

高效液相色谱法同时测定阿达帕林凝胶剂中的 主药阿达帕林和两种防腐剂

张春泓^{1,2}, 赵迎春², 韩春晖², 郭兴杰¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 大连市药品检验所, 辽宁 大连 116021)

摘要 建立了同时测定阿达帕林凝胶剂中主药阿达帕林和防腐剂(苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯)含量的反相高效液相色谱法(HPLC)。采用Tigerkin C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 pH 3.0 的 0.02 mol/L 醋酸盐缓冲液-四氢呋喃-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 在 270 nm 波长条件下检测。线性范围: 苯氧乙醇, 10 ~ 100 mg/L ($r = 0.9999$); 对羟基苯甲酸甲酯, 4 ~ 40 mg/L ($r = 0.9999$); 阿达帕林, 4 ~ 40 mg/L ($r = 0.9999$)。3 种组分的平均回收率为 98.0% ~ 98.6%。该方法简便、可靠, 可用于阿达帕林凝胶剂中阿达帕林、苯氧乙醇和对羟基苯甲酸甲酯的同时测定。

关键词 高效液相色谱法 苯氧乙醇 对羟基苯甲酸甲酯 阿达帕林 阿达帕林凝胶剂

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)05-0640-03 栏目类别 技术与应用

Simultaneous determination of adapalene, 2-phenoxyethanol and methyl-4-hydroxybenzoate in adapalene gels using high performance liquid chromatography

ZHANG Chunhong^{1,2}, ZHAO Yingchun², HAN Chunhui², GUO Xingjie¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was developed for the simultaneous determination of the contents of adapalene and the preservatives (2-phenoxyethanol and methyl-4-hydroxybenzoate) in adapalene gels. The chromatographic analysis was carried out on a Tigerkin C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.02 mol/L ammonium acetate buffer (pH 3.0) and tetrahydrofuran-acetonitrile with gradient elution, and the detection wavelength was set at 270 nm. The calibration curves were linear over the ranges of 10 ~ 100 mg/L ($r = 0.9999$), 4 ~ 40 mg/L ($r = 0.9999$) and 4 ~ 40 mg/L ($r = 0.9999$) for 2-phenoxyethanol, methyl-4-hydroxybenzoate and adapalene, respectively. The average recoveries of the three substances were within 98.0% ~ 98.6%. The method is simple, reliable and suitable for the simultaneous determination of adapalene, 2-phenoxyethanol and methyl-4-hydroxybenzoate in adapalene gels.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); 2-phenoxyethanol; methyl-4-hydroxybenzoate; adapalene; adapalene gels

阿达帕林是人工合成的新的角质溶解药, 其外用制剂为含主药 0.1% 的阿达帕林凝胶。该药具有溶解粉刺、抗增殖和抗炎作用。临床研究表明, 其对痤疮的非炎性损害和炎性损害均有良好的治疗作用^[1,2], 且较其他维 A 酸有更好的耐受性和更低的副作用^[3,4]。苯氧乙醇(标示含量 0.25%)和对羟基

苯甲酸甲酯(标示含量 0.1%)在该药的处方中主要作为防腐剂使用。为了确保该药的有效性和安全性, 需对两种防腐剂的含量进行控制。文献[5]报道采用高效液相色谱法(HPLC)测定阿达帕林凝胶剂中阿达帕林的含量, 但同时测定处方中主药阿达帕林和两种防腐剂含量的方法还未见报道。本文采

用 HPLC 梯度洗脱方法同时测定阿达帕林凝胶剂中阿达帕林、苯氧乙醇和对羟基苯甲酸甲酯的含量,方法简单、准确,重复性好,可以作为控制阿达帕林凝胶剂质量的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Alliance 高效液相色谱仪, Waters 2695 四元梯度泵, Waters 2996 二极管阵列检测器, Chromeleon 色谱工作站。

