

HPLC法同时测定克敏乳膏中3种成分的含量

陈晓亮^{1*},汪旭^{2#}(1.海口市人民医院药学部,海口 570208;2.长春八一医院药剂科,长春 130024)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4725-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.39

摘要 目的:建立同时测定克敏乳膏中盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为WondaSil C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的检测进样量线性范围分别为0.604 5~2.871 4 μg($r=0.999\ 9$)、0.169 9~0.807 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.326 5~1.550 9 μg($r=0.999\ 9$);定量限分别为3.17、1.50、2.33 ng,检测限分别为0.95、0.45、0.70 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为98.29%~100.10%(RSD=0.64%, $n=9$)、98.04%~100.70%(RSD=0.80%, $n=9$)、98.02%~99.81%(RSD=0.70%, $n=9$)。结论:该方法结果准确、精密度高,可用于同时测定克敏乳膏中盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的含量。
关键词 克敏乳膏;高效液相色谱法;盐酸利多卡因;马来酸氯苯那敏;氯霉素;含量测定

Simultaneous Determination of Three Ingredients in Kemin Cream by HPLC

CHEN Xiaoliang¹, WANG Xu²(1.Dept. of Pharmacy, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China; 2.Dept. of Pharmacy, Bayi Hospital of Changchun, Changchun 130024, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the contents determination of lidocaine hydrochloride, chlorpheniramine maleate and chloramphenicol in Kemin cream. METHODS: HPLC was performed on the column of WondaSil C₁₈ with mobile phase of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 25℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.604 5-2.871 4 μg for lidocaine hydrochloride($r=0.999\ 9$), 0.169 9-0.807 0 μg for chlorpheniramine maleate($r=0.999\ 9$) and 0.326 5-1.550 9 μg for chloramphenicol ($r=0.999\ 9$); limit of quantitation was 3.17, 1.50, 2.33 ng, limit of detection was 0.95, 0.45, 0.70 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.29%-100.10% (RSD=0.64%, $n=9$), 98.04%-100.70% (RSD=0.80%, $n=9$) and 98.02%-99.81% (RSD=0.70%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate with high precision, and can be used for the simultaneous determination of lidocaine hydrochloride, chlorpheniramine maleate and chloramphenicol in Kemin cream.
KEYWORDS Kemin cream; HPLC; Lidocaine hydrochloride; Chlorpheniramine maleate; Chloramphenicol; Content determination

克敏乳膏为长春八一医院自拟处方、自主研发的院内制剂,是由盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素3种主要化学成分及乳膏基质制成的外用复方制剂,具有抗炎、抗过敏、镇痛止痒等作用^[1-2],临床上用于治疗急性慢性湿疹、皮肤瘙痒等疾病。现有文献多为对其单一成分进行含量测定,不能有效控制该制剂的质量。因此,笔者参考相关文献^[3-6]采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定克敏乳膏中盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素含量的方法,以期为该制剂的质量

控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010AHT型HPLC仪,包括自动进样器、紫外分光光度检测器、LC solution工作站(日本Shimadzu公司);PB-10型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-3200E型数控超声波处理器(昆山市超声仪器有限公司,功率:150 W,频率:40 kHz)。

(5):328.
[7] 王满元,李莉娅,邹海燕,等.高效液相色谱法同时测定珍珠降压滴丸中氢氯噻嗪和芦丁的含量[J].时珍国医国药,2008,19(11):2 749.
[8] 裴月梅.HPLC法测定清脑降压片中非法添加的氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平[J].中草药,2014,45(23):3 414.

[9] 吴毅,刘绪平,王栋,等.中药制剂及保健品中添加的10种抗高血压药物监测[J].中国药事,2014,28(5):495.
[10] 钱忠义.HPLC法测定复方罗布麻片I中3组分的含量[J].中国药师,2009,12(9):1 265.
[11] 贺文军,刘哲鹏,包璇,等.HPLC法测定复方利血平中氢氯噻嗪、硫酸双肼屈嗪、维生素B₁、维生素B₆的含量[J].应用化工,2012,41(9):1 632.
[12] 程正,万庆,管玉云,等.HPLC法测定复方利血平片中氢氯噻嗪、盐酸异丙嗪和利血平的含量[J].安徽医药,2010,14(1):38.

* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0898-66151101。
E-mail:41802931@qq.com
通信作者:主管药师,硕士。研究方向:药剂学。电话:0431-86933827。E-mail:wangxujlu@foxmail.com

(收稿日期:2016-01-07 修回日期:2016-09-01)
(编辑:刘 柳)

1.2 药品与试剂

克敏乳膏(长春八一医院制剂室自制,批号:20150401、20150402、20150403,规格:20 g/支);盐酸利多卡因对照品(批号:100341-201403,纯度:93.4%)、马来酸氯苯那敏对照品(批号:100047-200606,纯度:99.7%)、氯霉素对照品(批号:130555-201203,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:WondaSil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-乙腈(B)-0.1%磷酸(C),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:25℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%	C,%
0~19	10	10	80
19~35	10	20	70
35~42	10	10	80

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏、氯霉素对照品各适量,置于同一250 ml量瓶中,加95%乙醇溶解并定容,摇匀,制成每1 ml含盐酸利多卡因0.16 mg、马来酸氯苯那敏0.04 mg、氯霉素0.08 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品0.40 g,置于50 ml棕色量瓶中,加95%乙醇溶解并定容,称定质量,于80℃超声处理40 min,冷却至室温,再次称定质量,加95%乙醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和工艺制备缺盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以盐酸利多卡因峰、马来酸氯苯那敏峰和氯霉素峰计分别为3 500、7 000、8 000,保留时间分别为13.0、16.5、32.0 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液4、7、10、13、16、19 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),结果见表3。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素峰面积的RSD分别为0.10%、0.08%、0.11%(n=6),表明仪器精密度良好。

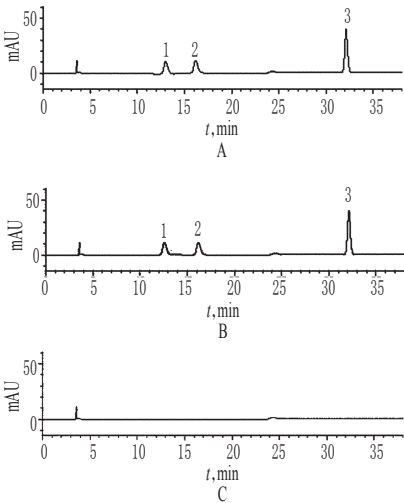


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.盐酸利多卡因;2.马来酸氯苯那敏;3.氯霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B.test sample; C.negative control; 1.lidocaine hydrochloride; 2.chlorpheniramine maleate; 3.chloramphenicol

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
盐酸利多卡因	y=98 710x+1 236.9	0.999 9	0.604 5~2.871 4
马来酸氯苯那敏	y=786 458x-328.33	0.999 9	0.169 9~0.807 0
氯霉素	y=1 000 000x+3 053.3	0.999 9	0.326 5~1.550 9

表3 定量限与检测限测定结果

Tab 3 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ,ng	LOD,ng
盐酸利多卡因	3.17	0.95
马来酸氯苯那敏	1.50	0.45
氯霉素	2.33	0.70

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150401)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素峰面积的RSD分别为0.12%、0.25%、0.21%(n=6),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20150401)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的平均含量分别为18.417 7、5.166 0、10.063 1 mg/g,RSD分别为0.05%、0.09%、0.09%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20150401)适量,共9份,分别加入低、中、高质量的盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
盐酸利多卡因	0.160 2	2.950 5	3.148 7	6.102 4	100.10	98.89	0.64
	0.160 1	2.948 7	3.148 7	6.084 9	99.60		
	0.161 0	2.965 2	3.148 7	6.068 6	98.56		
	0.200 2	3.687 2	3.935 9	7.562 5	98.46		
	0.201 0	3.702 0	3.935 9	7.570 5	98.29		
	0.200 2	3.687 2	3.935 9	7.568 0	98.60		
	0.240 2	4.423 9	4.723 1	9.082 1	98.62		
	0.240 0	4.420 2	4.723 1	9.069 2	98.43		
	0.240 9	4.436 8	4.723 1	9.128 0	99.32		
	0.160 2	0.826 9	0.733 0	1.565 0	100.70	99.03	0.80
马来酸氯苯那敏	0.160 1	0.826 4	0.733 0	1.555 2	99.43		
	0.161 0	0.831 0	0.733 0	1.552 8	98.47		
	0.200 2	1.033 4	0.916 2	1.941 6	99.13		
	0.201 0	1.037 5	0.916 2	1.935 7	98.04		
	0.200 2	1.033 4	0.916 2	1.943 5	99.33		
	0.240 2	1.239 8	1.099 5	2.325 9	98.78		
	0.240 0	1.238 8	1.099 5	2.328 7	99.13		
	0.240 9	1.243 4	1.099 5	2.323 7	98.25		
	0.160 2	1.612 1	1.517 8	3.127 0	99.81	98.66	0.70
氯霉素	0.160 1	1.611 1	1.517 8	3.115 8	99.14		
	0.161 0	1.620 2	1.517 8	3.114 1	98.42		
	0.200 2	2.014 6	1.897 2	3.874 3	98.02		
	0.201 0	2.022 7	1.897 2	3.884 7	98.14		
	0.200 2	2.014 6	1.897 2	3.874 8	98.05		
	0.240 2	2.417 2	2.276 6	4.683 7	99.56		
	0.240 0	2.415 1	2.276 6	4.648 0	98.08		
	0.240 9	2.424 2	2.276 6	4.670 7	98.68		

