

HPLC 法测定氢化可的松戊酸酯有关物质

陈丽萍¹ 殷义平² 王元有¹ 张杰¹

(1. 扬州工业职业技术学院, 扬州, 225127; 2. 江苏联环药业集团有限公司, 扬州, 225009)

摘要 用 HPLC 法测定了氢化可的松戊酸酯有关物质, 结果表明, 氢化可的松戊酸酯与氢化可的松及氢化可的松-21-戊酸酯分离良好, 氢化可的松戊酸酯与氢化可的松及氢化可的松-21-戊酸酯的最低检测限分别为 0.9 ng, 0.2 ng, 2.0 ng。本法专属性强, 结果准确、灵敏, 操作简便, 可作的质量控制方法。

关键词 高效液相色谱法 氢化可的松戊酸酯 氢化可的松 氢化可的松-21-戊酸酯

氢化可的松戊酸酯又名氢化可的松-17-戊酸酯, 是一种糖皮质激素类药, 有较强的抗炎、抗增生和免疫抑制作用。目前仅美国药典(32 版)^[1] 收载有测定其含量的 HPLC 方法, 对与其有关物质的测定尚未见报道。本文通过对方法学的考察, 建立了氢化可的松戊酸酯有关物质的 HPLC 测定方法, 能对其主要杂质氢化可的松及氢化可的松-21-戊酸酯进行有效测定。试验表明, 该方法专属性强, 结果准确, 灵敏度高, 操作简便, 可作为本品的质量控制方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪(Waters 515 泵, Waters 2487 紫外检测器, 7725i 进样器, 浙大智达 N2000 工作站)。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

氢化可的松戊酸酯对照品(USP LOT F-1, 含量 100%), 氢化可的松工作对照品及氢化可的松-21-戊酸酯工作对照品均由扬州制药有限公司提供。氢化可的松戊酸酯样品由扬州制药有限公司提供(批号 20060001, 20060002, 20060003)。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C18 (250mm × 4.6mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水(45:55); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流速 0.8 mL/min; 检测波长 254nm; 进样量 20 μ L; 溶剂为乙腈-水(50:50)。

3 结果与讨论

3.1 专属性试验

氢化可的松戊酸酯及其有关物质专属性试验色

谱图见图 1。

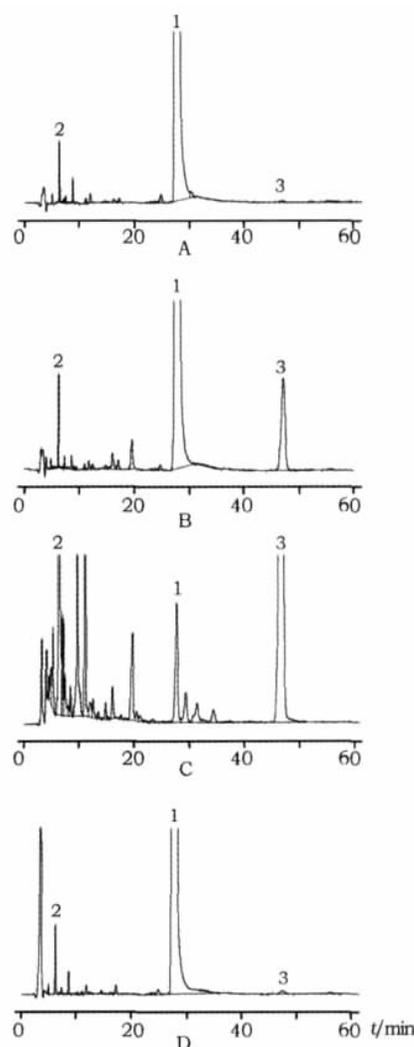


图 1 光照(A)、强酸(B)、强碱(C)和强氧化剂(D)条件下的色谱图

1. 氢化可的松戊酸酯(27.7min) 2. 氢化可的松(6.3min)
3. 氢化可的松-21-戊酸酯(46.8min)

