

霜剂中氢化可的松和尼泊金乙酯 的高效液相色谱分析

张胜强 王 军¹ 许迎春² 俞仁爱³

(药物分析学研究室;³ 浙江镇海石化医院,315207)

摘 要 建立了同时测定霜剂中氢化可的松和尼泊金乙酯的高效液相色谱分析法。样品以乙醇提取,以反相 C-18 为固定相,甲醇-水(3:2)为流动相,紫外 254 nm 检测。考察了保留值与流动相组成的关系和影响测定的因素。回收率测定的结果为:氢化可的松 98.42%,尼泊金 99.62%。

关键词 霜剂;氢化可的松;尼泊金乙酯;高效液相色谱

氢氟酸烧伤防治膏内含氢化可的松、葡萄糖酸钙,用于防治氢氟酸烧伤,该霜剂还含有尼泊金乙酯及其他辅料。关于氢化可的松的分析虽有报道^[1,2]但对于霜剂中氢化可的松与尼泊金乙酯共存的分析方法未见报道。本文建立的高效液相色谱分析法可同时测定氢化可的松和尼泊金乙酯,霜剂中的其他组分对测定无干扰。

1 实验部分

1.1 试药与试样

氢化可的松,尼泊金乙酯,对硝基苯酚(由镇海石化医院提供纯品)。

软膏(霜剂)制成品:含氢化可的松 0.5%,尼泊金乙酯 0.2%(镇海石化医院提供),其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器与色谱条件

高效液相色谱仪包括高压泵、进样阀、检测器和记录器(上海科学仪器厂或 Waters HPHC 装置)。

色谱柱为 4.6×150 mm Lichrosorb RP 18 不锈钢柱;流动相为甲醇-水(3:2),流量 0.8 ml/min。

1.3 样品处理

样品 1.000 g,以乙醇反复提取,加入内标对硝基苯酚,制成 100.00 ml,供测定。

2 结果与讨论

2.1 保留值、分离度与流动相组成之间的关系

氢化可的松、尼泊金乙酯和对硝基苯酚均溶于醇,采用甲醇-水流动相,改变其配比,可使三组分有不同的保留值和分离效能。混合溶剂流动相中降低水的配比量虽能使谱图峰形变尖变窄,分析时间缩短,但各峰拥挤,分离度反而变小。随着水配比用量的相对增加,保留值和分析时间增大,同时分离度也明显增大。当甲醇-水配比达到 12:8 时,各色谱峰均达到基线分离(图 1),并有合适的分析时间。

用不同的回归方程考察了保留值、分离度及流动相组成之间的关系(表 1)。对于保留值与流动相中水配比用量之间的关系,结果表明两者若按直线拟合不很理想;改用对数关联可提高相关系数;若按双曲线拟合,相关系数的绝对值最大,两者成负相关。对于保留值与分离度之间的关系,各组分都存在良好线性关系。

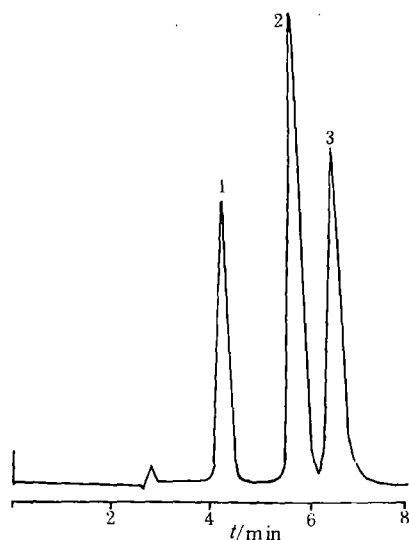


Fig 1. Chromatogram of sample to which internal standard *p*-nitrophenol had been added.

1. *p*-nitrophenol; 2. nipagin; 3. hydrocortisone

Tab 1. The relationship between retention time of various components and the water ratio in mobile phase ($n=5$)

Components	Equation ^a	Coefficient		
		a	b	r
Hydrocortisone	1	-3.7790	1.3896	0.9340
	2	-0.3237	1.3026	0.9464
	3	0.2425	0.07286	0.9786
	4	0.3411	-0.02524	-0.9979
Nipagin B	1	-1.0416	0.9052	0.9476
	2	-0.1396	1.0289	0.9501
	3	0.3086	0.05743	0.9805
	4	0.3439	-0.02064	-0.9961
<i>p</i> -nitrophenol	1	1.5792	0.3471	0.9534
	2	0.1233	0.5761	0.9355
	3	0.3727	0.03234	0.9708
	4	0.03679	-0.01632	-0.9831

^aequation 1. $t'_r = a + b V_w$; 2. $\log t'_r = a + b \log V_w$; 3. $\log t'_r = a + b V_w$; 4. $1/t'_r = a + b V_w$. V_w is volume parts of water mixed with 12 parts of methanol volume

