doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2022.09.07

高效液相色谱法同时测定兽药复方酮康唑软膏中的酮康唑和甲硝唑的含量

尹伶灵[1],杨志昆[1],周 晶[2],商 菲[2],张含侠[3],章安源[1],门晓冬[1],李有志[1],田成国[2],陈 玲[1*]

(1. 山东省饲料兽药质量检验中心(山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室),济南 250100; 2. 青岛欧博方医药科技有限公司,山东青岛 266114; 3. 邹平市农业农村局,山东滨州 256200)

[收稿日期] 2022－04－21　[文献标识码]A　[文章编号]1002－1280 (2022) 09－0047－05　[中图分类号]S859.83

[摘　要]　建立了同时测定兽药复方酮康唑软膏中酮康唑、甲硝唑含量的高效液相色谱(HPLC)法。采用 C_{18} 色谱柱,甲醇－水为流动相,梯度洗脱,检测波长 239 nm。结果表明,酮康唑和甲硝唑 2 种成分线性关系良好($r>0.999$)。在 3 个不同浓度水平下酮康唑和甲硝唑平均加样回收率分别为 97.8% 和 100.0%,溶液稳定性和方法重复性的 *RSD* 均小于 1%。应用该方法对三个不同厂家的样品中两种成分的含量进行了测定,结果与《兽药质量标准》(2017 年版)方法一致。本方法简便,可靠,专属性强,重现性好,为兽药复方酮康唑软膏的质量控制提供了技术支撑。

[关键词]　高效液相色谱法;兽药复方酮康唑软膏;酮康唑;甲硝唑

Simultaneous Determination of Ketoconazole and Metronidazole in Compound Ketoconazole Ointment of Veterinary Drug by HPLC

YIN Ling－ling[1], YAN Zhi－kun[1], ZHOU Jing[2], SHANG Fei[2], ZHANG Han－xia[3], ZHANG An－yuan[1], MEN Xiao－dong[1], LI You－zhi[1], TIAN Cheng－guo[2], CHEN Ling[1*]

(1. *Shandong Center for Quality Control of Feed and Veterinary Drugs* (*Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products*), *Jinan* 250100, *China*; 2. *Qindao Orbiepharm Co., Ltd.*, *Qingdao*, *Shandong* 266114, *China*; 3. *Zouping Agriculture Rural Bureau*, *Binzhou*, *Shandong* 256200, *China*)

Corresponding author: *CHEN Ling*, *E－mail*: 1969*chenling*@163.*com*

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of ketoconazole and metronidazole in compound ketoconazole ointment of veterinary drug by high－performance liquid chromatography (HPLC). Chromatography was performed on C_{18} column at 239 nm by the methanol－water as mobile phase, gradient elution. Analytical study showed that ketoconazole and metronidazole had a good linearity $r>0.999$. The average

---

作者简介: 尹伶灵,硕士,高级兽医师,从事兽药和畜禽产品质量监督检验及标准制修订工作。杨志昆,学士,高级兽医师,从事兽药质量管理与研究。尹伶灵、杨志昆为共同第一作者。

通讯作者: 陈 玲,E－mail:1969chenling@163.com

recovery rates of ketoconazole and metronidazole in three different concentrations were 97.8% and 100.0%, respectively. The *RSD* of the stability of the solution and the repeatability of the method were less than 1%. This method was applied to determine the contents of two components in samples from three different manufacturers, and the results were consistent with the method of Quality Standards for Veterinary Drugs (2017 edition). This method was simple, reliable, specific and reproducible, which provide the technical support for the quality control of compound ketoconazole ointment of veterinary drug.

