

反相高效液相色谱法测定壳糖止血海绵中诺氟沙星和盐酸利多卡因的含量

王曙东, 潘璟, 方李, 夏曙辉, 宋炳生 (南京军区南京总医院制剂科, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的 建立反相高效液相色谱法测定壳糖止血海绵中诺氟沙星和盐酸利多卡因含量的测定方法。方法 采用 Hederar-ODS-3 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈 - 1% 磷酸溶液 (12: 88) 为流动相, 三乙胺调节 pH 3.0 ± 0.1, 检测波长为 254 nm。结果 诺氟沙星和盐酸利多卡因在 0.025~0.100 mg/ml 浓度范围内均有良好线性关系。诺氟沙星平均回收率为 98.84%, *RSD* 为 1.72%, 盐酸利多卡因平均回收率为 100.24%, *RSD* 为 1.86%。结论 该法简便准确, 稳定无干扰, 重现性好, 可用作壳糖止血海绵中诺氟沙星和盐酸利多卡因的含量测定。

[关键词] 壳糖止血海绵; 诺氟沙星; 盐酸利多卡因; 高效液相色谱

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0045-03

Determination of lidocaine hydrochloride and norfloxacin in chitosan hemostatic sponge by RP-HPLC

WANG Shu-dong PAN Jing FANG Li XIA Shu-hui SONG Bing-sheng (Department of Pharmaceuticals, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quantitative determination method for lidocaine hydrochloride and norfloxacin in chitosan hemostatic sponge by RP-HPLC. **Methods** The determination was carried out with a Hederar-ODS-3 C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of acetonitrile-% phosphoric acid solution (12: 88), with pH adjusted to 3.0 ± 0.1 by using triethylamine. Detecting wavelength was at 254 nm. **Results** The linear range for lidocaine hydrochloride and norfloxacin was both 0.025~0.100 mg/ml. The average recovery and *RSD* of norfloxacin were 98.84% and 1.72%, and those of lidocaine hydrochloride were 100.24% and 1.86%. **Conclusion** The method offers simple instrumental operation, good stability, and high accuracy for the determination of the chitosan hemostatic sponge.

[Key words] chitosan hemostatic sponge; lidocaine hydrochloride; norfloxacin; HPLC

壳糖止血海绵为我院自制复方壳聚糖海绵制剂, 其主要成分为壳聚糖明胶, 其质量控制的指标性成分为诺氟沙星和盐酸利多卡因。临床上用于止血、消炎、止痛、促进伤口愈合等具有良好的疗效, 是战伤救护和平时外伤的急救药品。原有的检测方法采用紫外分光光度法^[1], 不能对两种指标性成分进行同时检测, 操作步骤繁琐, 检出限灵敏度不高。为有效控制该制剂的内在质量, 我们采用了反相高效液相色谱法对其进行检测, 分析速度快, 检出灵敏, 操作简便易行, 提高了检测效率。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配置四元泵、自动进样器、VWD 紫外可变波长检测器、智能化

柱温箱、在线真空脱气机以及 Chem station 工作站); Mettler Toledo AE240 十万分之一电子天平; KQ-2500B 型数控超声清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。
1.2 药品与试剂 诺氟沙星对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 130450-200304), 盐酸利多卡因对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 100341-200301), 壳糖止血海绵样品 (南京军区总医院制剂科, 批号: 090304, 090317, 090326), 所用乙腈、磷酸均为色谱纯, 水为双蒸水, 盐酸、三乙胺均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 分别精密称取干燥的诺氟沙星对照品 49.99 mg, 盐酸利多卡因对照品 49.99 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。

[基金项目] 南京市科技发展计划资助项目 (20028006)。

[作者简介] 王曙东 (1965-), 男, 博士, 副主任药师。Tel: (025) 80860161, Email: wangshudong_163@sina.com。

2.1.2 对照品溶液 精密量取 5 ml 上述储备液至 50 ml 量瓶,以 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 精密称取样品粉末约 250 mg 置 50 ml 容量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液约 40 ml 震荡混匀,置 60 °C 超声 60 min,冷至室温,再加 0.1 mol/L 盐酸溶液定容,摇匀,过滤,弃去初滤液,精取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液 取原方除诺氟沙星和盐酸利多卡因的空白辅料,按制剂工艺法制备空白制剂,按 2.1

3 项下供试品溶液制备方法制备成阴性对照溶液。

2.2 色谱条件及系统适应性 H edera-ODS-3 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-1% 磷酸溶液 (12: 88), 三乙胺调 pH 3.0 ± 0.1; 流速为 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μl。在上述色谱条件下测定,诺氟沙星与盐酸利多卡因分离度大于 2.5,理论塔板数以盐酸利多卡因计算不低于 3 000。阴性对照溶液在诺氟沙星或盐酸利多卡因位置处无色谱峰,即空白辅料对测定结果没有干扰。结果见图 1。

