

HPLC法同时测定双氯达克乳膏中2种主药及防腐剂的含量

陈红君^{1*}, 干志彬¹, 沈 鸣², 袁 杰¹, 余自成^{1#}(1. 同济大学附属杨浦医院/上海市杨浦区中心医院临床药学与药理学研究室, 上海 200092; 2. 上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

中图分类号 R927.2; R986 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2765-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.28

摘要 目的: 建立同时测定双氯达克乳膏中氯霉素、丙酸氯倍他索和防腐剂羟苯乙酯含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以醋酸氟轻松为丙酸氯倍他索的内标。色谱柱为XBridge™ C₁₈, 流动相为0.02 mol/L磷酸二氢钾-甲醇(35:65), 流速为1.0 ml/min, 紫外检测波长为240 nm, 柱温为40 ℃。结果: 氯霉素、丙酸氯倍他索和羟苯乙酯检测质量浓度线性范围分别为0.11~2.22、0.005~0.11、0.01~0.22 mg/ml($r \geq 0.999 9$, $n=5$), 平均回收率分别为101.40%、98.31%、100.19%, RSD分别为0.70%、0.63%、0.75%($n=9$)。结论: 该方法准确度和回收率均符合要求, 可用于控制双氯达克乳膏的质量。

关键词 高效液相色谱法; 双氯达克乳膏; 氯霉素; 丙酸氯倍他索; 羟苯乙酯; 含量测定

Simultaneous Determination of 2 Kinds of Main Components and Preservative in Shuanglv Dake Cream by HPLC

CHEN Hong-jun¹, GAN Zhi-bin¹, SHEN Ming², YUAN Jie¹, YU Zi-cheng¹ (1. Research Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology, Yangpu Hospital of Tongji University/Shanghai Yangpu District Central Hospital, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chloramphenicol, clobetasol propionate and ethylparaben in Shuanglv dake cream. METHODS: HPLC method was adopted using fluocinonide as internal standard for clobetasol propionate. The determination was carried out on XBridge™ C₁₈ column with 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate-methanol (35:65) as mobile phase at flow rate of 1.0 ml/min. The UV detection wavelength was 240 nm, and the column temperature was 40 ℃. RESULTS: The linear ranges of chloramphenicol, clobetasol propionate and ethylparaben were 0.11-2.22 mg/ml, 0.005-0.11 mg/ml and 0.01-0.22 mg/ml ($r \geq 0.999 9$, $n=5$), respectively. The average recoveries were 101.40% for chloramphenicol (RSD=0.70%), 98.31% for clobetasol propionate (RSD=0.63%) and 100.19% for ethylparaben (RSD=0.75%), respectively ($n=9$). CONCLUSIONS: The accuracy and recovery of the method are in line with the standard. It can be applied for the quality control of Shuanglv dake cream.

KEY WORDS HPLC; Shuanglv dake cream; Chloramphenicol; Clobetasol propionate; Ethylparaben; Content determination

双氯达克乳膏为我院自制制剂, 由氯霉素、丙酸氯倍他索等与乳膏基质混匀制成, 临床上用于治疗神经性皮炎、银屑

病、湿疹和各种瘙痒等, 疗效确切。制剂中所用的羟苯乙酯为尼泊金酯类化合物, 是一类很有效的防腐剂, 普遍应用于医院

同比例的流动相可用于检测曲安奈德。笔者通过比较不同流动相的分离结果, 最终确定了甲醇-水(每1 000 ml加入三乙胺7 ml, 磷酸调pH为7.2)(70:30)为流动相。结果显示, 在此流动相下, 阴性对照溶液对目标成分未见干扰, 加样回收率符合要求; 流动相中加入三乙胺以及用磷酸调节pH可以显著改善色谱图的峰形。

(2)通过全波长扫描, 发现醋酸曲安奈德在240 nm波长处吸光度值最大, 但是盐酸苯海拉明、硝酸咪康唑在此波长下吸光度值较小; 而当选择230 nm波长时, 三者均有较好的吸收, 故选择230 nm为检测波长。

(3)本试验结果表明所建立的方法方便、快速、准确。由

* 主管药师, 博士。研究方向: 临床药学、药物分析。电话: 021-65690520-624。E-mail: cindy009898@163.com

通信作者: 主任药师, 博士。研究方向: 临床药学。电话: 021-65690520-361。E-mail: yzcheng666@hotmail.com

于复方曲安奈德乳膏原有的制剂质量标准中无“含量测定”项, 本试验方法的建立可提高本品的质量标准, 保障临床用药安全、有效。

参考文献

- [1] 黄兴汉, 费路华, 陆春游. HPLC法测定复方醋酸曲安奈德乳膏的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(1): 89.
- [2] 陆兴义. HPLC法测定醋酸曲安奈德乳膏中醋酸曲安奈德的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1 652.
- [3] 陈文, 田勇, 周伟. HPLC法测定复方硝酸咪康唑乳膏中3组分的含量[J]. 中国药房, 2009, 20(4): 292.
- [4] 费路华, 聂小春. 高效液相色谱法测定复方健疗霜中三组分含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 165.
- [5] 刘百义. 派瑞松乳膏中曲安奈德和硝酸益康唑的含量测定[J]. 中国药业, 2009, 18(7): 26.

