

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.07.04

高效液相色谱法测定四环素片中四环素含量

刘素梅,方忠意,王 丽,张跃京,臧合英,李慧素

(河南省兽药饲料监察所,郑州 450002)

[收稿日期] 2020-02-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 07-0023-05 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了四环素片中四环素含量的高效液相色谱测定法。色谱条件: XBridge C18 (5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 值至 2.0) (12:88), 检测波长 280 nm。线性回归方程为 $y = 1803x + 4150$, 相关系数 $r = 0.99999$, 即在 10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 四环素峰面积与浓度有良好的线性关系, 回收率为 100.0 %。该方法简便、准确、重复性好, 可以很好地控制四环素的质量。

[关键词] 四环素片; 四环素; 高效液相色谱法; 含量测定

The Determination of Tetracycline in Tetracycline Tablets by HPLC

LIU Su - mei, FANG Zhong - yi, WANG Li, Zhang Yue - jing, ZANG HE - ying, LI Hui - su

(Henan Province Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To develop the method for Tetracycline in Tetracycline Tablets by HPLC. The liquid chromatography separation was carried on XBridge C18 column (5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm) with methanol - 0.02 mol/L KH_2PO_4 (pH value was adjusted to 2.0 with H_3PO_4) (12:88) as mobile phase with the detection wavelength 280nm. The equation was $y = 1803x + 4150$, $r = 0.99999$, the alibration curve was linear in the range 10 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ and the average recovery was 100.0 %. This method was simple, accurate and reproducible to control the quality of Tetracycline.

Key words: Tetracycline Tablets; Tetracycline; HPLC; determination

四环素类抗生素是 20 世纪 40 年代发现的一类具有菲烷(母核)的广谱抗生素, 该类抗生素广泛应用于革兰阳性和阴性细菌、支原体和立克次氏体等引起的感染^[1]。四环素片收载在《兽药质量标准》(2017 年版)化学药品卷中, 含量测定采用微生物检定法, 该方法操作较繁琐, 试验周期长, 影响因素多, 结果重复性差, 拟采用简便高效的高效液相

色谱法, 对四环素含量进行测定。

1 材 料

1.1 仪器设备 Waters 高效液相色谱系统: 包括 2695 分离系统、2489 紫外检测器、Empower2 色谱工作站; METTLER XS205 电子天平; MILIPORE 超纯水处理器等。

1.2 试药试剂 盐酸四环素对照品购自中国食品

药品检定研究院,液相用甲醇、乙腈为色谱纯试剂,磷酸二氢钾为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 标准工作液的制备 精密称取盐酸四环素对照品 50 mg,置 50 mL 量瓶中,加 0.01 mol/L 盐酸溶液适量,振摇使溶解,加 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀;临用前用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释成浓度为 10、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品 20 片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(相当于四环素 0.05 g),置 100 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液 10 mL,振摇使溶解,加 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀;精密量取上清液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀。

2.1.3 提取方法的考察 四环素在水中微溶,与盐酸结合生成盐酸四环素后溶于水^[1-2],所以先用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解,再用 0.01 mol/L 盐酸溶液进行稀释^[3-4],分别考察了直接稀释、超声提取 10 min 和超声提取 20 min 的提取效果。四环素用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解效果优于 0.01 mol/L 盐酸溶液溶解;振摇溶解提取效果优于超声提取效果,原因可能是四环素不稳定,在超声过程中降解的原因。所以采用 0.1 mol/L 盐酸溶液 10 mL 振摇溶解,再用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释的提取方法。

2.2 色谱条件的选择 查阅相关文献,先后考察了 0.1 mol/L 磷酸氢二铵-乙腈^[5]、0.01 mol/L 十二烷基硫酸钠溶液-乙腈^[6]、0.1 mol/L 草酸铵-二甲基甲酰胺-0.2 mol/L 磷酸氢二铵^[7-8]、甲醇-0.05% 庚烷磺酸钠溶液-三乙胺^[9]、乙腈-水-甲酸^[10]等系统,结果四环素与其他杂质分离度不好,并且四环素峰前延;后采用《中国药典》2015 年版二部盐酸四环素含量测定所用流动相^[2]:醋酸铵溶液[0.15 mol/L 醋酸铵溶液-0.01 mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液-三乙胺(100:10:1)],用醋酸调节 pH 值至 8.5]-乙腈(83:17),四环素峰前延,对

称因子为 0.8065,并且基线噪音大。后采用 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 值至 2.0)-甲醇(88:12),四环素峰形、柱效及分离度均满意,所以采用该系统作为流动相。

