

HPLC 法梯度洗脱同时测定曲安奈德益康唑乳膏中 4 种抑菌剂的含量

李震¹, 刘明鹭¹, 栾曾惠², 于玮洁¹, 杨钊^{1*}

(1. 青岛市食品药品检验研究院, 山东 青岛 261000; 2. 青岛妇女儿童医院, 山东 青岛 261000)

摘要 目的: 建立梯度洗脱 HPLC 法, 以双波长同时测定不同厂家曲安奈德益康唑乳膏中 4 种抑菌剂含量。方法: 采用 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇为流动相 A, 以甲醇-0.02 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 (95:5) 为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 柱温为 35 °C, 检测波长为 228 nm、254 nm。结果: 本法可有效分离曲安奈德益康唑乳膏中各色谱峰, 苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯分别在 0.010 348 ~ 0.155 22 mg · mL⁻¹、0.009 876 ~ 0.148 145 mg · mL⁻¹、0.010 106 ~ 0.151 588 mg · mL⁻¹、0.010 259 ~ 0.153 882 mg · mL⁻¹ 范围内与峰面积线性关系良好; 平均回收率 ($n=9$) 分别为 99.68% (RSD = 2.35%)、100.21% (RSD = 1.78%)、100.47% (RSD = 1.59%)、100.06% (RSD = 1.65%), 检测限分别为 3×10^{-5} mg · mL⁻¹、 1.67×10^{-5} mg · mL⁻¹、 1.67×10^{-5} mg · mL⁻¹、 1.67×10^{-5} mg · mL⁻¹。结论: 本研究建立的曲安奈德益康唑乳膏中抑菌剂的含量测定方法, 方法灵敏、准确, 色谱峰分离良好, 为其质量控制提供了依据。

关键词: 曲安奈德益康唑乳膏; 抑菌剂; 苯甲酸; 羟苯甲酯; 羟苯乙酯; 羟苯丙酯

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2024)02-0204-05

doi: 10.19778/j.chp.2024.02.016

Simultaneous determination of 4 bacteriostatic agents in triamcinolone acetonide econazole cream by HPLC under gradient elution

LI Zhen¹, LIU Minglu¹, LUAN Zenghui², YU Weijie¹, YANG Zhao^{1*}

(1. Qingdao Institute for Food and Drug Control, Qingdao 261000, China;

2. Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao 261000, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method with gradient elution for the simultaneous determination of 4 bacteriostatic agents in triamcinolone acetonide econazole cream from the different manufacturers. **Methods:** The test was performed on a Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) under gradient elution of methanol (A) and methanol-0.02 mol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution (B). The flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was 35 °C. The detection wavelengths were 228 nm and 254 nm. **Results:** The good separation of the bacteriostatic agents peaks were achieved. The linear ranges of benzoic acid, methyl hydroxybenzoate, ethylparaben and propylparaben fell into 0.010 348 - 0.155 22 mg · mL⁻¹, 0.009 876 - 0.148 145 mg · mL⁻¹, 0.010 106 - 0.151 588 mg · mL⁻¹ and 0.010 259 - 0.153 882 mg · mL⁻¹ respectively. The average recoveries were 99.68% (RSD = 2.35%), 100.21% (RSD = 1.78%), 100.47% (RSD = 1.59%) and

第一作者简介: 李震, 硕士; 研究方向: 药理, 药物分析。Tel: 13716092530; E-mail: cpu_lizhen@126.com

* 通讯作者简介: 杨钊, 主任药师; 研究方向: 药物分析。Tel: 0532-58759188; E-mail: yangzhao@qingdao.gov.cn

100.06% (RSD = 1.65%) respectively. The LODs were $3 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1.67 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1.67 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.67 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. **Conclusion:** The established method is sensitive and accurate, and has the good separation. It provides the reliable basis for the quality control of triamcinolone acetone econazole cream.

