

HPLC测定黄体酮氢化可的松霜中黄体酮和氢化可的松的含量

蔡果,龚春燕,申国庆(中国医学科学院 中国协和医科大学皮肤病研究所,南京 210042)

摘要:目的 建立黄体酮氢化可的松霜中黄体酮和氢化可的松含量测定的高效液相法。方法 采用 C_{18} 色谱柱,流动相为乙腈-水(1:1),检测波长为 240 nm,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果 黄体酮浓度在 $8.012 \sim 40.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.99991$),平均回收率为 99.56% (RSD%为 1.47%)。氢化可的松浓度在 $59.43 \sim 138.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.99994$),平均回收率为 100.19% (RSD%为 1.28%)。结论 本法简便、快捷,结果准确,适用于该制剂的质量控制。

关键词:高效液相法;黄体酮氢化可的松乳膏;氢化可的松;黄体酮

中图分类号: R917.101; R977.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)02-0154-03

Determination of Progesterone and Hydrocortisone in Progesterone and Hydrocortisone cream by HPLC

CAI Guo, GONG Chun-yan, SHEN Guo-qing (Institute of Dermatology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Nanjing 210042, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simple and sensitive HPLC method for determinations of Progesterone and Hydrocortisone in Progesterone and Hydrocortisone cream. **METHODS** Symmetry C_{18} column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) was used. Acetonitrile and water (1:1) was used as mobile phase. The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the detection wavelength was set at 240 nm. The

作者简介:蔡果,女,副主任药师 Tel: (025) 85478007 - 18 E-mail: Caiguol9640202@vip.sina.com

column temperature was 35 °C. **RESULTS** A good linearity was obtained over the range of 8.012 ~ 40.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 91$) for Progesterone and 59.43 ~ 138.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 94$) for Hydrocortisone, respectively. The average recoveries of these two components were 99.56% with RSD% = 1.47% and 100.19% with RSD% = 1.28%. **CONCLUSION** The method is a simple, rapid and accurate for quantitative analysis of Progesterone and Hydrocortisone.

KEY WORDS: HPLC; progesterone and hydrocortisone cream; hydrocortisone; progesterone

黄体酮氢化可的松霜是根据《上海市医院制剂手册》(第三版)^[1]配制的医院制剂,我院长期用于治疗阴道湿疹,疗效确切,临床效果较好。但该制剂质量控制仅限于定性分析,为了完善该制剂质量标准,更好地控制剂质量,笔者建立了高效液相法同时测定黄体酮、氢化可的松含量的方法,取得满意效果,现报道如下。

1 仪器与试剂

Waters1524 高效液相色谱仪, Waters2487 型紫外检测器, Breeze 色谱工作站, AE-240 型电子分析天平(梅特勒托利多), 黄体酮(上海轻工实验厂, 批号 20040608), 氢化可的松(江苏联环药业集团扬州制药有限公司, 批号 20050409), 黄体酮氢化可的松乳膏(本院自制, 批准文号: 苏药制字 H04001031), 乙腈(色谱纯), 纯化水, 其他试剂均为分析纯, 辅料均为药用规格。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 美国 WatersSymmetry C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈: 水 = 1:1, 流速: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 240 nm, 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μL 。

2.2 对照品液的制备

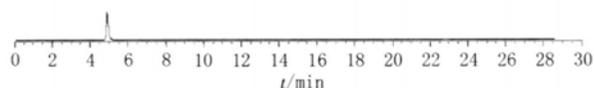
精称 105 °C 干燥至恒重的黄体酮对照品 20.77 mg, 氢化可的松对照品 19.81 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取稀释液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品液的制备

取样品 1 g (约相当于黄体酮 2 mg, 氢化可的松 10 mg), 精密称定, 置烧杯中, 加甲醇适量, 水浴加热使溶解, 在冰水中冷却, 过滤至 100 mL 量瓶中, 用甲醇反复冲洗烧杯和滤器, 洗液并入量瓶, 并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 阴性对照液的制备

按处方量去掉黄体酮和氢化可的松, 制成黄体酮氢化可的松霜基质, 精密称取基质 1.001 g, 置烧杯中, 其余操作同供试品的制备即可。分别取对照品液、供试品、阴性对照液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 结果见图 1~3。



空白基质液 HPLC 色谱图 ($t_R = 4.9\ \text{min}$)

Fig 1 HPLC-chromatogram of blank adjuvant

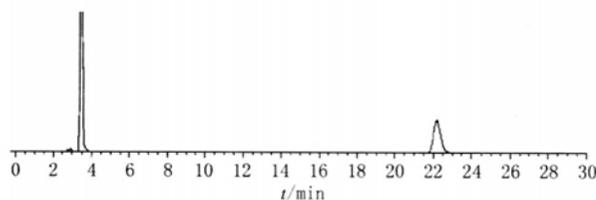


图 2 对照品 HPLC 色谱图 ($t_{R\text{氢化可}} = 3.4\ \text{min}; t_{R\text{黄体酮}} = 22.2\ \text{min}$)