(收稿日期: 2012-10-17 修回日期: 2013-02-06)

制剂的软膏和液体制剂处方中。近年来国外研究显示其在临床上有多重不良反应,尤以过敏反应多见^[1-2]。医院外用乳膏剂中其常用量为0.1%^[3],有报道^[4]建议羟苯乙酯用量可控制在0.03%~0.06%,以降低其不良反应发生几率。因此医药学工作者应控制这类防腐剂的处方含量在适宜水平,不宜高于目前的常用含量。为此,笔者建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定双氯达克乳膏中氯霉素、丙酸氯倍他索及羟苯乙酯的含量,以控制制剂质量,研究结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器

HPLC系统,包括1525二元泵、2489紫外检测器、2707自动进样器、智能柱温箱、Breeze™ Software色谱工作站(美国Waters公司);MS204S型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);DK-S22型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

氯霉素对照品(批号:130303-200614,纯度:99.3%)、丙酸氯倍他索对照品(批号:100302-200602,纯度:99.8%)、醋酸氟轻松对照品(内标,批号:100010-201108,纯度:99.6%,使用前105℃干燥2h)均来源于中国食品药品检定研究院;羟苯乙酯对照品(广东省台山市新宁制药厂,批号:20100701,纯度:100.1%);双氯达克乳膏(批号:2012001、2012002、2012003,规格:每盒20g,含氯霉素0.2g、丙酸氯倍他索0.01g、羟苯乙酯0.02g)及不含主成分的空白基质均由我院制剂室制备;试验用水均为超纯水,甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯。

2 方法与结果^[5-6]

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品混合溶液的制备。精密称取对照品氯霉素250.0mg、丙酸氯倍他索50.0mg、内标7.5mg、羟苯乙酯25.0mg,分别置于25ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成质量浓度分别为10.0、2.0、0.3、1.0mg/ml的对照品贮备液。分别精密量取除内标贮备液外的对照品贮备液适量,置于25ml量瓶中,再加入内标贮备液1.25ml,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即制成含氯霉素0.4mg/ml、丙酸氯倍他索0.02mg/ml、羟苯乙酯0.04mg/ml,并含内标0.015mg/ml的对照品混合溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备。精密称取双氯达克乳膏1g(约含氯霉素10mg、丙酸氯倍他索0.5mg、羟苯乙酯1mg),置于25ml量瓶中,精密加内标溶液1.25ml,加甲醇约20ml,于70℃水浴中加热10min,小心摇荡使主药尽量溶解;放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,置于冰浴中冷却2h以上,取出后用0.45μm微孔滤膜迅速滤过,续滤液放冷,即得供试品溶液。空白基质由不含3个被测组分的其他组分按处方比例制得,同法处理得空白基质试液。

2.2 检测波长的选择

取丙酸氯倍他索(0.02mg/ml)、氯霉素(0.02mg/ml)、羟苯乙酯(0.008mg/ml)3溶液进行扫描,光谱图见图1。

由图1可见,丙酸氯倍他索、羟苯乙酯及氯霉素的最大吸收波长分别为240、256、277nm,同质量浓度丙酸氯倍他索与氯霉素的最大吸收强度相当,0.008mg/ml的羟苯乙酯的最大吸收强度比其他2种组分最大吸收强度高,加之样品中3种组分含量之比为氯霉素-羟苯乙酯-丙酸氯倍他索=20:2:1,鉴