Key words: triamcinolone acetone econazole cream; bacteriostatic agent; benzoic acid; methyl hydroxybenzoate; ethylparaben; propylparaben

曲安奈德益康唑乳膏是一种由曲安奈德和硝酸益康唑组成的复合乳膏,既可抑制真菌,又可减轻真菌感染后引起的炎症反应及过敏反应,具有广泛的临床应用范围^[1]。曲安奈德益康唑乳膏为多剂量制剂,开启包装后需多次使用,而其基质中含有水性和油性物质,这些基质易受细菌和真菌的侵袭,使制剂受到污染,从而导致潜在的安全性问题,因此在乳膏中添加抑菌剂必不可少^[2,3]。抑菌剂的种类应结合制剂所用原料及其他辅料种类进行确定,并通过抑菌效力实验对不同浓度抑菌剂的抑菌效力进行考察,一般应选择最低有效抑菌浓度作为处方中抑菌剂的用量^[4,5]。抑菌剂使用不当可能会刺激皮肤,影响曲安奈德益康唑乳膏的药效,因此乳膏中抑菌剂的控制很有必要。

本次实验选取国内 10 家生产企业的产品作为研究对象,不同厂家的曲安奈德益康唑乳膏中添加的抑菌剂种类不同,主要有苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯等。本实验参考相关文献对曲安奈德益康唑乳膏中的不同抑菌剂进行含量测定,为其质量控制提供了依据^[6-10]。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

苯甲酸(含量 100%,批号:100419-200301);羟苯甲酯(含量 99.6%,批号:100278-201103);羟苯乙酯(含量 99.9%,批号:100847-201604);羟苯丙酯(含量 99.6%,批号:100444-201403)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈(Merck,批号:JA082030);邻苯二氢钾(国药集团,批号:10017618);磷酸(国药集团,批号:10015418)。

曲安奈德益康唑乳膏(A-J 共 10 家企业样品,其中 A 为原研厂家)。

Waters e2695 高效液相色谱仪,分析天平(Mettler AG285)。

1.2 混合对照品储备液的配制

准确称取苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯各 0.1g,用少量甲醇溶解,移入 100 mL 量瓶中,

用甲醇定容至刻度,摇匀,配成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇;流动相 B:0.02 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(磷酸调 pH 至 2.2)-甲醇(95:5);梯度方法见表 1。流速 1.0 mL · min⁻¹;二极管阵列检测器,检测波长:228 nm、254 nm;柱温 35 °C 进样量 10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 The gradient elution procedure

时间 (time)	流动相 A (mobile phase A)	流动相 B (mobile phase B)
0	40	60
5	40	60
15	65	35
20	75	25
21	40	60
30	40	60

1.4 样品处理

准确称取样品 1.25 g 于 25 mL 量瓶中,加四氢呋喃 2 mL,振摇 1 min 后,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,按照“1.3”项色谱条件,取 10 μL 滤液进行测定。

2 实验结果

2.1 专属性试验

按厂家提供的处方,称取曲安奈德、硝酸益康唑和除抑菌剂外的辅料适量,配制为空白基质。称取约 1.25 g 照样品处理方法配制专属性空白溶液。同时精密移取混合对照品储备溶液适量加入空白溶液中,可得专属性混合溶液。精密量取 10 μL 专属性空白溶液和混合溶液注入高效液相色谱仪,记录色谱图。由图 1 可见,不同抑菌剂间分离度符合规定,主成分和其他辅料不干扰抑菌剂的测定。