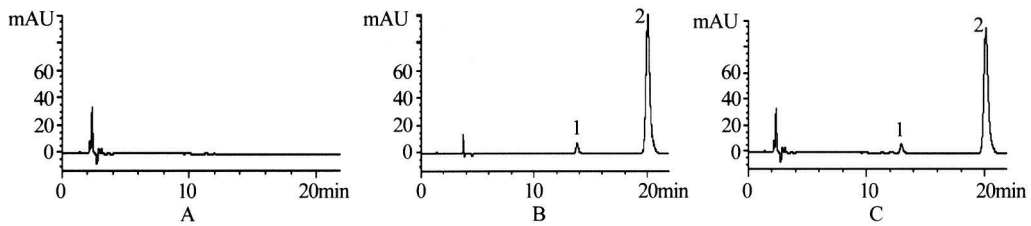


图 1 壳糖止血海绵色谱图

A-阴性对照品; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-盐酸利多卡因; 2-诺氟沙星

2.3 线性关系的考察 分别精密量取 2.1.1 项下对照品储备液 2.5, 4, 5, 7.5, 10.0 ml 分别置 50 ml 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液各 20 μl 注入液相色谱仪,以诺氟沙星和盐酸利多卡因峰面积为纵坐标 y , 浓度 C 为横坐标 x , 绘制标准曲线,得到回归方程: 诺氟沙星: $y = 2.94 \times 10^4 x + 34.46 (r = 0.9999, n = 5)$; 盐酸利多卡因: $y = 1.42 \times 10^3 x + 1.50 (r = 0.9999, n = 5)$ 。结果表明,该方法在 0.025 ~ 0.100 mg/ml 浓度范围内测定诺氟沙星和盐酸利多卡因时线性关系均良好。

2.4 精密度试验 取同一浓度的对照品溶液,重复进样 6 次,诺氟沙星含量 RSD 为 0.24%, 盐酸利多卡因含量 RSD 为 0.21%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 精密称取同一批号供试品 (批

号: 090317) 各 6 份, 分别按 2.1.3 项下供试品制备方法处理, 进样测定。诺氟沙星含量 RSD 为 1.26%, 盐酸利多卡因含量 RSD 为 1.78%, 表明本方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 取同一样品供试液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样测定, 测得诺氟沙星含量的 RSD 为 0.77%, 盐酸利多卡因含量的 RSD 为 0.72%。结果显示, 该供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 取本品 (批号: 090317) 9 份各约 250 mg 精密称定, 分别置 100 ml 量瓶中, 3 份一组, 每组分别按对照品溶液浓度的 80%、100%、120% 的量加入对照品, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 照含量测定方法测定其加入量, 根据测定结果, 计算回收率, 结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 盐酸利多卡因加样回收率测定结果 ($n = 9$)

| 取样量 (mg) | 样品量 (mg) | 测得量 (mg) | 加标量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|----------|----------|----------|----------|---------|-----------|-----------|
| 80% | 251.2 | 2.4929 | 4.5453 | 1.9996 | 102.12 | |
| | 249.8 | 2.4790 | 4.5251 | 1.9996 | 101.88 | |
| | 250.1 | 2.4820 | 4.5379 | 1.9996 | 102.27 | |
| 100% | 248.9 | 2.4701 | 5.0092 | 2.4995 | 101.60 | |
| | 249.6 | 2.4770 | 4.9822 | 2.4995 | 100.23 | 100.24 |
| | 251.1 | 2.4919 | 4.9552 | 2.4995 | 98.55 | 1.86 |
| 120% | 252.3 | 2.5038 | 5.4509 | 2.9994 | 97.91 | |
| | 253.3 | 2.5137 | 5.5142 | 2.9994 | 100.04 | |
| | 248.7 | 2.4681 | 5.4072 | 2.9994 | 97.56 | |

