



# 眼药水制剂质量控制中的自动化样品前处理

## 应用简报

### 作者

Bart Tienpont, Maria Rambla Alegre,  
Frank David 和 Pat Sandra  
气相色谱研究所  
Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

### 摘要

在眼药水制剂质量控制方法中使用带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台。自动化样品前处理包括通过称重和稀释过程制备含两种活性成分的校准标样（四个水平）以及眼药水制剂样品。两个序列全自动化。分析结果具有极佳的重现性和线性。

## 前言

使用带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台测定眼药水制剂中的两种活性成分——地塞米松和氯霉素。地塞米松是最有效的皮质类固醇之一，它的药效比泼尼松龙强 5-14 倍，比可的松和氢化可的松强 25-75 倍。将广谱抗菌素氯霉素加入到地塞米松中之后能有效治疗前葡萄膜炎（虹膜炎、虹膜睫状体炎）。治疗炎症的眼药水制剂可能含有地塞米松和氯霉素中的一种或两种，而且通常是一种粘性的水溶液。

典型的分析 QC 步骤包括：1) 制备含活性成分的四个水平的校准标样系列水溶液（水相流动相）以及 2) 用水（水相流动相）稀释一定量的眼药水制剂。如表 1A 所示，样品前处理通常是在容量瓶中进行的，最开始需分别制备含地塞米松和氯霉素的两种储备溶液。制得的校准溶液中含有这两种成分，其中地塞米松浓度介于 16-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，氯霉素介于 80-320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通常使用水相流动相将样品稀释 25 倍。样品前处理完成后，使用 HPLC 对校准标样和样品进行紫外检测分析。由于标准溶液不稳定，因此通常在每次样品分析时现配现用。

本应用简报介绍了校准标样的自动化制备以及样品的自动稀释。常规方法布局见表 1B。使用称重站来追踪精确的校准标样浓度并测量样品量。

## 实验部分

### 化学试剂

地塞米松和氯霉素均购自 Sigma-Aldrich（比利时贝尔塞）。水和乙腈 (AcCN) 为 HPLC 级 (BioSolve, 荷兰)。磷酸和氢氧化钠购自 Sigma-Aldrich。

### 配置

Agilent 7696A 样品前处理工作台配有两个 Agilent 7693A 自动液体进样器。前进样口带一个强化进样针架和一根 500  $\mu\text{L}$  进样针（部件号 G4513-60561）。后进样口带一个强化进样针架和一根 50  $\mu\text{L}$  进样针（部件号 5183-0314）。

### 工作台方法

#### 资源布局

图 1 所示为工作台的资源布局。流动相 A（0.3% 磷酸水溶液，用氢氧化钠调至  $\text{pH} = 3$ ）和乙腈作为“化学资源”分别置于 81-150 和 71-72 位。前后进样塔样品瓶 A1 和 B1 中的溶剂均为水。制备标准稀释用的样品瓶定义为 Empty Container（空容器）。

#### 工作台方法程序步骤

制备四种校准标样的 7696A 样品前处理工作台程序见图 2。称重完空样品瓶后，暂停系统以加入固体标样。然后，继续运行自动程序，添加溶剂以制备四个水平的校准标样。将固体标样稀释 6 倍得到最低水平校准标样。

表 1A. 传统的样品前处理 (USP 或 EP 方法)

	代码	制备储备溶液	目标浓度 (µg/mL)
校准标准品	DEX Stck	称取 10 mg 地塞米松于 25 mL 样品瓶 + 加 25 mL 水	400
	CLO Stck	称取 10 mg 氯霉素于 25 mL 样品瓶 + 加 25 mL 水	400
		<b>制备标准溶液</b>	<b>目标浓度 (µg/mL) 地塞米松/氯霉素</b>
	LVL1	1 mL Dex Stck + 5 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	16/80
	LVL2	2 mL Dex Stck + 10 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	32/160
	LVL3	3 mL Dex Stck + 15 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	48/240
	LVL4	4 mL Dex Stck + 20 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	64/320
		<b>制备眼药水制剂样品</b>	
样品	SAM	1 mL 或 1 g 眼药水样品 + 25 mL 流动相	