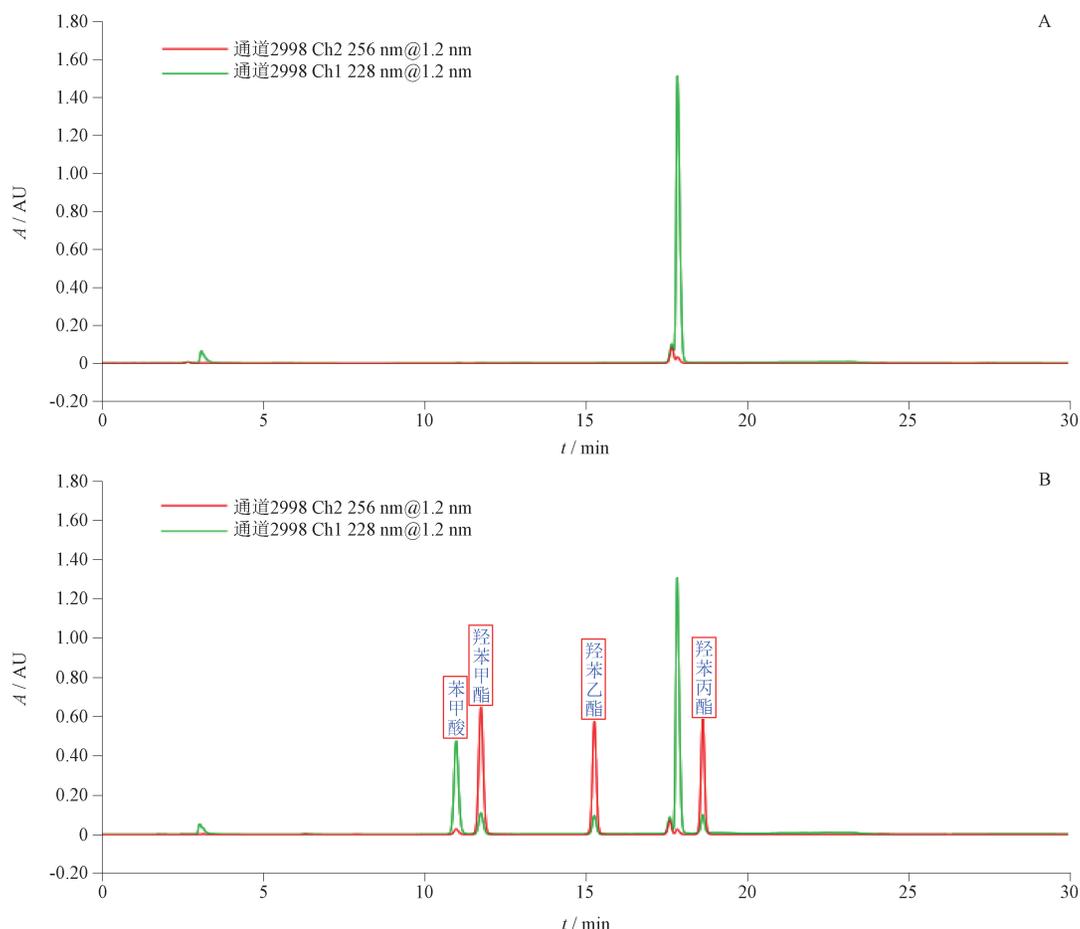


图1 空白溶液(A)混合溶液(B)色谱图

Fig. 1 The chromatograms of blank solution (A) and mixed solution (B)

2.2 稳定性试验

取混合对照品储备溶液,精密移取 2.5 mL 至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀作为对照品溶液。室温下放置,分别于 1、12、24 h 精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果 4 种抑菌剂的峰面积 RSD 均小于 2.0。该溶液在 24 h 内稳定。

2.3 精密度与重复性试验

精密量取上述对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪,连续进样 6 次,记录色谱图,结果 4 种抑菌剂的峰面积 RSD 均小于 2.0。说明该方法的精密度良好。取不同厂家的样品按“1.4”项下样品处理的

方法的进行处理,连续进样 6 次,记录色谱图,结果 4 种抑菌剂的峰面积 RSD 均小于 2.0。说明该方法的重复性良好。

2.4 线性与范围

取混合对照品储备溶液,分别精密移取 1 mL 至 100 mL、50 mL、25 mL 量瓶中;2.5 mL 至 50 mL 量瓶中;1 mL 至 10 mL 量瓶中;1.5 mL 至 10 mL 量瓶中,得到浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.05、0.1、0.15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液。分别精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果 4 种抑菌剂在下表 2 所示的范围内均呈良好的线性关系。

表 2 线性与范围

Tab. 2 The linearity and range

名称 (bacteriostatic agent)	线性方程 (linearity equation)	r	线性范围 (linearity range) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
苯甲酸 (benzoic acid)	$y = 54\ 363\ 720.14x + 327.38$	1.0	0.010 348 ~ 0.155 22
羟苯甲酯 (methyl hydroxybenzoate)	$y = 61\ 263\ 958.82x - 17\ 507.37$	1.0	0.009 876 ~ 0.148 145
羟苯乙酯 (ethylparaben)	$y = 56\ 963\ 264.24x - 13\ 957.73$	1.0	0.010 106 ~ 0.151 588
羟苯丙酯 (propylparaben)	$y = 53\ 100\ 482.38x - 13\ 458.19$	1.0	0.010 259 ~ 0.153 882

