

· 研究报告 ·

双波长 HPLC 法测定止痒地霜中地塞米松和羟苯乙酯的含量

郝哲, 邱会革, 王丽军, 刘栋, 宋艳丽, 王伟勤, 屈俊 (中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院制剂室, 河南郑州 450042)

[摘要] 目的 建立双波长 HPLC 法同时测定止痒地霜中地塞米松磷酸钠和羟苯乙酯的含量。方法 采用 RP-HPLC 法, 以 Wondasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以三乙胺溶液-甲醇-乙腈 (52 : 43 : 5) 为流动相; 检测波长为 242 nm, 流速为 1.0 ml/min。结果 羟苯乙酯和地塞米松磷酸酯分别在 21.42~64.26 μg/ml ($r=1.0000$) 和 20.84~62.53 μg/ml ($r=0.9999$) 范围内有良好的线性关系, 平均回收率分别为 99.1% (RSD=0.41%) 和 99.0% (RSD=0.72%)。结论 该法简便、准确、重复性好, 可用于止痒地霜的质量控制。

[关键词] 止痒地霜; 地塞米松磷酸钠; 羟苯乙酯

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)04-0361-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.015

Determination of dexamethasone sodium phosphate and ethylparaben in Zhiyang dishuang cream by HPLC of double wavelength

HAO Zhe, QIU Huiping, WANG Lijun, LIU Dong, SONG Yanli, WANG Weiqin, QU Jun (Preparation Room, Hospital 988 of, Joint Logistics Support Force of PLA, Zhengzhou 450042, China)

[Abstract] **Objective** To establish a double wavelength HPLC method for determination of dexamethasone sodium phosphate and ethylparaben in Zhiyang dishuang cream. **Methods** The HPLC method was adopted with the Wondasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and triethylamine solution-methanol-acetonitrile (52 : 43 : 5) as the mobile phase at the rate of 1 ml/min. The detection wavelength was 242 nm. **Results** The linear ranges of ethylparaben and dexamethasone phosphate were 21.42-64.26 μg/ml ($r=1.0000$) and 20.84-62.53 μg/ml ($r=0.9999$) respectively. The average recoveries of the three contents were 99.1% and 99.0%, while RSD were 0.41% and 0.72%. **Conclusion** The method is simple, accurate, reproducible and suitable for quality control of Zhiyang dishuang cream.

[Key words] Zhiyang dishuang cream; dexamethasone sodium phosphate; ethylparaben

止痒地霜系本院自制制剂, 主要用于过敏性皮炎, 疗效颇佳。该制剂处方以地塞米松磷酸钠为主药, 以羟苯乙酯为抑菌剂。地塞米松磷酸钠是一种常用激素类药, 连续摄入过多易导致机体激素失衡而引起一系列症状, 摄入不足则达不到理想治疗效果^[1], 因此, 有必要控制其含量。羟苯乙酯为尼泊金酯类防腐剂, 具有广谱抑菌作用, 常用于食品、药品和化妆品中^[2-4]。人用药物注册技术要求国际协调会议 (ICH) 明确提出应制订抑菌剂含量测定方法^[5], 药物制剂中抑菌剂用量不足, 达不到有效抑菌浓度; 用量过大, 具有一定毒性, 易引起不良反应^[6]。近年来, 检测制剂中羟苯乙酯的含量已越来越引起

人们的重视^[7-14]。本试验采用一种方法同时测定止痒地霜中主药及抑菌剂两种成分的含量, 方法简便, 快速, 可为其质量标准的制定提供一定的科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, 配置 SPD-10A 紫外检测器 (日本岛津公司), LC-solution Lite 色谱工作站; BT-125D 型电子天平 (赛多利斯有限公司); AS3120A 型超声波清洗器 (天津 Auto-science 公司)。

1.2 试剂

地塞米松磷酸酯对照品 (纯度 98.5%, 批号: 101116-201001, 中国食品药品检定研究院); 羟苯乙酯对照品 (纯度 99.9%, 批号: 100847-201604, 中国食品药品检定研究院)。

[作者简介] 郝哲, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药物质量控制与新药研究, Email: hzsunshine@126.com

[通讯作者] 屈俊, Email: 460567720@qq.com

止痒地霜 3 批(批号: 181020, 181022, 181024) 和阴性样品均为本院自制; 水为自制蒸馏水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Wondasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以三乙胺溶液(取三乙胺 7.5 ml, 加水稀释至 1 000 ml, 用磷酸调节 pH 值至 3.0 ± 0.05)-甲醇-乙腈(52 : 43 : 5) 为流动相; 检测波长为 256 nm 和 242 nm; 柱温 40 °C, 流速为 1 ml/min; 进样量为 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

