

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.09.06

高效液相色谱法同时测定兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的含量

张 璐, 马秋冉, 董玲玲, 赵富华, 杨 星, 于晓辉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-05-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 09-0034-07 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了同时测定兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬含量的高效液相色谱法。C8(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 甲醇-0.02% 三乙胺水溶液(75:25) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 采用 224 nm 作为氟苯尼考及盐酸特比萘芬的检测波长、250 nm 作为糠酸莫米松的检测波长分别进行检测。氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬线性范围分别为 0.49~49.20 μg/mL ($r=1.000$)、0.24~7.96 μg/mL ($r=1.000$)、0.25~50.00 μg/mL ($r=1.000$), 其回收率($n=9$) 分别为 100.80%、102.83%、101.37%。测得兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬含量分别为 15.46 mg/mL、2.07 mg/mL、15.35 mg/mL。结果表明该方法可用于兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松及盐酸特比萘芬的含量的测定。

[关键词] 兽用制剂; 氟苯尼考; 糠酸莫米松; 盐酸特比萘芬; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Florfenicol, Mometasone Furoate and Terbinafine Hydrochloride in Veterinary Preparations by HPLC

ZHANG Lu, MA Qiu-ran, DONG Ling-ling, ZHAO FU-hua, YANG Xing, YU Xiao-hui*

(China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YU Xiao-hui, E-mail: yuxiaohui@ivdc.org.cn

Abstract: This research was aimed to establish an HPLC method for the simultaneous determination of florfenicol, mometasone furoate and terbinafine hydrochloride in veterinary preparations. A Thermo C8 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted as analytical column. The mobile phase consisted of methanol-0.02% triethylamine (75:25) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 224 nm for florfenicol and terbinafine hydrochloride, 250 nm for mometasone furoate, and the injection volume was 10 μL. The linear ranges

作者简介: 张 璐, 硕士, 从事兽药检验及相关研究。E-mail: zhanglu8070@126.com

通讯作者: 于晓辉。E-mail: yuxiaohui@ivdc.org.cn

observed were 0.49 ~ 49.20 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 1.000$), 0.24 ~ 7.96 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 1.000$) and 0.25 ~ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 1.000$). The average recoveries ($n = 9$) were 100.80%, 102.83% and 101.37%. The contents of florfenicol, mometasone furoate and terbinafine hydrochloride in a veterinary preparation were 15.46 mg/mL, 2.07 mg/mL, 15.35 mg/mL. The method can be used for simultaneous determination of florfenicol, mometasone furoate and terbinafine hydrochloride in veterinary preparations.

Key words: veterinary preparations; florfenicol; mometasone furoate; terbinafine hydrochloride; HPLC

外耳炎是一种犬猫耳道常见疾病,患病动物的耳部皮肤会出现红斑、脱皮、疼痛和瘙痒症状,犬的发病率在 5% ~ 20% 之间^[1]。近年来有研究表明,氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬三种成分的复方兽药制剂可用于治疗犬的外耳炎。但目前多采用高效液相色谱法分别对氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的含量进行测定,尚未见有同时测定三种成分的研究报道。本文拟建立高效液相色谱法同时测定兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的含量,以期对兽用制剂的开发提供研究基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂 Waters 2695 高效液相色谱仪,配置 Waters 2489 双通道紫外检测器,Empower 色谱工作站软件;电子分析天平:感量 0.00001 g;KQ3200 型超声波清洗器;三乙胺,色谱纯, Fisher 公司;甲醇,色谱纯,默克公司;水由实验室 MILLI-PORE 超纯水仪自制。

1.2 试药 氟苯尼考对照品(批号 K0301305),购自中国兽医药品监察所;糠酸莫米松对照品(批号 510022 - 201301)、盐酸特比萘芬对照品(批号 100503 - 201402),均购自中国食品药品检定研究院。糠酸莫米松原料药(批号 20140510),盐酸特比萘芬原料药(批号 140301TH),均购自武汉那拉白医药化工有限公司。兽用制剂为实验室自制,制备过程为:将氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬溶解于适宜辅料后,加纯水至 37.5 mL,即得。制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的浓度分

