

利用 RP-HPLC 測定去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑中有效成分含量

陳玉林*、陳韶浩、詹勳隆、林文華、張家禎

農業部獸醫研究所

摘要 本研究利用逆相高效液相層析法 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 搭配聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物管柱，建立動物用去氧羥四環素鹽酸鹽 (doxycycline hyclate) 口服液劑有效成分定量方法。本方法主要參考中華藥典中去氧羥四環素鹽酸鹽原料含量測定方法進行參數調整，層析管柱使用 RP-Sep PRX-1 (4.6×250 mm)、控溫於 60°C ± 1°C，流速設定為 1 mL/min，以含 77 gm 三級丁醇之磷酸鹽緩衝液為移動相、分析波長設定為 270 nm，可於 18 分鐘完成分析。結果顯示，主波峰出現於約 10.6 分鐘處，且無其他波峰干擾、於 400 - 1,200 µg/mL 濃度間呈現良好線性， R^2 為 0.9999、重複性相對標準差 (RSD) 介於 0.10 % - 0.57 %、中間精密度 RSD 為 1.00 %、準確度添加回收率介於 97.4 % - 99.1 %，且測試樣品溶液儲存於 2 - 8°C 中，7 天內顯示具有良好的穩定性。所建立之方法穩固性與再現性良好，可應用於動物用去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑含量檢測。

關鍵詞：去氧羥四環素鹽酸鹽、逆相高效液相層析法、聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物管柱

緒言

去氧羥四環素 (doxycycline) 是一種廣泛使用的半合成四環素類抗生素，主要通過抑制細菌蛋白質合成而發揮抑菌作用，對多數革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌、立克次體、披衣菌與部分原蟲均有作用 [2]。與其他四環素類抗生素相比，去氧羥四環素具有半衰期長、有效性高與副作用低的特點 [5]。因此，無論是治療人類或動物疾病，去氧羥四環素抗生素皆被廣泛使用。在臺灣，去氧羥四環素口服液劑因其液體形態使用方便，已成為常見用於治療畜禽呼吸道疾病的抗生素藥品。去氧羥四環素口服液劑主要以去氧羥四環素鹽酸鹽 (doxycycline hyclate) 為主成分；去氧羥四環素鹽酸鹽為半水合物半乙醇酸鹽形態，易溶於水 [2]。溶解於水溶液中的穩定性，與水質狀況和 pH 值相關 [5, 9]。若藥品以不良的水質進行稀釋，容易造成去氧羥四環素降解，無法達到預期使用濃度；在

使用上，應選擇優質飲用水進行稀釋 [9]。藥品中水活性越高，抗生素穩定性越差，故常見去氧羥四環素口服液劑配方，使用乙醇或丙二醇為賦形劑，以降低水活性。添加乙醇或丙二醇為賦形劑，有助於去氧羥四環素口服液劑穩定，而添加檸檬酸，則無觀察到明顯效果 [7]。

去氧羥四環素含量與純度檢測，已可利用 UV 法、TLC 法、微生物法與 RP-HPLC 等技術進行測定 [5, 8, 10-13]；其中 RP-HPLC 分析技術，由於快速、準確、再現性與特異性佳，已成為目前常用之檢測技術 [8, 13]。各國藥典，包含中華藥典、美國藥典、英國藥典與歐洲藥典，皆採此技術進行含量與純度檢測 [1, 3, 4, 14]。然而，目前在各國藥典對於去氧羥四環素口服液劑尚無專論規範，因此，本研究參考中華藥典所收載之去氧羥四環素鹽酸鹽原料含量測定方法，進行參數調整，建立適用於動物用去氧羥四環素鹽酸

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

鹽口服液劑的含量檢測方法，主要調整為移動相比例，由 60 gm 三級丁醇提高至 77 gm，以及目標測定濃度由 1,200 $\mu\text{g/mL}$ 降低為 800 $\mu\text{g/mL}$ 。分析方法確效參照 VICH GL2 所載之各項參數，進行專一性、線性、精密度、準確度與耐變性評估 [6]，以提供準確且可靠之測試方法，作為去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑含量測定的參考。

