

· 研究报告 ·

用反相高效液相色谱法同时测定复方酮康唑软膏中三组分的含量

吴博¹, 王铁柱², 拜年¹, 刘冰¹, 宋洪涛³ (1. 新疆医科大学第一附属医院药剂科, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学第四附属医院重症医学科, 新疆乌鲁木齐 830000; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院药学科, 福建福州 350025)

[摘要] 目的 建立同时测定复方酮康唑软膏中酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松含量的方法。方法 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Intersil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-pH5.5 磷酸盐缓冲液(65:35), 柱温 45 °C, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 248 nm。结果 方法学验证表明, 酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松 3 种成分线性关系良好($r \geq 0.9995$), 日内日间精密度均小于 3.0%, 回收率在 90%~108% 之间, 稳定性和重复性的 RSD 均小于 3.0%, 符合方法学要求。按照新建立的方法测定了 3 个批次样品中三组分的含量, 结果符合要求。结论 该方法简便可靠, 可为复方酮康唑软膏的质量控制提供依据, 也为其质量标准研究奠定了基础。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 酮康唑; 莫匹罗星; 糠酸莫米松

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)02-0152-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202006053

Determination of three constituents in compound ketoconazole ointment by RP-HPLC

WU Bo¹, WANG Tiezhu², BAI Nian¹, LIU Bing¹, SONG Hongtao³ (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Department of ICU, Affiliated Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 3. Department of Pharmacy, No. 900 Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish a RP-HPLC method for determination of ketoconazole, mupirocin and mometasone furoate in compound ketoconazole ointment. **Methods** RP-HPLC was conducted on a Intersil ODS-3 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with methanol-PBS with pH 5.5 (65:35) as the mobile phase and the column temperature was 45 °C. The flow rate was 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 248 nm. **Results** The methodological verification showed that ketoconazole, mupirocin and mometasone furoate had a good linearity ($r \geq 0.9995$). The inter/intra-day precisions were less than 3.0%. The recovery rates were between 90% and 108%. The stability and repeatability of RSD were also less than 3.0%, which met the requirements of method validation. The contents of the three components in three batches were determined by the new method. **Conclusion** The method is simple and reliable. It can provide a basis for the quality control of compound ketoconazole ointment and lay a foundation for its quality standard research.

[Key words] RP-HPLC; ketoconazole; mupirocin; mometasone furoate

市售复方酮康唑乳膏包含酮康唑、硫酸新霉素和丙酸氯倍他索, 是治疗浅部真菌感染的常用药物。其中, 酮康唑是最常用的抗真菌药物, 具有价格低、抗菌谱广、抗真菌活性强等优势。但细菌对硫酸新霉素易产生耐药性, 可导致患者反复感染, 难以根治, 且丙酸氯倍他索不适合 12 岁以下儿童

使用, 副作用较多, 可产生红斑、灼热、瘙痒等刺激症状, 长期大面积用药可导致高血糖等^[1-5]。针对上述问题, 为改善市售产品的有效性和安全性, 本课题组将硫酸新霉素替换为抗菌作用更强的莫匹罗星, 将丙酸氯倍他索替换为副作用较少的糠酸莫米松, 再结合酮康唑, 制备新型复方酮康唑软膏, 以提高患者的用药依从性^[6-8]。

本研究采用反相高效液相色谱法同时测定复方酮康唑软膏中酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松 3 种药效成分的含量, 该方法目前未见有文献报道。本法简便, 灵敏, 分离度好, 准确性高, 可以为

[作者简介] 吴博, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型和制剂新技术, Email: 384336299@qq.com

[通信作者] 宋洪涛, 博士生导师, 主任药师, 研究方向: 药物新剂型和制剂新技术, Email: sohoto@vip.163.com

该制剂的质量标准研究提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); TU-1901型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); Starter 2C型实验室pH计(奥豪斯仪器有限公司); KQ-800KDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

酮康唑对照品(批号: 100294-201203, 含量99.4%)、莫匹罗星对照品(批号: 130568-200501, 含量94.2%)、糠酸莫米松对照品(批号: 100930-201201, 含量99.9%)均购自中国食品药品检定研究院; 酮康唑原料药(批号: 20130405)、莫匹罗星原料药(批号: 20130301)、糠酸莫米松原料药(批号: 20130228)均购自武汉鑫佳公司; 聚乙二醇400和聚乙二醇3350(中国医药对外贸易公司)。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定