《中国药典》2015 年版二部盐酸四环素含量测定项下检测波长为 280 nm,所以本研究也采用 280 nm 作为检测波长,最终色谱条件为:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 值至 2.0)(12:88)为流动相;柱温为 40℃;检测波长为 280 nm。

2.3 线性与范围 按 2.1.1 项下方法制备系列浓度标准工作溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,以对照品溶液浓度与相应的组分峰面积算回归方程和相关系数,回归方程为: $y = 1803x + 4150$,相关系数 $r = 0.99999$,即在 10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,四环素具有良好的线性,结果见图 1。

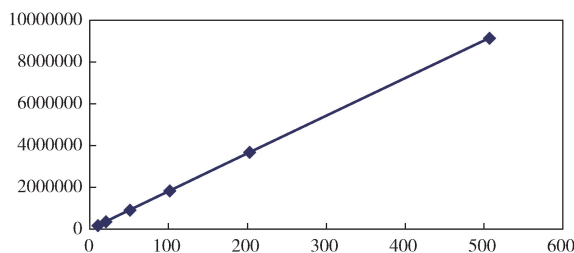


图 1 四环素标准曲线图

Fig 1 Standard curve of Tetracycline

2.4 准确度 取空白辅料 0.02 g,共取 6 份,精密称定,分别加入四环素原料 50 mg,混匀。按照 2.4.1.2 项下供试品制备方法进行处理,注入液相色谱仪,记录色谱图。以加入的同批四环素原料为对照,同法测定,按外标法以峰面积计算,结果见表 1。结果表明,该试验回收率高,准确度好,可以准确测定四环素含量。

2.5 精密度 取四环素片样品 20 片,精密称定,研细,精密称取细粉 0.07 g,共 6 份,按 2.4.1.2 项下供试品制备方法进行处理,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,结果乘以 0.9242,即得含量,计算 RSD,结果见表 2。结果表明,该试验重复性良好。

表 1 回收率试验结果 (n=6)

Tab 1 Results of recovery tests (n=6)

编号	添加量/mg	测得量/mg	回收率/%		平均回收率/%	RSD/%
1	50.55	50.55	100.00	100.05	100.03	0.5
		50.60	100.10			
2	50.86	50.79	99.86	99.74		
		50.67	99.63			
3	50.60	50.76	100.32	100.40		
		50.84	100.47			
4	50.67	50.95	100.55	100.63		
		51.03	100.71			
5	50.58	50.60	100.04	100.02		
		50.58	100.00			
6	50.48	50.24	99.52	99.33		
		50.04	99.13			

表 2 精密度试验结果 (n=6)

Tab 2 Results of precision tests (n=6)

编号	取样量/g	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	0.07020	89.38	88.63	0.6
2	0.07047	88.12		
3	0.07363	89.05		
4	0.07244	88.24		
5	0.07307	88.42		
6	0.07295	88.58		

2.6 专属性 经过考察,四环素片在生产过程中使用辅料为淀粉和硬脂酸镁,我们模拟生产工艺,配制了含 0.2 % 硬脂酸镁的淀粉进行压片,作为空白样品。称取研细后的空白样品 0.02 g,按2.4.1.2项下供试品制备方法进行处理,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明,空白无干扰,见图 2 ~ 图 5。

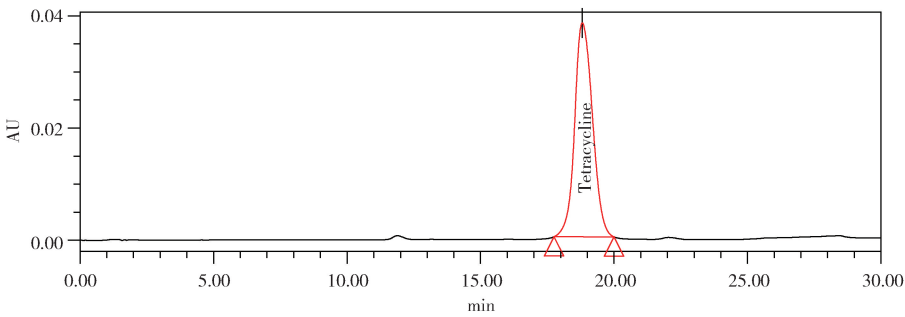


图 2 四环素对照品 (100 µg/mL) 色谱图

Fig 2 Chromatogram of Tetracycline reference substance (100 µg/mL)

