

· 研究报告 ·

用 HPLC 法同时测定自制复方特比萘酚软膏中 3 个主药成分的含量

严 佳, 宋洪涛, 周 欣 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院药剂科, 福建 福州 350025)

[摘要] 目的 建立同时测定自制复方特比萘酚软膏中 3 个主药成分含量的 HPLC 法。方法 色谱柱为 ZORBAX SB-C₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(70 : 30), 柱温: 30 °C, 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 248 nm, 进样量: 10 μl。结果 盐酸特比萘酚在 20.4 ~ 204.0 μg/ml($r=0.9997$), 莫匹罗星在 40.4 ~ 404.0 μg/ml($r=0.9998$), 糠酸莫米松在 2.02 ~ 20.20 μg/ml($r=0.9997$)的浓度范围呈良好的线性关系, 加样回收率分别为 99.39%、99.21%、99.97%, RSD 分别为 0.82%、0.59%、0.81%($n=9$)。结论 该方法的专属性、重复性良好, 可用于自制复方特比萘酚软膏中的特比萘酚、莫匹罗星、糠酸莫米松的含量测定。

[关键词] 复方特比萘酚软膏; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)03-0267-03

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202007109

Simultaneous determination of three components in pharmacy compounded terbinafine ointment by HPLC method

YAN Jia, SONG Hongtao, ZHOU Xin (Department of Pharmacy, No. 900 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method to assay 3 active components in pharmacy compounded terbinafine ointment simultaneously. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) equipped with the ZORBAX SB-C₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used for the assay. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid (70 : 30). The flow rate was 1.0 ml/min with the 248 nm detection wavelength, 10 μl injection volume and 30 °C column temperature. **Results** A good linear relationship was observed in the range of 20.4-204.0 μg/ml for terbinafine hydrochloride($r=0.9997$), 40.4-404.0 μg/ml for mupirocin($r=0.9998$), 2.02-20.20 μg/ml for mometasone furoate($r=0.9997$). The average recovery of each detected component in terbinafine ointment was 99.39%, 99.21%, 99.97% with the RSD 0.82%, 0.59%, 0.81%($n=9$). **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate. It can be used to detect the content of terbinafine, mupirocin and mometasone furoate in pharmacy compounded terbinafine ointment.

[Key words] compound terbinafine ointment; content determination; HPLC

浅部真菌病是由致病真菌(皮肤癣菌、念珠菌、马拉色菌等)所致的浅表真菌感染,为皮肤科高发的感染性疾病,以足癣发病率最高,而趾间糜烂型和水疱型为最主要的发病类型。部队官兵作训任务重、居住环境艰苦,且常年穿着透气性较差的胶鞋、作战靴,战士间易交叉感染,是此类型疾病的高发人群。目前,足癣治疗方案为外用抗真菌药物,但临床上使用的多为单方制剂,对治疗合并有

细菌感染伴有瘙痒症状的浅部真菌病效果较差,患者有时需使用两种或两种以上的药物,因携带不便,导致依从性较低。因此,本实验在前期研制复方酮康唑软膏的基础上^[1],拟选用盐酸特比萘酚作为外用抗真菌药替代酮康唑,制备一种外用复方制剂——复方特比萘酚软膏,用于治疗浅部真菌皮肤病并发细菌感染,以解决酮康唑化学性质不稳定、易变色的问题,也方便部队官兵携带使用。同时,建立 HPLC 法同时测定该复方制剂的 3 个主要成分:特比萘酚、糠酸莫米松、莫匹罗星的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, DAD 检测器); DV215CD 型电子天平 [奥豪斯仪器(上海)有限公司]。

[基金项目] 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院临床应用研究专项院内课题(2019L17)

[作者简介] 严 佳, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Tel: (0591)22859963, Email: 25831145@qq.com

[通信作者] 宋洪涛, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 药物新剂型与制剂新技术, Email: sohoto@vip.163.com; 周 欣, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与药物临床试验, Tel: (0591) 22859459, Email: fzyjg@163.com

1.2 试药

盐酸特比萘芬对照品(批号:100563-201402,含量99.8%)、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。盐酸特比萘芬原料药(批号:20150405)、莫匹罗星原料药(批号:20150301)购自武汉鑫佳灵生物科技有限公司;糠酸莫米松原料药(批号:20150228,浙江仙琚制药股份有限公司)。聚乙二醇400、聚乙二醇3350(中国医药对外贸易公司),甲醇为色谱纯,水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备^[1]