试验方法:精密称取氢化可的松戊酸酯样品 25mg,用强酸(加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 1mL,放置 2h)、强碱(加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1mL,放置 60min)、强氧化剂(加入 25%过氧化氢溶液 5 滴,放置 60min)和在照度为 4500 lx 的光照箱内放置 10 天,进行破坏性试验,用溶剂定容。在上述条件下进样 20 μ L,记录色谱图,至氢化可的松戊酸酯峰 2 倍的保留时间(约 60min),见图 1。

结果表明,氢化可的松戊酸酯对光照及氧化剂较为稳定,对酸、碱不稳定,已知的降解产物有氢化可的松及氢化可的松-21-戊酸酯,氢化可的松戊酸酯与各降解产物均分离良好。

3.2 线性关系测定

精密称取氢化可的松与氢化可的松-21-戊酸酯标准品各 10mg 于 200mL 容量瓶中,用 10mL 甲醇溶解,并用溶剂稀释至刻度,制得标准溶液。分别吸取该标准溶液 1.0,2.0,5.0,10.0,15.0,20.0mL 于 100mL 容量瓶中,制成浓度为 0.00050,0.0010,0.0025,0.005,0.0075,0.010 mg/mL 的标准溶液,摇匀,按 1.2 项下条件分别进样测定,记录色谱图,以峰面积 Y 为纵坐标,浓度 X 为横坐标。计算氢化可的松的回归方程为:

$$Y = 68684X + 2099, r = 0.99994$$

氢化可的松-21-戊酸酯的回归方程为:

$$Y = 52900X - 365.27, r = 0.99994$$

结果表明,氢化可的松及氢化可的松-21-戊酸酯在 0.0005~0.010 mg/mL 范围内线性良好。

3.3 回收率试验

采用加样回收试验方法,精密称取 100mg 氢化可的松戊酸酯样品(批号为 20060001)共 10 份,置于 100mL 容量瓶中,各加入 2mL 甲醇溶解,一份作对照,其余 9 份中分别精密加入标准溶液 2,10,20mL 各 3 份,用溶剂稀释至刻度,摇匀,分别作为回收样品溶液。按 1.2 条件测定氢化可的松与氢化可的松-21-戊酸酯的加样回收率,结果见表 1。

3 次测定平均回收率 \pm RSD 分别为氢化可的松(98.2 \pm 0.21)%,(99.6 \pm 0.46)%,(99.2 \pm 0)%;氢化可的松-21-戊酸酯(95.6 \pm 0.49)%,(100.2 \pm 1.5)%,(98.9 \pm 0.41)%。

3.4 最低检测限

分别配制一系列浓度的溶液,逐级稀释,按 $S/N \approx 3$ 测得氢化可的松戊酸酯和氢化可的松及氢

表 1 回收率试验结果(n=9)

成分	加入量 (μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)
氢化可的松	102.1	100.5	98.4	
	102.1	100.4	98.3	98.2
	102.1	100.1	98.0	
	510.5	505.9	99.1	
	510.5	510.0	99.9	99.6
	510.5	510.0	99.9	
	1021	1013	99.2	
	1021	1013	99.2	99.2
	1021	1013	99.2	
氢化可的 松-21- 戊酸酯	102.0	97.1	95.2	
	102.0	97.3	95.4	95.6
	102.0	98.0	96.1	
	510.0	508.0	99.6	
	510.0	505.3	99.1	100.2
	510.0	519.5	101.9	
	1020	1013	99.3	
	1020	1008	98.8	98.9
	1020	1004	98.5	

化可的松-21-戊酸酯的最低检测限分别为 0.9ng、0.2ng 和 2.0ng。

3.5 样品有关物质测定

精密称取 25mg 氢化可的松戊酸酯样品于 25mL 容量瓶中,用 2mL 甲醇溶解并用溶剂稀释至刻度,摇匀,作为样品溶液(1mg/mL)。精密量取 1mL 于 50mL 容量瓶中,用溶剂稀释至刻度,再精密量取 5mL 于 100mL 容量瓶中,用溶剂稀释至刻度作为对照溶液(1 μ g/mL)。精密量取对照溶液 20 μ L,注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使氢化可的松戊酸酯的峰高约为满量程的 10%,再分别精密量取对照溶液及样品溶液各 20 μ L 进样,记录色谱图,样品溶液记录至氢化可的松戊酸酯保留时间的 2 倍,约 60min(图 2)。以峰面积计算,样品中如有氢化可的松(RRT 约 0.22)及氢化可的松-21-戊酸酯(RRT 约 1.74),峰面积分别不得大于对照溶液中主峰面积的 5 倍(0.5%);其他最大单个杂质不得