2.5 检测限与定量限

将已知浓度的对照品溶液按 1:10 的比例用甲醇连续稀释,取稀释后的溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,以主峰高为基线噪音的 10 倍时的浓度为定量限,主峰高为基线噪音的 3 倍时的浓度为检测限。经试验可得检测限与定量限,结果见表 3。

表 3 定量限与检测限($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab. 3 The LOQ and LOD

名称(bacteriostatic agent)	LOD	LOQ
苯甲酸(benzoic acid)	3×10^{-5}	1×10^{-4}
羟苯甲酯(methyl hydroxybenzoate)	1.67×10^{-5}	5×10^{-5}
羟苯乙酯(ethylparaben)	1.67×10^{-5}	5×10^{-5}
羟苯丙酯(propylparaben)	1.67×10^{-5}	5×10^{-5}

2.6 回收率试验

取苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯对照品适量,精密称定,置容量瓶中,按处方量加入辅料,

表 4 加样回收结果

Tab. 4 The test results of spiked recovery

名称(bacteriostatic agent)	加样浓度(spiked concentration)	回收率(recovery)/%	平均回收率(average recovery)/%	RSD/%
苯甲酸(benzoic acid)	80%	98.34	99.68	2.35
	100%	98.32		
	120%	102.39		
羟苯甲酯(methyl hydroxybenzoate)	80%	101.55	100.21	1.78
	100%	98.18		
	120%	100.9		
羟苯乙酯(ethylparaben)	80%	98.64	100.47	1.59
	100%	101.15		
	120%	101.62		
羟苯丙酯(propylparaben)	80%	101.29	100.06	1.65
	100%	100.7		
	120%	98.18		

表 5 不同厂家抑菌剂测定结果

Tab. 5 The test results of bacteriostatic agents in the samples from different manufacturers

生产企业 (manufacturers)	测定批数 (batch number)	标示抑菌剂种类 (type of bacteriostatic agents indicated)	测出抑菌剂种类 (types of bacteriostatic agents measured)	处方浓度 (prescription concentration)/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	实际平均浓度 (actual average concentration)/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
A	8	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	2.00	1.95
B	5	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	2.00	1.95
C	5	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	1.00	0.99
D	6	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	2.00	1.96
E	3	羟苯甲酯/羟苯丙酯(methyl hydroxybenzoate/Propylparaben)	羟苯甲酯/羟苯丙酯(methyl hydroxybenzoate/Propylparaben)	1.00/1.00	0.94/0.96
F	8	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	0.67	0.65
G	5	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	2.64	2.54
H	8	羟苯乙酯(ethylparaben)	羟苯乙酯(ethylparaben)	1.00	0.96
I	5	羟苯甲酯(methyl hydroxybenzoate)	羟苯甲酯(methyl hydroxybenzoate)	0.50	0.47
J	6	苯甲酸(benzoic acid)	苯甲酸(benzoic acid)	1.00	0.98

配制成相当于制剂中 80%、100% 和 120% 抑菌剂浓度的溶液,各 3 份,取 10 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,计算苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯的回收率及其 RSD 值。结果见表 4。

2.7 样品测定结果

选取 10 家企业的 59 批样品进行测定,结果见表 5。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

不同物质特征吸收波长不同,4 种防腐剂的紫外吸收光谱见图 2。由图 2 所知,苯甲酸在 228 nm 处有最大吸收,羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯(尼泊金酯类)在 254 nm 处有最大吸收。而二者在 254 nm 和 228 nm 处吸收值几乎处于最低值。故使用二极管阵列检测器,在 228 nm 和 254 nm 处采用双波长进行检测。