分别取酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松适量, 精密称定, 加流动相制备成适宜浓度的溶液, 以相应的溶剂为空白溶液, 在190~400 nm波长范围内进行紫外扫描, 结果见图1。

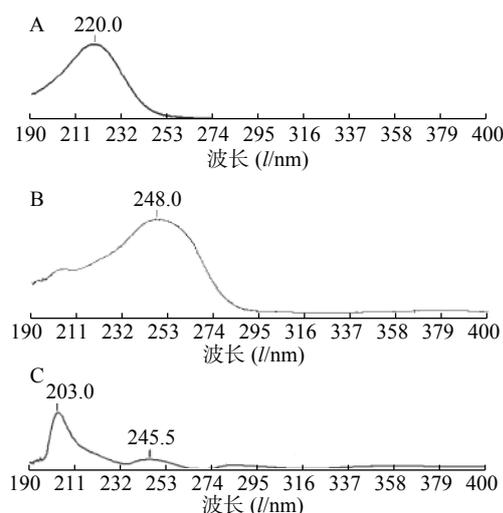


图1 莫匹罗星、糠酸莫米松和酮康唑的紫外图谱
A.莫匹罗星; B.糠酸莫米松; C.酮康唑

由图1可见, 莫匹罗星在220 nm处具有最大吸收波长, 糠酸莫米松在248 nm处具有最大吸收波长, 酮康唑在203 nm和245.5 nm具有最大吸收波长, 三者均在220 nm与248 nm之间均有吸收, 因

在供试品中酮康唑和莫匹罗星的浓度均是糠酸莫米松的20倍, 糠酸莫米松在220 nm处响应值较小, 为保证3种药物能同时测定, 确定酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松的检测波长为248 nm。

2.2 色谱条件及系统适用性

色谱柱: Intersil ODS-3柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-pH5.5磷酸盐缓冲液(65:35), 柱温45℃, 流速1.0 ml/min, 检测波长248 nm, 进样量10 μl。理论塔板数以各组分峰计, 均不低于5000, 各色谱峰的分度度良好。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液

酮康唑对照品溶液: 取酮康唑20 mg, 精密称定, 置10 ml量瓶中, 加入适量65%甲醇, 超声使其完全溶解, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到酮康唑的标准储备液, 4℃低温避光保存。精密吸取酮康唑的标准储备液1 ml, 置于10 ml量瓶中, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

莫匹罗星对照品溶液: 取莫匹罗星20 mg, 精密称定, 置10 ml量瓶中, 加入适量65%甲醇, 超声使其完全溶解, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到莫匹罗星的标准储备液, 4℃低温避光保存。精密吸取莫匹罗星的标准储备液1 ml, 置于10 ml量瓶中, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

糠酸莫米松对照品溶液: 取糠酸莫米松10 mg, 精密称定, 置100 ml量瓶中, 加入适量65%甲醇, 超声使其完全溶解, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到糠酸莫米松的标准储备液, 4℃低温避光保存。精密吸取糠酸莫米松的标准储备液1 ml, 置于10 ml量瓶中, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

混合对照品溶液: 取酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松的标准储备液各1 ml, 置10 ml量瓶中, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 供试品溶液

取复方酮康唑软膏0.5 g, 精密称定, 置于50 ml的容量瓶中, 加65%甲醇适量, 超声溶解, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.3.3 阴性对照溶液

取空白软膏基质0.5 g, 精密称定, 置于50 ml的容量瓶中, 加65%甲醇适量, 超声溶解, 加65%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得阴性对照溶液。

2.4 专属性考察

取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 用0.22 μm微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 续滤液

分别按照上述色谱条件进样,记录色谱图及相关参数。莫匹罗星的保留时间为 5.075 min,理论塔板数为 9196,对称因子 0.81;糠酸莫米松的保留时间为 18.413 min,理论塔板数为 11859,对称因子 0.88;

酮康唑的保留时间为 23.318 min,理论塔板数为 12291,对称因子 0.89,空白基质对莫匹罗星、糠酸莫米松和酮康唑的测定无干扰,方法专属性好。对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液色谱见图 2。