材料與方法

試藥與溶劑

去氧羥四環素鹽酸鹽標準品購入自 Sigma-Aldrich。磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate)、硫酸氫氧化四丁銨 (tetra-butylammonium hydrogen sulfate)、乙二胺四乙酸二鈉 (edetate disodium) 與氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 皆使用試藥級。三級丁醇 (tertiary butyl alcohol) 與 37.0 % 鹽酸 (hydrochloric acid) 使用分析級試劑。測試樣品為市售含 doxycycline 200 mg/mL 之口服液劑，由 Cenavisa S. L. 藥廠所製造。

儀器設備

高效液相層析儀器使用 Hitachi 2000 HPLC 系列搭配 DAD 偵測器。電子天平使用 Sartorius CPA225D。使用 Milli-Q (Millipore) 所製造之去離子水，比電阻在 25°C 時可達 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。定容瓶使用 A 級褐色玻璃定容瓶、玻璃定容吸管使用 AS 級透明玻璃定容吸管、微量吸管使用正位微量移液管，皆為 BRAND 廠牌。

層析方法

層析管柱使用 RPsep PRX-1 (4.6×250 mm)、控溫於 60°C $\pm$ 1°C，流速設定為 1 mL/min；以含 77 gm 三級丁醇之磷酸鹽緩衝液為移動相，進行 270 nm 分析波長測定。含 77 gm 三級丁醇之磷酸鹽緩衝液之配置方法：取磷酸二氫鉀 2.72 g、氫氧化鈉 0.74 g、硫酸氫氧化四丁銨 0.5 g 及乙二胺四乙酸二鈉 0.4 g，置 1 L 定量瓶中，加水約 850 mL，振搖使溶解後，藉水之助加入三級丁醇 77 g，以水定量至 1 L，再以 1 N

氫氧化鈉調整 pH 值為 8.0 $\pm$ 0.1。

標準品溶液配置

正確秤取含去氧羥四環素 500 mg 力價之標準品置於 50 mL 褐色定容瓶內，以 0.01 N 鹽酸為稀釋液，加入適當稀釋液後，震盪至溶解，再以稀釋液定容至 50 mL，此為去氧羥四環素標準品溶液原液 (25,000 $\mu\text{g/mL}$)。

測試樣品溶液配置

以微量吸管取 0.5 mL 測試樣品 (相當於含去氧羥四環素 100 mg) 置於 25 mL 褐色定容瓶中，以 0.01 N 鹽酸為稀釋液，定容至 25 mL；再取 5 mL 置於 25 mL 褐色定容瓶中，同樣以 0.01 N 鹽酸加至定容。此溶液為目標測試樣品溶液 (800 $\mu\text{g/mL}$)。

專一性

以空白溶劑溶液，確認預測波峰滯留時間附近無其他波峰干擾，同時以測試樣品溶液與標準品溶液進行主波峰光譜圖比對，以確認專一性。

線性

取標準品原液溶液，以 0.01 N 鹽酸為稀釋液，分別配置最終濃度分別為 400、600、800、1,000 與 1,200 $\mu\text{g/mL}$ 標準品溶液，注入高效液相層析儀，以層析波峰面積與對應濃度作圖，並進行線性回歸計算，相關係數平方值 (R^2) 應在 0.995 以上。

精密度與準確度

精密度將進行重複性與中間精密度評估，重複性執行為短時間內，以 3 種濃度以上標準品溶液重複注射 3 次，與 6 次測試樣品溶液，分別計算層析波峰面積相對標準差 (RSD)。中間精密度則採不同分析日期與不同分析人員所測得結果進行評估。

準確度評估，是將已知濃度標準品添加入樣品中，計算回收率，以評估準確度。故將目標測試樣品溶液分別與 3 種濃度標準品溶液 (600 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1,000 $\mu\text{g/mL}$) 進行等比例添加，配製為 3 種濃度添加樣品溶液。所測得之測試樣品溶液濃度與

添加樣品溶液濃度將進行回收率計算；回收率計算方法為 2 倍添加樣品溶液濃度扣除測試樣品溶液濃度後，再除以所添加之標準品溶液濃度，並計算回收率百分比。

最低定量濃度與最低檢測濃度

採回應值標準差與斜率法，利用低濃度樣品檢量線線性回歸所得，計算最低定量濃度 (quantification limit ; QL) 與最低檢測濃度 (detection limit ; DL)。

$$QL = \frac{10\sigma}{S}, DL = \frac{3.3\sigma}{S}, S \text{ 為標準曲線斜率、}\sigma \text{ 為回應值}$$