Fig 2 HPLC-chromatogram of standard solution for progesterone and hydrocortisone standards

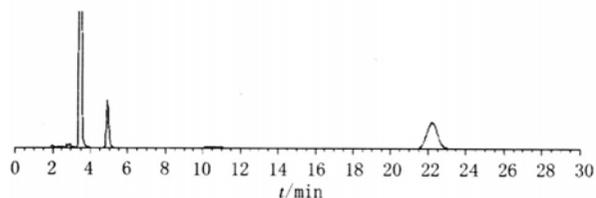


图 3 供试品 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC-chromatogram of sample

由图可知, 样品在此条件下得到很好的分离, 基质无干扰, 理论塔板数黄体酮不低于 5 300。氢化可的松不低于 4 300。

2.5 线性关系

2.5.1 黄体酮的线性关系 精密称取 105 °C 干燥至恒重的黄体酮 80.12 mg 置 100 mL 量瓶, 用甲醇适量超声溶解, 放置至室温, 定容, 摇匀, 作为储备液, 精密吸取此储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 分别置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。在上述色谱条件下, 进样 20 μL , 注入色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归, 回归方程为 $A = -51\ 600\ C + 13\ 820$ ($r=0.999\ 91$), 黄体酮浓度在 8.012 ~ 40.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.2 氢化可的松的线性关系 精密称取 105 °C 干燥至恒重的氢化可的松 19.81 mg 置 100 mL 量瓶, 用甲醇适量超声溶解, 放置至室温, 定容, 摇匀, 作为储备液, 精密吸取此储备液 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。在上述色谱条件下, 进样 20 μL , 注入色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归, 回归方程为 $A = -50\ 500\ C + 83\ 800$ ($r=0.999\ 94$), 氢化可的松浓度在 59.43 ~ 138.675 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.6 精密度试验

取同一份对照品溶液, 重复进样 5 次, 分别记录黄体酮和氢化可的松峰的面积, 黄体酮和氢化可的松 RSD 为 1.01%

和 0.8%。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品在 0, 2, 4, 6 h 测定, 记录黄体酮和氢化可的松峰面积, 黄体酮和氢化可的松的 RSD 为 1.53% 和 1.12%, 说明供试液在 6 h 内是稳定的。

2.8 重复性试验

取同一批号样品, 按“2.3”项下方法配制 5 份测定液, 按上述色谱条件分别进样 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录黄体酮和氢化可的松, 根据上述标准曲线计算两者含量。结果黄体酮平均含量为 99.56% (标示量), RSD 为 1.47%; 氢化可的松平均含量为 100.19% (标示量), RSD 为 1.28%。

2.9 回收率实验

分别取 3 份空白基质, 精密加入黄体酮和氢化可的松适量 (80%, 100%, 120%), 按“2.3”项制备供试品液。取供试品液精密进样 20 μL , 每个样品连续测定 3 次, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验 ($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=3$)

试药	加入量	测得量	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$			
黄体酮	16.01	15.82	98.81		
	20.16	19.89	98.66	99.56	1.47
	24.32	24.62	101.23		
氢化可的松	80.12	81.89	98.72		
	101.13	101.96	98.82	100.19	1.28
	120.76	122.01	101.03		

结果表明, 高, 中, 低 3 水平的回收率良好。黄体酮的平均回收率为 99.56% (RSD = 1.47%, $n=3$), 氢化可的松的平均回收率为 100.19% (RSD = 1.28%, $n=3$)。

2.10 样品测定

取样品 1 g, 精密称定, 置烧杯中, 加甲醇适量, 水浴加热使溶解, 在冰水浴中冷却, 过滤至 100 mL 量瓶中, 用甲醇反复冲洗烧杯和滤器, 洗液并入量瓶, 并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。按供试品液的制备方法制备并测定峰面积, 代入线性方程计算, 测定 3 个批次样品, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定 ($n=3$)

Tab 2 Results for content determination of samples ($n=3$)

样品批号	黄体酮的含量 (标示量 %)	RSD /%	氢化可的松的含量 (标示量 %)	RSD /%
	20060108	100.6	1.36	102.75
20060303	97.70	1.95	103.09	1.92
20060406	98.21	1.17	97.56	1.45

3 讨论

流动相的选择: 笔者曾根据中国药典^[2]方法选用甲醇-水体系, 但黄体酮和氢化可的松与基质均不能分离, 选用乙腈-甲醇-水体系, 黄体酮和氢化可的松可获得很好的分离, 但氢化可的松与空白基质分不开; 在试验中发现, 乙腈-水体系中水的比例至关重要, 对黄体酮出峰时间影响较大, 对氢化可的松出峰时间影响较小, 通过反复多次实验, 选用乙腈-水 = 1:1 体系能达到满意分离效果。

REFERENCES

- [1] The standards for Shanghai hospital pharmaceuticals (上海市医院制剂手册) [M]. Vol 3. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1995: 96.
- [2] Ch. P (2005) Vol III (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 403, 643.

收稿日期: 2007-04-03