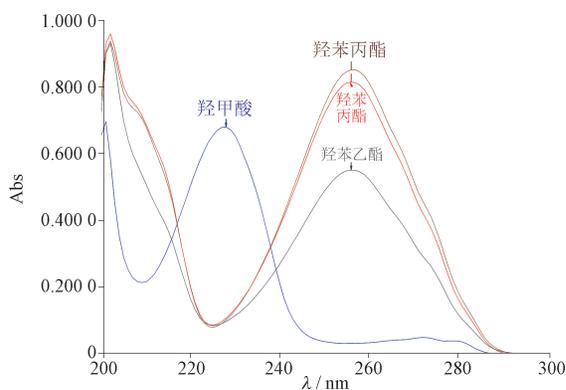


图2 四种抑菌剂紫外吸收图

Fig. 2 The UV absorption diagram of four bacteriostatic agents

3.2 检测结果分析

由表5看出不同厂家均按处方规定的抑菌剂进行投放,未发现非法添加的行为;测定不同厂家的抑菌剂含量发现企业添加含量较为准确,未出现较大偏差。而对比不同厂家处方中添加抑菌剂的含量,发现处方添加量差异较大。苯甲酸的最高与最低添加量相差可达4倍。《中华人民共和国药典》中抑菌效力检查法中规定,所有抑菌剂都具有一定的毒性,制剂中抑菌剂的量应为最低有效量。同时,为保证用药安全,成品制剂中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度。因此对抑菌剂的添加量必须有一定的限制,在保证其抑菌效力的基础上应尽可能减少使用量。

参考文献

- [1] 马中华. 曲安奈德益康唑乳膏的质量过程控制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
MA ZH. Investigation of quality process control of triamcinolone and econazole cream[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [2] 张星一, 田娜. 皮肤科药物研发中的若干问题解析[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(18): 63.

ZHANG XY, TIAN N. Key points in the development of dermatology drugs[J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(18): 63.

- [3] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:151.
ChP 2015. IV[S]. 2015:151.
- [4] 王萍, 柳玉红. 我国化妆品用防腐剂及分析方法的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(7): 557.
WANG P, LIU YH. Cosmetics preservatives and analysis methods used in China[J]. J Environ Health, 2007, 24(7): 557.
- [5] 李明. 化妆品防腐剂及其特点[J]. 口腔护理用品工业, 2018, 28(5): 34.
LI M. Cosmetic preservatives and their characteristics[J]. Oral Care Ind, 2018, 28(5): 34.
- [6] 聂鹤云, 王森, 朱卫丰, 等. 曲安奈德益康唑乳膏中防腐剂苯甲酸含量测定[J]. 江西中医学院学报, 2014, 26(4): 80.
NIE HY, WANG S, ZHU WF. Content determination of the preservatives of benzoic acid in triamcinolone acetamide and econazole nitrate cream[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2014, 26(4): 80.
- [7] 于玮洁, 徐慧, 李震, 等. 曲安奈德益康唑乳膏含量和有关物质检测方法的建立[J]. 中国药品标准, 2022, 23(4): 414.
YU WJ, XU H, LI Z, et al. Determination of content and related substances in triamcinolone acetamide and econazole nitrate cream[J]. Drug Stand China, 2022, 23(4): 414.
- [8] 刘燕. 硝酸咪康唑乳膏中防腐剂测定方法的建立[J]. 中国药业, 2015, 24(20): 85.
LIU Y. Construction of a method to determine the antiseptics in miconazole nitrate cream[J]. China Pharm, 2015, 24(20): 85.
- [9] 王健辉, 胡家庆, 张欣荣, 等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中几种防腐剂[J]. 日用化学工业, 2009, 39(2): 138.
WANG JH, HU JQ, ZHANG XR, et al. Determination of preservatives in cosmetics by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. China Surfact Deterg Cosmet, 2009, 39(2): 138.
- [10] 张飞, 华夏. 高效液相色谱法同时测定化妆品中12种防腐剂[J]. 广东化工, 2018, 45(2): 181.
ZHANG F, HUA X. Simultaneous determination of 12 preservatives in cosmetics by HPLC[J]. Guangdong Chem Ind, 2018, 45(2): 181.

(收稿日期: 2023-09-17)