别为 15 mg/mL、2 mg/mL、15 mg/mL。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo C8(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以甲醇 - 0.02% 三乙胺水溶液(75 : 25)为流动相进行等度洗脱,流速为 1.0 mL/min,以 224 nm 作为氟苯尼考及盐酸特比萘芬的检测波长、以 250 nm 作为糠酸莫米松的检测波长,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,进样 10 μL 检测。在上述色谱条件下,氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬峰的理论塔板数均大于 5000,分离度均大于 1.5。

2.2 混合对照品溶液的配制 精密称取对照品氟苯尼考 9.91 mg、糠酸莫米松 19.95 mg、盐酸特比萘芬 10.02 mg,分别置 10 mL、25 mL、10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取氟苯尼考溶液 5.0 mL、糠酸莫米松溶液 2.0 mL、盐酸特比萘芬溶液 5.0 mL 分别置于 100 mL、200 mL、100 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得各对照品稀释液。从三种对照品稀释液中精密吸取适量于 10 mL 容量瓶中,配制成不同浓度的混合对照品溶液,用于含量测定。

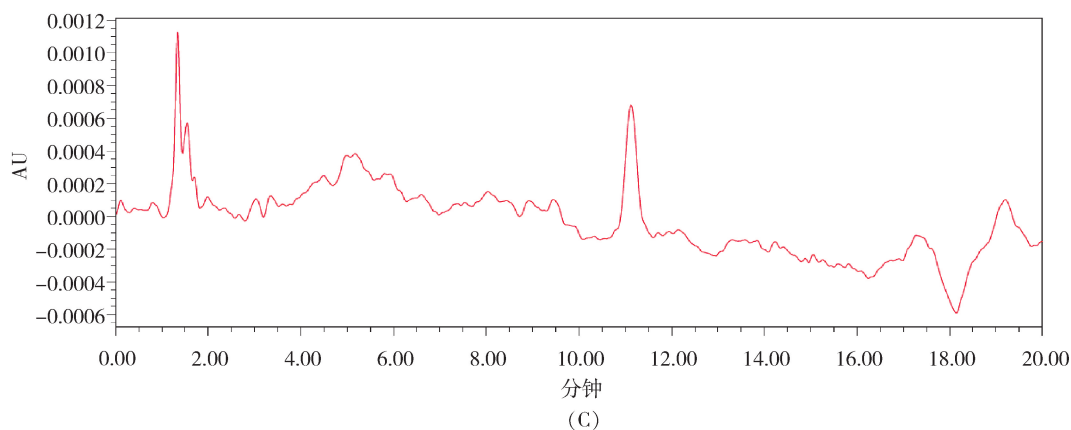
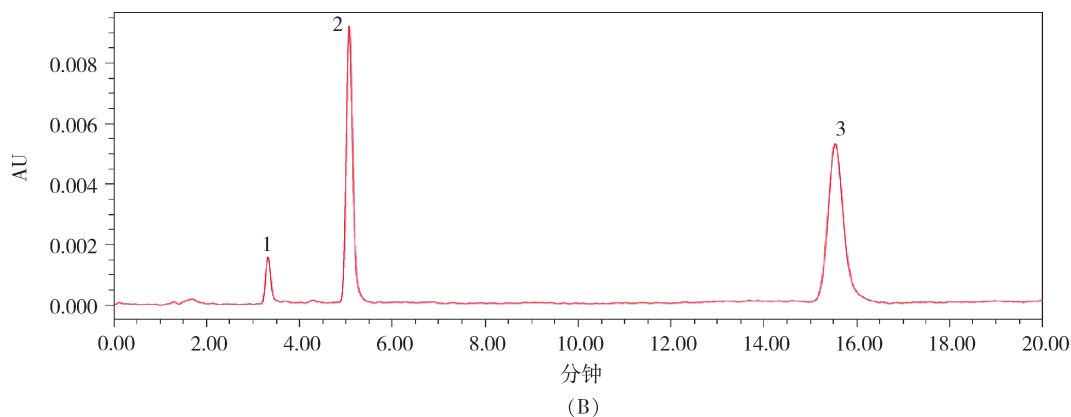
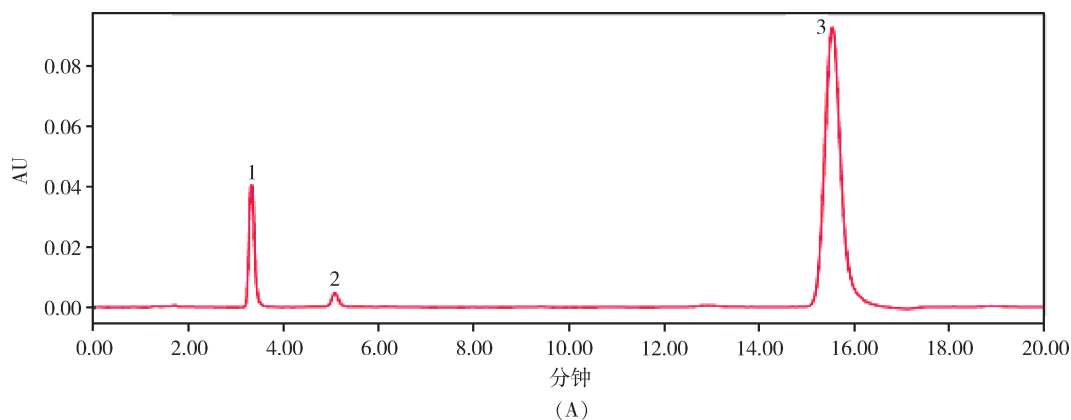
2.3 供试品溶液的配制 精密吸取自制制剂 2.0 mL,置 200 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇稀释至刻度,摇匀。再精密吸取 5.0 mL 置 50 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