標準差，將以截距標準誤計算。依 VICH GL1 確效定義規範，含量檢測確效評估，最低定量濃度與最低檢測濃度並非必要執行項目。

耐變性

耐變性為不受方法參數故意以小幅變異所影響之能力的表現，本方法變異參數包含溶液安定性與不同管柱評估。其中不同管柱同時搭配不同儀器進行評估；儀器 A 為主要使用 Hitachi 2000 HPLC 系列，將搭配管柱 A (批號：12200340)，儀器 B 為耐變性評估用，使用 Hitachi 5000 HPLC 系列，將搭配管柱 B (批號：12200341)。

結果與討論

專一性

空白樣品於標準品主波峰滯留時間 10.66 分鐘 $\pm 3\%$ 處皆無其他波峰干擾 (圖 1)；且測試樣品溶液與標準品溶液主波峰光譜圖比對，可見同樣於 271 nm 與 363 nm 處皆有高吸收值 (圖 2)，光譜圖比對結果相似度為 1.0000。光譜圖相似度越趨近 1，代表兩個波峰光譜圖符合程度越高，當相似度大於 0.95 時，可視為無其他波峰干擾。

線性與範圍

以濃度為橫坐標 (x)，波峰面積為縱坐標 (y) 進行檢量線波峰面積線性迴歸，可見去氧羥四環素標準品濃度 400 $\mu\text{g/mL}$ 至 1,200 $\mu\text{g/mL}$ 間呈現良好線性 (圖 3)，回歸方程式為 $y = 158127x + 1311293$ ，相

關係數平方 R^2 為 0.9999，符合 0.99 以上。

精密度與準確度

以 5 點濃度標準品溶液進行 3 次重複注射，去氧羥四環素層析波峰面積 RSD 介於 0.10 % ~ 0.57 % (表 1)；以正常操作濃度測試樣品進行 6 重複測試結果，去氧羥四環素層析波峰面積 RSD 為 0.25 %。以 3 天分析日期與 3 名分析人員進行樣品中間精密度評估，含量平均值為 201.03 mg/mL ，RSD 為 1.00 % (表 2)。精密度評估結果 RSD 皆小於 3.0 %，符合 ORA (Office of Regulatory Affairs) 所建議之規範。準確度評估結果，採目標測試樣品溶液分別與 3 種濃度標準品溶液進行等比例添加，目標測試樣品溶液為 802.3 $\mu\text{g/mL}$ ，3 個添加樣品溶液分別進行 3 次重複測定結果，回收率為 97.4 % - 99.1 %，平均回收率為 98.5 % (表 3)，以 ORA 所建議回收率應符合 95.0 - 105.0 %，準確度結果可符合規範。

最低定量濃度與最低檢測濃度

採回應值標準差與斜率法，利用低濃度測試樣品檢量線，樣品濃度為 2.5、5、10、20、30 $\mu\text{g/mL}$ ，計算線性回歸，所測得回歸線性方程式為：

$$y = 157945.36x + 10514.18, \text{斜率}(S) \text{ 為 } 157945.36, \text{截距標準誤}(\sigma) \text{ 為 } 17220.87。$$

$$\text{再以 } QL = \frac{10\sigma}{S}, DL = \frac{3.3\sigma}{S} \text{ 公式推算，}$$

所得 QL 為 1.09 $\mu\text{g/mL}$ 、DL 為 0.36 $\mu\text{g/mL}$ 。

耐變性

以 0.01 N 鹽酸為稀釋液所配置的測試溶液，保存於 2 - 8°C，分別測試放置 7 天內結果，計算各別放置天數與第 0 天之含量平均值相對差異百分比 (RPD)，RPD 介於 0.51 % - 0.93 %，樣品含量平均值 RSD 為 0.31 % (表 4)。以 RPD 小於 3.0 % 為可接受變異範圍，依結果顯示，測試樣品以 0.01 N 鹽酸為稀釋液所配置的測試溶液，儲存於 2 - 8°C 中，7 天內皆可維持安定。使用不同批次管柱搭配不同儀器進行兩組別測試，系統適用性評估結果，層析波峰滯留時間 RSD 分別為 0.94 % 與 0.47 %，層析波峰面積 RSD 分別為