分别精密称取羟苯乙酯对照品 10.72 mg、地塞米松磷酸酯对照品 10.58 mg 置于 50 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。再精密量取 2 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液

取本品 4 g (约相当于地塞米松磷酸钠 4 mg), 精密称定, 置烧杯中, 加甲醇约 30 ml, 50 °C 水浴保温, 超声 15 min, 移至 50 ml 量瓶中, 放至室温, 用甲醇稀释至刻度, 置冰浴中放置 1 h, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液 5 ml 至 10 ml 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.3 阴性对照品溶液

根据处方中药物的比例, 按相关工艺制备不含对应成分的阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制成阴性对照品溶液。

2.2.4 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μl 注入液相色谱仪, 照上述色谱条件进样测定, 记录色谱图。其中测定地塞米松磷酸钠的含量时, 因以地塞米松磷酸酯为对照品, 按外标法计算应以地塞米松磷酸酯的峰面积乘以 1.0931, 即得。结果见图 1。由图可知, 各主成分分离度好, 阴性对照品在相应位置上无吸收, 表明阴性无干扰。

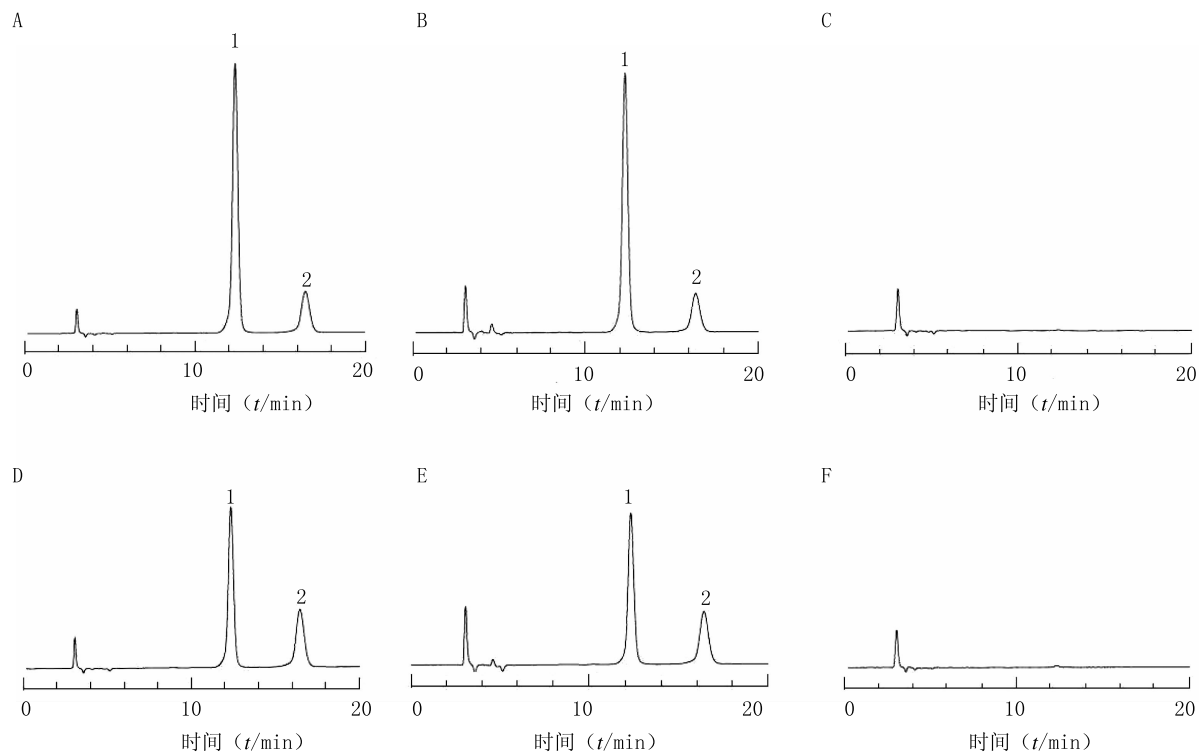


图 1 止痒地霜 HPLC 图

A. 混合对照品(256 nm); B. 供试品(256 nm); C. 阴性对照品(256 nm); D. 混合对照品(242 nm); E. 供试品(242 nm); F. 阴性对照品(242 nm); 1. 羟苯乙酯; 2. 地塞米松磷酸酯