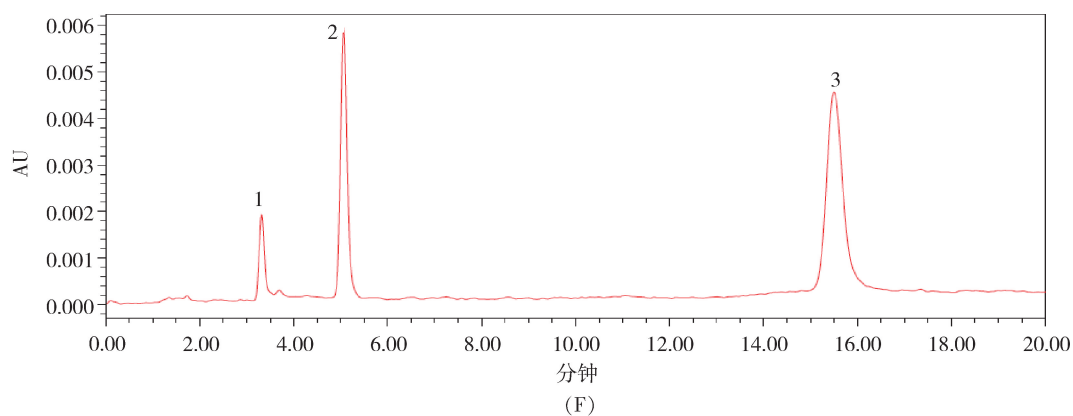
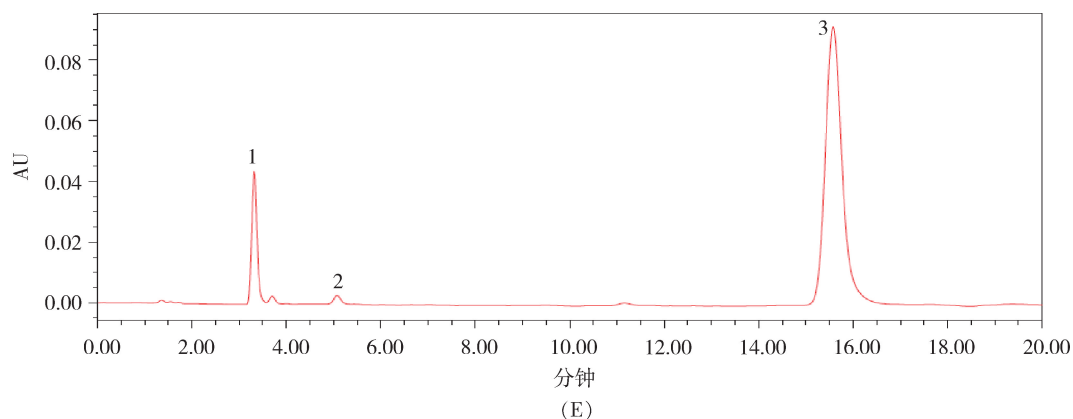
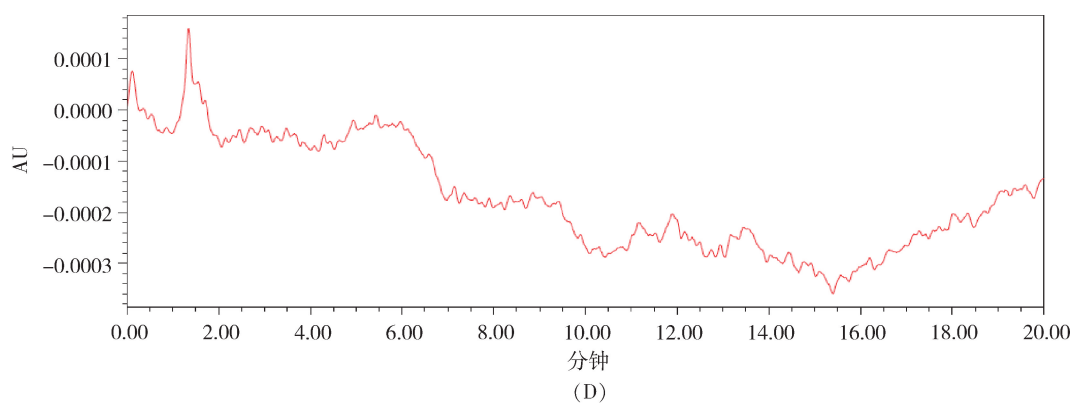
2.4 阴性供试品溶液的配制 取各辅料,除不添加氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬原料药外,其他操作同自制制剂。配制完成后摇匀,精密吸取 2.0 mL 置 200 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇稀释至刻