阿达帕林对照品由辽宁日升科技开发有限公司提供(纯度为 99.9%);自制阿达帕林凝胶(批号:070408,070415,070420);市售阿达帕林凝胶(法国高德美制药公司,批号 D51026-2)。苯氧乙醇(国药集团化学试剂有限公司,纯度 99.9%);对羟基苯甲酸甲酯(北京化学试剂公司,纯度 99.9%)。四氢呋喃、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:Tigerkin C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)。流动相 A:四氢呋喃-乙腈(体积比为 17:83);流动相 B:0.02 mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 3.0) 线性梯度洗脱程序 D $\rightarrow$ 8 min, 80%B $\rightarrow$ 72%B; 8 $\rightarrow$ 12 min, 72%B $\rightarrow$ 5%B; 12 $\rightarrow$ 25 min, 5%B; 25 $\rightarrow$ 30 min, 5%B $\rightarrow$ 80%B。检测波长:270 nm;流速:1.0 mL/min;进样量 20 μ L。

1.3 溶液配制

苯氧乙醇和对羟基苯甲酸甲酯对照品贮备液的制备:分别精密称取苯氧乙醇对照品约 25 mg 和对羟基苯甲酸甲酯对照品约 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加乙腈-水-四氢呋喃(体积比为 30:66:4)混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

阿达帕林对照品贮备液的制备:精密称取阿达帕林对照品约 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加四氢呋喃溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

对照品溶液的制备:分别精密吸取上述对照品贮备液各 5.0 mL,置于同一 25 mL 量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 3.0)(体积比为 75:25)稀释至刻度,摇匀即得。

1.4 样品处理

取凝胶剂 2 g,精密称定,置于小烧杯中,添加四氢呋喃 10 mL,超声 10 min,用乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 3.0)(体积比为 75:25)转移至 100 mL 量瓶并稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

1.5 方法学评价

根据《中国药典》2005 年版附录 X IX A^[6] 的相

关规定,对所建方法的线性关系、检出限、定量限、精密度、重现性、溶液的稳定性和回收率进行评估。

2 结果与讨论

2.1 最佳分离条件的确定

2.1.1 洗脱方式的选择

阿达帕林、苯氧乙醇和对羟基苯甲酸甲酯的极性相差较大,等度洗脱难以实现良好的分离效果,所以本文采用梯度洗脱分离分析上述 3 种化合物。

2.1.2 流动相的选择

阿达帕林在水和乙腈中几乎不溶,仅在四氢呋喃中溶解,因此本文在样品溶解和流动相配制中均使用了四氢呋喃。

2.1.3 检测波长的选择

苯氧乙醇和阿达帕林均在 270 nm 波长处有最大吸收,故本文选择 270 nm 为测定波长。

2.2 方法学评价

2.2.1 线性关系与最低检出限

分别精密吸取苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯和阿达帕林对照品贮备液各 1, 2.5, 5, 7.5 和 10 mL 系列,置于 5 mL 量瓶中,添加乙腈-0.02 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 3.0)(体积比为 75:25)稀释至刻度,摇匀,得到苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯和阿达帕林的混合标准系列溶液。分别取该溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,以峰面积(A)对质量浓度(C, mg/L)进行回归计算,得回归方程:苯氧乙醇 $A = 0.192C + 0.033$ ($r = 0.9999$);对羟基苯甲酸甲酯 $A = 1.172C - 0.049$ ($r = 0.9999$);阿达帕林 $A = 1.327C + 0.070$ ($r = 0.9999$)。线性范围:苯氧乙醇 10 ~ 100 mg/L,对羟基苯甲酸甲酯 4 ~ 40 mg/L,阿达帕林 4 ~ 40 mg/L。

苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、阿达帕林的定性检出限($S/N = 3$)分别为 3.5, 0.6 和 0.5 ng,定量检出限($S/N = 10$)分别为 11.8, 2.0 和 1.7 ng。

2.2.2 精密度试验

取供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,测得峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为苯氧乙醇 0.9%,对羟基苯甲酸甲酯 0.8%,阿达帕林 0.8%。

2.2.3 重复性试验

取同一批号的阿达帕林凝胶剂 6 份,按“1.4”节所述方法操作,得到该凝胶剂中苯氧乙醇含量(用质量分数表示,下同)的平均值为 0.2385%,RSD 为 1.1%;对羟基苯甲酸甲酯含量的平均值为 0.0995%,RSD 为 0.8%;阿达帕林含量的平均值为 0.1032%,RSD 为 1.2%。表明方法的重复性较好。

2.2.4 稳定性试验

分别将供试品溶液于室温下放置 0,2,4,8,12,24 h 后,取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。6 次进样所得各组分峰面积的 RSD 值如下:苯氧乙醇 0.9%,对羟基苯甲酸甲酯 1.0%,阿达帕林 1.4%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 回收率试验