大于对照溶液中主峰面积的2倍(0.2%);总杂质不得大于对照溶液中主峰面积的15倍(1.5%)。结果显示,三批样品皆符合要求,见表2。

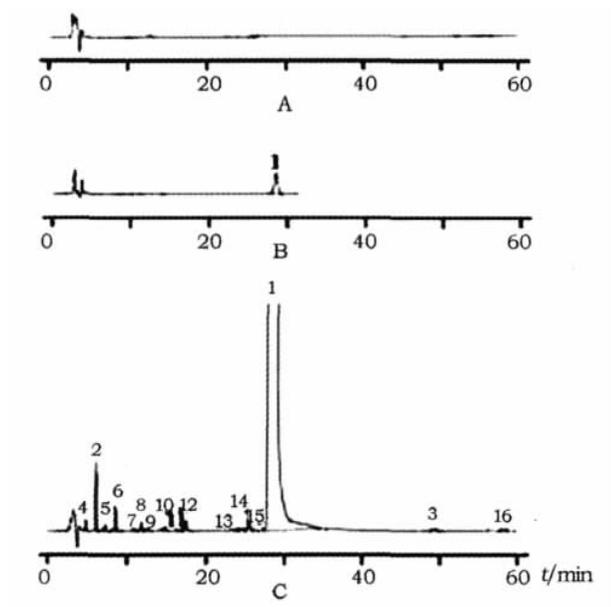


图2 空白(A)、对照溶液(B)、和样品(C)色谱图

1. 氢化可的松戊酸酯(28.5min) 2. 氢化可的松(6.2min)
3. 氢化可的松-21-戊酸酯(49.3min) 4~16. 其他杂质

表2 样品测定结果 (%)

批号	氢化可的松	氢化可的松-21-戊酸酯	其他最大单个杂质	总杂质质量
20060001	0.123	0.022	0.064	0.446
20060002	0.126	0.029	0.081	0.452
20060003	0.123	0.024	0.065	0.450

对照品及氢化可的松和氢化可的松-21-戊酸酯工作标准品分别进行紫外扫描。结果显示,氢化可的松戊酸酯及氢化可的松和氢化可的松-21-戊酸酯在254nm附近均有最大吸收,分别为243nm、242nm、245nm。我们参照美国药典测定方法,选择254nm作为检测波长。

(2) 通过破坏性试验发现,氢化可的松和氢化可的松-21-戊酸酯为氢化可的松戊酸酯主要降解产物。目前,对其有关物质的测定方法尚未见相关报道。本文通过以上试验,为氢化可的松戊酸酯有关物质的测定提供了一种准确、灵敏、简便快捷的测定方法。

(3) 本法有关物质限度标准根据扬州制药有限公司客户要求制定。

参考文献

- [1] USP32-NF27. Vol 2: 2585

收稿日期: 2010-05-31

Determination of hydrocortisone valerate related substances by HPLC. Chen Liping¹, Yin Yiping², Wang Yuanyou¹, Zhang Jie¹ (1. Yangzhou College of Industry Vocational Technology, Yangzhou, 225127; 2. Jiangsu Lianhuan Pharmaceutical Co., Ltd., Yangzhou, 225009)

Objective: To establish a HPLC method for the determination of hydrocortisone valerate and related substances. Method: A Phenomenex C18 column (250mm×4.6mm, 5 μ m) was used with ACN-water (45:55) as mobile phase. The flow rate was 0.8mL/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the detection was at 290nm. Results: Hydrocortisone valerate was separated from impurities (hydrocortisone and hydrocortisone-21-valerate) completely. Their detection limits for hydrocortisone valerate, hydrocortisone and hydrocortisone-21-valerate were 0.9ng, 0.2ng and 2.0ng, respectively. Conclusion: The method is accurate, sensitive, simple and specific, and is appropriate for the quality control of hydrocortisone valerate.