度,摇匀。再精密吸取 5.0 mL 置 50 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 专属性试验 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液各 10 μ L,照“2.1”项下色谱条件测定,氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬与相应的对照品的色谱峰保留时间一致,达到基

线分离,此时混合对照品溶液中,三种成分的浓度分别为 14.76 μ g/mL、3.18 μ g/mL、15.00 μ g/mL。阴性样品色谱中与氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬峰相应的保留时间处无吸收峰,表明制剂中其他成分对测定无干扰。见图 1。





1. 氟苯尼考; 2. 糠酸莫米松; 3. 盐酸特比萘芬

A. 混合对照品溶液(224 nm 检测); B. 混合对照品溶液(250 nm 检测); C. 阴性样品溶液(224 nm 检测);

D. 阴性样品溶液(250 nm 检测); E. 供试品溶液(224 nm 检测); F. 供试品溶液(250 nm 检测)

1. Florfenicol; 2. Mometasone furoate; 3. Terbinafine hydrochloride

1. Mixed reference solution(224 nm); B. Mixed reference solution(250 nm); C. Negative sample solution(224 nm);

D. Negative sample solution(250 nm); E. Test solution(224 nm); F. Test solution(250 nm)

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 The High performance liquid chromatogram

2.6 标准曲线 将“2.2”项下混合对照品溶液照“2.1”项下色谱条件,分别进样 10 μL ,测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),分别绘制标准曲线,得氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬回归方程($n = 8$):
 $Y = 22754244.64 X + 1239.20, r = 1.000$;
 $Y = 28139914.58 X - 1198.81, r = 1.000$;
 $Y = 149172957.70X - 17145.80, r = 1.000$ 。结果表明,氟苯尼考质量浓度在 0.49 ~ 49.20 $\mu\text{g/mL}$,糠酸莫米松在 0.24 ~ 7.96 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸特比萘芬在 0.25 ~ 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,峰面积与溶液浓度线性关系良好。