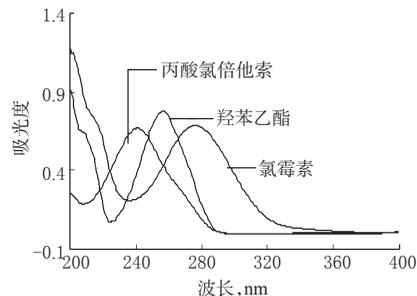


图1 3组分的紫外吸收光谱图

Fig 1 UV spectrums of 3 components

于丙酸氯倍他索量最低,最大吸收较弱,此组分测定波长选择240nm为佳。笔者曾试验0~6min使用270nm、6~14min使用240nm的双波长检测,但由于波长差距较大,转化后基线漂移较大,导致内标峰形不好,丙酸氯倍他索含量测定准确度不理想;且双波长检测对仪器要求较高,影响方法的适用性。最终本文选定240nm为3种组分共同检测的波长。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:XBrige™ C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:0.02mol/L磷酸二氢钾-甲醇(35:65),流速:1.0ml/min;紫外检测波长:240nm;进样量:20μl;柱温:40℃;灵敏度:0.002AUFS。取“2.1”项下对照品混合溶液、供试品溶液和空白基质试液进样分析。结果在该色谱条件下,氯霉素、羟苯乙酯、内标及丙酸氯倍他索的色谱峰形良好,保留时间分别为3.46、4.44、9.63、13.35min,4种组分的理论板数均大于2800,分离度均大于3.7,基质不干扰主成分的测定,色谱图见图2。

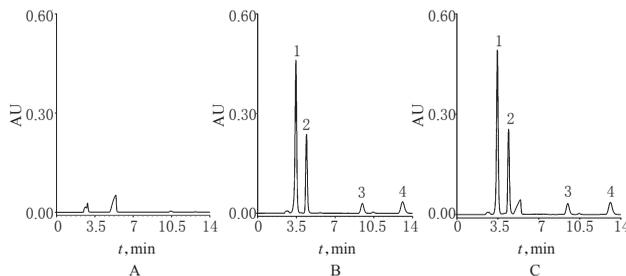


图2 高效液相色谱图

A. 空白基质试液;B. 对照品混合溶液;C. 供试品溶液;1.氯霉素;2.羟苯乙酯;3.内标;4.丙酸氯倍他索

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank matrix solution; B. mixed solution of substance control; C. test sample solution; 1. chloramphenicol; 2. ethylparaben; 3. internal standard; 4. clobetasol propionate

2.4 标准曲线的制备

分别精密量取除内标溶液外的对照品贮备液适量,置于25ml量瓶中,再各加入内标贮备液1.25ml,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成一系列不同质量浓度的标准溶液(氯霉素为0.11、0.22、0.56、1.11、2.22mg/ml,丙酸氯倍他索为0.005、0.01、0.028、0.056、0.11mg/ml,羟苯乙酯为0.01、0.02、0.056、0.11、0.22mg/ml),进样测定。氯霉素与羟苯乙酯分别按外标法以色谱峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归,丙酸氯倍他索按内标法以丙酸氯倍他索与内标峰面积之比(y)对质量浓度(x)进行线性回归,结果见表1。

2.5 精密度试验

表1 3种组分的线性关系(n=5)

Tab 1 Linear ranges of 3 components(n=5)

组分	质量浓度,mg/ml	回归方程	r
氯霉素	0.11~2.22	$y=-5.67 \times 10^3+1.21 \times 10^4x$	0.999 94
丙酸氯倍他索	0.005~0.11	$y=-2.64 \times 10^{-4}+9.56 \times 10^{-1}x$	0.999 99
羟苯乙酯	0.01~0.22	$y=-1.73 \times 10^4+5.71 \times 10^7x$	0.999 98

取对照品混合溶液适量,分别在同日内重复进样5次,测定其峰面积;另连续测定5 d,每日进样1次。结果,氯霉素、丙酸氯倍他索、内标、羟苯乙酯的日内RSD分别为0.63%、0.97%、0.83%、0.87%(n=5),日间RSD分别为1.09%、1.26%、0.89%、0.95%(n=5)。

2.6 回收率试验

取空白基质1 g,精密称定,共9份,按处方比例精密加入低、中、高不同量的氯霉素、丙酸氯倍他索和羟苯乙酯对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。以标准曲线定量各被测组分,回收率试验结果见表2。

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab 2 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,%
氯霉素	12.032	11.951	99.33	101.40	0.70
	10.027	10.047	100.20		
	8.022	8.397	104.67		
丙酸氯倍他索	0.600 6	0.602 1	100.25	98.31	0.63
	0.500 5	0.490 3	97.97		
	0.400 4	0.387 3	96.72		
羟苯乙酯	1.201	1.197	99.25	100.19	0.75
	1.001	1.004	100.29		
	0.808	0.809	101.02		

2.7 样品含量测定

精密称取双氯达克乳膏1 g(约含氯霉素10 mg,丙酸氯倍他索0.5 mg,羟苯乙酯1 mg)置于25 ml量瓶中,精密加内标溶液1.25 ml,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。氯霉素和羟苯乙酯按外标法以峰面积计算含量,丙酸氯倍他索以内标法计算含量。样品中3组分含量测定结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=4)