2.1.1 盐酸特比萘芬对照品溶液的制备

精密称定盐酸特比萘芬对照品10.2 mg,置10 ml量瓶中,用70%甲醇稀释至每1 ml含盐酸特比萘芬1020 μg的对照品储备液。精密移取盐酸特比萘芬对照品储备液1 ml置10 ml量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含量为102 μg/ml的盐酸特比萘芬对照品溶液。

2.1.2 莫匹罗星对照品溶液的制备

精密称定莫匹罗星20.2 mg,置10 ml量瓶中,用70%甲醇稀释至每1 ml含莫匹罗星2020 μg的对照品储备液。再精密移取莫匹罗星的对照品储备液1 ml置10 ml量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含量为202 μg/ml的莫匹罗星对照品溶液。

2.1.3 糠酸莫米松对照品溶液的制备

精密称定糠酸莫米松10.1 mg,置100 ml量瓶中,用70%甲醇稀释至每1 ml含糠酸莫米松101 μg的对照品储备液。再精密移取糠酸莫米松的对照品储备液1 ml置10 ml量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含量为10.1 μg/ml的糠酸莫米松对照品溶液。

2.1.4 混合对照品溶液的制备

分别取盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松对照品储备液各1 ml,置10 ml量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.5 供试品溶液的制备

精密称取原料药盐酸特比萘芬1 g、莫匹罗星2 g、糠酸莫米松0.1 g,置100 ml量瓶中,用70%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为供试品,同法制备3份。精密吸取上述溶液1 ml置100 ml量瓶中,

加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.6 阴性对照溶液的制备

按“2.1.5”项下,分别配制缺盐酸特比萘芬、缺莫匹罗星、缺糠酸莫米松成分的溶液,即得阴性对照溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为ZORBAX SB-C₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(70:30),检测波长248 nm,流速1.0 ml/min,柱温30℃,进样量10 μl。

2.3 专属性试验

分别取供试品溶液、对照品溶液及阴性对照溶液适量,滤过,取续滤液10 μl注入HPLC仪,分别记录色谱图。实验结果表明,该方法专属性良好,阴性对照无干扰。结果见图1。

2.4 标准曲线制备及线性关系考察

分别精密吸取盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松对照品储备液各0.2、0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2 ml置10 ml量瓶中,用70%甲醇稀释配制成含盐酸特比萘芬浓度为20.4、40.8、81.6、102.0、122.4、142.8、163.2、204.0 μg/ml,含莫匹罗星浓度为40.4、80.8、161.6、202.0、242.4、282.8、323.2、404.0 μg/ml,含糠酸莫米松浓度为2.02、4.04、8.08、10.10、12.12、14.14、16.16、20.20 μg/ml的混合对照品溶液,滤过,取续滤液10 μl,按“2.2”项下色谱条件分析,记录色谱图,计算峰面积。以峰面积A对对照品浓度C(μg/ml)线性回归。实验结果表明,盐酸特比萘芬在20.4~204.0 μg/ml浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $A=1.905 \times 10C+25.90$, $r=0.9997$;莫匹罗星在40.4~404.0 μg/ml浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $A=2.440C+1.446$, $r=0.9998$;糠酸莫米松在2.02~20.20 μg/ml浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $A=2.838 \times 10C+15.12$, $r=0.9997$ 。

2.5 精密度试验

精密吸取同一份混合对照品溶液6次,每次10 μl,分别注入HPLC仪,记录峰面积,计算RSD值。盐酸特比萘芬、莫匹罗星、糠酸莫米松RSD($n=6$)分别为0.05%、0.12%、0.25%,实验结果表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批供试品6份,按“2.1.5”项下方法制备供试品溶液,滤过,取续滤液按“2.2”项下色谱条件分析,分别记录色谱图,测定峰面积,计算含