2.7 重复性试验 取自制制剂样品,照“2.3”项下方法配制 6 份供试品溶液,分别进样,测定峰面积,计算含量。结果氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬平均含量分别为 15.46 mg/mL、2.07 mg/mL、15.35 mg/mL, RSD 分别为 0.64%、0.75%、0.63%,表明方法重复性良好。

2.8 精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液,照“2.1”项下色谱条件,重复进样 6 次,记录峰面积并计算 RSD 值。氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘的 RSD 分别为 0.75%、0.63%、0.68%,表明方法精密度良好。

2.9 稳定性试验 取“2.3”项下的供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 各进样 10 μL ,测定氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的峰面积,其 RSD 分别为 0.36%、0.70% 和 0.40%,表明供试品溶液稳定。

2.10 定量限与检出限 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液进行逐步稀释,取稀释后溶液进样检测。按照 10 倍噪音计算最低定量限浓度,氟苯尼考、糠酸莫米松和盐酸特比萘芬的最低定量限浓度分别为:0.49 $\mu\text{g/mL}$ 、0.24 $\mu\text{g/mL}$ 、0.20 $\mu\text{g/mL}$;按照 3 倍噪音计算最低检出限浓度,氟苯尼考、糠酸莫米松和盐酸特比萘芬的最低检出限浓度分别为:0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.16 $\mu\text{g/mL}$ 、0.13 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.11 回收率试验 自制制剂中氟苯尼考原料药的量为 562.5 mg、糠酸莫米松原料药的量为 75 mg、盐酸特比萘芬原料药的量为 562.5 mg。分别按照三个添加量添加原料药,氟苯尼考添加量为 450、562.5、675 mg,糠酸莫米松添加量为 60、75、90 mg,盐酸特比萘芬添加量为 450、562.5、675 mg,每个添加量平行三份,照“2.3”项下制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件测定,计算加标回收率(表 1)。其中,氟苯尼考的回收率在 99.06% ~ 103.68% 之间,平均回收率为 100.80%, RSD 值为 1.89%;糠酸莫米松的回收率在 101.53% ~ 104.94% 之间,平均回收率为 102.83%, RSD 值为 1.17%;盐酸特比萘芬的回收率在 99.84% ~ 103.54% 之间,平均回收率为 101.37%, RSD 值为 1.59%。上述试验结果表明该方法回收率高。

3 讨论与小结

3.1 流动相的确定 本试验曾参照《中华人民共和国兽药典》(2010 年版)一部中收录的氟苯尼考含量测定方法^[2]、国家食品药品监督管理局发布的国家药品标准糠酸莫米松(征求意见稿)中收录的糠酸莫米松含量测定方法^[3]及《中华人民共和国药典》(2015 年版)二部中收录的盐酸特比萘芬含量测定方法^[4]同时测定兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松、盐酸特比萘芬的含量,以便测定方法的推广和应用。试验中发现,三种方法均无法同时测定三种成分的含量。氟苯尼考含量测定方法的流动相为乙腈-水-冰醋酸(100:197:3),以流动相为溶剂溶解样品。糠酸莫米松在该溶剂中溶解度极低,进样后无响应;盐酸特比萘芬峰的保留时间长于 45 min,且峰形不佳。盐酸特比萘芬含量测定方法为:以三乙胺缓冲液(0.2% 三乙胺溶液,用冰醋酸调节 pH 值至 7.5)-甲醇-乙腈(30:42:28)为流动相 A,以三乙胺缓冲液-甲醇-乙腈(5:57:38)为流动相 B,进行梯度洗脱,梯度时间为 38 min,以乙腈-水(1:1)为溶剂溶解样品。流动

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Sample recovery rate test results