Key words: HPLC; compound ketoconazole ointment of veterinary drug; ketoconazole; metronidazole

兽药复方酮康唑软膏用于治疗犬猫真菌病、厌氧菌等引起的细菌性皮肤病[1]。以酮康唑、甲硝唑为主药,加入薄荷脑、助悬剂,抗氧化剂等制成。现有检测方法收录在《兽药质量标准(2017 版)》化学药品卷,酮康唑和甲硝唑的含量是通过分别提取后,采用紫外－可见分光光度法分别测定。该方法需要分别提取,且提取方法复杂,尤其是酮康唑的测定方法,需要先用 0.1 mol/L 盐酸溶液提取 3 次,再用三氯甲烷萃取 3 次,操作繁琐,耗时久,且有机溶媒使用量大(一次检验需易制毒试剂三氯甲烷 300 多毫升)。中国药典抗真菌感染药复方酮康唑乳膏中酮康唑的含量测定采用液相色谱法[2－3],但其处方中不含甲硝唑。陆国庆等[4]曾尝试用高效液相色谱法等度洗脱同时检测酮康唑乳膏中酮康唑与甲硝唑的含量,但甲硝唑出峰时间太早,不能与溶剂峰能很好地基线分离,且制剂处方相差较大。本试验拟采用反相高效液相色谱梯度洗脱方式,同时测定兽药复方酮康唑软膏制剂中酮康唑和甲硝唑 2 种药效成分的含量,旨在为兽药复方酮康唑软膏的质量控制提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　仪器　BT125D 型电子天平(梅特勒－托利多仪器有限公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪配带二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司)。

1.2　药品与试剂　酮康唑对照品(批号:100294－201904,含量 99.8%)、甲硝唑对照品(批号:100191－200305,含量 99.6%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙醇均为色谱纯,德国默克公司生产;水为符合 GB/T 6682 标准的超纯水。

复方酮康唑软膏(批号:20210110)及软膏空白基质均由青岛欧博方医药科技有限公司提供。

1.3　色谱条件　色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C_{18} 柱(4.6×150 mm,5 μm),柱温:30 ℃,流速:1.0 mL/min;检测波长:239 nm;进样体积:10 uL,流动相为甲醇－水,梯度洗脱程序见表 1。

表 1　液相色谱梯度洗脱程序

Tab 1　HPLC gradient elution program

时间/min	甲醇/%	水/%
0	17	83
6	17	83
7	80	20
20	80	20
21	17	83
25	17	83

1.4　溶液的制备

1.4.1　对照品溶液的制备　酮康唑对照品溶液:称取酮康唑对照品约 16 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

甲硝唑对照品溶液:称取甲硝唑对照品约 32 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

混合对照品溶液:分别精密量取甲硝唑对照品溶液、酮康唑对照品溶液各 1 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加溶剂(初始比例流动相)稀释至刻度,摇匀即得(约含酮康唑 0.16 mg/mL,甲硝唑唑 0.32 mg/mL)。

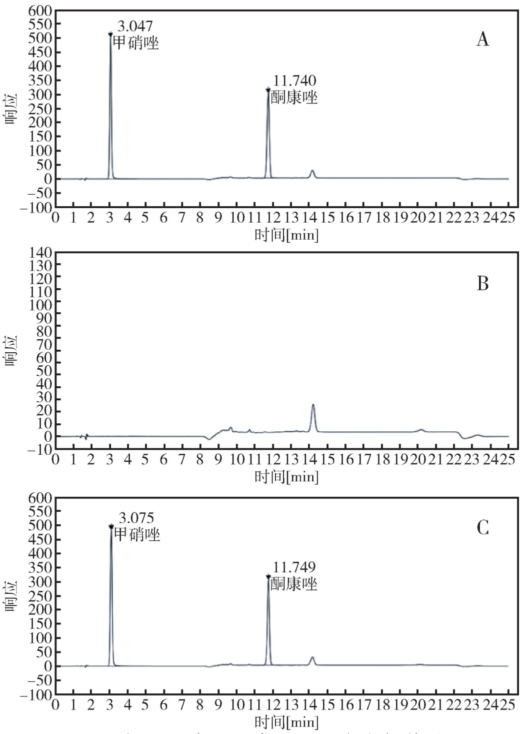
1.4.2　供试品溶液的制备　取本品约 4 g,精密称定,加无水乙醇 20 mL,置 80 ℃水浴中加热使样品全部溶解[2,5],转移移至 50 mL 量瓶中,用适量无水乙醇冲洗烧杯 3 次,放冷至室温,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀。置冰浴中冷却 2 h[6－8],过滤,弃去

初滤液(约 5 mL),取续滤液放置至室温。精密量取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,用溶剂(初始比例流动相)稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。(约含酮康唑 0.16 mg/mL;甲硝唑 0.32 mg/mL)。

