

反相高效液相色谱法同时测定氯霉素氢化可的松滴耳液中氯霉素和氢化可的松含量的方法学研究

杜静¹, 徐宏祥² (1. 杭州市红十字会医院, 浙江 杭州 310009; 2. 嘉兴市药品检验所, 浙江 嘉兴 314001)

摘要:目的 建立用反相高效液相色谱法同时测定氯霉素氢化可的松滴耳液中氯霉素和氢化可的松含量的方法。方法 以 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm × 15 cm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-水(内含 1.5% 冰醋酸)(65:35) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。结果 一次进样可同时测定两种组分的含量, 氯霉素在 154.5 ~ 1030.0 μg/mL, 氢化可的松在 32.4 ~ 210.0 μg/mL 范围内, 峰面积与其浓度均呈良好的线性关系, *r* 值分别为 0.999 9 和 0.999 6, 日内精密度和日间精密密度良好, 平均回收率分别为 100.1%, RSD = 0.49% (*n* = 9) 和 100.2%, RSD = 0.42% (*n* = 9) 结论 方法简单快速, 结果准确, 可作为该制剂的质控分析。

关键词:反相高效液相色谱法; 氯霉素; 氢化可的松; 氯霉素氢化可的松滴耳液

中图分类号: R917.701; R978.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2004)05-0394-03

Simultaneous determination of chloramphenicol and hydrocortisone in chloramphenicol and hydrocortisone ear drops by RP HPLC

DU Jing¹, XU Hong-xiang² (1. Hangzhou Red cross Hospital of Zhejiang province, Hangzhou 310009, China; 2. Jiaxing Institute for Drug Control, Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for simultaneous determination of chloramphenicol and hydrocortisone in

chlora mphenicol and hydrocortisone ear drops by RP- HPLC. **METHOD** The sample was separated on a Shim-pack VP- ODS column (4.6 mm × 15cm, 5μm) and the mobile phase was consisted of methanol — water (contained 1.5 % of acetic acid glacial) (65: 35). The wavelength of UV detector was set at 240nm. The flow rate was 1.0 mL/ min. Injection volume was 10μL. **RESULTS** The linear range was from 154.5 ~ 1030.0μg/ mL, $r = 0.9999$ (chlora mphenicol) and 32.4 ~ 210.0μg/ mL, $r = 0.9996$ (hydrocortisone). precisions(RSD) of the within-day and between-day were good. The average recoveries were 100.1 %, RSD = 0.49 %, ($n = 9$) for chlora mphenicol and 100.2 % RSD = 0.42 %, ($n = 9$) for hydrocortisone. **CONCLUSION** The method was simple, rapid and accurate, suitable for the quantitative analysis of chlora mphenicol and hydrocortisone of the preparation.

KEY WORDS: RP- HPLC; chlora mphenicol; hydrocortisone; chlora mphenicol and hydrocortisone ear drops

氯霉素氯化可的松滴耳液是《中国医院制剂规范》(西药制剂)第二版收载的品种,具有抗炎、抗过敏作用,是临床常用药物之一,用于治疗中耳炎,疗效确切,其主要成分为氯霉素和氯化可的松。但该制剂质量标准只对氯霉素作了定量规定,而对氯化可的松仅作一般的定性描述,难以起到控制制剂质量的作用。有关氯霉素的测定方法主要有紫外光谱法,氯化可的松有高效液相色谱法。本实验依据两者在一定波长区间均具有紫外吸收的特点,经摸索建立了反相高效液相色谱法同时测定该制剂中氯霉素和氯化可的松含量的方法。本法简单快速,准确性和重现性均好,结果满意。

1 仪器与药品

1.1 仪器

Shimadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪,shimadzu SPD-10Avp 紫外检测器,Rheodyne 7725i 手动进样器,10μL 定量管,HS 色谱数据处理工作站 V4.0+(杭州英谱),shimadzu UV-256FW 紫外分光光度计,Mettler AE240 电子天平。

1.2 药品

氯霉素、氯化可的松对照品(中国药品生物制品检定所),以上对照品经面积归一化测定含量均在 99.4% 以上。氯霉素氯化可的松滴耳液(自制)三批,批号分别为 030115、030116、030118,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 方法专属性考察

氯霉素易分解,通过对氯霉素制备 0.1 mol/L HCl, 0.1 mol/L NaOH, 10 % H₂O₂ 溶液于 100 °C 水浴加热 30 min 及甲醇溶液于 4500lx 强光照射 5h 等破坏性试验,经 HPLC 分离检测,结果表明采用 HPLC 测定氯霉素与氯化可的松含量的方法专属性良好。

2.2 系统适用性试验

以 Shimadzu Shim-Pack VP- ODS 柱(4.6 mm × 15cm, 5μm) 为色谱柱,甲醇-水(内含 1.5 % 冰醋酸)(65: 35) 为流动相,流速 1.0 mL/ min,检测波长为 240nm,进样量 10μL,室温。在给定的色谱条件下,氯霉素和氯化可的松的理论板数分别为 2100 和 3000,两组分的分离度达到 3.0 以上,其他组分均不出峰,不干扰测定。