2.2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品储备溶液 1、1.5、2、2.5、3 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 吸取 10 μl 注入色谱仪, 按上述色谱条件测

定, 以对照品的质量浓度($X, \mu\text{g/ml}$) 为横坐标, 以峰面积(Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 羟苯乙酯、地塞米松磷酸酯的回归方程分别为 $Y = 57653X - 440.8$, $r = 1.0000$ ($n = 5$) 和 $Y = 18524X + 321.4$, $r = 0.9999$

($n=5$)。结果表明,羟苯乙酯、地塞米松磷酸酯分别在 21.42~64.26 $\mu\text{g/ml}$ 和 20.84~62.53 $\mu\text{g/ml}$ 范围内有良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验

吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液重复进样 6 次,每次进样 10 μl ,测定其峰面积,结果羟苯乙酯、地塞米松磷酸酯 RSD 值分别为 0.94%、1.00%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验

精密称取 6 份样品(批号:181020)各 4 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进行测定,结果羟苯乙酯含量为 1.04 mg/g;地塞米松磷酸钠含量为 1.02 mg/g,其 RSD 值分别为 1.00%、0.95%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验

取供试品溶液适量,分别于 0、2、4、8、12 h 进样 10 μl ,分别测定其峰面积,结果羟苯乙酯、地塞米松磷酸钠的含量的 RSD 值分别为 1.00%、1.01%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验

精密称取已知羟苯乙酯、地塞米松磷酸钠含量的样品(批号:181020)9 份,其中羟苯乙酯含量为 1.04 mg/g;地塞米松磷酸钠含量为 1.02 mg/g。按照样品中各成分含有量的 80%、100%、120% 分别精密加入相应对照品(羟苯乙酯对照品浓度为 0.418 0 mg/ml;地塞米松磷酸酯浓度为 0.372 3 mg/ml)各 3 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液并照上述色谱条件测定,分别计算平均回收率,结果见表 1。

表 1 止痒地霜加样回收率试验结果($n=9$)

成分	称样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
羟苯乙酯	2.013 4	2.093 9	1.643 2	3.720 7	99.00	99.1	0.41
	2.005 4	2.085 6	1.643 2	3.717 8	99.33		
	2.113 7	2.198 2	1.643 2	3.816 2	98.46		
	2.107 6	2.191 9	2.054 0	4.227 5	99.10		
	2.125 8	2.210 8	2.054 0	4.250 1	99.28		
	2.058 7	2.141 0	2.054 0	4.180 3	99.28		
	2.056 2	2.138 4	2.464 8	4.570 6	98.68		
	2.037 1	2.118 6	2.464 8	4.579 8	99.85		
	2.077 2	2.160 3	2.464 8	4.597 7	98.89		
地塞米松磷酸钠	2.013 4	2.053 7	1.627 8	3.645 3	97.78	99.0	0.72
	2.005 4	2.045 5	1.627 8	3.647 8	98.43		
	2.113 7	2.156 0	1.627 8	3.754 1	98.18		
	2.107 6	2.149 8	2.034 8	4.171 3	99.35		
	2.125 8	2.168 3	2.034 8	4.1902	99.37		
	2.058 7	2.099 9	2.034 8	4.118 7	99.21		
	2.056 2	2.097 3	2.441 8	4.530 4	99.64		
	2.037 1	2.077 8	2.441 8	4.503 6	99.34		
	2.077 2	2.118 7	2.441 8	4.556 4	99.83		

注:做地塞米松磷酸钠回收率时,加入的是地塞米松磷酸酯对照品,表中折算为地塞米松磷酸钠的含量

2.2.10 样品含量测定

分别取 3 批样品,精密称定,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,依“2.1”项下方法进行含量测定,以外标法计算含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

试验曾比较了甲醇、乙醇两种提取溶剂,结果二者提取的样品冰浴后,基质均无明显析出,但甲醇提

取的样品二者含量均略高且杂质峰面积较小,故选择甲醇为提取溶剂。

3.2 冰浴时间考察

试验曾考察了冰浴 1 h 与 2 h,结果二者含量基本一致,故选择冰浴 1 h 后,趁冷过滤。

3.3 流动相选择

本试验曾尝试用甲醇-1%冰醋酸溶液(65:35)^[3]和(40:60)体系、甲醇-0.03 mol/L 磷酸二氢钾溶液(0.1%三乙胺,用 50%磷酸调 pH 3.0 \pm

