限公司, 批号: 20101208)和醋酸氯己定(含量: 99.8%, 锦州九泰药业有限责任公司, 批号: 081101)均为符合中国药典规格的原料; 甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司, 批号: 20100528); 三乙胺(分析纯, 天津东丽区天大试剂厂, 批号: 20100308); 磷酸(分析纯, 天津东丽区天大试剂厂,

基金项目: 辽宁省级科学技术研究成果奖(20080599)

作者简介: 李博, 女, 硕士, 药师 Tel: (0416)4198024 E-mail: 95744508@qq.com

批号: 20100608); 水为二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil(钻石) C_{18} (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(60:40:0.5)(用磷酸调 pH 值至 4.0), 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长: 260 nm, 进样量: 20 μ L; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。在此条件下, 替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定的理论板数均 $>2\ 000$, 3 者之间的分离度均 >1.5 。

2.2 专属性考察

对复方替硝唑载体栓采用 HPLC 测定, 结果流动相和基质不干扰主药峰, 替硝唑、克霉唑和醋酸氯己定分离度良好, 本法专属性良好, 色谱图见图 1。

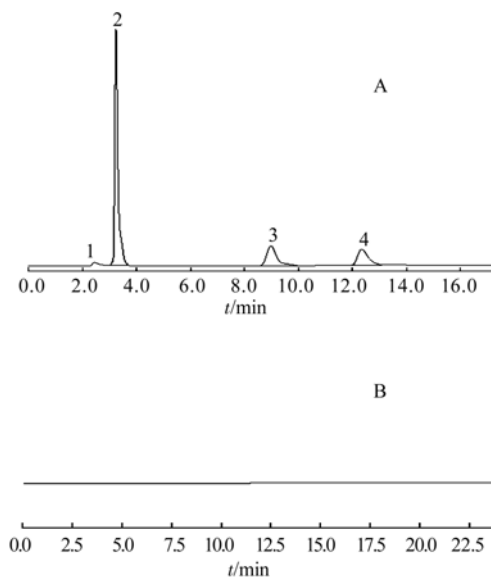


图 1 HPLC 色谱图

A-样品; B-空白对照; 1-杂质峰; 2-替硝唑(3.234 min); 3-醋酸氯己定(8.974 min); 4-克霉唑(12.336 min)

Fig 1 HPLC chromatograms

A-sample; B-blank control; 1-impurity peak; 2-tinidazole; 3-chlorhexidine acetate; 4-clotrimazole

2.3 检测限与定量限考察

甲硝唑、克霉唑和醋酸氯己定中以克霉唑的峰高最小, 因此以克霉唑为基准, 确定检测限和定量限(以克霉唑计)。

精密称取克霉唑原料药 10 mg, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 浓度为 1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$; 精密量取上述溶液 1 mL, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 浓度为 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$; 精密量取上述溶液 1 mL, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 浓度为 0.1

μ g $\cdot$ mL $^{-1}$; 取 10 μ L 进样, 得出检测限为 1 ng; 取 20 μ L 进样, 得出定量限为 50 ng。

2.4 线性关系考察

精密称取干燥至恒重的替硝唑对照品 200 mg、克霉唑对照品 160 mg 和醋酸氯己定对照品 8 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 于 $-10\ ^{\circ}$ C 保存, 备用。精密量取上述对照品贮备液 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 3.0 mL, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图和峰面积。各峰之间的分离度良好。以峰面积 A 对药物浓度 C 进行线性回归, 每个浓度测 3 次, 得替硝唑、克霉唑和醋酸氯己定的标准曲线方程分别为: $A=0.109\ 4C+1.257\ 3$, $r=0.999\ 9$; $A=0.028\ 8C+0.770\ 5$, $r=0.999\ 9$; $A=0.719\ 3C+0.382\ 6$, $r=0.999\ 9$ 。线性范围分别为 40~600 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, 32~480 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, 1.6~24 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

2.5 精密度试验

分别于日内 0, 2, 5, 8, 12 h 连续测定高、中、低 3 个浓度样品的峰面积, 计算日内精密度, 替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定的 RSD 平均分别为 0.57%, 0.77% 和 0.57%。连续 5 d 配制溶液并测定峰面积, 计算日间精密度, RSD 分别为 0.44%, 0.62% 和 0.49%, 结果见表 1 至表 3。

表 1 替硝唑精密度测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Results of tinidazole precision test($\bar{x} \pm s$)

替硝唑浓度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日内精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日间精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$
160	158.69 $\pm$ 0.15	159.34 $\pm$ 0.10
200	201.48 $\pm$ 0.16	199.77 $\pm$ 0.14
240	242.70 $\pm$ 0.07	242.77 $\pm$ 0.05

