

HPLC - UV 与 HPLC - ELSD 测定环丙沙星含量之比较

乔成孝¹ 裴朝玉² 陈晓刚³ 方国波¹

(1.南开大学生命科学学院 天津 300071)

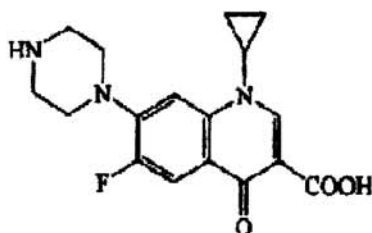
(2.周口师范学院化学系 河南周口市 466000)

(3.天津市琛航科技有限公司 天津 300070)

摘要 目的:探讨利用 HPLC - 紫外检测器(UV)和 HPLC - 蒸发光散射检测器(Evaporative light scattering detector, ELSD)测定乳酸环丙沙星氯化钠注射液中环丙沙星含量,比较两种检测方法的优劣。方法:色谱条件为:色谱柱:Kromasil C-18, 5 μ , 250 \times 4.6 mm;流动相:三氟乙酸:乙腈 = 80:20 (V/V);流速:1 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:277 nm;蒸发光散射检测器条件:雾化温度 30 $^{\circ}$ C, 漂移管温度 65 $^{\circ}$ C。结果:环丙沙星注射液中的各种成分在上述色谱条件下能完全分离,分析时间仅需 20 min;两种测定方法结果一致。结论:紫外检测器更加灵敏和稳定,而蒸发光散射检测器则适用于更多的物质。

关键词 高效液相色谱法 紫外检测器 蒸发光散射检测器 环丙沙星

环丙沙星是第三代氟喹诺酮类药物,属于广谱抗菌药,药物中通常以盐酸或乳酸盐形式存在^[1],其化学式为:



C₁₇H₁₈FN₃O₃ 331.34

制剂中氟喹诺酮的浓度是评价药物质量的重要标准,因此,对其浓度的准确测定尤其重要。紫外检测器是应用比较普遍和非常成熟的检测器,但是只适用于有生色基团的物质,蒸发光散射检测器是近些年发展起来的一种质量检测器,还处于不断完善中,几乎对所有物质都适用,但是要求流动相中不能含有盐类物质。在微量分析中,这两种检测器都有着重要作用,对于两种检测器都适用的物质,结果的测定是否有差异还有待考察。本文通过两种检测器对环丙沙星含量进行测定,进而对两种方法进行比较。

1 材料与试剂

1.1 仪器

Lab Alliance PC2000 HPLC SYSTEM (包括 series III 型单元泵和 Model 500 紫外/可见可变波长检测器); SoftA ELSD Model 200 型蒸发光散射检测器; EZchrom 工作站。

1.2 药品与试剂

环丙沙星标准品(ciprofloxacin, 含量 84.9%, 由中国药品生物制品检定所提供); 乳酸环丙沙星氯化钠注射液(100 mL:0.2 g) (国内某厂家产品); 乙腈(色谱纯); 三氟乙酸; 超纯水(南开大学生命科学院中心实验室提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C-18, 5 μ , 250 \times 4.6 mm; 流动相:三氟乙酸:乙腈 = 80:20^[2]; 流速:1 mL/min; 柱温:25 $^{\circ}$ C; 检测波长:277 nm^[1]; 蒸发光散射检测器条件:雾化温度 30 $^{\circ}$ C, 漂移管温度 65 $^{\circ}$ C; 进样量:10.0 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的配制 取环丙沙星标准品,精密称量,用超纯水溶解,配制 0.02 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL 的溶液各一份。

2.2.2 供试品溶液 取三种不同批次的乳酸环丙沙星氯化钠注射液(100 mL:0.2 g)。

2.3 系统适应性试验

2.3.1 在上述色谱条件下,取对照品溶液和供试品溶液进样。在 UV 检测器下出峰单一;在 ELSD 检测器下“环丙沙星”与“氯化钠”等其他物质分离效果好,均不影响其含量测定。色谱图(见图 1~4)。

2.3.2 重复性试验 平行配制 6 份供试品溶液(UV 为 0.1 mg/mL, ELSD 为 0.5 mg/mL), 分别进样,以环丙沙星峰面积计算,考察方法重复性(见表 1)。

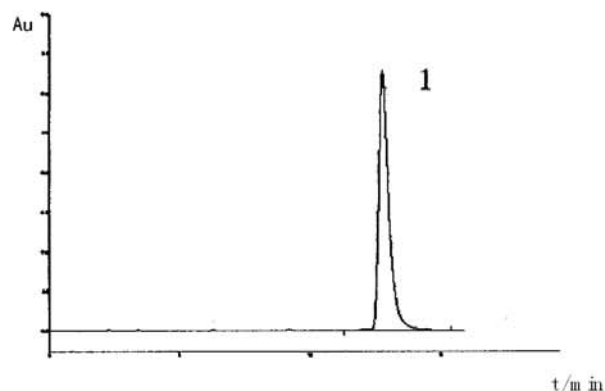


图1 环丙沙星标准品(UV)

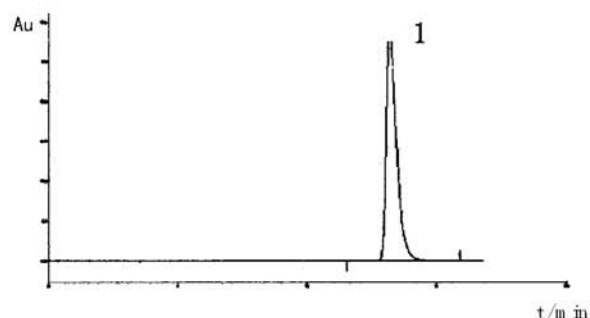


图2 环丙沙星供试品(UV)

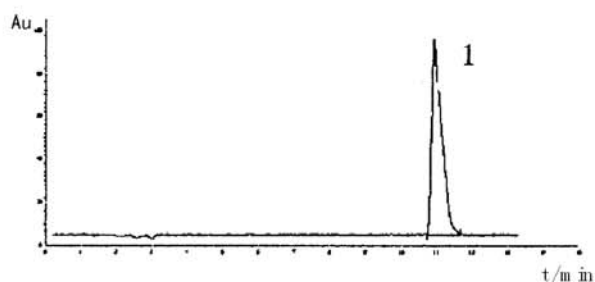


图3 环丙沙星标准品(ELSD)

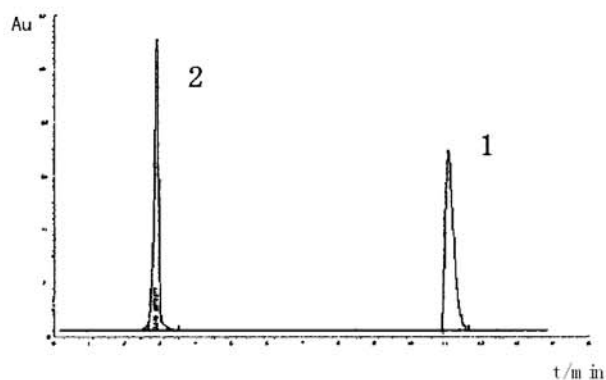


图4 环丙沙星供试品(ELSD)
1.环丙沙星 2.氯化钠等其他物质

表1 重复性比较

	面积			RSD (%)
UV	16011104	15847038	16244668	1.65
	15862406	16323391	16503993	
	1777693	1742448	1703642	
ELSD	1777693	1742448	1703642	1.88
	1750023	1779663	1794448	

2.3.3 线性关系考察 (1) 紫外检测器:取

0.02mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1mg/mL, 0.15mg/mL, 0.2 mg/mL 的对照品溶液各一份, 分别进样 10 μL, 以峰面积为横坐标, 以浓度为纵坐标作图, 考察对照品响应因子的线性范围(见表2)。

表2 紫外检测器线性关系考察

编号	1	2	3	4	5
峰面积	3128810	7912770	15847038	22925716	31333804
浓度(μg/mL)	20	50	100	150	200

得线性方程 $y = 6 \times 10^{-6}x - 0.5022$, $R^2 = 0.9994$, 结果表明, 对紫外检测器而言, 在 0.02 ~ 0.2 mg/mL 范围内, 线性关系良好。(2) 蒸发光散射检测器: 取 0.2mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL, 2.0 mg/mL 的对照品溶液各一份, 分别进样 10 μL。由于 ELSD 的响应值与浓度并非呈简单的线性关系, 而是其响应值与浓度的对数呈良好的线性关系(见表3)。其响应值受到多种因素影响, 所以其定量计算时通常采用随行标准曲线法⁸⁾。

表3 蒸发光散射检测器线性关系考察

编号	1	2	3	4	5
峰面积	628781	932138	1742449	3709112	8818607
峰面积对数值	5.7985	5.96948	6.24116	6.56927	6.9454
浓度(μg/mL)	200	300	500	1000	2000
浓度对数值	2.30103	2.47172	2.69897	3	3.30103

得线性方程 $y = 0.8709x - 2.7361$, $R^2 = 0.9991$, 结果表明, 对蒸发光散射检测器而言, 在 0.2 ~ 2.0 mg/mL 范围内, 线性关系良好。

2.3.4 最低检出限 以信噪比 3:1 为指标, 考察方法最低检出限。UV 的最低检出限约为 30ng/mL, ELSD 的最低检出限约为 400ng/mL。

2.3.5 回收率测定 取环丙沙星标准品适量, 精密称定, 紫外检测器配制成 0.05mg/mL, 0.1mg/mL, 0.2mg/mL; 蒸发光散射检测器配置成 0.3mg/mL, 0.5mg/mL, 1.0mg/mL, 每个浓度各配制成三份。测定回收率结果(见表4,5)。

表4 紫外检测器回收率测定

已知浓度(μg/mL)	峰面积	实测浓度	回收率(%)	平均回收率(%)
50	7912770	46.97	93.9	95.1
	8025120	47.65	95.3	
	8084174	48.00	96.0	
100	15847038	94.58	94.6	94.9
	15862466	94.67	94.7	
	16011104	95.56	95.6	
200	31333804	187.50	93.8	94.9
	31643638	189.36	94.6	
	32244130	192.96	96.5	

注: 以上表中浓度单位均为 μg/mL

表5 蒸发光散射检测器回收率测定

已知浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	峰面积	实测浓度	回收率(%)	平均回收 率(%)
300	5.96948	290.2	96.7	96.0
	5.96691	288.7	96.2	
	5.96055	285.1	95.0	
500	6.22116	478.0	95.6	95.5
	6.21390	473.8	94.8	
	6.22471	481.4	96.3	
1000	6.56927	966.2	96.6	96.0
	6.56739	962.6	96.3	
	6.56142	951.1	95.1	

注:以上表中浓度单位均为 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3 样品的测定

将供试品原液分别稀释 20 倍(紫外检测器 $0.1\text{mg}/\text{mL}$)和 4 倍(蒸发光散射检测器 $0.5\text{mg}/\text{mL}$)进行测定(结果用百分数表示)。

表6 含量结果测定

批号	HPLC - UV (%)	HPLC - ELSD (%)
050817	96.5	96.3
050818	95.5	95.3
050819	95.9	97.2

4 讨论

由蒸发光散射检测器的原理可以看出,流动相只能选择易于挥发性物质,否则会影响到物质的检测,因此在本实验中,流动相的配制选择三氟乙酸的乙腈水溶液。

从两种检测器的最低检出限可以很明显的看出

紫外检测器比蒸发光检测器灵敏的多,可见蒸发光散射检测器在灵敏度方面还有待于改进。

由图 1~4 分析出蒸发光散射检测器可以检测到紫外检测器检测不到的物质。紫外检测器只可以检测到具有紫外吸收的物质,而 ELSD 最大的优越性在于能检测不含发色团的化合物,如:碳水化合物、脂类、聚合物、未衍生脂肪酸和氨基酸、表面活性剂、药物,并在没有标准品和化合物结构参数未知的情况下检测未知化合物。

由于蒸发光散射检测器和紫外检测器在应用上有各自的局限性,因此对于检测器类型的选择,应考虑到所分离物质的理化性质以及系统要求。

参考文献

- 1 潘莹,江海燕,吴小燕. 乳酸环丙沙星原料药的含量测定方法探讨, *Guangxi Medical Journal*, Aug1 2003, 125 (18): 1384~1386
- 2 洪建文,胡昌勤,盛龙生. 喹诺酮类抗生素在蒸发光散射检测器中响应因子的一致性考察, *药学报 Acta Pharmaceutica Sinica* 2003, 38 (9): 695~697
- 3 于华生,郑一赛,陈婕. HPLC - ELSD 法测定硫酸西索米星氯化钠注射液中西索米星含量, *海峡药学*, 2004, 16 (6): 41
- 4 朱业晋,张旻杰. HPLC - ELSD 在药物分析中的应用进展, *赣南师范学院学报*, 2003, 6: 39~41
- 5 王明娟,胡昌勤,金少鸿. 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法分析庆大霉素 C 组分, *药物分析杂志*, 2002, 22 (6): 461~464

The comparison of determination of ciprofloxacin by HPLC - UV and HPLC - ELSD

Qiao Chengxiao¹ Pei Chaoyu² Chen Xiaogang³ Fang Guobo¹

(1. College of Life Science, NanKai University, Tianjin 300071)

(2. Department of Chemistry, Zhoukou Normal University, Henan 466000)

(3. Tianjin Science and Technology Instrument Co. Ltd, Tianjin 300070)

Abstract Objective: To approach an assay of determination of ciprofloxacin in Ciprofloxacin Lactate and Sodium Chloride Injection by HPLC - UV and HPLC - ELSD methods. Make a comparison between the two different methods. Methods: The separation was performed on a Kromasil C-18 column ($5\mu\text{m}$, $250\times 4.6\text{mm}$). The mobile phase consists of trifluoroacetic acid (0.1%) - acetonitrile (80:20) at a flow rate of $1.0\text{mL}/\text{min}$. Determination wavelength: 277nm . An evaporative light-scattering detector (ELSD) Model 200 (SoftA, USA) was used, its parameters were set as follows: spray temperature at 30°C , drift tube temperature at 65°C . Results: Good separation of Ciprofloxacin and related substances can be achieved respectively under the two chromatographic system only in 20 minutes. The two methods could give the same determination. Conclusion: The UV detection is more sensitive and more steady, and ELSD detection could be used in determination of more substances.

Key words HPLC UV ELSD Ciprofloxacin Content determination