2.3 线性关系

分别精密称取氯霉素、氯化可的松对照品 51.50 mg 和 10.80 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再分别精密量取 0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 5 只 10 mL 量

瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。各进样 10μL,测定峰面积,以两组分的峰面积 $A(\times 10^6)$ 与浓度 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$,绘制标准曲线,回归方程:氯霉素 $A = 0.00766 + 0.606 C$, $r = 0.9999$; 氯化可的松 $A = -0.00593 + 0.772 C$, $r = 0.9996$ 。线性范围分别为:氯霉素 154.5 ~ 1030.0μg/ mL; 氯化可的松 32.4 ~ 210.0μg/ mL。由于标准曲线均通过原点,定量方法采用峰面积一点法。

2.4 精密度试验

取 030115 批号样品,精密配制浓度约为 500μg/ mL 的氯霉素及 100μg/ mL 的氯化可的松样品溶液各 5 份,分别精密量取 10μL,注入液相色谱仪中,以外标法计算 5 份样品的含量,均值氯霉素为 98.8 %, RSD = 0.49 %,氯化可的松为 99.6 %, RSD = 0.39 %,日内精密度良好。对 030115 样品,取样测定含量,连续测定 5d,以外标法计算含量,均值氯霉素为 99.0 %, RSD = 0.58 %,氯化可的松为 100.0 %, RSD = 0.60 %,日间精密度良好。

2.5 进样重复性

取同一份样品溶液连续进样 6 次,测得两组分峰面积的 RSD 分别为 0.35 % (氯霉素) 和 0.42 % (氯化可的松)。

2.6 回收率试验

按处方比例配制模拟样品,再按测定浓度的 80 %, 100 %, 120 % 用甲醇配制供试溶液,每个浓度配制 3 份。另精密称取氯霉素对照品和氯化可的松对照品各适量,加甲醇配制氯霉素浓度约为 500μg/ mL 和氯化可的松浓度约为 100μg/ mL 的混合对照品溶液,各取对照溶液与供试溶液 10μL,注入液相色谱仪中,以外标法计算回收量,得平均回收率氯霉素为 100.1 %, RSD = 0.49 %,氯化可的松为 100.21 %, RSD = 0.52 %。

2.7 最低定量限

取对照溶液 10μL 进样,按信噪比为 10 计算,得最低定量浓度氯霉素为 28μg/ mL,氯化可的松为 6μg/ mL。

表 1 样品含量测定结果(标示量 %, $n = 3$)

Tab 1 Determination results of sample

批号	高效液相色谱法		紫外光谱法
	氯霉素	氯化可的松	氯霉素
030115	98.5(0.4)	99.80(0.3)	99.3(0.8)
030116	99.7(0.5)	98.9(0.4)	100.3(0.9)
030118	99.0(0.3)	99.2(0.4)	99.6(0.6)

注:括号内为 RSD 值(%)

Notes: Values in parentheses were RSD (%)

2.8 样品测定

取本品 3 批样品,用内容量移液管分别精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,作为供试溶液,照回收率试验项下自“另精密称取 ……”起,依法操作,计算含量,所得结果与按法定方法测定结果作比较,结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取氯霉素与氢化可的松的对照品溶液,在 200 ~ 300 nm 波长区间扫描,结果表明,氯霉素在 278 nm 波长处有最大吸收,在 238 nm 波长处有最小吸收;氢化可的松在 240 nm 处有最大吸收,考虑到处方中氯霉素与氢化可的松的量之比为 5:1,因此在选择检测波长时尽可能提高氢化可的松的吸收值,同时降低氯霉素的吸收值,故选择 240 nm 作为检测波长,氯霉素在此波长处有谷吸收,可克服因浓度差别过大带来的检测困难,从而提高两组分定量的准确性。

3.2 流动相的选择

曾试验用甲醇-水作为流动相,氢化可的松拖尾现象严

重,可能是氢化可的松分子中羟基解离后与硅醇基发生吸附所致。可采用离子抑制技术加以消除,向水相中添加冰醋酸,可大大减少氢化可的松的拖尾现象,提高柱效。经试验,酸浓度越大,氢化可的松峰形越对称,而对氯霉素峰形影响不大。另外,增加有机相浓度,可缩短两组分的保留时间,对提高柱效有利。同时,为了保护色谱柱,尽可能降低酸的浓度,故选择最佳流动相组成为甲醇-水(内含 1.5% 冰醋酸)(65:35),所得两组分色谱峰形对称,保留时间短,柱效高,分离度大于 1.5,达到了快速分析的目的。

3.3 由于氯霉素遇酸、碱、空气及光线易降解,分解失效,其降解产物在紫外区有吸收,用紫外光谱法测定含量不能反映这一变化情况,而高效液相色谱法具有分离分析功能,所测含量较真实反映制剂的质量变化,准确性好,可靠性强,而且一次进样可同时测定两组分的含量,省时省力,结果准确,可作为该制剂的质控方法。

收稿日期:2003-03-29