0.16 %與 0.21 %，平均曳尾因數分別為 1.07 與 1.08 (表 5)，兩組間樣品平均含量，RPD 為 1.94 % (表 6)。以 RPD 小於 2.0 %為可接受偏差規範，測試結果 1.94 %於可接受範圍內，但明顯可見差異較大，顯示不同儀器搭配不同管柱所造成之量測誤差較大。此外，在測試結果中，儀器 A 滯留時間約為 10.72 分鐘與儀器 B 滯留時間為 11.81 分鐘，兩者滯留時間有所差異，推測主要原因為耐變性所使用的儀器雖然是同廠牌，但屬不同系列；由於不同廠牌或不同系列儀器，本身具有不同的儀器系統體積，所以進行相同測試時，仍有滯留時間差異性。

結論

本方法參考中華藥典中去氧羥四環素鹽酸鹽原料含量測定方法，修改調整以適用於口服液劑含量檢測。使用簡單的逆相高效液相層析法，搭配聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物管柱，並以含有 77 gm 三級丁醇的磷酸鹽緩衝液為移動相，可於 18 分鐘內完成分析。經由專一性、線性、精密度與準確度等確效參數評估結果顯示，於 400 - 1,200 $\mu\text{g/mL}$ 濃度範圍內，相關線性良好， R^2 為 0.9999；精密度 RSD 符合小於 3 % 預期規範內；準確度回收率符合 95.0 - 105.0 % 預期規範內；且以 0.01 N HCl 為稀釋液所配置的測試溶液，儲存於 2 - 8°C 中，7 天內 RPD 皆小於 2.0 %，顯示出良好的穩定性。綜合以上結果，確認本方法具有良好的準確性與再現性，可提供作為去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑含量測定參考方法。