2.7 溶液稳定性 取精密度项下的一个样品,分别在 0,1,2,6,10 和 12 h 进样,考察样品稳定性,结果显示,样品在 12 h 内稳定。

2.8 耐用性 取四环素对照品溶液,在不同柱温、不同 pH 值下进行测定,以及采用不同的色谱柱,对该方法的耐用性进行考察。

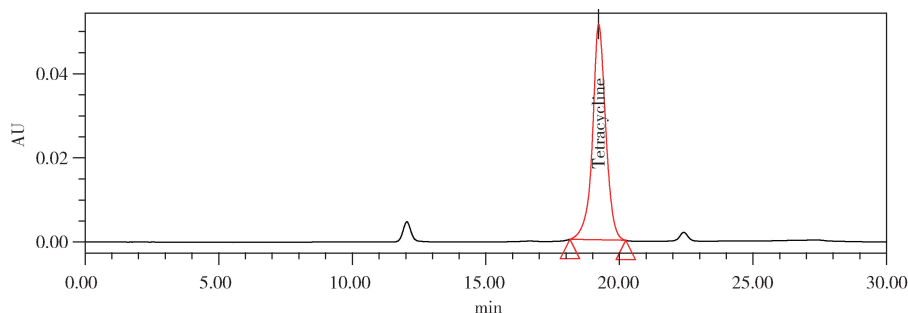


图 3 四环素片样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of Tetracycline Tablets

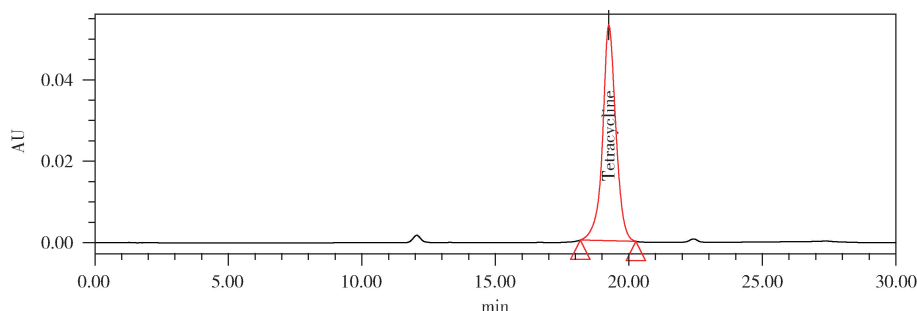


图 4 空白样品阳性添加色谱图

Fig 4 Chromatogram of positive control sample

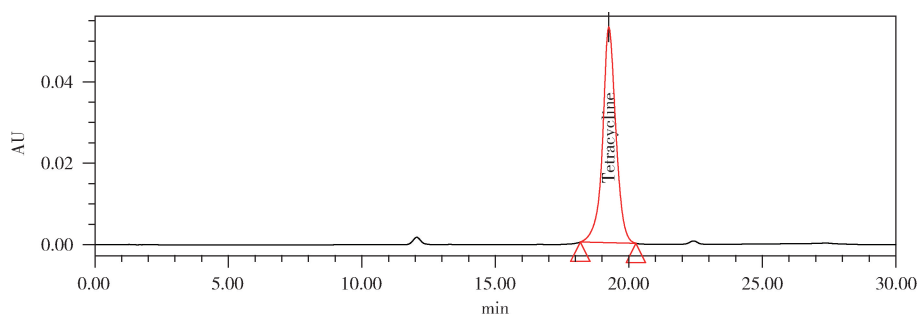


图 5 空白样品色谱图

Fig 5 Chromatogram of negative sample

2.8.1 不同柱温的考察 考察了 30 ℃、40 ℃ 和 50 ℃ 等温度下,对四环素的影响。从结果看,不同柱温下,四环素峰形及柱效均达到满意效果,但随着温度的降低,色谱峰展宽严重,所以柱温定为 40 ℃。

2.8.2 不同 pH 值的考察 流动相中 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液的 pH 值对色谱峰影响很大,考察了 2.0、2.5 和 3.0 三个不同 pH 值下的四环素色谱峰,分别称取 4-差向四环素对照品、盐酸四环素对照品和土霉素对照品,配制成每 1 mL 含各组分均

为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液进样。pH 值 2.5 和 3.0 时峰形对称性变差,且四环素与土霉素的分离度降低。考虑到柱子的耐用性,流动相 pH 值不能过低,所以采用 2.0。

2.8.3 不同柱子的考察 分别考察了 Waters Xbridge C18(5 μm, 4.6 mm × 150 mm)、phenomenex Gemini C18(5 μm, 4.6 mm × 250 mm)、Agilent ZORBAX SB-C18(5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 和 Agela Venusil MP C18(3 μm, 4.6 mm × 150 mm) 四