1.4.3　软膏基质样品溶液的制备　取处方中除去甲硝唑、酮康唑制成的软膏基质样品,按照2.2.2项下方法制备,即得。

2　结果与分析

2.1　系统适用性试验　分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、软膏基质样品溶液各 10 μL,按 1.3 项下色谱条件进样测定。结果显示,甲硝唑峰和酮康唑峰理论板数均大于 4000,甲硝唑与酮康唑的分离度大于 25,完全分离,且基质无干扰。对照溶液、供试品溶液及软膏基质样品溶液色谱图见图 1。



A:甲硝唑、酮康唑混合对照品溶液色谱图;

B:软膏基质样品溶液色谱图;C:供试品溶液色谱图。

A: Chromatogram of metronidazole and ketoconazole mixed control substance solution;B: Chromatogram of ointment matrix sample solution;C: Chromatogram of sample solution.

图 1　HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC Chromatogram

2.2　线性关系试验　将甲硝唑、酮康唑对照品溶液,分别稀释成含甲硝唑 0.128、0.192、0.256、0.320、0.384、0.512 mg /mL,含酮康唑 0.064、0.096、0.128、0.160、0.192、0.256 mg /mL 的混合溶液(标液浓度相当于供试品含量相当于标示量的 40%、60%、80%、100%、120%、160%),照 1.3 项下色谱条件进样 10 μL,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,甲硝唑的线性回归方程为 $y = 10.014x + 40.29$, $R^2 = 0.9997$;酮康唑的线性回归方程为 $y = 15.337x + 40.505$, $R^2 = 0.9995$。表明甲硝唑在 0.128 ~ 0.512 mg/mL、酮康唑在 0.064 ~ 0.256 mg/mL 范围内,线性关系良好。

2.3　精密度试验　精密吸取含甲硝唑 0.32 mg /mL、酮康唑 0.16 mg /mL 的混合对照品溶液,按 1.3 项下色谱条件进样测定 6 次,记录色谱图。结果表明,甲硝唑峰面积的 *RSD* 为 0.2%,酮康唑峰面积 *RSD* 为 0.3%,证明本方法精密度良好。

2.4　溶液稳定性实验　取供试品溶液室温放置,分别于 0、4、8、12、18、24、36、48 h,进样测定,考察供试品溶液的稳定性。48 h 内两组分含量的 *RSD* 分别为 0.99%、0.94%,结果表明供试品溶液在 48 h内稳定。

2.5　重复性试验　精密称定复方酮康唑软膏样品(批号:20210110,实际投料量为标示量的 100%)6 份,每份约 4 g,按照 1.4.2 项下的方法制成供试品溶液,按 1.3 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以峰面积计算供试品中甲硝唑、酮康唑的含量,结果见表 2,表明本方法重复性良好。

表 2　重复性试验结果(n =6)

Tab 2　Results of repeated trials (n = 6)

样品	甲硝唑			酮康唑		
	含量/%	平均含量/%	*RSD*/%	含量/%	平均含量/%	*RSD*/%
1	100.44	100.3	0.82	99.31	99.0	0.83
2	100.80			98.98		
3	98.79			97.55		
4	100.32			99.37		
5	101.17			100.00		
6	100.01			99.03		

2.6 加样回收率试验 称取软膏基质样品共 9 份,每份约 4 g,精密加入含量相当于标示量 80%、100%、120% 的对照品溶液,按照 1.4.2 项下的方法制成供试品溶液,按 1.3 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以峰面积计算基质添加样品中甲硝唑、酮康唑的含量,计算回收率。甲硝唑平均回收率为 100.0%,*RSD* 为 0.85%,酮康唑平均回收率为 97.8%,*RSD* 为 1.28% (n=9)(表 3)。

表 3 加样回收试验结果及 *RSD*(n=9)

Tab 3 The results of recovery test and *RSD*(n=9)

样品	甲硝唑			酮康唑		
	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
80% -1	100.21			97.85		
80% -2	98.63			95.25		
80% -3	100.11			96.86		
100% -1	99.36			99.28		
100% -2	99.99	100.0	0.85	99.00	97.8	1.28
100% -3	99.04			98.17		
120% -1	101.27			98.81		
120% -2	100.33			97.21		
120% -3	100.89			98.15		

