

高效液相色谱法直接测定复方倍氯米松橡胶膏中微量丙酸倍氯米松的含量

陈悦¹, 蔡志波² (1. 浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004; 2. 浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310003)

摘要:目的 建立了复方倍氯米松橡胶膏剂中丙酸倍氯米松的含量测定方法。方法 RP-HPLC 外标法, Shim-pack CLC-ODS C_{18} 柱, $6.0\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$; 流动相为 $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液(用 80% 磷酸溶液调节 pH 值至 2.5)-甲醇(20:80); 柱温 40°C ; 检测波长 240 nm 。结果 当进样体积为 $50\mu\text{L}$ 时, 在 $0.109 \sim 4.34\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内, 线性关系良好; 其他相似物质峰对丙酸倍氯米松的测定没有任何干扰; 方法的重复性、回收率、溶液的稳定性均令人满意。结论 本法灵敏、方便、准确, 可作为复方倍氯米松橡胶膏剂中丙酸倍氯米松的含量测定的首选方法。

关键词: 高效液相色谱法; 丙酸倍氯米松; 橡胶膏剂; 含量测定

中图分类号: R917.01; R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2003)06-0497-03

Determination of beclometasone dipropionate in compound beclometasone adhesive plaster by directly HPLC microanalysis

Chen Yue¹, Cai Zhibo² (1. Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2. Affiliated Children Hospital, Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a reversed phase HPLC method to determine the content of beclometasone dipropionate in compound beclometasone adhesive plaster. **METHOD** The analysis was carried out on a column named Shim-pack CLC-ODS ($6.0\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$) with a mobile phase of $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate monobasic sodium solution (adjusted the pH value to 2.5 by 80% phosphate solution) - methanol (20:80). The detection wavelength was 240 nm and the column temperature was set at 40°C . **RESULTS** The linear range was $0.109 \sim 4.34\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.999994$, $n = 10$) when the injection volume was $50\mu\text{L}$; the average recovery of beclometasone dipropionate was 101.6% ($RSD = 3.7\%$, $n = 9$); The reproducibilities of the method (RSD) was 1.2% ($n = 6$). The specificity of the method was very well. **CONCLUSION** This method is a rapid, simple and accurate procedure, which is suitable for assay of beclometasone dipropionate in compound beclometasone adhesive plaster.

KEY WORDS: HPLC; beclometasone dipropionate; adhesive plaster; determination

复方倍氯米松橡胶膏为治疗神经性皮炎、湿疹和牛皮癣的外用良药,膏内有效成分主要为丙酸倍氯米松、硫酸新霉素、盐酸苯海拉明、氧化锌和麝香草酚等,其中以丙酸倍氯米松含量为最低,每片仅 $84\mu\text{g}$,加上膏内成分复杂,提取困难,要准确测定其含量十分困难,所以多年来地方标准中丙酸倍

氯米松一直只有鉴别项而无含量测定。为提高和完善本品的质量标准,更好地控制生产工艺和产品质量,本实验借地标升国标的契机,研究和建立了复方倍氯米松橡胶膏剂中丙酸倍氯米松的含量测定方法,该法运用反相 HPLC 外标法,样品只经简单预处理,就可直接进样,快速、准确地测定出橡

胶膏中微量丙酸倍氯米松的含量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 型组合式全自动高效液相色谱仪,包括 Agilent G1311 A 四元混合泵、Agilent G1315 B DAD 检测器、Agilent G1313 A ALS 自动进样器;Sartorius BP 211 D 型电子分析天平。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯;磷酸二氢钠、磷酸为分析纯;水(重蒸水)。

1.3 样品、对照品和辅料的来源

丙酸倍氯米松化学对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 119-9101),经 105℃干燥恒重后含量为 99.5%以上;橡胶膏剂(4cm×6cm/片,浙江嘉兴康宝药业有限公司,批号分别为 20020117、20020123、20020126)。

2 实验方法

2.1 方法与色谱条件

色谱柱为 Shimadzu Shim-pack CLC-ODS C₁₈柱,6.0mm×150mm,5μ;流动相为 0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钠溶液(用 80%磷酸溶液调节 pH 值至 2.5)-甲醇(20:80);柱温 40℃;检测波长 240nm。取本品 5 片,除去盖衬,黏贴于定量滤纸上,仔细裁剪成细丝状,投入 500mL 量瓶中,加乙醇 250mL,水浴加热使乙醇挥发至约 50mL,取出,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,超声 30min 使溶液呈半透明状,取出,静置 1h,滤过,精密量取续滤液 50μL 注入液相色谱仪,以每分钟 1.0mL 的流速记录色谱图至丙酸倍氯米松峰保留时间的 1.5 倍,接着以每分钟 2.0mL 的流速继续洗脱至丙酸倍氯米松峰保留时间的 5 倍;另取丙酸倍氯米松对照品,同法测定,按外标法以峰面积定量计算。