种色谱柱,取 2.8.2 项下混合对照品溶液进样。四种色谱柱在柱效和分离度上都能满足检测需求。

2.9 样品测定 按 2.1.2 项下供试品溶液制备方法进行处理,进高效液相色谱仪分析,按外标法以峰面积计算四环素的含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

Tab 3 Results of contents determination of samples		
编号	取样量/g	含量/%
1	0.07033	88.8
2	0.07113	87.9
3	0.07074	90.3

3 讨论

3.1 现行四环素片质量标准中含量测定采用的微生物检定法 该方法操作繁琐,试验周期长,影响因素多,结果重复性差,经验证,本试验建立的高效液相色谱法方法简单、专属强、准确度高、重现性好,适用于四环素片的含量测定。

3.2 目前中国食品药品检定研究院提供的只有盐酸四环素对照品 无四环素对照品。四环素分子式为 $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 分子量为 444.43, 盐酸四环素分子式为 $C_{22}H_{25}ClN_2O_8$, 分子量为 480.9, 所以用盐酸四环素对照品测定四环素含量, 计算结果需乘以系数 0.9242。

3.3 四环素和盐酸四环素的溶解性不同 所以进行准确性验证时, 采用四环素原料做添加回收试验, 经验证, 回收率为 100.03%。

3.4 试验所用的四环素片含量偏低 原因可能是该样品质量问题, 也可能是按照现行质量标准测定含量合格, 按照本方法测定含量不合格。

参考文献:

[1] 中国药典委员会. 兽药质量标准 (2017 年版化学药品卷) [S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary drug quality standards 2017 edition (veterinary chemical drugs volume) [S].

[2] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S].
China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part II) [S].

[3] 崔春英, 安华民, 杨淑先, 等. 实用抗生素微生物鉴定技术 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2007: 90 - 92.
Cui Ch Y, An H M, Yang Sh X, et al. Practical microbiological examination technology of antibiotics [M]. Zhengzhou: Henan science and Technology Press, 2007: 90 - 92.

[4] 胡昌勤, 刘 炜. 抗生素微生物检定法及其标准操作 [M]. 北京: 气象出版社, 2004: 161 - 166.
Hu C Q, Liu W. Microbiological assay of antibiotics and its standard operation [M]. Beijing: China Meteorological Press, 2004: 161 - 166.

[5] 黄 萍, 高 琳, 司马磊, 等. 高效液相色谱法测定四环素片含量的方法改进 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(3): 255 - 257.
Huang P, Gao L, Si M L, et al. The method improvement of determination of Tetracycline Tablets by HPLC [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2014, 29(3): 255 - 257.

[6] 刘映倩, 曾 杰, 邓贵富, 等. HPLC 法同时测定四环素可的松眼膏中四环素何醋酸可的松的含量 [J]. 中国药房, 2015, 26(30): 4274 - 4276.
Liu Y Q, Zeng J, Deng G F, et al. Simultaneous Determination of Tetracycline Hydrochloride and Cortisone Acetate in Cortisone Tetracycline Eye Ointment by HPLC [J]. China Pharmacy, 2015, 26(30): 4274 - 4276.

[7] 曹晓云, 水野左敏, 一户惠子, 等. HPLC 法测定盐酸四环素有关物质及制剂的含量 [C]. 天津市第十二色谱学术交流会论文集, 1998: 131 - 133.
Cao X Y, Satoshi M, Keiko, et al. Determination of the content of tetracycline hydrochloride related substances and preparations by HPLC [C]. The Proceedings of the twelfth Chromatography Seminar in Tianjin, 1998: 131 - 133.

[8] 邱 洪, 王宝佳, 龚 红. 高效液相色谱法测定复方四环素片中盐酸四环素含量 [J]. 中国药业, 2008, 17(23): 25 - 26.
Qiu H, Wang B J, Gong H. Determination of tetracycline hydrochloride in compound tetracycline tablets by HPLC [J]. China Pharmaceuticals, 2008, 17(23): 25 - 26.

[9] 陈建琴, 陈秋虹. HPLC 法四环素片 4 个组分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(2): 154 - 156.
Cheney J Q, Chen Q H. Determination of Four Components of Compound Tetracycline tablets by HPLC [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2010, 27(2): 154 - 156.

[10] 丘淦才, 郭智聪. 高效液相色谱法测定四环素片的含量 [J]. 中国药业, 2010, 19(11): 23 - 24.
Qiu J C, Guo Z C. Determination of tetracycline tablets by HPLC [J]. China Pharmaceuticals, 2010, 19(11): 23 - 24.

(编辑: 陈 希)