表 1B. Agilent 7696A 样品前处理工作台样品前处理

	代码	制备储备溶液	目标浓度 (µg/mL)
校准标准品	DEX Stck-1	称取 4 mg 地塞米松于 2 mL 样品瓶* + 加 1 mL AcCN	4000
	DEX Stck	150 µL DEX Stck-1 + 1350 µL 流动相 (稀释 10 倍)	400
CLO Stck-1	称取 4 mg 氯霉素于 2 mL 样品瓶* + 加 1 mL AcCN	4000	
	CLO Stck	150 µL CLO Stck-1 + 1350 µL 流动相 (稀释 10 倍)	400
		<b>制备标准溶液</b>	<b>目标浓度 (µg/mL) 地塞米松/氯霉素</b>
	LVL1	20 µL Dex Stck + 100 µL CLO Stck + 380 µL 流动相	16/80
	LVL2	40 µL Dex Stck + 200 µL CLO Stck + 260 µL 流动相	32/160
	LVL3	60 µL Dex Stck + 300 µL CLO Stck + 140 µL 流动相	48/240
	LVL4	80 µL Dex Stck + 400 µL CLO Stck + 20 µL 流动相	64/320
		<b>制备成品样品</b>	
样品	SAM	1 滴眼药水样品* + 1 mL 流动相 (大约 35-40 mg)	

\*Agilent 7696A 样品前处理工作台暂停时, 手动添加固体粉末或粘稠液体。在这之后进行称重。

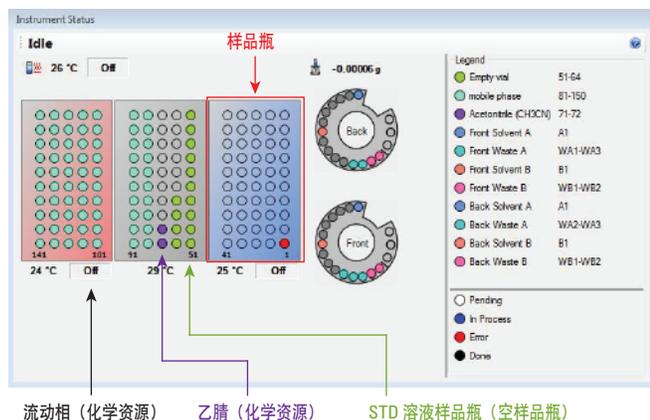
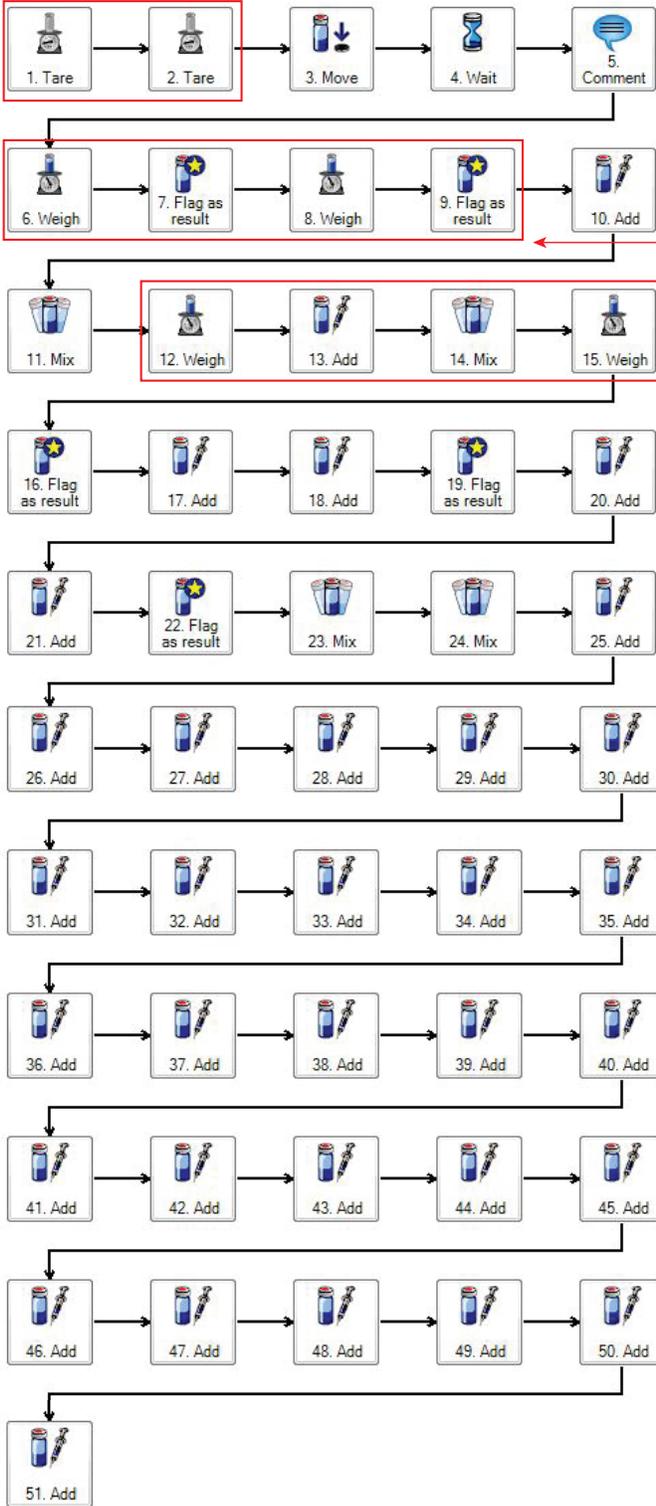


图 1. Agilent 7696A 样品前处理工作台资源布局, 用于地塞米松和氯霉素的梯度稀释

去皮 DEX stck-1 和 CLO stck-1 样品瓶



按 Agilent 7696A 样品前处理工作台上的 PAUSE，然后加入标样（大约 40 mg）按 START 继续运行

称重 DEX stck-1 和 CLO stck-1 样品瓶（准确的标样称重）

称量加入溶剂的精确量

稀释

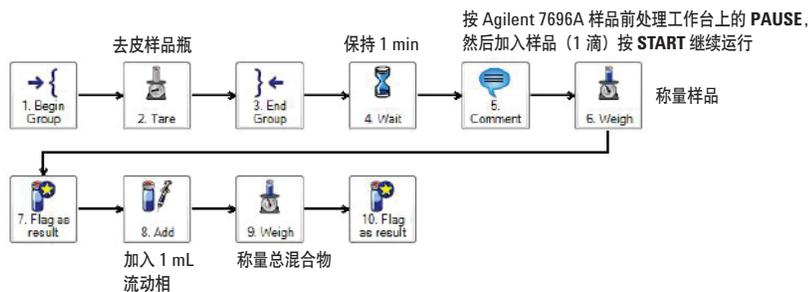
图 2. Agilent 7696A 样品前处理工作台校准标准制备的方法设置流程图

另外制备一个样品稀释的序列：将空样品瓶去皮并暂停系统。向每一个样品瓶中加入一滴粘性样品。这时需要手动操作，因为样品比较粘稠，无法使用注射器转移液体。然后继续启动工作台。再次称重样品瓶（图 3），计算精确的样品量并记录在序列报告中。最后，加入溶剂稀释样品（见图 4 中的方法布局）。

可以在一个序列中对校准标样制备和样品前处理进行编程。



图 3. 去皮、样品添加以及样品量称量的图解说明



1. 开始一个组
2. 去皮样品
3. 结束该组
4. 等待 1 min
5. 按工作台上的 **PAUSE** 加入样品后按 **START**
6. 称重样品
7. 将样品标记为 RESULT (结果)
8. 向前进样塔的样品中加入 1000  $\mu$ L 流动相 (清洗, 泵)
9. 称量样品
10. 将样品标记为 RESULT (结果)

图 4. 用于样品的 Agilent 7696A 样品前处理工作台方法设置

## HPLC 分析实验条件

使用 Agilent 1290 Infinity HPLC 系统进行分析。使用 Poroshell 120 色谱柱 (2.1 mm × 400 mm, 2.4 μm dp (部件号 695775-902)) 进行分离。流动相 A 为 0.3% 磷酸水溶液 (使用氢氧化钠调至 pH=3), 流动相 B 为乙腈。采用 20% B (0 min)-50% B (5 min) 的梯度条件。流速为 0.5 mL/min。进样量为 1 μL, 紫外检测波长为 254 nm。

## 结果与讨论

四种校准水平的叠加谱图见图 5。校准曲线见图 6。地塞米松和氯霉素的线性都非常出色 ( $R^2 > 0.999$ )。

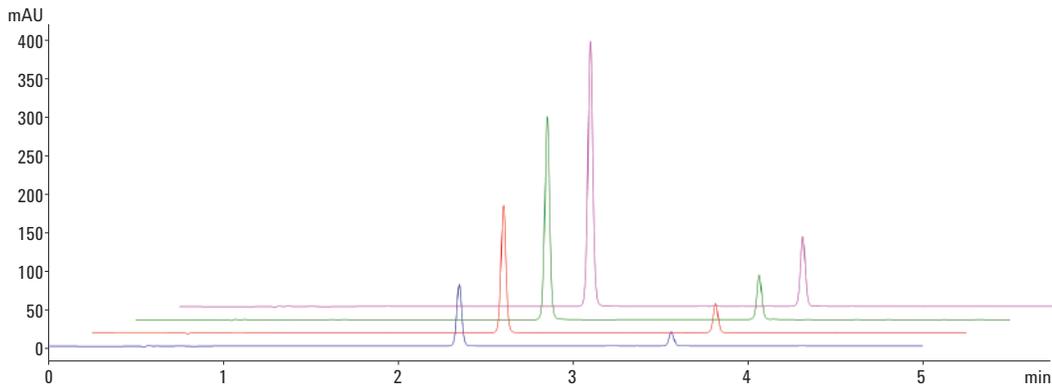


图 5. 四种校准水平的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的谱图 (叠加图, X/Y 轴偏置)

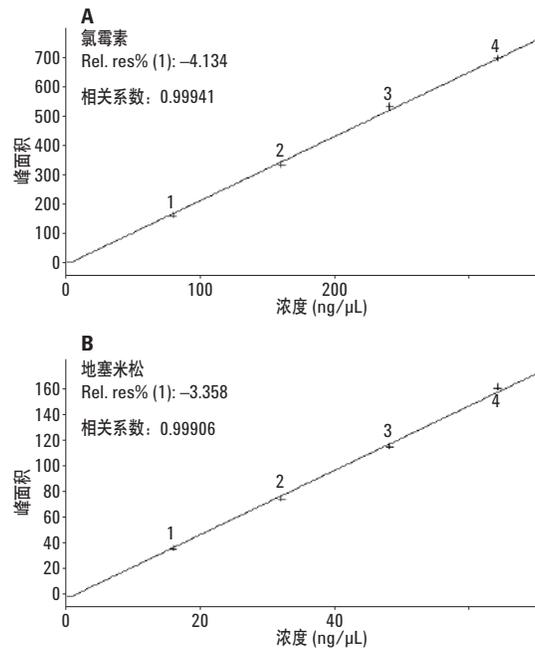


图 6. 使用 Agilent 7696A 样品前处理工作站自动校准标准样制备获得的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的校准曲线

通过制备稀释 6 倍的最低校准样品评估了样品前处理的重现性。叠加谱图见图 7，可以看出重现性非常出色，氯霉素和地塞米松的 RSD 分别为 1.5% 和 2.7%。

另外，对三种类型的样品进行了分析。谱图见图 8。样品 A 含地塞米松，样品 B 含氯霉素，样品 C 则同时含有地塞米松和氯霉素。检测了三种样品中活性成分的准确量（测定值为标签浓度的 90%-105%）。对同一个序列里制备的三种不同类型样品的分析表明没有发生交叉污染（只含地塞米松的样品中没有氯霉素，反之亦然）。

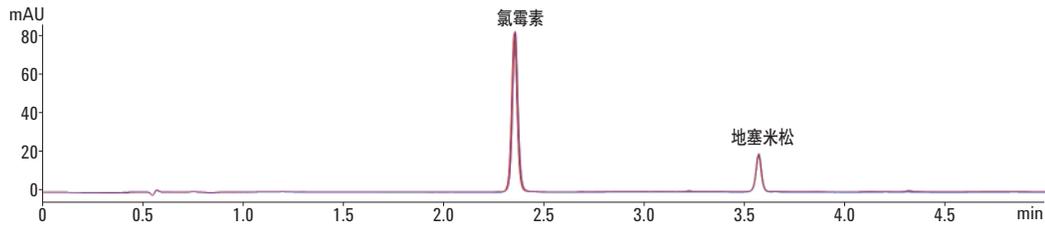


图 7. 使用 Agilent 7696A 样品前处理工作站自动校准标准样制备获得的 6 种单独的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的 6 个叠加谱图。氯霉素和地塞米松的相对标准偏差分别为 1.5% 和 2.7%

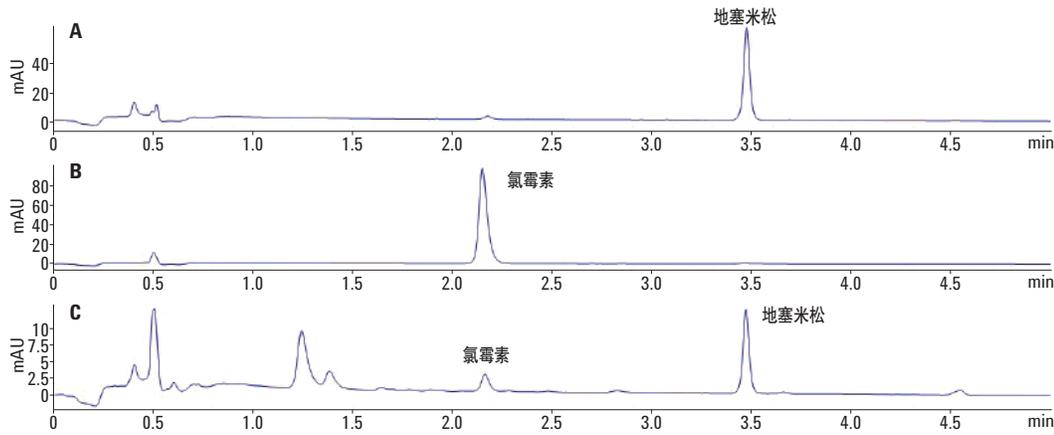


图 8. 三种类型眼药水制剂的谱图

样品前处理的重现性见表 2，该表给出了样品 B 的实测浓度、样品重量以及氯霉素的最终浓度。该样品稀释了 6 倍。实测量的相对标准偏差低于 1%。

除了这些定量数据外，值得注意的是总溶剂消耗量大大减少了，没有使用容量瓶，而且几乎没有浪费任何溶液。

表 2. 眼药水质剂类型 B 样品前处理的重现性

	实测浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	样品重量 (mg)	校正浓度 ( $\mu\text{g/mg}$ )
SAM-rep01	124	27.72	4.59
SAM-rep02	121	26.95	4.61
SAM-rep03	114	25.41	4.61
SAM-rep04	103	23.07	4.57
SAM-rep05	143	32.58	4.53
SAM-rep06	138	31.27	4.53
		<b>RSD (%)</b>	<b>0.74</b>

## 结论

带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台可成功地自动进行校准样品前处理和样品稀释。样品的粘稠特性使得我们无法使用注射器进行体积稀释，但是通过使用称重站，可以精确测定样品的质量。稀释之后，能够准确测定活性成分。

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014  
2014 年 2 月 6 日，中国印刷  
5991-3591CHCN