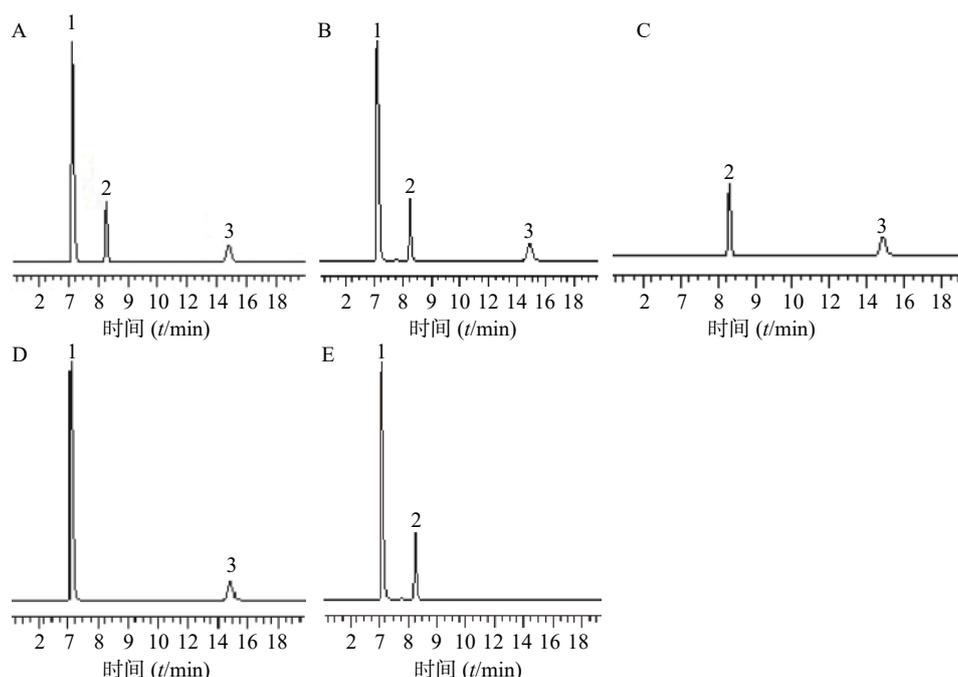


图1 复方特比萘芬的 HPLC 图

A. 盐酸特比萘芬、莫匹罗星、糠酸莫米松对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 缺盐酸特比萘芬阴性对照溶液;
D. 缺莫匹罗星阴性对照溶液; E. 缺糠酸莫米松阴性对照溶液
1. 盐酸特比萘芬; 2. 莫匹罗星; 3. 糠酸莫米松。

量。盐酸特比萘酚、莫匹罗星、糠酸莫米松 RSD($n=6$)分别为 0.19%、0.08%、0.44%，实验结果表明，RSD 均小于 1%，方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 取样 10 μ l 注入 HPLC 仪，测定并计算不同时间点莫匹罗星、糠酸莫米松和盐酸特比萘芬的含量。盐酸特比萘酚、莫匹罗星、糠酸莫米松 RSD($n=6$)分别为 0.66%、0.77%、0.57%。结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验

分别精密量取“2.1.1”、“2.1.2”、“2.1.3”项下盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松的对照品储备液各 0.8、1、1.2 ml，分别置于 3 个 10 ml 量瓶中，加 70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，得低、中、高 3 种浓度的混合对照品溶液，每个浓度平行配制 3 份。滤过，弃去初滤液，取续滤液 10 μ l 注入 HPLC 仪，测定并计算。实验结果表明，盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松平均回收率分别为 (99.39 \pm 0.82)%、(99.21 \pm 0.59)%、(99.97 \pm 0.81)%，说明此方法回收率符合要求。

2.9 样品含量测定结果

按“2.1.5”项下配制供试品 3 批，每批 3 份，精密称取供试品 1 ml，置于 100 ml 量瓶中，加 70% 甲

醇稀释至刻度，摇匀，得供试品溶液 9 份，测定，外标法计算药物含量。结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

供试品	莫匹罗星	糠酸莫米松	特比萘芬
1	99.32 \pm 0.26	100.8 \pm 0.37	100.2 \pm 0.38
2	99.95 \pm 0.26	101.2 \pm 0.52	101.8 \pm 0.56
3	100.3 \pm 0.87	101.4 \pm 0.72	100.5 \pm 1.04

3 讨论

3.1 最大吸收波长的选择

紫外光谱扫描结果显示，盐酸特比萘芬在 282 nm 具有最大吸收峰，莫匹罗星在 220 nm 处具有最大吸收峰，糠酸莫米松在 248 nm 处具有最大吸收峰。由于 3 个组分中糠酸莫米松含量较低，仅占处方量的 0.1%，而盐酸特比萘芬占 1%，莫匹罗星占 2%。故为了让这 3 种药物能同时测定并保证糠酸莫米松的响应值，确定盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松的检测波长为 248 nm，在此波长下 3 种主药均有较好的响应值，建立的 HPLC 法回收率试验结果符合要求。

3.2 色谱条件的选择

笔者曾首先尝试以甲醇-pH5.5 磷酸盐缓冲液

(下转第 279 页)