Tab 3 Results of content determination of samples(n=4)

组分	批号	含量,mg/g	占标示量百分比,%	RSD,%
氯霉素	2012001	9.437	94.37	0.76
	2012002	9.542	95.42	0.49
	2012003	10.280	102.80	0.63
丙酸氯倍他索	2012001	0.502 2	100.43	0.59
	2012002	0.501 5	100.29	0.48
	2012003	0.524 5	104.89	0.65
羟苯乙酯	2012001	0.999 3	99.93	0.57
	2012002	1.003 0	100.30	0.42
	2012003	1.012 7	101.27	0.43

2.8 稳定性试验

取供试品溶液适量,按“2.3”项下色谱条件,分别于第0、1、2、4、6、8、12 h进样测定,计算。结果,供试品中氯霉素、丙酸氯倍他索及羟苯乙酯的RSD分别为0.59%、0.87%及0.89%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本试验曾测试了色谱柱XBrige™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5

μm)与Symmetry® C₁₈(75 mm×4.6 mm, 3.5 μm)的分析效果,结果发现采用前种色谱柱,被测组分的分离度效果较好,且无重叠峰,因此选择前者为分析色谱柱。

3.2 流动相体积比与柱温的优化

为得到最快的分析速度和最好的分离度,本试验比较了0.02 mol/L磷酸二氢钾-甲醇流动相在30:70、35:65和40:60不同体积比下的测定结果。结果显示体积比为30:70时,组分迅速洗脱,但分离度和峰形均不理想;而40:60体积比下,各组分峰分离度良好,但洗脱时间太长;当体积比为35:65时,洗脱时间、峰形得以兼顾,且峰2与峰1、峰3与峰2、及峰4与峰3之间的分离度分别为3.8、7.3及6.8,均与杂质达到基线分离(见图2C)。同时,本试验比较了30℃柱温和40℃柱温对测定结果的影响,结果发现在35:65流动相体积比、40℃柱温条件下,各组分洗脱时间、峰形和分离度都达到最理想的情况。

3.3 样品处理工艺的优化

为使被测组分在测定前充分从样品中提取出来,笔者测试了甲醇直接超声溶解、少量氯仿大量甲醇超声溶解后直接滤过进样的方法,发现超声不能使样品溶解,且进样后峰形欠佳。又考察了甲醇以不同温度(60、70、80℃)溶解样品,溶解后冰浴不同时间(0、30、60、90、120 min与8 h)后过滤进样,同时考察了样品稀释倍数(1 g至10 ml、1 g至25 ml、1 g至50 ml、1 g至100 ml)的影响,结果回收率以1 g样品用25 ml甲醇70℃溶解、冰浴2 h以上时最接近100%。

3.4 方法的确定

双氯达克乳膏是医院制剂,目前只有1篇报道用HPLC法同时测定其中氯霉素与丙酸氯倍他索的含量^[6]。经本试验验证该方法均用外标法测定氯霉素与丙酸氯倍他索,由于两者含量相差20倍,如果均用外标法测定稳定性不理想,测试样品含量结果易偏高。故本文以该法为基础优化了色谱条件、样品处理方法及工艺,参考《中国药典》^[5]引入醋酸氟轻松为丙酸氯倍他索内标,使结果稳定、准确度更高,且可以同时测定2种主药及防腐剂羟苯乙酯的含量。在本方法色谱条件下,几种被测组分达到基线分离、峰形好、分离度高,准确度及回收率均符合要求,各试验中RSD均<2%。故本方法可以更好地控制双氯达克乳膏的质量。

参考文献

- [1] Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives[J]. *Dermatol Ther*, 2004, 17(3): 251.
- [2] Veien NK, Hattel T, Laurberg G. Oral challenge with parabens in paraben-sensitive patients[J]. *Contact Dermatitis*, 1996, 34(6): 433.
- [3] 雍德卿. 新编医院制剂技术[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 238-294.
- [4] 李中东, 张云轩, 郭燕萍, 等. 羟苯酯类防腐剂的不良反应[J]. *中国药物警戒*, 2012, 9(5): 303.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 102, 1 031.
- [6] 袁杰, 张琳, 黄雄伟, 等. HPLC法同时测定双氯达克乳膏中氯霉素和丙酸氯倍他索的含量[J]. *中国药房*, 2010, 21(1): 78.

(收稿日期: 2012-10-16 修回日期: 2012-12-04)