0.03)(60:40)^[5]及甲醇-乙腈-三乙胺溶液体系^[15]等。结果发现甲醇-乙腈-三乙胺溶液体系分离效果最好,但按照《中国药典》^[15]中比例,二者出峰较慢,适当调整流动相比例后,二者峰形尖锐,出峰时间提前10 min,且均达到基线分离,故选择该体系。

表2 止痒地霜含量测定结果($n=3$)

批号	羟苯乙酯		地塞米松磷酸钠	
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
181020	1.04	1.00	1.02	0.95
181022	0.94	0.90	0.97	0.86
181024	0.99	0.96	0.99	1.03

3.4 检测波长的选择

将羟苯乙酯和地塞米松磷酸酯两种对照品储备液用流动相稀释后在200~400 nm波长范围内进行扫描,结果羟苯乙酯的最大吸收波长在256 nm,地塞米松磷酸酯的最大吸收波长在242 nm。羟苯乙酯在242 nm处的峰面积与256 nm处的峰面积比值为0.57,峰高比值为0.57,地塞米松磷酸酯在256 nm处的峰面积与242 nm处的峰面积比值为0.73,峰高比值为0.74,两组分在两个波长下,峰面积及峰高差异均较大。羟苯乙酯在256 nm处峰形尖锐且对称,响应值高;而地塞米松磷酸酯在242 nm处的峰形较好且响应值较高,故采用双波长检测法,分别在其最大吸收波长处测定各组分的含量,检测灵敏度更高,受基线噪音干扰更小,误差更小,定量更准确。

3.5 柱温的考察

本试验曾对柱温25℃、30℃、35℃、40℃进行了考察,结果柱温为40℃时,样品峰形对称且尖锐,重复性好,故选择柱温为40℃。

3.6 提取时间考察

分别对样品超声提取15、25、35 min;结果三者提取结果基本一致,表明提取15 min足以将样品中有效成分全部溶出,故选择提取15 min。

3.7 含量限度确定

本处方中地塞米松磷酸钠和羟苯乙酯含量均为1 mg/g,取其标示量的90.0%~110.0%为含量限度,即得地塞米松磷酸钠和羟苯乙酯的含量限度均

为0.9 mg/g~1.1 mg/g,本实验所测值均在此范围内。

【参考文献】

- [1] 杨雪,马虹英,刘博,等. 高效液相色谱法测定地塞米松磷酸钠乳膏中地塞米松磷酸钠含量[J]. 中南药学, 2018, 16(4): 537-540.
- [2] 汪艳,项伟. HPLC法测定羟苯乙酯的含量[J]. 今日药学, 2010, 20(6): 33-34.
- [3] 石蓉,龙海燕,赵勇. 顶空气相色谱法测定羟苯乙酯中甲醇、乙醇残留量[J]. 中南药学, 2017, 15(7): 960-963.
- [4] 郑荣,茹歌,王柯. 高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中16种防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(19): 2758-2761.
- [5] 湛雯,徐进,孙芳,等. 高效液相色谱法测定自制苯海拉明乳膏中羟苯乙酯的含量[J]. 安徽医药, 2016, 20(9): 1655-1658.
- [6] 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): 303-305.
- [7] 任轶,白林,蔡乐,等. HPLC法测定倍他米松尿素乳膏中倍他米松和羟苯乙酯的含量[J]. 解放军药学报, 2014, 30(6): 527-529.
- [8] 罗艳,涂晓琴,钟庆元,等. HPLC测定12种口服液类保健食品中的6种防腐剂[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(3): 331-333.
- [9] 夏方亮,宋磊,李奕婧. 高效液相色谱法测定硫唑酮乳膏中甲硝唑、己烯雌酚和羟苯乙酯的含量[J]. 中南药学, 2015, 13(12): 1307-1310.
- [10] 王尧,刘筱雪,吴慧. 胃蛋白酶合剂中羟苯乙酯的含量测定[J]. 抗感染药学, 2016, 13(4): 740-742.
- [11] 张艳,杨颖. 高效液相色谱法测定诺氟沙星滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯含量[J]. 中国药业, 2017, 26(21): 20-22.
- [12] 李丹青,余驰,曹艳. 高效液相色谱法测定氯化钾口服液中羟苯乙酯的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 3188-3191.
- [13] 林文鑫,孙逸威,管章委,等. 硝酸咪康唑乳膏中9种抑菌剂的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(1): 103-106.
- [14] 夏方亮,王玉林,李奕婧,等. HPLC法测定20种滴眼液中的9种常用抑菌剂[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(2): 234-238.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 339-341.

[收稿日期] 2019-02-26 [修回日期] 2019-06-10

[本文编辑] 陈盛新