- [8] 刘卫东. 头孢他啶联合阿奇霉素治疗小儿肺炎的临床疗效[J]. 中国医学工程, 2013, 21(9): 142.
- [9] 陈荣. 头孢他啶联合阿奇霉素治疗儿童社区获得性肺炎临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(4): 14-16.
- [10] 范小萍, 鲍晓岑, 李晓英. 头孢菌素联合阿奇霉素治疗小儿社区获得性肺炎的疗效观察[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(15): 134-135.
- [11] AMBROGGIO L, TEST M, METLAY J P, et al. Beta-lactam versus beta-lactam/macrolide therapy in pediatric outpatient pneumonia[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2016, 51(5): 541-548.
- [12] 夏剑萍. 头孢曲松钠与阿奇霉素联用对社区获得性肺炎患儿的疗效与安全性评价[J]. 抗感染药学, 2016, 13(3): 536-538.
- [13] 齐艳芳. 头孢菌素联合阿奇霉素治疗小儿社区获得性肺炎的临床对照分析[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2017, 4(11): 58-59.
- [14] 戚海波. 内酰胺类联合大环内酯类抗生素治疗儿童重症社区获得性肺炎的临床效果探讨[J]. 中外医学研究, 2018, 16(10): 34-35.
- [15] 孙寅田, 王博龙, 张军雷, 等. β -内酰胺类联合大环内酯类抗生素治疗社区获得性肺炎有效性及安全性的Meta分析[J]. *宜春学院学报*, 2015, 37(9): 23-25.
- [收稿日期] 2020-07-20 [修回日期] 2021-03-15
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 269 页)

(65 : 35)作为流动相, 色谱柱选用 C_{18} 柱^[2], 结果显示该色谱条件下, 盐酸特比萘芬出峰时间太长, 而莫匹罗星及糠酸莫米松的出峰时间偏早, 且杂峰较多; 还曾尝试以甲醇-水、甲醇-醋酸铵、甲醇-乙腈-水、乙腈-水等、甲醇-0.1% 磷酸溶液、四氢呋喃-乙腈-四甲基氢氧化铵缓冲液^[3-10] 作为流动相, 试验结果表明, 甲醇-0.1% 磷酸溶液(70 : 30)作为流动相, C_8 色谱柱的条件下, 盐酸特比萘芬出峰时间明显提前, 三大主药出峰时间都在 20 min 以内, 基线平稳, 各峰分离度良好; 但该条件下盐酸特比萘芬的峰型对称性不佳, 有拖尾现象。故在此基础上, 考虑莫匹罗星(弱酸性)^[11-12], 实验又尝试通过调节流动相 pH 改善峰型, 发现在 pH7.5 时, 盐酸特比萘芬具有良好的对称性, 但莫匹罗星与糠酸莫米松拖尾严重。为保证大部分主药的峰型良好, 本课题最终选用色谱条件为 C_8 色谱柱, 甲醇-0.1% 磷酸溶液(70 : 30)作为流动相。实验采用 HPLC 法, 建立同时测定盐酸特比萘芬、莫匹罗星和糠酸莫米松的含量测定方法, 所建立的分析方法简便、准确、灵敏度高, 阴性对照无干扰。

【参考文献】

- [1] 吴博. 复方酮康唑软膏的制备与评价[D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [2] 陶春, 吴博, 黄爱文, 等. 复方酮康唑软膏的制备与稳定性考察[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35(6): 535-538.
- [3] AMRUTIYA N, MADAN M, BAJAJ A. Development and val-

idation 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.

- [4] 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.
- [5] MURDOCH D, PLOSKER G L. Anidulafungin[J]. *Drugs*, 2004, 64(19): 2249-2258.
- [6] 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.
- [7] 何一鸣, 张蜀, 邓哄, 等. 盐酸特比萘芬乳膏的释放度考察[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(4): 462-465.
- [8] 成铃, 王伯涛. 盐酸特比萘芬乳膏的透皮吸收和含量测定[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(6): 518-522.
- [9] 刘瑛, 陈景勇, 黄劲松, 等. HPLC法同时测定盐酸特比萘芬压敏胶贴剂中酮康唑和盐酸特比萘芬的含量[J]. *宜春学院学报*, 2014, 36(12): 20-22.
- [10] 张友智, 杨晓艳, 崔颖. 特比萘芬乳凝剂的制备及质量评价[J]. *中国药房*, 2014, 25(13): 1204-1207.
- [11] 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.
- [12] 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] 2020-07-28 [修回日期] 2020-11-04
[本文编辑] 李睿旻