取约为处方量 80%,100%,120% 的苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯和阿达帕林对照品,按“1.4”节所述方法平行制备供试品溶液各 3 份,进样 20 μL。测得苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯和阿达帕林的回收率及 RSD 结果见表 1。

表 1 回收率的测定结果 (n=3)			
组分	加入量/μg	平均回收率/%	RSD/%
苯氧乙醇	4.00	98.7	0.4
	5.00	97.9	0.8
	6.00	99.4	2.3
对羟基苯甲酸甲酯	1.60	100.6	0.3
	2.00	99.0	0.5
	2.40	98.8	1.7
阿达帕林	1.60	101.6	1.1
	2.00	100.0	0.4
	2.40	101.0	1.3

2.2.6 系统适用性试验

在上述色谱条件下,分别取对照品和供试品溶液各 20 μL 进样,记录色谱图。理论塔板数按苯氧乙醇色谱峰计算不低于 6 000 塔板/m。苯氧乙醇、对羟基苯甲酸甲酯和阿达帕林的色谱图见图 1。

2.3 样品测定

分别取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算。4 批样品的含量测定结果见表 2。

表 2 样品含量(用质量分数表示)的测定结果 (n=4) %						
批号	苯氧乙醇		对羟基苯甲酸甲酯		阿达帕林	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
070408	0.2375	1.1	0.0991	0.6	0.1032	1.2
070415	0.2501	0.6	0.0995	1.2	0.1014	1.0
070420	0.2610	1.0	0.1043	1.4	0.0978	1.0
051026-2	0.2421	1.5	0.1065	1.0	0.0995	1.5

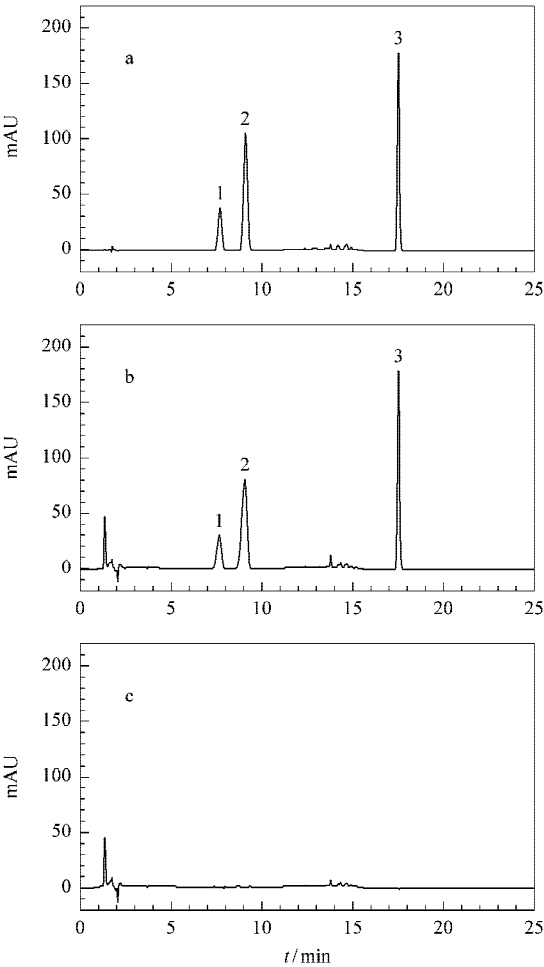


图 1 阿达帕林、苯氧乙醇和对羟基苯甲酸甲酯的色谱图
a. 对照品; b. 样品; c. 阴性样品。
1. 苯氧乙醇; 2. 对羟基苯甲酸甲酯; 3. 阿达帕林。

参考文献：

[1] Cunliffe W J, Caputo R, Dreno B, et al. J Am Acad Dermatol, 1997, 36 :S126
[2] Cunliffe W J, Caputo R, Dreno B, et al. J Dermatol Treat, 1997, 8 :173
[3] 张锡宝, 赵辨. 临床皮肤科杂志, 1999, 28 (2) :132
[4] 吴娜. 中国新药杂志, 1999, 8 (10) :702
[5] 颜琳琦, 刘可, 郭云珍, 等. 药物分析杂志, 2006, 26 (3) :409
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 版. 二部, 附录 X IX A. 北京 :化学工业出版社, 2005