待测成分 Test components	本底值/mg Background value/mg	添加量/mg Add amount/mg	加样回收率/% Sample recovery rate/%	RSD/% Relative standard deviation/%
氟苯尼考 Florfenicol	0.00	450.00	102.84	1.89
			103.68	
			103.21	
		562.50	99.10	
			99.99	
			100.53	
		675.00	99.06	
			99.68	
			99.13	
糠酸莫米松 Mometasone furoate	0.00	60.00	104.05	1.17
			103.92	
			104.94	
		75.00	101.53	
			102.88	
			102.33	
		90.00	101.55	
			102.09	
			102.17	
盐酸特比萘芬 Terbinafine hydrochloride	0.00	450.00	103.54	1.59
			103.49	
			103.48	
		562.50	99.84	
			100.84	
			100.12	
		675.00	100.36	
			100.36	
			100.35	

相配制过程复杂,色谱图中氟苯尼考峰形不佳,糠酸莫米松无响应,盐酸特比萘芬出峰正常,但保留时间较长。糠酸莫米松含量测定方法的流动相是甲醇-水(65:35),以流动相为溶剂溶解样品。在该液相条件下,氟苯尼考峰会受到辅料的干扰,无法准确测定;盐酸特比萘芬峰保留时间长,且拖尾严重。为改善氟苯尼考与干扰峰的分离度,优化流动相比例为甲醇-水(75:25)。为改善盐酸特比萘芬峰形,在水相中加入少量三乙胺。试验中发现不同浓度的三乙胺水溶液(0.004%、0.008%、0.02%、0.04%)对三种成分保留时间、分离度、拖尾因子、理论塔板数影响不大。考虑到三乙胺为易挥发性液体,为避免流动相配制过程中由于三乙胺挥发而造成试验结果不稳定,最终选择0.02%三乙

胺水溶液为本试验的水相。故本试验采用“2.1”项下色谱条件分析。

3.2 色谱柱的确定 考察 Thermo Hypersil GOLD C8 (4.6 mm×250 mm,5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 mm×150 mm,5 μm)、Waters Symmetry® C8 (4.6 mm×75 mm,5 μm)等色谱柱对三种成分保留时间、分离度、拖尾因子、理论塔板数的影响。结果表明,在相同试验条件下,Agilent C18 色谱柱对盐酸特比萘芬的保留时间为 74.87 min,理论塔板数约为 665,保留时间过长,理论塔板数过低;Agilent C8 色谱柱对氟苯尼考的保留时间为 1.65 min,理论塔板数为 958,保留时间较短,理论塔板数较低;Waters C8 色谱柱对氟苯尼考的保留时间为 0.94 min,保

留时间过短。综合试验结果, Thermo Hypersil GOLD C8 色谱柱对三种成分的保留时间分别为 3.29 min、4.97 min、15.17 min, 分离度分别为 3.8、2.9、2.1, 拖尾因子分别为 1.2、1.1、1.1, 理论塔板数分别为 6384、9306、15002, 故选择 Thermo Hypersil GOLD C8 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为试验用色谱柱。

3.3 色谱柱温度的确定 在含量测定过程中发现, 糠酸莫米松的保留时间会随室温的变化而变化。为确保试验的重复性, 应固定色谱柱温度。调节色谱柱温度为 25、30、35 ℃, 考察柱温对三种成分保留时间、分离度、拖尾因子、理论塔板数的影响。结果表明, 三种试验温度下, 这三种成分的色谱行为均良好。结合试验室室温变化, 最终确定试验柱温为 30 ℃。

本文建立的高效液相色谱法灵敏、简单易行, 专属性、重复性、回收率均符合要求, 能够同时测定兽用制剂中氟苯尼考、糠酸莫米松及盐酸特比萘芬的含量。

参考文献:

- [1] 周传铎, 赵然. 犬外耳炎的临床调查研究[J]. 中国工作犬业, 2016(6): 17-19.
Zhou C D, Zhao R. Clinical investigation of canine otitis externa [J]. China Working Dog, 2016(6): 17-19.
- [2] 国家兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010 年版. 北京: 中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China [S]. 2010 edition. Beijing: China Agriculture Press.
- [3] 糠酸莫米松征求意见稿[S]. 国家食品药品监督管理总局, 2015.
Draft for comments on mometasone furoate[S]. China Food and Drug Administration, 2015.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China [S]. 2015 edition. Beijing: China Medical Science and Technology Press.

(编辑: 李文平)