表 2 诺氟沙星加样回收率测定结果 (n=9)

| | 取样量 (mg) | 样品量 (mg) | 测得量 (mg) | 加标量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|----------|----------|----------|----------|---------|-----------|---------|
| 80% | 251.2 | 2.4798 | 4.5328 | 1.9996 | 102.15 | 98.84 | 1.72 |
| | 249.8 | 2.4660 | 4.5024 | 1.9996 | 101.49 | | |
| | 250.1 | 2.4690 | 4.5099 | 1.9996 | 101.67 | | |
| | 248.9 | 2.4571 | 4.9706 | 2.4995 | 100.57 | | |
| 100% | 249.6 | 2.4641 | 4.9512 | 2.4995 | 99.50 | 98.84 | 1.72 |
| | 251.1 | 2.4789 | 4.9582 | 2.4995 | 99.19 | | |
| | 252.3 | 2.4907 | 5.4547 | 2.9994 | 98.58 | | |
| 120% | 253.3 | 2.5006 | 5.4555 | 2.9994 | 98.22 | 98.84 | 1.72 |
| | 248.7 | 2.4552 | 5.3865 | 2.9994 | 97.23 | | |

结果表明, 盐酸利多卡因的平均回收率为 100.24%, RSD 为 1.86%, 诺氟沙星的平均回收率为 98.84%, RSD 为 1.72%。

2.8 样品测定 分别取 3 个批次的样品粉末, 按 2.1.3 项下制备供试品溶液, 依法测定, 计算样品中诺氟沙星和盐酸利多卡因的含量, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

| 批号 | 标示量 (%) | | 平均标示量 (%) | |
|--------|---------|--------|-----------|--------|
| | 诺氟沙星 | 盐酸利多卡因 | 诺氟沙星 | 盐酸利多卡因 |
| 090304 | 96.12 | 96.46 | 96.76 | 96.89 |
| 090317 | 98.72 | 99.24 | | |
| 090326 | 95.43 | 94.98 | | |

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 由于诺氟沙星理化性质较为特殊, 为提高诺氟沙星的提取回收率, 同时考虑到盐酸利多卡因的结构特性, 分别尝试文献中使用过的甲醇、流动相以及不同浓度的盐酸溶液进行提取^[2], 试验结果表明 0.1 mol/L 盐酸溶液提取效果较好。

3.2 提取温度的确定 由于诺氟沙星受明胶海绵基质吸附, 常温下超声提取不完全, 为提高提取效率, 分别尝试置 45℃、60℃超声 60 min, 结果表明,

超声时提高温度诺氟沙星溶解充分, 回收率更好。

3.3 检测波长的选择 诺氟沙星的紫外吸收明显, 最佳检测波长为 278 nm, 而盐酸利多卡因紫外吸收较弱, 检测波长在 254 nm 处为佳。分别在以上两种波长进行测定, 最终确定检测波长在 254 nm 处, 两种指标成分均有稳定的紫外吸收。

3.4 色谱柱的选择 中国药典 2005 年版二部中测定诺氟沙星含量的流动相为乙腈-0.025 mol/L 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 3.0±0.1) (13:87)^[3], 而诺氟沙星和盐酸利多卡因在该流动相下拖尾现象明显, 适当调整磷酸-三乙胺缓冲液的比例后, 可略微改善峰形, 峰对称性依然不很理想, 参考文献^[4], 改为 ODS 色谱柱后, 拖尾现象明显改善。

【参考文献】

- [1] 宋炳生, 李汉宝. 壳糖止血海绵的质量研究 [J]. 医学研究生学报, 2005, 18(9): 790
- [2] 王海红, 骆 瑛. 高效液相色谱法测定复方甲硝唑栓中甲硝唑及诺氟沙星的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 79.
- [3] 中国药典 2005 版·二部 [S]. 2005: 641.
- [4] 颜 晗, 王铁杰. HPLC 法盐酸利多卡因注射液含量测定的探讨 [J]. 中国药品标准, 2003, 4(3): 61

[收稿日期] 2009-04-22

[修回日期] 2009-10-16

(上接第 2 页)

- [2] Kubitzka D, Becka M, Wensing G, et al. Safety, pharmacodynamics and pharmacokinetics of BAY 59-7939-an oral direct factor Xa inhibitor-after multiple dosing in healthy male subjects [J]. Eur J Clin Pharmacol 2005, 61: 873.
- [3] Mueck W, Becka M, Kubitzka D, et al. Population model of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban oral direct factor Xa inhibitor in healthy subjects [J]. Int J Clin Pharmacol Ther 2007, 45: 335.
- [4] Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, et al. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double

blind randomised controlled trial [J]. Lancet 2008, 372: 31.

- [5] Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis is after hip arthroplasty [J]. N Engl J Med 2008, 26, 358 (26): 2765.
- [6] Lassen MR, Ageno W, Borris LC, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty [J]. N Engl J Med 2008, 26, 358 (26): 2776.
- [7] 陈敏华, 王兴祥. 未来心房颤动抗栓——谁主沉浮 [J]. 心血管病学进展, 2008, 29 (2): 185

[收稿日期] 2009-07-14

[修回日期] 2009-09-09