2.2 线性关系考察

取丙酸倍氯米松对照品适量,照“2.1”项下的方法用流动相制成浓度分别为 0.109、0.217、0.434、0.869、1.09、1.30、1.74、2.17、3.26、4.34μg·mL⁻¹的工作溶液,依次准确进样 50μL,记录色谱图。结果见表 1。

表 1 供试液浓度(μg·mL⁻¹)与相应的峰面积

Tab 1 The injection concentrations vs response peak area			
浓度	峰面积	浓度	峰面积
0.109	9.98	1.30	110.61
0.217	18.76	1.74	146.58
0.434	36.80	2.17	184.27
0.869	73.67	3.26	276.52
1.09	91.89	4.34	368.71

以峰面积 A 为纵坐标,以上述梯度工作溶液的浓度 C 为横坐标,对表 1 中的数据组合进行线性拟合,得回归方程:

$A = 84789.0 C + 0.10339 \quad r = 0.999994 \quad (n = 10)$

结果表明,当进样体积为 50μL 时,在 0.109~4.34μg·mL⁻¹ 的浓度范围内,丙酸倍氯米松的量与相应的峰面积呈良好的线性关系;并据此将丙酸倍氯米松含量测定的供试液浓度定为约 0.8~1μg·mL⁻¹,进样体积定为 50μL。

2.3 定量限

本法用于微量样品的含量测定,故应重点考察方法的定量限。分析“2.2”项下最低端浓度(0.1μg·mL⁻¹)线性工作溶液的色谱图,发现主色谱峰的信噪比约为 10,且每次进样峰面积均有良好的重现性,可以实现定量测定,据此求得本法的定量限为 5.45ng。

2.4 重复性实验

取 020107 批号样品共 30 片,分成 6 份,每份 5 片,照 2.1 项下的方法,依法处理,依次连续测定,同时取丙酸倍氯米松对照品,同法测定,按外标法分别计算上述 6 份样品中每片含丙酸倍氯米松的含量,对本法的重复性进行考察。结果分别为 116.3、115.2、114.5、116.8、115.8、118.5%,平均值为 116.2%,RSD 为 1.2%。

2.5 溶液的稳定性

任取本品重复性试验项下的供试品溶液 1 份,照 2.1 项下方法和色谱条件实验,分别于第 0、24、48h 量取 50μL 注入液相色谱仪,注意保持整个实验过程(48h 内)仪器、流动相及色谱参数的稳定。记录色谱图,观察色谱图中倍氯米松主峰峰面积,色谱图中各峰形态、保留时间等的变化,以分析其稳定性变化规律。

实验结果表明,本品的供试品溶液相当稳定,HPLC 色谱图完全一致,倍氯米松主峰峰面积基本相同。良好的溶液稳定性,为丙酸倍氯米松含量测定的准确性提供了保障。

2.6 回收率试验

取丙酸倍氯米松对照品适量,加流动相溶解并定量稀释制成浓度约为 20μg·mL⁻¹的工作溶液,精密量取 15、20、25mL 各 3 份,分别置 500mL 量瓶中(按处方配比计算分别相当于每片橡胶膏剂标示量的 80%、100%、120%的丙酸倍氯米松),再各加入同法剪成细丝状的仅缺丙酸倍氯米松的空白橡胶膏剂 5 片,即得模拟样品;取上述模拟样品,照 2.1 项下的方法处理并测定,对本法的准确性进行考察,结果见表 2。

表 2 回收率测定结果

Tab 2 The result of recovery test					
模拟浓度范围	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均值	RSD
80%	0.05976	0.05878	98.35	101.56%	3.7%
	0.05976	0.05603	93.76		
	0.05976	0.06266	104.86		
100%	0.07968	0.08153	102.32		
	0.07968	0.08325	104.48		
	0.07968	0.08302	104.19		
120%	0.0996	0.1019	102.29		
	0.0996	0.09903	99.42		
	0.0996	0.1039	104.36		

2.7 专属性试验

用色谱峰保留时间对供试品溶液色谱图中的丙酸倍氯米松峰进行定性,用峰面积进行定量。尽管样品成分复杂,色谱图中未知物质峰为数众多,但运用本法规定的预处理步骤和 HPLC 色谱条件进行试验,能使橡胶膏剂中含量甚微的

丙酸倍氯米松得到很好的分离,与前后的相似物质峰完全分开;用不含丙酸倍氯米松的缺味橡胶膏剂进行空白对照试验,结果发现在原丙酸倍氯米松的出峰位置 8.1 min 处没有任何基质峰或不明成分峰存在,因此对供试品溶液中丙酸倍氯米松的定量测定没有任何干扰,证明了本法的专属性是可行的。见图 1。