利用 RP-HPLC 測定去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑中有效成分含量

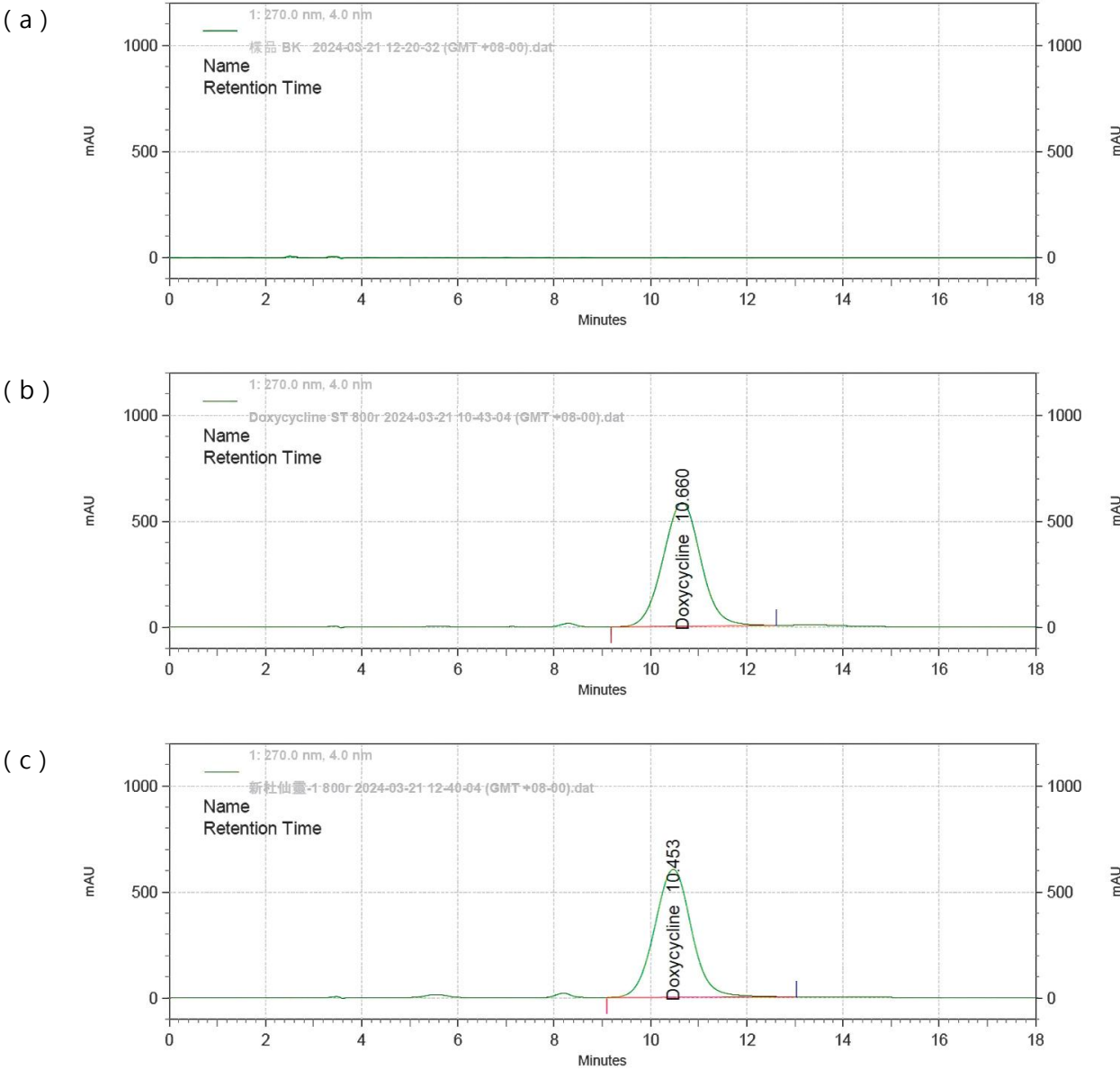


圖 1、空白樣品層析圖 (a) 顯示，於標準品溶液 (b) 與樣品溶液 (c) 主波峰滯留時間附近皆無其他波峰干擾。

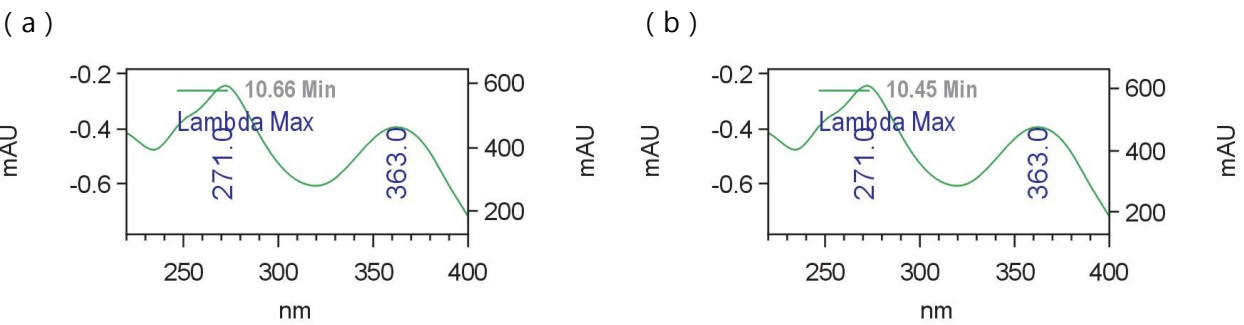


圖 2、標準品溶液 (a) 與樣品溶液 (b) 去氧羥四環素波峰光譜圖可見同樣於 271 nm 與 363 nm 處皆有高吸收值。

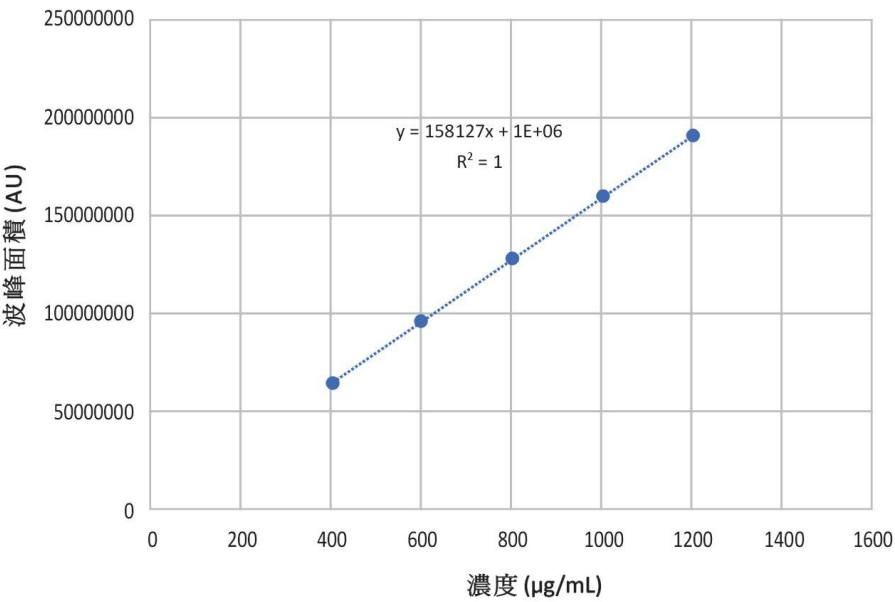


圖 3、標準品濃度 400 µg/mL 至 1,200 µg/mL 間呈現良好線性。

利用 RP-HPLC 測定去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑中有效成分含量

表 1、精密度 (重複性) 評估結果。

標準品濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	面積	平均面積	標準差	相對標準差 (RSD)
400	63071688			
400	63657464	63463844	339626	0.54 %
400	63662380			
600	95783502			
600	95204330	95444153	302140.9	0.32 %
600	95344627			
800	127223628			
800	127888601	127498626	347076.6	0.27 %
800	127383648			
1,000	158987219			
1,000	159119774	158965950	165486.3	0.10 %
1,000	158790858			
1,200	189752105			
1,200	189913624	190346221	892820.1	0.47 %
1,200	191372935			

表 2、精密度 (中間精密度) 評估結果。

組別	不同天/ 操作人員	樣品測定含量 (mg/mL)							含量平均值 $\pm$ SD	RSD
一	Day 1+人員 A	202.53	202.51	202.38	200.87	202.98	201.76	202.17 $\pm$ 0.75		
二	Day 2+人員 B	200.39	202.70	200.04	195.55	198.62	200.39	199.61 $\pm$ 2.38	201.03 $\pm$ 2.01	1.00 %
三	Day 3+人員 C	200.18	203.08	199.19	203.23	199.53	202.55	201.29 $\pm$ 1.86		