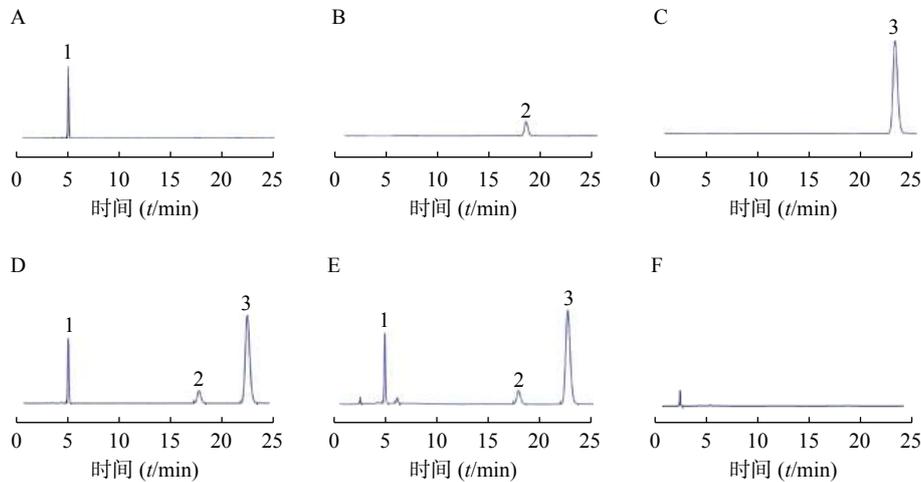


图 2 复方酮康唑软膏的 RP-HPLC 色谱图

A.莫匹罗星对照品溶液;B.糠酸莫米松对照品溶液;C.酮康唑对照品溶液;D.混合对照品溶液;
E.供试品溶液;F.阴性溶液 1.莫匹罗星;2.糠酸莫米松;3.酮康唑

2.5 线性关系考察

分别精密吸取酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松标准储备液各 0.2、0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2 ml,置 10 ml 量瓶中,用 65% 甲醇稀释至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,续滤液按上述色谱条件分别进样 10 μl ,记录色谱图峰面积。以峰面积 A 对浓度 C ($\mu\text{g/ml}$) 进行线性回归,结果见表 1。

表 1 复方酮康唑软膏中主药的线性方程

药名	线性方程	r	线性范围($\mu\text{g/ml}$)
莫匹罗星	$A=2.295C+10.20$	0.9995	40.0~400.0
糠酸莫米松	$A=28.240C+1.871$	0.9995	2.0~20.0
酮康唑	$A=12.280C+27.94$	0.9995	40.0~400.0

2.6 重复性试验

分别精密量取同一批复方酮康唑软膏 6 份,每份约 0.5 g,按“2.3.2”项下操作,测定,计算酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松含量。结果见表 2,结果表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样 10 μl 测定,计算不同时间点莫匹罗星、糠酸莫米松和酮康唑的含量,结果见表 3。

2.8 回收率试验

分别精密称取莫匹罗星 8、10、12 mg,糠酸莫

米松 0.4、0.5、0.6 mg,酮康唑 8、10、12 mg(相当于标示量的 80%、100%、120%),精密称定,分别置于 0.5 g 的空白基质中,加适量流动相溶液,超声 10 min 使溶解,置于 50 ml 量瓶中,加流动相溶液

表 2 复方酮康唑软膏中三种主药的重复性试验结果

药物	含量($\mu\text{g/ml}$)	测得量($\mu\text{g/ml}$)	平均含量($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)
莫匹罗星	200.00	203.60	204.30	1.51
	200.00	204.90		
	200.00	201.70		
	200.00	208.80		
	200.00	206.40		
	200.00	200.40		
糠酸莫米松	10.00	10.10	9.99	1.23
	10.00	9.91		
	10.00	10.06		
	10.00	10.10		
	10.00	9.99		
	10.00	9.79		
酮康唑	200.00	203.30	203.60	0.65
	200.00	203.90		
	200.00	202.60		
	200.00	204.90		
	200.00	205.00		
	200.00	201.60		

表3 复方酮康唑软膏中三种主药的稳定性试验结果

主药	时间(<i>t</i> /h)							RSD (%)
	0	2	4	6	8	12	24	
莫匹罗星	100.00	99.94	100.00	99.94	99.81	99.12	98.49	0.68
糠酸莫米松	100.00	99.69	100.49	100.38	100.38	99.65	98.37	0.74
酮康唑	100.00	99.90	100.06	100.02	100.04	99.64	100.00	0.15