表 2 克霉唑精密度测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of clotrimazole precision test($\bar{x} \pm s$)

克霉唑浓度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日内精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日间精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$
128	128.36 $\pm$ 0.02	134.78 $\pm$ 0.02
160	161.57 $\pm$ 0.05	159.17 $\pm$ 0.05
192	190.95 $\pm$ 0.06	191.00 $\pm$ 0.03

表 3 醋酸氯己定精密度测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Results of chlorhexidine acetate precision test($\bar{x} \pm s$)

醋酸氯己定浓度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日内精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$	日间精密度/ μ g $\cdot$ mL $^{-1}$
6.4	6.41 $\pm$ 0.04	6.42 $\pm$ 0.04
8.0	7.97 $\pm$ 0.01	7.92 $\pm$ 0.02
9.6	9.65 $\pm$ 0.05	9.68 $\pm$ 0.03

2.6 稳定性试验

取样品溶液，于 0，1，2，4，6，8 h 进样，以峰面积计算，结果替硝唑、克霉唑与醋酸氯己定 RSD 分别为 0.10%，0.10%，0.72%，供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批号样品，精密称取 5 份，平行测定 3 种组分的含量，结果替硝唑、克霉唑与醋酸氯己定 RSD 分别为 0.15%，0.08%，0.13%。

2.8 回收率试验

取复方替硝唑载体栓剂 10 枚，去除载体，置小烧杯中，在 80 ℃ 水浴上加热熔融，在不断搅拌下冷却至室温，精密称取适量(约相当于替硝唑 16，20，24 mg)，至 100 mL 量瓶中，加流动相约 70 mL，80 ℃ 水浴中振摇使充分溶解，放冷至室温，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液配置成高、中、低 3 种浓度作为供试品溶液；另精密配制含替硝唑 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、克霉唑 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和醋酸氯己定 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液，进样，记录峰面积，外标法计算回收率。结果见表 4 至表 6。替硝唑、克霉唑与醋酸氯己定的平均回收率($n=9$)分别为 99.81%，RSD=0.37%；100.2%，RSD=0.20%；100.3%，RSD=0.40%。结果表明，本法准确度较好，可对栓剂中替硝唑、克霉唑与醋酸氯己定进行准确测定。

2.9 样品测定

取复方替硝唑载体栓剂 10 枚，去除载体，置小烧杯中，在 80 ℃ 水浴上加热熔融，在不断搅拌下冷却至室温，精密称取适量(约相当于替硝唑 20 mg)，至 100 mL 量瓶中，加流动相约 70 mL，80 ℃ 水浴中振摇使充分溶解，放冷至室温，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪，记录峰面积。外标法计算 3 种成分含量，结果见表 7。

表 4 替硝唑回收率结果

Tab 4 The results of tinidazole recovery test

替硝唑 浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%			平均检测 浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回 收率/%	RSD/ %
	1	2	3			
160	99.29	99.38	99.48	360		
200	100.34	99.87	100.20	400	99.81	0.37
240	100.02	100.06	99.69	440		

表 5 克霉唑回收率结果

Tab 5 The results of clotrimazole recovery test

克霉唑 浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%			平均检测 浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回 收率/%	RSD/ %
	1	2	3			
128	100.06	99.96	100.35	288		
160	100.36	100.54	100.22	320	100.2	0.20
192	100.29	99.98	100.39	352		

表 6 醋酸氯己定回收率结果

Tab 6 The results of chlorhexidine acetate recovery test

醋酸氯己 定浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%			平均检测 浓度 C/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	平均回 收率/%	RSD/ %
	1	2	3			
6.4	100.86	100.29	100.31	14.40		
8.0	99.98	100.21	100.89	16.02	100.3	0.40
9.6	100.53	99.81	99.69	17.60		

表 7 样品测定结果($n=3$)

Tab 7 Results of sample determination($n=3$)

样品 批号	替硝唑		克霉唑		醋酸氯己定	
	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
100604	99.92	0.67	100.2	0.73	100.4	0.37
100605	99.96	0.38	100.1	0.19	100.5	0.68
100606	99.88	0.49	100.3	0.34	100.6	0.71

3 讨论

3.1 避光操作

据文献[2-3]报道，替硝唑、克霉唑和醋酸氯己定在光照条件下均不稳定，故在实验过程中应特别注意避光操作，量瓶均采用棕色量瓶。

3.2 检测波长的选择

在本制剂处方中，替硝唑和克霉唑的用量分别是醋酸氯己定的 25 倍和 20 倍，因此本实验在选择检测波长时，首先考虑醋酸氯己定的最大吸收。由紫外扫描结果可知，替硝唑在 318 nm 波长处有最大吸收，在 260 nm 波长处基本为最小吸收；克霉唑和醋酸氯己定在 260 nm 波长附近有最大吸收，在 320 nm 波长处基本无吸收。因此选择 260 nm 波长为检测波长，可使 3 者的色谱峰面积相差不大，又能够同时测出。