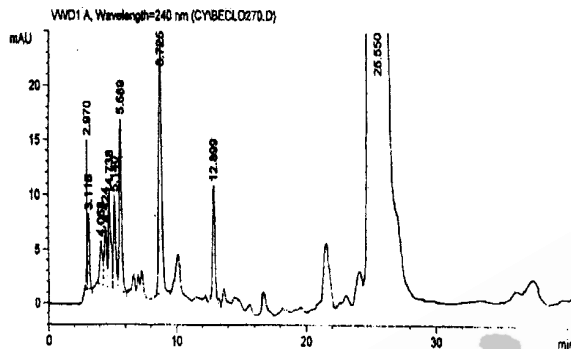


图 1 空白复方倍氯米松橡胶膏(不含丙酸倍氯米松)的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatogram of blank solution of compound beclometasone adhesive plaster without beclometasone dipropionate

3 样品测定

取“1.3”项下的 3 批样品,照“2.1”项下方法分别测定含量,结果见表 3 和图 2。

表 3 复方倍氯米松橡胶膏剂中丙酸倍氯米松的含量测定结果

Tab 3 The contents of beclometasone dipropionate of compound beclometasone adhesive plaster samples

批号	含量(标示量 %)	RSD (n = 3)
20020117	115.2	1.9 %
20020123	113.1	2.2 %
20020126	118.5	0.3 %

4 讨论

4.1 本法选定的 Shimadzu 公司 Shim-Pack CLC- ODS C₁₈ 柱(6.0 mm × 150 mm, 5 μm),经多次试验证明是适用和耐用的,故制订标准时最好予以明确;由于样品提取液中不明物质峰较多,丙酸倍氯米松峰流出后尚需 4 ~ 5 倍的保留时间才能洗脱完毕,故在倍氯米松峰流出后,可加大流速进行冲洗以节约分析时间;Shim-Pack CLC- ODS C₁₈ 柱柱压较低,可耐受较

大的流速,这也是选择该柱的原因之一;柱温测试了 20 ~ 50 ℃,发现较高的柱温有利于提高柱效和分离度,由于丙酸倍氯米松对热相当稳定,故柱温选定 40 ℃。

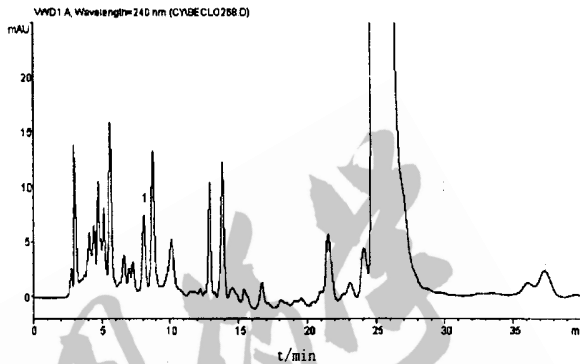


图 2 复方倍氯米松橡胶膏中丙酸倍氯米松含量测定的 HPLC 色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample solution of compound beclometasone adhesive plaster

1 beclometasone dipropionate

4.2 样品用乙醇加热提取后,尝试了两种稀释液。一是 80 % 甲醇水,该溶剂加入后,立即产生乳白色混浊,超声约 0.5 h 后,溶液呈几乎澄清,放冷过滤后可进样;二是直接用流动相稀释,加入后,也产生了白色混浊,但伴有一些灰白色沉淀,超声 0.5 h 后,溶液呈半透明状,放冷过滤可得到比前者更为清澈的溶液。两种供试液进样测定所得色谱图相差不大,但考虑到后者沉淀掉了一些无关成分,溶液与流动相性质亦较为接近,故选定后者作为正式方法。

4.3 经与中国药典 2000 年版二部收载的丙酸倍氯米松原料标准含量测定项下的流动相(74 % 甲醇水)对比,发现本法的流动相所得峰形、柱效都远高于前者。

4.4 由于橡胶膏中丙酸倍氯米松含量甚微,各种经典分析方法均难以胜任,故本实验摸索尝试了七八种溶剂(氯仿、丙酮、甲醇、乙醚、醋酸乙酯等)后选定了乙醇作为提取溶剂,经简单预处理后即可直接进样,方法灵敏,步骤简单,被测物几乎无损失,分析效率高,远胜于常规思路有机溶剂萃取分离测定法。本法线性关系、精密度、回收率、专属性等研究工作均有满意的结果,因此作为复方倍氯米松橡胶膏中丙酸倍氯米松的含量测定方法是适宜的。