稀释至刻度,摇匀,得低、中、高不同浓度的溶液,每个浓度各3份。用0.22 μm微孔滤膜过滤,弃去初滤液,续滤液按上述色谱条件分别进样,记录色谱图峰面积。根据回归方程计算出相应浓度和含量,并计算回收率、平均回收率及RSD。结果见表4。

表4 复方酮康唑软膏中三种主药回收率试验结果 (*n*=3)

药名	加入量 (μg/ml)	测得量 (μg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
莫匹罗星	160.00	154.40	96.50	97.50	0.59
	160.00	156.59	97.87		
	160.00	155.87	97.42		
	200.00	195.76	97.88		
	200.00	193.35	96.67		
	200.00	194.55	97.28		
	240.00	235.70	98.21		
	240.00	234.92	97.88		
糠酸莫米松	8.00	7.73	96.62	97.99	0.79
	8.00	7.84	98.00		
	8.00	7.83	97.91		
	10.00	9.88	98.80		
	10.00	9.71	97.10		
	10.00	9.78	97.80		
	12.00	11.88	99.00		
	12.00	11.85	98.75		
酮康唑	160.00	153.63	96.02	97.62	0.74
	160.00	156.39	97.74		
	160.00	155.84	97.40		
	200.00	195.72	97.86		
	200.00	194.06	97.03		
	200.00	195.44	97.72		
	240.00	236.46	98.52		
	240.00	235.60	98.17		
240.00	235.38	98.08			

2.9 样品含量测定

取3批样品,依法测定,结果见表5。

表5 3批次样品含量测定结果 (*n*=3, %)

样品批号	酮康唑	莫匹罗星	糠酸莫米松
20190411	99.03	99.20	101.4
20190415	106.3	99.76	101.6
20190408	100.6	100.7	100.7

3 讨论

3.1 提取方法的优化

本研究根据软膏剂的特性,选择了提取效率较高,操作简便的超声提取法进行样品前处理,对溶剂种类、溶剂体积、提取时间进行考察,最终选择65%甲醇50 ml,超声提取10 min,该提取方法可有效的除去样品中的杂质,让测定的专属性更高。

3.2 色谱条件的选择

对于流动相的选择,本实验尝试以甲醇-0.6%醋酸铵溶液作为流动相^[9-12],结果基线非常不稳定,这可能是由于醋酸铵的紫外吸收所造成。以甲醇-水、乙腈-水,甲醇-磷酸二氢钠溶液和甲醇-乙腈-水等作为流动相^[13-15],使用磷酸二氢钠溶液分离效果及峰形较好,有机相甲醇的比例应控制在一定范围,甲醇低于50%则酮康唑峰保留时间过长;流动相的酸度对酮康唑(弱碱性)和莫匹罗星(弱酸性)^[16]的峰形及保留时间亦有影响,用磷酸将磷酸二氢钠的pH值调节到4.5、5.0、5.5和6.0。结果表明,当流动相的pH值为5.5时,莫匹罗星、糠酸莫米松和酮康唑的三组峰值均具有较好的分离度,并且无前延和拖尾现象。对于检测波长的选择,酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松在220 nm与248 nm均有吸收,因在供试品中酮康唑和莫匹罗星的浓度均是糠酸莫米松的20倍,为了让这三种药物能同时测定,提高检测的灵敏度,确定最佳检测波长为248 nm。对于色谱柱的选择,本研究考察了岛津、安捷伦和沃特世等品牌的色谱柱,最终选择了岛津Intersil ODS-3柱,三种待测成分在该柱上分离度好,峰形佳,所以确定为最佳色谱柱。

3.3 含量测定结果分析

3个批次的复方酮康唑软膏均为实验室自制,从测定结果可以看出,不同批次的样品中酮康唑、莫匹罗星和糠酸莫米松的含量有一定波动,这提示我们在进行中试放大生产时,要充分考虑各因素的影响,保证制剂中主要成分的含量稳定,同时对软膏剂的长期稳定性也需要进行考察。

【参考文献】

- [1] 万芳友,李爱华.反相高效液相色谱法同时测定复方酮康唑搽剂中三种组分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(7):