3.3 流动相的选择

通过尝试流动相中甲醇和水的不同比例，发现当甲醇：水在 65：35 时，替硝唑、醋酸氯己定和克霉唑 3 者出峰时间分别为 2，4 和 7 min，各峰很接近且与杂质峰易混合，当加大甲醇比例时，醋酸氯己定和克霉唑出峰时间更加提前；而当甲醇：水在 60：40 时，替硝唑、醋酸氯己定和克霉

唑出峰时间分别为 3, 9 和 12 min, 杂质峰分离良好, 因此本实验选择甲醇: 水为 60: 40。同时, 在流动相中加入三乙胺并使用磷酸调节 pH 值, 可改善醋酸氯己定和克霉唑峰的拖尾现象。在此条件下, 替硝唑、克霉唑、醋酸氯己定的理论板数均>2 000, 3 者之间的分离度均>1.5。

3.4 栓剂提取溶剂的选择

在中国药典 2010 年版中经常使用甲醇作为栓剂中主药的提取溶剂, 但在本处方中, 当使用甲醇^[4]作为提取溶剂, 对甲醇提取液过滤后用流动相稀释时发现由于流动相中水比例较高, 稀释时出现混浊系由于克霉唑溶于甲醇溶液中达饱和, 再用含水的流动相稀释溶质呈过饱和状态而析出。当使用流动相作为提取溶剂时, 由于克霉唑在流动相中已经达到溶解饱和, 因此在加入相同浓度

的流动相也不会析出, 因此选用流动相作为提取溶剂。

REFERENCES

- [1] LI B, LI H Y, TONG W, et al. *In vitro* antibiotic activity of compound tinidazole carrier suppositories [J]. China Public Health(中国公共卫生), 2010, 26(4): 490-491.
- [2] ZAN X M, YOU W, GAO Z N. Electrocatalytic reduction of tinidazole at room temperature ionic liquid-multi-wall carbon nanotubes modified electrode and its electrochemical determination [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2010, 27(5): 445-449.
- [3] YE T T, LIN Z. Simultaneous determination of tetracaine hydrochloride and clotrimazole in compound neomycin sulfate pellicles by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2012, 29(6): 536-539.
- [4] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版, 二部) [S]. 2010: 235, 682, 852, Appendix 7.

收稿日期: 2011-11-26

HPLC 测定野马追中野马追内酯 A, B 和金丝桃苷的含量

罗敏敏¹, 李春华^{1*}, 王易芬² (1. 中南大学化学化工学院, 长沙 410083; 2. 中国科学院昆明植物所, 昆明 650201)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法对不同产地的 6 批野马追药材中野马追内酯 A, B 和金丝桃苷进行了定性定量分析。方法 野马追内酯 A, B 的测定采用 Agilent Extend-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)为分析柱, 乙腈-水(27: 73)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 等度洗脱, 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 ℃。金丝桃苷的测定以 SB-C₁₈为分析柱, 乙腈-1%醋酸水溶液(12: 88)为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 等度洗脱, 检测波长为 255 nm。结果 野马追内酯 A 在 0.02~1.88 μg, 野马追内酯 B 在 0.44~4.44 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。金丝桃苷在 0.101~1.414 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。结论 本实验方法准确、快速、灵敏、重复性好, 在该色谱条件及样品处理方法下, 可以准确测定野马追中野马追内酯 A, B 和金丝桃苷的含量。

关键词: 野马追; 野马追内酯 A; 野马追内酯 B; 金丝桃苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)11-1018-05

Determination of Eupalinolide A, B and Hyperin in *Eupatorium Lindleyanum* DC by HPLC

LUO Minmin¹, LI Chunhua^{1*}, WANG Yifen² (1. School of Pharmaceutical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming 650201, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of the content of eupalinolide A, B and hyperin in *Eupatorium lindleyanum* DC from 6 different areas by HPLC. **METHODS** For eupalinolide A, B, Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used under the mobile phase of acetonitrile-water(27: 73) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 220 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. For hyperin, SB-C₁₈ column was used under the mobile phase of acetonitrile-1% Acetic acid(12: 88) at a flow of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 255 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. **RESULTS** The standard curve of eupalinolide A was linear in the range of 0.02~1.88 μg and eupalinolide B was linear in the range of 0.44~4.44 μg. The standard curve of hyperin was linear in the

作者简介: 罗敏敏, 女, 硕士生 Tel: 15273175164 E-mail: shuilianz@163.com
13187021782 E-mail: 1033727728@qq.com

*通信作者: 李春华, 男, 博士, 副教授 Tel: