

HPLC法同时测定替硝唑螺内酯乳膏中替硝唑和螺内酯的含量^Δ

彭贤东*,唐志立#,龙凤,曾友志,李勇(南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院药学部,四川南充637000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0468-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.31

摘要 目的:建立同时测定替硝唑螺内酯乳膏中替硝唑和螺内酯含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS-2 C₁₈,流动相为乙腈-水(50:50),流速为1.0 ml/min,检测波长为238 nm,柱温为30 ℃。结果:替硝唑和螺内酯线性范围分别为40.11~481.32、6.07~72.84 μg/ml(*r*分别为0.999 7和0.999 9);平均回收率分别为100.72%(RSD=0.70%)和101.27%(RSD=1.00%)。结论:所建立的方法简便、准确、重复性好,可为制订替硝唑螺内酯乳膏的质量标准和产品质量控制提供依据。

关键词 高效液相色谱法;替硝唑;螺内酯;含量测定

Simultaneous Determination of Tinidazole and Spironolactone in Tinidazole and Spironolactone Cream by HPLC

PENG Xian-dong, TANG Zhi-li, LONG Feng, ZENG You-zhi, LI Yong (Dept. of Pharmacy, Nanchong Municipal Central Hospital & The Second Clinical School of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of tinidazole and spironolactone in Tinidazole and spironolactone cream. METHODS: HPLC method was adopted. Hypersil ODS-2 C₁₈ column was adopted with acetonitrile-water (50:50) as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min and the detection wavelength of 238 nm. The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges for tinidazole and spironolactone were 40.11-481.32 μg/ml (*r*=0.999 7) and 6.07-72.84 μg/ml (*r*=0.999 9). The average recovery rates were 100.72% (RSD=0.70%) and 101.27% (RSD=1.00%), respectively. CONCLUSIONS: The method is proved to be simple, accurate and reproducible, and it can be used for the setting of quality specifications and quality control of Tinidazole and spironolactone cream.

KEY WORDS HPLC; Tinidazole; Spironolactone; Content determination

寻常痤疮是皮肤科最常见的慢性炎症性毛囊皮脂腺疾病,好发于青春期的男性和女性,男性略多于女性,但女性发病年龄早于男性。流行病学研究^[1]表明,80%~90%的青少年患过痤疮,青春过后往往能自然减轻或痊愈,个别患者可迁延至30岁以上。根据临床需要,针对其发病机制,本院自主研发了替硝唑螺内酯乳膏,其主要成分为替硝唑和螺内酯。替硝唑为硝基咪唑衍生物,具有抗厌氧菌及抗原虫感染的作用。螺内酯为甾体类抗雄激素类药,弱效保钾利尿剂;可抑制激素生成酶的活性,减少雄激素的产生;还可直接作用于皮脂腺,与二氢睾酮竞争雄激素受体;其结合能力是二氢睾酮的10~20倍,可阻止二氢睾酮与雄激素受体的结合,从而抑制皮脂腺的分泌。因此二者联用可产生协同作用,具有抗菌、抑制皮脂分泌等功效,用于治疗寻常痤疮疗效显著^[2]。该制剂已获得四川省医疗机构制剂临床研究批件(批件号:ZJL2011004)。有关替硝唑或螺内酯的含量测定方法已有较多文献^[3-7]报道,其中复方制剂多用高效液相色谱(HPLC)法测定,但目前未见采用HPLC法同时测定乳膏中替硝唑和螺内酯含量的文献报道。为此,笔者通过试验建立了以HPLC法同时测定该制剂中替硝唑和螺内酯含量的方法。方法学考察结果表明,所建立

的含量测定方法稳定、可靠、简便、重复性好,可为制订替硝唑螺内酯乳膏的质量标准和产品质量控制提供依据。

1 材料

HPLC仪,包括7125六通阀定量进样器、303型高压泵、HM型紫外检测器、Gilson714色谱工作站(法国Gilson公司);UV-860紫外-可见分光光度计(法国康强公司);BP211D分析天平(德国Sartorius公司)。

替硝唑对照品(批号:100336-200703,纯度:99.8%)、螺内酯对照品(批号:100193-199601,纯度:99.8%)均由中国食品药品检定研究院提供;替硝唑螺内酯乳膏(本院自制,批号:110328、110329、110330,规格:每盒20g,含替硝唑400mg、螺内酯60mg);乙腈为色谱纯,水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS-2 C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(50:50),流速:1.0 ml/min;检测波长:238 nm;进样量:20 μl;柱温:30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液。分别精密称取替硝唑、螺内酯对照品80.22、12.14 mg,置于50 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密吸取上述溶液5 ml,置于50 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液。取本品2 g(约含替硝唑40 mg、螺内酯6 mg),精密称定,加入流动相适量,于60 ℃水浴提取,用流动相分次洗涤容器,并入100 ml量瓶中,放冷,加流动相稀释至刻

^Δ 基金项目:南充市2008年度应用技术研究及开发资金项目资助(No.N2008-SF015)

* 副主任药师。研究方向:药物分析及制剂。电话:0817-8184015。
E-mail:pxd0905@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0817-2243048。
E-mail:1003955916@qq.com

度,摇匀;置于冰浴中冷却2 h,以0.45 μm的滤膜过滤,放至室温;精密量取续滤液10 ml,置于25 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 空白样品溶液。按处方比例制备不含替硝唑和螺内酯的空白基质,按“2.2.2”项下方法操作,制得空白样品溶液。

2.3 系统适用性及专属性考察

分别取“2.2”项下空白样品溶液、对照品溶液、供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,进样测定。结果,替硝唑、螺内酯的保留时间分别为2.9、7.8 min,理论板数分别为3 600、6 000,分离度为8.93,替硝唑峰、螺内酯峰与其他峰分离度>3.0。在检测波长238 nm处,空白基质不干扰替硝唑和螺内酯的含量测定。色谱见图1。

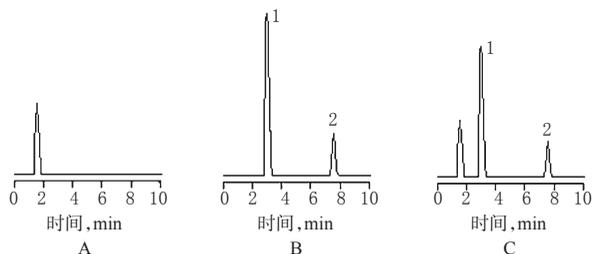


图1 高效液相色谱图

A.空白样品;B.对照品;C.供试品;1.替硝唑;2.螺内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank sample; B. substance control; C. test sample; 1. tinidazole; 2. spirinolactone

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液,加流动相分别制备成含替硝唑和螺内酯质量浓度分别为40.11、80.22、120.33、160.44、240.66、320.88、481.32和6.07、12.14、18.21、24.28、36.42、48.56、72.84 μg/ml的溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归,得替硝唑、螺内酯回归方程分别为 $A=1\ 815.5c+17\ 799.5$ ($r=0.999\ 7, n=7$)、 $A=6\ 246.7c+1\ 340.8$ ($r=0.999\ 9, n=7$)。结果表明替硝唑、螺内酯检测质量浓度的线性范围分别为40.11~481.32、6.07~72.84 μg/ml。

2.5 精密密度试验

精密量取替硝唑质量浓度分别为120.33、160.44、240.66 μg/ml,螺内酯质量浓度分别为18.21、24.28、36.42 μg/ml的对照品溶液,依法进样测定峰面积,分别于同日内测定5次计算日内RSD;每日测定1次,连续测定5 d计算日间RSD。结果,3种浓度峰面积的日内RSD替硝唑分别为0.83%、0.91%、0.58% (平均RSD=0.77%, $n=5$),螺内酯分别为1.13%、0.94%、0.79% (平均RSD=0.95%, $n=5$);日间RSD替硝唑分别为0.92%、0.89%、0.75% (平均RSD=0.85%, $n=5$),螺内酯分别为1.12%、0.97%、0.93% (平均RSD=1.01%, $n=5$)。表明本方法精密密度良好。

2.6 重复性试验

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,对同一批样品(批号:110328)重复操作6次,按“2.1”项下色谱条件,测定其含量。结果,替硝唑、螺内酯含量的RSD分别为0.72%、0.67% ($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.7 稳定性试验

取批号为110328的样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、6、8、16、24 h各进样20 μl。结果,替硝唑

和螺内酯峰面积的RSD分别为0.82%和0.93% ($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 回收率试验