- 1263-1266.
- [2] AMRUTIYA N, MADAN M, BAJAJ A. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of prednicarbate, mupirocin and ketoconazole in topical dosage forms[J]. *J Anal Chem*, 2010, 65(11): 1148-1154.
- [3] 王爱平, 李若瑜. 2%酮康唑乳膏在皮肤科疾病中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(3): 179-183.
- [4] 陆雪华, 陆艳萍, 覃美玲, 等. 复方酮康唑莫匹罗星联合治疗真菌性皮肤溃疡疗效观察[J]. 基层医学论坛, 2018, 22(2): 158-160.
- [5] 中国中西医结合学会皮肤性病学会环境与职业性皮肤病学组. 糠酸莫米松乳膏临床应用专家共识[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2017, 16(1): 88-90.
- [6] 孟甄, 金建玲, 刘玉庆, 等. 细菌耐药性的诱导与消除[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 1047-1051.
- [7] 谢阳, 万亩坚. 皮肤科常用糖皮质激素类药物的类型及适应证[J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2015, 32(3): 283-288.
- [8] 刘淮, 刘景桢. 外用糖皮质激素的适应症与副作用[J]. 皮肤病与性病, 2016, 38(1): 19-20.
- [9] 李文仕. RP-HPLC法测定复方中风康复片中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(5): 494-496.
- [10] 颜苗, 张金娇, 李焕德, 等. RP-HPLC法同时测定甘草酸制剂中18 α -、18 β -甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 301-304, 309.
- [11] ABDELWAHAB N S, ALI N W, ABDELKAWY M, et al. Validated RP-HPLC and TLC-densitometric methods for analysis of ternary mixture of cetylpyridinium chloride, chlorocresol and lidocaine in oral antiseptic formulation[J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(3): 318-325.
- [12] WAN F Y, LI A H. Determination of three constituents in compound ketoconazole liniment by RP-HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(7): 1263-1266.
- [13] SHEHNAZ H, HAIDER A, SAEED ARAYNE M, et al. Carboxyterfenadine antacid interaction monitoring by UV spectrophotometry and RP-HPLC techniques[J]. *Arab J Chem*, 2014, 7(5): 839-845.
- [14] VENISHETTY V K, PARIKH N, SISTLA R, et al. Application of validated RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in solid lipid nanoparticles[J]. *J Chromatogr Sci*, 2011, 49(2): 136-141.
- [15] AHMMED S M, MUKHERJEE P K, BAHADUR S, et al. CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: an herb from Indian traditional medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178: 34-39.
- [16] STAUB I, FLORES L, GOSMANN G, et al. Photostability studies of ketoconazole: isolation and structural elucidation of the main photodegradation products[J]. *Lat Am J Pharm*, 2010, 29(7): 1100-1106.
- [收稿日期] 2020-06-20 [修回日期] 2021-03-13
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 151 页)

0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈等流动相对 11 个成分含量测定的影响, 结果显示, 此 11 个待测成分在 0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈中, 采用梯度洗脱, 响应与峰形均佳。

3.3 内标与化学成分的选择

在预实验中分别考察了培美曲塞、利血平、卡马西平三个标准品作为内标时的响应和出峰时间, 最终选用了出峰时间居中、响应好、稳定性高的利血平作为内标。本实验中所选取的化学成分以药典为基础, 结合文献调研, 舍弃挥发油类成分及违禁成分, 最终选取了 11 个能代表药材的化学成分进行研究。

4 结语

本研究基于 UHPLC-MS/MS 同时测定寒湿郁肺汤中 11 个成分含量的方法, 经色谱柱、流动相的优化和全面的方法学考察, 成功应用于样品中寒湿郁肺汤 11 种成分的测定。该法简便可靠, 可为寒湿郁肺汤中的成分检测提供一定的方法参考, 也为寒湿郁肺汤的质量控制及质量标准研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] LUO H, TANG Q L, SHANG Y X, et al. Can Chinese medicine be used for prevention of *Corona* virus disease 2019 (COVID-19)? A review of historical classics, research evidence and current prevention programs[J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(4): 243-250.
- [2] LI Y X, LIU X B, GUO L X, et al. Traditional Chinese herbal medicine for treating novel coronavirus (COVID-19) pneumonia: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Syst Rev*, 2020, 9(1): 75.
- [3] ZHU F C, LI Y H, GUAN X H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial[J]. *Lancet*, 2020, 395(10240): 1845-1854.
- [4] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. [2020-12-01]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm
- [5] REN J L, ZHANG A H, WANG X J. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104743.
- [6] YANG Y, ISLAM M S, WANG J, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(10): 1708-1717.
- [7] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(10): 770-779.
- [收稿日期] 2020-12-05 [修回日期] 2021-03-13
[本文编辑] 陈盛新