表 3、準確度評估結果。

標準品添加濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	添加樣品波峰面積	添加後測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率	平均回收率
600	111541931	697.10	98.7 %	98.5 %
	111414090	696.30	98.4 %	
	111776172	698.59	99.1 %	
800	126373133	790.90	97.4 %	
	127246091	796.42	98.8 %	
	126828081	793.77	98.2 %	
1,000	142797340	894.76	98.7 %	
	142709237	894.21	98.6 %	
	142708787	894.20	98.6 %	

表 4、溶液安定性評估結果，以 0.01 N 鹽酸為稀釋液所配置的測試溶液，儲存於 2 - 8℃中，7 天內可維持穩定。

天數	含量平均值±標準差 ($\text{mg/mL}\pm\text{SD}$) ($n=6$)	相對差異百分比
0	202.17±0.75	-
1	201.04±1.33	0.56 %
2	201.15±0.96	0.51 %
3	201.06±0.99	0.55 %
6	200.31±1.06	0.93 %
7	200.63±1.19	0.77 %
平均值	201.06±0.63	
RSD	0.31 %	

利用 RP-HPLC 測定去氧羥四環素鹽酸鹽口服液劑中有效成分含量

表 5、不同批次管柱搭配不同儀器進行系統適用性測試結果。

重複注射	組別一 (儀器 A+管柱 A)			組別二 (儀器 B+管柱 B)		
	滯留時間	波峰面積	曳尾因數	滯留時間	波峰面積	曳尾因數
1	10.86	126747382	1.08	11.90	129176702	1.08
2	10.79	126812846	1.08	11.81	129600096	1.08
3	10.74	126961093	1.07	11.82	129535240	1.08
4	10.68	127104713	1.07	11.79	129715631	1.08
5	10.63	127099993	1.07	11.73	129847381	1.08
6	10.59	127287228	1.07	11.78	129920455	1.08
平均值	10.72	127002209	1.07	11.81	129632584	1.08
標準差	0.101	201886.25		0.055	266181.89	
RSD	0.94 %	0.16 %		0.47 %	0.21 %	

表 6、不同批次管柱搭配不同儀器進行測試樣品含量檢測結果。

組別	樣品測定含量 (mg/mL)							含量平均值±SD	RPD
一	202.53	202.51	202.38	200.87	202.98	201.76	202.17±0.75	200.23±2.15	1.94 %
二	198.78	198.72	198.24	197.90	197.02	199.09	198.29±0.75		

參考文獻

1. 中華藥典第九版編修諮議會。中華藥典。臺北，衛生福利部食品藥物管理署，2021。
2. Brayfield A. Martindale: The Complete Drug Reference, Pharmaceutical Press, London, 2014.
3. British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia Commission, London, UK, 2023.
4. European Pharmacopoeia (11th Edition). European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe, Strasbourg, France, 2022.
5. Hasan KM, Haque MA, Kobir SA, Hossain M. Quantification of Doxycycline Hyclate in Different Pharmaceutical Samples by UV Assay. Eur J Biol Res, 6:275-286, 2016.
6. International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH). Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology. Topic GL 2, European Medicines Agency, London, UK, 1998.
7. Jutglar M, Foradada M, Caballero F, Hoogmartens J, Adams E. Influence of the solvent system on the stability of doxycycline solutions. J Pharm Biomed Anal, 159:60-65, 2018.
8. Kogawa AC, Salgado HRN. Doxycycline hyclate: A review of properties, applications and analytical methods. Int J Life Sci Pharma Res, 2:11-25, 2012.
9. Kotb S, Ahmed M, Hassan D, Soltan E. Stability of antibiotics in drinking water: An advanced approach towards the impacts of water quality parameters on doxycycline bioavailability. J Adv Vet Anim Res, 6:438-444, 2019.
10. Mitic SS, Miletic GZ, Pavlovic AN, Naskovic-Djokic D. Determination of doxycycline in pharmaceuticals based on its degradation by Cu(II)/H₂O₂ reagent in aqueous solution. J Anal Chem, 64:231-237, 2009.
11. Pourmoslemi S, Mirfakhraee S, Yaripour S, Mohammadi A. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for rapid determination of doxycycline in pharmaceutical bulk and dosage forms. Pharm Sci, 22: 96-104, 2016.
12. Ramesh PJ, Basavaiah K, Divya MR, Rajendraprasad N, Vinay KB, Revanasiddappa HD. Simple UV and visible spectrophotometric methods for the determination of doxycycline hyclate in pharmaceuticals. J Anal Chem, 66:482-489, 2011.
13. Tegegne B, Chandravanshi BS, Zewge F, Pillay L, Chimuka L. Development and validation of a single HPLC method for the determination of thirteen pharmaceuticals in bulk and tablet dosage form. Bull Chem Soc Ethiop, 35:17-31, 2021.
14. United States Pharmacopeia. United States pharmacopeia Convention, Rockville, MD, USA, 2023.

Determination of active ingredient content in doxycycline hyclate oral solution by RP-HPLC method

YL Chen*, SH Chen, HL Chan, WH Lin, CC Chang

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract A quantitative method was developed to determine the active ingredients in oral solutions of doxycycline hyclate for animal use, employing reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with a polystyrene-divinylbenzene copolymer column. The modified method was based on the assay of doxycycline hyclate in the Taiwan Pharmacopoeia. Chromatographic separation was achieved by using an RPsep PRX-1 column (4.6×250 mm) maintained at a temperature of $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The flow rate was set at 1 mL/min, with a phosphate buffer containing 77 gm of tertiary butanol as the mobile phase, and detection was performed at 270 nm. Analysis was completed within 18 minutes. The results showed that the doxycycline peak appeared at approximately 10.6 minutes, with no interference from other impurity peaks. Excellent correlation coefficients (R^2) of 0.9999 were observed within a concentration range of 400 to 1,200 $\mu\text{g/mL}$. The relative standard deviations (RSD) for repeatability ranged from 0.10 % to 0.57 %, while the intermediate precision RSD was 1.00 %. The accuracy recovery rates ranged from 97.4 % to 99.1 %. The sample solutions stored at $2 - 8^{\circ}\text{C}$ showed stability over 7 days. The established analytical method demonstrated robustness and reproducibility, and gave the most reliable results for the quantification of doxycycline hyclate in oral solutions for animal use.

Keywords: *Doxycycline hyclate, Reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), Polystyrene-divinylbenzene copolymer column*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