分别精密称取替硝唑、螺内酯对照品适量,加入处方比例的空白乳膏基质,配制相当于处方量80%、100%、120%的样品各3份,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备成供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算其回收率。结果,替硝唑、螺内酯的平均回收率分别为100.72%、101.27%,RSD分别为0.70%、1.00% ($n=9$),详见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)

组分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
替硝唑	32.12	32.47	101.09	100.72	0.70
	31.89	31.85	99.87		
	32.03	32.57	101.69		
	40.07	40.27	100.50		
	40.12	40.54	101.05		
	40.02	39.89	99.68		
	47.92	48.04	100.25		
	48.13	48.53	100.83		
	48.07	48.81	101.54		
螺内酯	4.79	4.86	101.46	101.27	1.00
	4.83	4.93	102.07		
	4.76	4.84	101.68		
	6.22	6.21	99.84		
	6.06	6.18	101.98		
	6.14	6.12	99.67		
	7.16	7.35	102.65		
	7.27	7.32	100.69		
	7.21	7.31	101.39		

2.9 样品含量测定

取3批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件,分别精密量取供试品溶液和对照品溶液20 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Content determination of samples ($n=3$)

批号	替硝唑		螺内酯	
	占标示量百分比,%	RSD,%	占标示量百分比,%	RSD,%
110328	100.2	0.74	100.8	0.65
110329	102.7	0.64	104.2	0.71
110330	102.4	0.77	101.2	0.61

3 讨论

取替硝唑、螺内酯对照品适量,加流动相分别制成质量浓度为160、24 μg/ml的溶液,用紫外-可见分光光度计在200~400 nm波长内进行紫外扫描。结果,替硝唑最大吸收波长在310 nm附近,螺内酯最大吸收波长为238 nm。考虑到处方中替硝唑和螺内酯的质量比为20:3,而替硝唑在238 nm波长处的吸收也较强,故选择螺内酯的最大吸收波长238 nm为测定波长。在此波长下,检测结果可完全满足测定要求。

笔者曾以甲醇-水(70:30)为流动相,结果替硝唑出峰时间太短且与杂质峰不能较好分离。以0.02 mol/L磷酸氢二铵-乙腈(45:55)为流动相,结果出峰也较快,替硝唑峰、螺内酯峰的对称性不佳。按文献^[7]以0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH值至3.5)-甲醇(80:20)、0.025 mol/L磷酸二氢钾溶液(用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至6.5)-甲醇(40:60)2

Cajal间质细胞与胃肠动力关系的研究进展^Δ

肖开春^{1*}, 童荣生^{1,2#} (1.西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2.四川省医学科学院/四川省人民医院, 成都 610072)

中图分类号 R95;F714 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0470-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.32

摘要 目的:综述Cajal间质细胞(ICC)与胃肠动力学的关系。方法:就ICC的主要形态学、分布特点、生理功能及其与胃肠动力关系的研究进行综述。结果与结论:ICC有可能作为特异性治疗或药物的靶细胞。有关ICC的兴奋和抑制性神经反应是如何传到邻近平滑肌细胞、起搏机制等问题还需要进一步研究。在细胞水平研究中中药对ICC功能、结构的作用,有可能为中医药治疗胃肠动力障碍性疾病提供量化、客观的指标。

关键词 Cajal间质细胞;胃肠动力;起搏细胞;神经传递;综述

1893年,西班牙神经解剖学家Cajal发现并描述了胃肠道存在的一种特殊间质细胞,后来被命名为Cajal间质细胞(Interstitial cells of Cajal, ICC)。ICC都要表达c-kit基因,c-kit是原癌基因,分别位于人的4号染色体和小鼠5号染色体W位点上。c-kit编码Kit受体,即酪氨酸激酶受体,Kit受体的天然配体是干细胞因子(Stem cell factor, SCF)^[1]。在胃肠道中仅有ICC和肥大细胞是c-kit阳性细胞,ICC用甲苯胺蓝染色后不呈现异染性,而肥大细胞被染色后呈红紫色,可以区别两者。研究表明,ICC是调节胃肠动力的重要细胞,与某些胃肠疾病有着一定联系。ICC是胃肠运动的起搏细胞,具有产生并传播慢波的功能,慢波(Slow wave, SW)亦称基本电节律,是在胃肠平滑肌记录到膜电位自发、缓慢的节律性去极化波。ICC自发产生慢波并传播至平滑肌细胞,调控胃肠平滑肌的收缩节律;同时ICC参与胃肠道的神经信号传递,还具有牵张传感器的功能。本文就ICC的主要形态学、分布特点、生理功能及其与胃肠动力关系的研究进行综述。

1 ICC的形态学特征、分类及分布

1.1 ICC的形态学特征

光镜下成熟期ICC的典型特征:细胞核大,呈卵圆形,核周细胞质较少;胞质向不同方向发出2~5个细长的细胞突起,长度≥100 μm,并形成二级、三级分支突起,使ICC呈纺锤形或

星形。电镜下ICC具有以下超微结构特点:①细胞质含有大量的线粒体、发达的粗面及滑面内质网;②有许多微管、中间丝、细肌丝,而无粗肌丝;③具有基底膜、膜内陷小凹(Caveolae);④ICC相互间及其与平滑肌细胞间可见缝隙连接(Gap junctions)^[2]。

1.2 ICC在消化道中的分类及分布

ICC分类方法很多,无统一分类。依据其存在的位置可归纳为以下几类^[3]:①黏膜下丛ICC(Submucosal ICC, ICC-SM),位于胃窦、结肠黏膜下结缔组织与环状肌层表面之间;②深肌丛ICC(Deep muscular plexus ICC, ICC-DMP),位于小肠环状肌层较薄的内层和较厚的外层之间;③肌内ICC(Intramuscular ICC, ICC-IM),存在于环状肌和纵行肌内,即环肌内ICC、纵肌内ICC(ICC-CM、ICC-LM)2类,分布在食管、胃和大肠;④肌间ICC(Myenteric ICC, ICC-MY),位于环状肌层和纵行肌层之间,遍及胃、小肠和大肠;⑤浆膜下ICC(Subserosal ICC, ICC-SS),存在于结肠浆膜下层,其功能不清楚。

2 ICC调控胃肠动力的功能

2.1 ICC是起搏细胞

研究证实,胃肠道无论是纵行肌还是环行肌细胞均不具有产生SW的能力^[4]。采用膜片钳技术研究离体培养的小肠ICC,发现ICC自发产生节律性电活动,其静息膜电位为-80~-70

种流动相分别测定替硝唑和螺内酯的含量,结果替硝唑、螺内酯的保留时间分别为6.9、10.6 min,替硝唑峰的对称性较好,而螺内酯峰的对称性不佳,且2种流动相均含有缓冲液,易导致组分保留值变化,造成色谱系统不稳定。而选用0.05 mol/L磷酸二氢钾(用磷酸调pH至3.5)-乙腈(50:50)、乙腈-水(50:50)为流动相进行比较,所得的峰形基本相同,替硝唑峰、螺内酯峰与其他峰均能较好分离。最终选择乙腈-水(50:50)为流动相及溶剂,替硝唑峰、螺内酯峰与其他峰分离度>3.0,且不拖尾,保留时间恒定,既减少了系统干扰,又降低了对色谱柱的损害。

本方法分别测定2种成分的含量较文献^[7]中的方法更简便、快速,测定结果准确、可靠,适用于该制剂的质量控制。

参考文献

Δ 基金项目:四川省科技支撑计划资助项目(No.2011F20068)
* 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail: xkcde@126.com
通信作者:主任药师,教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:临床药学、医院药学。电话:028-87393485。E-mail: tongrs@126.com

[1] 赵辨.中国临床皮肤病学[M].1版.南京:江苏科学技术出版社,2009:1 165.
[2] 彭贤东,唐志立,龙凤,等.替硝唑螺内酯乳膏治疗寻常痤疮62例[J].中国药业,2010,19(17):77.
[3] 邓水德.高效液相色谱法测定复方替硝唑凝胶中两组分的含量[J].中国医院药学杂志,2004,24(10):652.
[4] 刘晋华,李建新,李冬梅,等.高效液相色谱法测定复方替硝唑搽剂中替硝唑和水杨酸的含量[J].药物分析杂志,2000,20(5):329.
[5] 王菊荣,王月军,叶勇,等.HPLC法测定复方药物微乳膏中螺内酯的含量[J].药物分析杂志,2006,26(12):1 883.
[6] 李超,张勉.HPLC法测定螺内酯片的含量[J].中国药房,2010,21(17):1 610.
[7] 彭贤东,唐志立,龙凤,等.替硝唑螺内酯乳膏的制备及质量控制[J].中国药业,2010,19(5):34.

(收稿日期:2012-03-28 修回日期:2012-04-24)