中国药典载有氢化可的松的高效液相色谱测定法^[1]。曾参照药典试用甲醇-水(7:3)分析受试软膏。在该条件下测得理论板数按氢化可的松计算约为2000,但软膏中的氢化可的松和尼泊金乙酯不能良好分离。改变流动相至甲醇-水(12:8),则尼泊金乙酯与氢化可的松完全分离,此时理论塔板数按氢化可的松计算约为3500。

2.3 线性试验

精密称取氢化可的松、尼泊金乙酯和对

硝基苯酚,用乙醇制成含氢化可的松和尼泊金乙酯分别为0.50 mg/ml和0.20 mg/ml的标准备用液。吸取标准备用液1.50,2.00,2.50,3.00和3.50 ml,分别置25 ml量瓶中。另用乙醇溶解对硝基苯酚制成含对硝基苯酚2.50 mg/ml的内标备用液,并向上述标准系列量瓶中各加入内标备用液1.00 ml,均以乙醇稀释至刻度,混匀。各进样8 μ l,得色谱图,分别求出氢化可的松、尼泊金乙酯对内标的峰高比 y 及相应的浓度比 x ,以峰高比对浓度比回归,得直线方程,氢化可的松: $y = 0.451x + 0.023$ ($n=5$), $r=0.9994$; 尼泊金乙酯 $y = 0.138x + 0.006$ ($n=5$), $r=0.9996$ 。

2.3 提取溶剂用量与提取效率

要准确测定药膏中的被测组分,应将各组分充分浸出。对提取效率进行如下考察。

精密称取药膏试样1 g(约相当于氢化可的松5 mg,尼泊金乙酯2 mg),加入内标备用液1.00 ml,然后用乙醇分次提取。第一次用乙醇20.00 ml,以后每次用10.00 ml。各次提取液分别进行色谱测定。至第六次提取后,所得提取液的色谱图不显示被测组分的色谱峰,至此,样品中被测组分充分提取进入提取液。

提取试验的结果表明葡萄糖酸钙对测定无影响,而氢化可的松和尼泊金乙酯可进入乙醇提取液,第一次提取出组分总量的78.8%;第二次提取后的提取累加为总量的95.8%;三次提取的累加为总量的98.8%。因此,用总量为100 ml的乙醇分五次提取可将组分充分提取出来。

2.4 峰高测定的精密度

峰高定量要求色谱峰半峰宽稳定性好。测定了标准系列所得色谱峰的半峰宽,表明在同一流动相条件下各浓度试样测得的相应色谱峰的半峰宽稳定不变。因此影响测定精密度的重要因素在于峰高测定的精密度。配制每毫升含氢化可的松50 μ g,尼泊金乙酯

20 μg , 对硝基苯酚 100 μg 的标准试样三份, 每份测三次, 每次进样 8 μl , 获 9 组峰高数据, 结果列于表 2。

Tab 2. Peak height determination for standard sample

Sample	<i>p</i> -nitrophenol	Nipagin B	Hydrocortisone
1	5.02	8.12	5.87
	4.99	8.04	5.85
	5.03	8.25	6.01
2	5.09	8.12	5.68
	5.06	8.14	5.68
	5.06	8.07	5.63
3	4.95	8.21	5.87
	5.03	8.20	5.80
	5.01	8.20	5.82
\bar{x}	5.026	8.15	5.801
σ_{n-1}	0.0415	0.0698	0.1196
CI^*	0.00826	0.00856	0.0206

2.5 回收率

在含氢化可的松 11.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尼泊金乙酯 4.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的本底试样中, 按标准加入法测定百分回收率。氢化可的松的回收率为

98.42 ($CI^* = 1.96\%$, $n = 5$), 尼泊金乙酯为 99.62 ($CI^* = 1.03\%$, $n = 5$)。

2.6 样品测定

精密称取软膏试样 1 g, 按本文提取效率与提取溶剂用量一节中所述程序提取, 提取液定容为 100.00 ml, 以甲醇-水 (12 : 8) 为流动相, 进样 8 μl , 峰高定量, 结果如表 3 所列。

Tab 3. Percent content of HPLC assay of hydrocortisone and nipagin B in creams (%)

Sample	Hydrocortisone	Nipagin B
1	101.6	100.7
2	98.88	101.5
3	91.00	95.33
4	101.2	107.9

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 380
- 2 安登魁. 药物分析. 济南: 济南出版社, 1992: 1514

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Hydrocortisone and Nipagin in Creams

Zhang Shengqiang, Wang Jun, Xu Yingchun, Yu Renai

Department of Pharmaceutical Analysis

A high-performance liquid chromatographic assay procedure was established for the simultaneous determination of hydrocortisone and nipagin in creams using *p*-nitrophenol as an internal standard. HPLC was performed using a reverse-phase C-18 column and an UV detector set at 254 nm. A mobile phase containing methanol and water (3 : 2) was employed. The recoveries of hydrocortisone and nipagin were 98.24% and 99.62% respectively. At the same time, the relationship between the composition of mobile phase and retention value was examined.

Key words HPLC; Hydrocortisone; Nipagin; Cream