

# 岛津 NexeraLC-40 分析盐酸多西环素中的有关物质

## LC-182

**摘要：**本文参考美国药典（USP），采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素中有关物质分析的超高效液相色谱测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm I.D.×50mm L., 1.9 μm)，以甲醇-水（含磷酸二氢钾、EDTA·Na<sub>2</sub>、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5）为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件设置系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均 >1.5，满足测定需求。

**关键词：**Nexera LC-40 高效液相色谱仪 盐酸多西环素 有关物质

多西环素 (Doxycycline) 又名强力霉素或脱氧土霉素，是一种半合成的抗生素，临床上作为广谱抑菌剂，高浓度时具有杀菌功能。该药品以发酵产生的土霉素为原料，经氯代、脱水、催化氢化、转化和成盐等单元反应制备而成。药典将从起始原料带入、生产过程氢化反应不完全、反应副产物等杂质，如：杂质 A-6- 表多西环素 (6-epidoxycycline)、杂质 B- 甲烯土霉素 (metacycline)、杂质 C-4- 表- 多西环素 (4-epidoxycycline)、杂质 D-4、6- 表多西环素 (4、6-epidoxycycline)、杂质 E- 土霉素 (oxytetracycline)、杂质 F-2-acetyl-2-decarbamoylepidoxycycline 等有关物质。因其疗效低、毒性大，各国药典对有关物质的含量进行了限定。《中国药典》2015 版规定，杂质 A 和 B 面积不得大于对照溶液主峰面积 (2.0%)，其他单个杂质峰面积不得大于主峰的 0.5 倍 (1.0%)，各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍 (4.0%)。美国药典 (USP) 采用主成分自身对照法，限定杂质 C 的限量 <0.5%，未知杂质之和 <0.5%，总杂质 <2.0%。

文献报道，四环素类抗生素会发生光降解，在高温、强酸、强碱、氧化条件下稳定性差。USP 采用了超高效液相色谱法，分析时间更短，样品稳定性更好，流动相消耗更少。

本实验参考 USP 药典，使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，以亚 2 μm 填料色谱柱进行分离，建立了盐酸多西环素中有关物质的分析方法。Nexera LC-40 高效液相色谱仪是岛津公司 2019 年推出的液相新产品，该产品秉承了岛津一直以来的设计理念，同时还引入了智能分析 (AI)、智能物联 (IoT) 等尖端技术。Nexera LC-40 系统耐压 70 Mpa，可满足大部分超高效液相分析需求。自动进样器 SIL-40CXR 采用空气循环式控温，更均匀，有效避免样品降解，配置的二极管阵列检测器 SPD-M40 具有极高的灵敏度和卓越的线性范围 (2.5 AU)，三重控温技术能有效降低基线噪音并提供稳定的基线，因此，即使在高浓度的样品中，也能准确定量检测痕量的杂质组分，可为有关物质分析提供参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B XR 输送泵，SIL-40CXR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SPD-M40A 检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1 岛津 NexeraLC-40 高效液相色谱仪

## 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm i.d.×50mm L., 1.9 μm)

流动相: A, 水 (每升含 3.1 g 磷酸二氢钾、0.5 g EDTA·Na<sub>2</sub>、0.5 mL 三乙胺, 氢氧化钠调节 pH=8.5) ;  
B, 甲醇

流速: 0.6 mL/min

柱温: 60°C

检测波长: 350 nm

进样体积: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Pumps	Pump B Conc.	10
9.00	Controller	Stop	

## ■ 样品前处理

样品: 盐酸多西环素片 (市售, 规格: 0.1 g, 批号: 20190204, 有效期至 2022.01)

稀释剂: 0.01 M 盐酸

系统适应性储备溶液 1: 1 mg/mL β- 多西环素和盐酸甲烯土霉素, 溶剂为 0.01 M 盐酸。

系统适应性储备溶液 2: 1.2 mg/mL 盐酸多西环素, 溶剂为 0.01 M 盐酸

系统适应性溶液: 取 5 mL 系统适应性储备溶液 2 至 25 mL 容量瓶, 加热 60 min, 加热至干燥, 小心不要烧焦, 将残留物溶解在稀释剂中, 加入 0.5 mL 系统适应性储备溶液 1, 以稀释剂定容。过滤。这份溶液包括 4-epi 多西环素、多西环素有关物质 A、甲烯土霉素以及多西环素, 可以保存 14 d。

样品溶液：0.25 mg/mL 多西环素，稀释剂溶解。操作流程，取不少于 20 片剂研钵磨粉，取一部分至容量瓶，加 50% 稀释剂，超声 5 min，振摇 15 min，定容。过 0.22 μm 滤膜。

标准溶液：1.5 μg/mL，取适量多西环素标准品，超声溶解，稀释剂定容。

分离度：>1.5，4-epi 多西环素和甲烯土霉素；>1.5，4-epi 多西环素、多西环素有关物质 A；>1.5，多西环素有关物质 A 和多西环素。

相对标准偏差：<5.0% 多西环素峰，标准溶液。

## 结果与讨论

### 3.1 系统适应性考察

岛津 LabSolutions 软件拥有丰富智能的批处理功能，可以实现系统适应性的自动判别，省去了繁琐的人工核验。在方法中设置系统适应性参数，并在批处理中选择相应的判定条件，系统适应性通过则继续样品分析，否则暂停分析。批处理运行后，自动输出一份系统适应性考察结果的 HTML 文件，如图 2 所示。由图 2 所知，标准溶液连续分析 6 次，多西环素峰面积相对标准偏差 (RSD) =2.05%，满足 USP 药典关于多西环素峰面积重复性的要求。

<标准>					
ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	面积	-	-	5.000

<面积>	
评价	Pass

<数据号>	
数据号	PDA-1
1	44408
2	45564
3	46383
4	45815
5	44518
6	44061
平均值	45125
%RSD	2.047

图 2 系统适应性输出结果

USP 药典要求，多西环素、多西环素有关物质 A、4-epi 多西环素、甲烯土霉素等相邻峰之间分离度大于 1.5。在采集方法中设置分离度参数，批处理分析后，即自动出具分离度的系统适应性结果，如图 3 所示，多西环素与多西环素有关物质 A 分离度为 2.8，多西环素有关物质 A 与 4-epi 多西环素之间的分离度为 1.7，4-epi 多西环素与甲烯土霉素分离度为 4.8，分离度均大于 1.5，满足要求。

<样品信息>			
数据路径	D:\ZX\DOX		

数据号	样品名	样品ID	分析日期和时间
1	系统适应性		2019/9/4 11:44:46 (+0800)

D:\ZX\DOX\0904_系统适应性_00	System Administrator
4.lcd	

<标准>					
ID#	化合物名	参数	下限	上限	%RSD
PDA-1	多西环素	分离度	1.500	100.000	-
PDA-2	多西环素有关A	分离度	1.500	100.000	-
PDA-3	4epi多西环素	分离度	1.500	100.000	-

<分离度>			
评价	Pass		

<数据号>			
数据号	PDA-1	PDA-2	PDA-3
1	2.819	1.709	4.829

图 3 系统适应性输出结果

### 3.2 色谱图

稀释剂、系统适应性溶液和标准溶液色谱图如下所示。稀释剂色谱图无干扰峰，系统适应性溶液色谱图中多西环素和杂质分离良好。

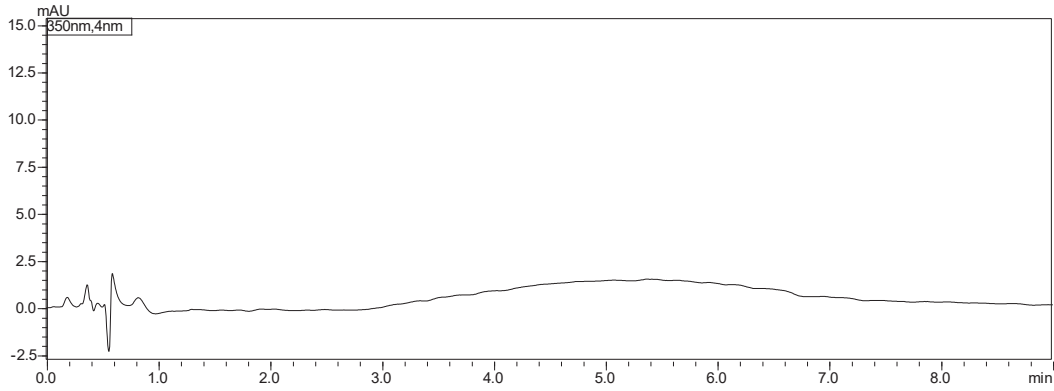


图 4 空白溶剂色谱图

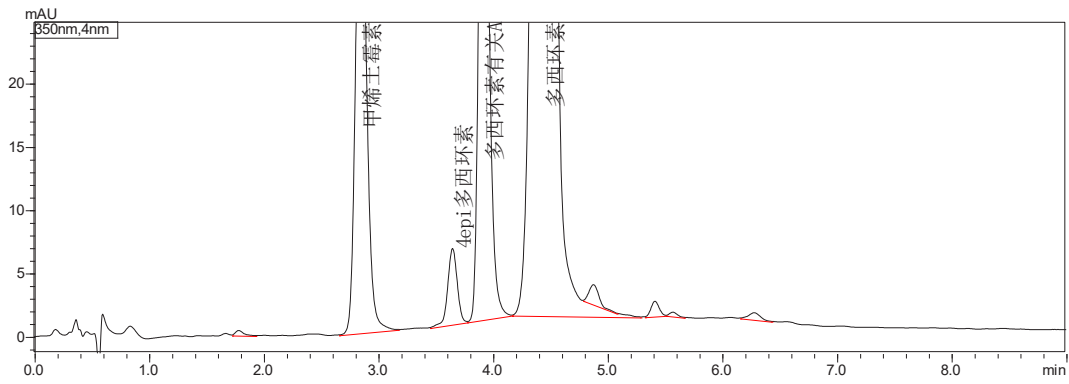


图 5 系统适应性色谱图

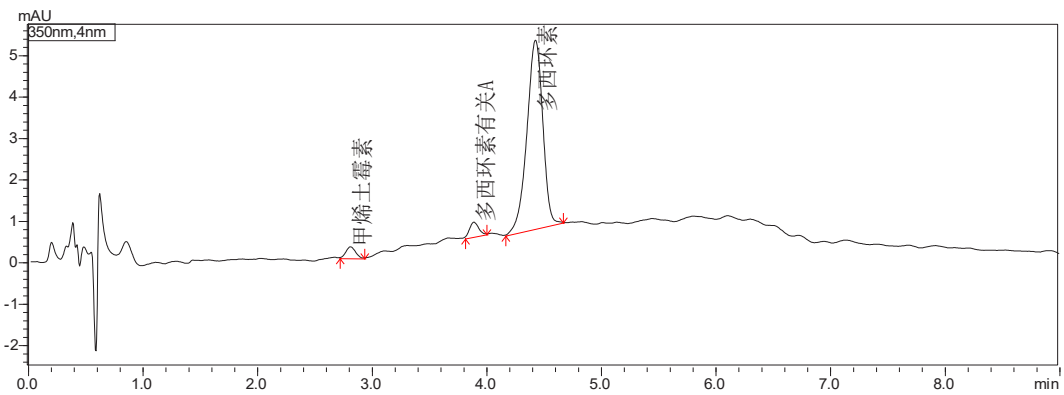


图 6 标准溶液色谱图 (1.5 µg/mL)

### 3.3 样品测定

按前述条件，制备样品溶液，并分析。结果如图 7 所示，多西环素、有关物质 A、4-epi 多西环素邻近峰之间实现了基线分离。

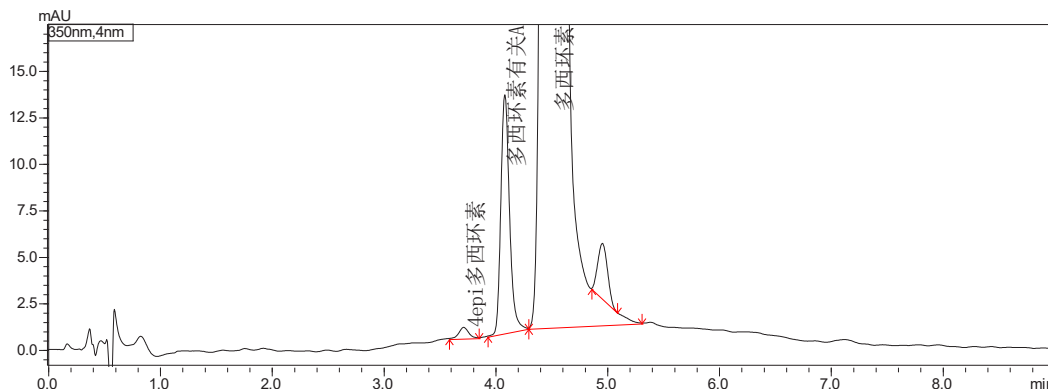


图 7 样品溶液色谱图 (0.25 mg/mL)

### ■ 结论

本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了盐酸多西环素片中有关物质测定方法。方法采用 Shim-pack Scepter C8-120 (2.1 mm I.D.×50mm L., 1.9 μm)，以甲醇 - 水 (含磷酸二氢钾、EDTA·Na<sub>2</sub>、三乙胺，氢氧化钠调节 pH=8.5) 为流动相，0.6 mL/min 的流速进行梯度洗脱，检测波长为 350 nm。分析结果表明：该方法测定基线噪音良好，通过 LabSolutions 软件进行系统适应性考察，自动出具报告；标准溶液连续测定 6 次，多西环素峰面积的 RSD 为 2.05%，仪器稳定性好。多西环素片剂测定结果显示多西环素与多西环素杂质 A、多西环素杂质 A 与 4-epi 多西环素分离度均 >1.5，满足测定需求。