2.7 实际样品含量测定 取 3 批不同厂家的已经检验合格的报批检验样品进行复检,按照 1.4.2 项下的方法制成供试品溶液,按 1.3 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以峰面积计算供试品中甲硝唑、酮康唑的含量。结果表明,甲硝唑、酮康唑含量测定结果与《兽药质量标准(2017版)》检测结果相一致,进一步证明了该方法的准确性(表 4)。

表 4 不同生产厂家样品含量测定结果

Tab 4 Determination results of samples from different manufacturers

样品批号	本方法测定样品含量		标准方法测定样品含量	
	酮康唑/%	甲硝唑/%	酮康唑/%	甲硝唑/%
202108241	102.5	101.1	102.8	100.6
202009231	103.9	104.2	104.3	103.8
202107211	105.2	103.3	104.8	102.8

3 讨 论

3.1 色谱条件的选择 对于检测波长的选择,用乙醇做溶剂时,甲硝唑和酮康唑两种组分的紫外吸收图谱见图 2。通过二极管阵列检测器,全波长扫描采集图谱后,提取色谱图,最终确定采集波长为 239 nm,由图 2 可以看出在该波长下甲硝唑和酮康唑均有一定的紫外吸收。二极管阵列检测器中峰纯度检测表明,甲硝唑峰和酮康唑峰峰纯度均在 995 以上,证明该波长和色谱条件下辅料不干扰主成分检测。复方酮康唑软膏中含有较复杂的基质,且不同生产厂家的基质组成不同,因此在供试品测定过程中应避免空白基质峰对样品峰的影响。流动相选择的过程中,通过参考文献[2,9],最终选择甲醇 - 水体系,梯度洗脱方式,甲硝唑和酮康唑实现了很好的分离,且基质无干扰。与陆国庆等[4]所采用的等度洗脱方式相比,该方法专属性更好,因甲硝唑和酮康唑极性差别大,在液相色谱柱上的保留差别比较大,不适合等度条件下检测。

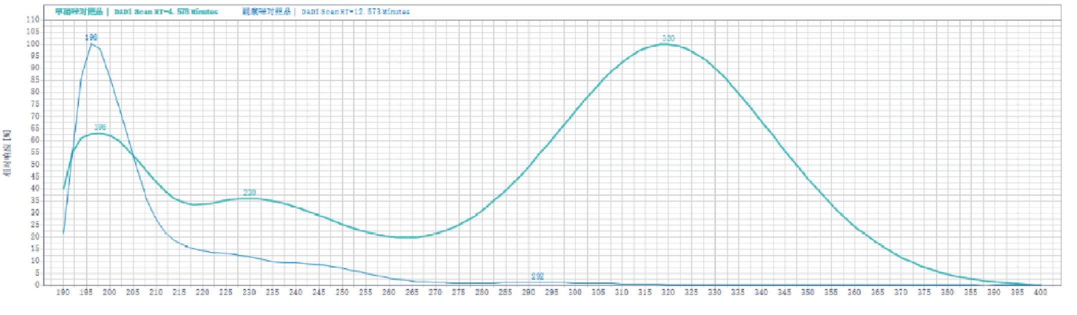


图 2 甲硝唑、酮康唑紫外光谱叠加图谱

Fig 2 Overlay ultraviolet spectrum of metronidazole and ketoconazole

3.2　提取溶剂的选择　考虑到软膏的油性基质[10-11]，为了提高甲硝唑、酮康唑两种主成分的提取效率，参考文献[2,5]，本实验选择了对软膏基质和甲硝唑、酮康唑均有一定溶解性，且对操作人和环境友好的乙醇作为提取溶剂。通过对提取溶剂体积、加热温度和时间以及冷却时间的考察，最终确定样品置80 ℃水浴中加热5 min，振摇，能够使基质全部溶散，甲硝唑、酮康唑提取完全。冰浴冷却又可以使基质冷凝沉淀去除干扰，让测定的专属性更强。