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 5 Results of contents determination of samples(n=3,mg/g)

样品批号	盐酸利多卡因	马来酸氯苯那敏	氯霉素
20150401	18.415 0	5.161 2	10.063 5
20150402	19.550 1	4.987 8	10.025 4
20150403	19.089 7	5.024 1	9.897 4

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择^[7-9]

本品为复方乳膏制剂,处方较复杂。笔者在供试品溶液制备过程中分别选择了50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇为提取溶剂。结果,95%乙醇和甲醇对样品的提取率最高且相同,考虑提取成本及毒性因素,本试验最终选择95%乙醇作为提取溶剂。

3.2 流动相的选择

本试验曾分别以2015年版《中国药典》(二部)^[9]中盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素含量测定项下的流动相进行预试验。结果,以盐酸利多卡因含量测定项下磷酸盐缓冲液-乙腈(50:50,V/V)为流动相时,马来酸氯苯那敏与氯霉素色谱峰均延迟,且氯霉素峰拖尾;以马来酸氯苯那敏含量测定项下磷酸盐缓冲液-乙腈(80:20,V/V)为流动相时,氯霉素峰拖尾;以氯霉素含量测定项下0.01 mol/l庚烷磺酸钠缓冲溶液-甲醇(68:32,V/V)为流动相时,盐酸利多卡因峰与乳膏基质峰分

离度不佳,且盐酸利多卡因与马来酸氯苯那敏色谱峰理论板数及对称因子均较差。最后,笔者参考相关文献^[7]的流动相,并在此基础上添加了极性相对较大的乙腈溶液调整流动相的比例,以甲醇-乙腈-0.1%磷酸为流动相(梯度洗脱)进行预试验,结果盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的分离度均较好且峰型对称。因此,本试验选择甲醇-乙腈-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱。

3.3 检测波长的选择

经查阅相关文献^[9],盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的紫外吸收波长分别为254、262、277 nm。预试验时,以262和277 nm为检测波长,马来酸氯苯那敏和氯霉素的峰面积及峰形均较好,而盐酸利多卡因峰面积却较小;以254 nm为检测波长时,盐酸利多卡因有最大紫外吸收,其峰面积、峰形及分离度均达到要求,且马来酸氯苯那敏和氯霉素峰形也较好,故本试验选择254 nm作为检测波长。

综上所述,本方法结果准确、精密度高,可用于同时测定克敏乳膏中盐酸利多卡因、马来酸氯苯那敏和氯霉素的含量。

参考文献

[1] 盛国荣.复方利多卡因乳膏的抗炎镇痛和抗过敏止痒的实验观察[J].中国医院药学杂志,2010,30(3):217.
[2] 何渊民,杨艳,廖勇梅,等.复方利多卡因乳膏治疗慢性局限型湿疹37例随机、双盲对照的临床观察[J].中国皮肤性病学杂志,2015,29(10):1 026.
[3] 李宏,盛国荣.HPLC测定复方利多卡因乳膏中的利多卡因和马来酸氯苯那敏[J].华西药学杂志,2015,30(4):490.
[4] 任睿,陈林,李英,等.HPLC法同时测定复方地克软膏中3组分的含量[J].中国药房,2015,26(30):4 277.
[5] 杨平,曾蔚欣,孙路路.HPLC法同时测定氯霉素醋酸曲安奈德乳膏中两组分含量[J].中国药师,2016,19(3):591.
[6] 阿不都西克日·阿不都力米提,卡斯木·卡哈尔,滕亮,等.HPLC法测定痤疮酊中氯霉素和水杨酸的含量[J].中国药房,2015,26(18):2 557.
[7] 汪旭,严铁,高中华,等.HPLC法测定复方丙酸氯倍他索软膏中丙酸氯倍他索和维A酸的含量[J].解放军药学学报,2015,31(6):489.
[8] 汪旭,黄翠,严铁,等.HPLC法测定皮康净乳膏中醋酸氟轻松和丹皮酚的含量[J].解放军药学学报,2015,31(5):396.
[9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:62-63、978-979、1 397-1 398.

(收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-08-10)

(编辑:刘柳)