本文建立了同时测定兽药复方酮康唑软膏中酮康唑、甲硝唑含量的高效液相色谱(HPLC)法，采用 C_{18} 色谱柱，甲醇-水为流动相梯度洗脱，检测波长239 nm。该方法与原标准方法相比，显著缩短了检验周期，减少了有机溶媒的使用，且操作简单，分离度好，准确性高，重现性好，为该制剂的质量控制提供了技术支撑。

参考文献：

[1] 中国兽药典委员会，兽药质量标准(化学药品卷)[S]. 北京：中国农业出版社，2017，149-150.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee，Quality Standards for Veterinary Drugs (Chemical Drugs Volume)[S].. Beijing：China Agricultural Press，2017，149-150.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1733.
Chinese Pharmacopoeia Commission，Pharmacopoeia of the People′s Republic of China (Part 2)[S]. Beijing：China Medical Science and Technology Press，2020：1733.

[3] 吴博，王铁柱，拜年，等. 反相高效液相色谱法同时测定复方酮康唑软膏中三组分的含量[J]. 药学实践杂志，2021，39(2)，152-156.
Wu B，Wang T Z，Bai N，*et al*. Determination of three constituents in compound ketoconazole ointment by RP HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Practice 2021，39(2)，152-156.

[4] 陆国庆，胡婷婷，孙伟张，等. HPLC法测定酮康唑乳膏中酮康唑和甲硝唑的含量[J]. 西南军医，2005，7(3)，7-9.
Lu G Q，Hu T T，Sun W Z，*et al*. HPLC Determination of Ketoconazole and Metronidazole in Ketoconazole Cream[J]. Journal of Military Surgeon in Southwest China Jun，2005，7(3)，7-9.

[5] 吕丹丹，张含智，杨金延，等. 液相色谱结合液质联用法测定酮康唑原料药及复方酮康唑软膏中的有关物质[J]. 中国抗生素杂志，2021，46(7)，686-693.
Lü D D，Zhang H Z，Yang J Y，*et al*. Analysis of the related substances in ketoconazole bulk sample and compound ketoconazole cream by HPLC and HPLC-MS[J]. Chinese Journal of Antibiotics，2021，46(7)，686-693.

[6] 霍旺，赵振兴，赵磊，等. 复方甲诺尿素乳膏中甲硝唑和尿素含量的测定[J]. 中国医药导刊，2021，23(11)，857-860.
Huo W，Zhao Z X，Zhao L，*et al*. The Determination of Metronidazole and Urea in Compond Metronidazole Urea Cream[J]. Chinese Journal of Medicinal Guide，2021，23(11)，857-860.

[7] 游殷媛，李玉兰，陈桂红. 高效液相色谱法同时测定复方地克软膏中3组分的含量[J]. 中国医药科学，2021，11(11)，64-67.
You Y Y，Li Y L，Chen G H. Simultaneous determination of three components in compound Dike ointment by HPLC[J]. CHINA MEDICINE AND PHARMACY，2021，11(11)，64-67.

[8] 张荣琴. HPLC法测定复方苯甲酸软膏中苯甲酸和水杨酸的含量[J]. 实验与检验医学，2019，37(1)，48-50.
Zhang R Q. Determination of benzoic acid and salicylic acid in compound benzoic acid ointment by HPLC[J]. Experimental and Laboratory Medicine，2019，37(1)，48-50.

[9] 中国兽药典委员会，兽药质量标准(化学药品卷)[S]. 北京：中国农业出版社，2017，53-54.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee，Quality Standards for Veterinary Drugs (Chemical Drugs Volume)[S].. Beijing：China Agricultural Press，2017，53-54.

[10] 喻超. 软膏剂制备及含量测定的研究进展[J]. 广东化工，2017，44(16)，174-175.
Yu Chao. The Research Progress of Ointment Preparation and Content determination[J]. Guangdong Journal of Chemical Industry，2017，44(16)，174-175.

[11] 罗超，罗越，周琳，等. 软膏剂制备及皮肤安全性的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医，2015，(11)，75-77.
Luo C，Luo Y，Zhou L，*et al*. Research progress of ointment preparation and skin safety[J]. Heilongjiang Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine，2015，(11)，75-77.

(编　辑：侯向辉)