

反相液相色谱分离肾上腺皮质激素

John Henderson, William Long, Ronald Majors
(Agilent Technologies, Inc., USA)

摘要 使用安捷伦新的C18反相色谱柱,以水/乙腈或水/甲醇为流动相可以轻松分离肾上腺皮质激素。本文应用等度洗脱,成功开发了一个OTC膏剂中氢化可的松的定量分析方法。

1 引言

肾上腺皮质激素类药物包括皮质醇(氢化可的松)、皮质酮(体内自然存在的肾上腺激素)以及部分合成药物如氟羟泼尼松龙和泼尼松。作为有效的抗炎药,肾上腺皮质激素被用于各种口服制剂、吸入剂及外用药,用以治疗各种自身免疫和炎症。由于肾上腺皮质激素应用广泛,对它在各种基质中的分析十分重要。HPLC是分析和定量这些药物的方便、快速而灵敏的技术。

2 实验

肾上腺皮质激素分子体积庞大且结构相近。图1显示了部分常用肾上腺皮质激素的分子结构式。肾上腺皮质激素在水中的溶解度从可溶、微溶到完全不溶不等,大部分肾上腺皮质激素溶于有机溶剂。因此,肾上腺皮质激素非常适用于反相液相色谱分离^[1-5]。尽管结构相近,此次考查的几种肾上腺皮质激素的色谱保留却相差很大,有时甚至需要梯度洗脱来获得理想的分离时间。

本文介绍了制药行业中重要肾上腺皮质激素的分析方法,并描述了一外用制剂中肾上腺皮质激素的实际分析应用。

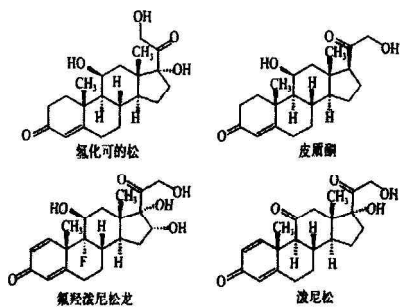


图1 肾上腺皮质激素结构式

3 液相色谱分离肾上腺皮质激素

图2显示了四种肾上腺皮质激素在反相C18柱上的等度分离,色谱柱填充的是5 μ m Agilent TC C18填料,

规格4.6 $\times$ 150 mm,是典型的分析色谱柱。鉴于疏水性的差异,几种肾上腺皮质激素(结构式如图1所示)在该色谱柱上具有不同的保留。由于没有可电离的基团,这些中性化合物并不需要使用缓冲溶液。但是,对于真实样品来说,样品基质或其它赋型剂中的干扰物可能能够电离,因此需要缓冲溶液来调节pH或离子强度,以将它们与待测肾上腺皮质激素很好地分离。在实验中的色谱条件(如图2所示)下,色谱分离良好、峰形对称(所有峰的USP(5%)拖尾因子小于1.1)且重现性好(保留时间RSD<1%)。

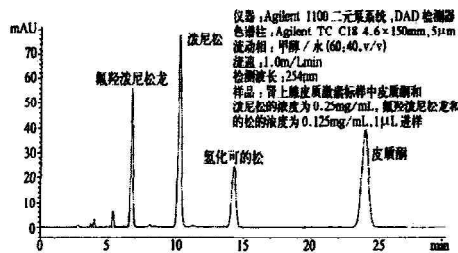


图2 肾上腺皮质激素混合标样的甲醇/水等度分离

4 氢化可的松软膏分析

肾上腺皮质激素通常用于外用制剂。氢化可的松是常用的止痒药,在OTC药物中常以1%的乳膏出现。参考USP方法^[6],我们分析了一款市售药物,其标识药物浓度为1%氢化可的松活性成分。该药物中同时含有芦荟、尼泊金,表面活性剂等惰性成分。样品制备过程为,取相当于含氢化可的松2.5~5 mg的软膏270mg置于容量瓶,加10 mL甲醇,超声10分钟后用PTFE膜过滤。因样品中只含有一种肾上腺皮质激素,采用60:40甲醇/水等度洗脱该L1色谱柱(详见方法)。将氢化可的松对照品(Sigma H4001-1G)制备成30mg/mL甲醇溶液,用前10倍稀释。

进样1 μ L氢化可的松标准稀释液用以考察响应因子(结果未显示);1 μ L过滤好的氢化可的松软膏供试品的色谱分离结果详见图3。

除了氢化可的松,色谱图还显示了其它一些化合物的存在。经研究惰性赋形剂的性质,推测这些化合物可

能是烷基尼泊金。事实上, 甲基尼泊金和丙基尼泊金标样分析结果表明(数据未提供), 它们的保留时间与图3中的完全匹配。

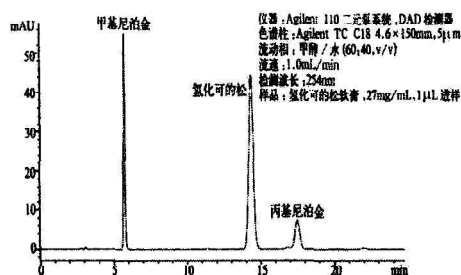


图3 反相色谱水/甲醇等度分离1%氢化可的松软膏

通过单点校正, 测得软膏中活性成分的含量为1.1%。当然, 若作为耐用而可重现的实验室方法, 还需要进行更完全的定量校正。

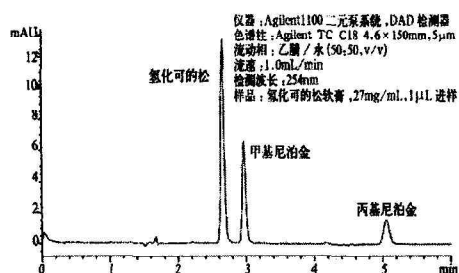


图4 反相色谱水/乙腈等度分离1%氢化可的松软膏

5 流动相对分离的影响

以乙腈替代甲醇的等度洗脱被用来研究有机相对分离的影响。色谱级的乙腈比甲醇价格要贵, 但是不少人喜欢用乙腈作有机相, 因为它的粘度低, 且在紫外低波长吸收弱。在相同条件下, 以等效洗脱强度(即与60:40甲醇/水洗脱强度相当)的50:50乙腈/水混合液为流动相分析氢化可的松软膏, 同甲醇/水的分离效果相比, 所有组分的保留时间都有所缩短, 而且, 甲基尼泊金与氢化可的松之间的选择性大大改变(从图5可见, 两者的流

出顺序颠倒了)。这种现象并不罕见, 而且恰恰证实了调整流动相在液相分离中的重要作用。

6 总结

以乙腈/水或甲醇/水为流动相, 采用安捷伦新型C18色谱柱可以有效分离肾上腺皮质激素。本应用建立了一个分析市售OTC软膏中氢化可的松的等度分离方法。

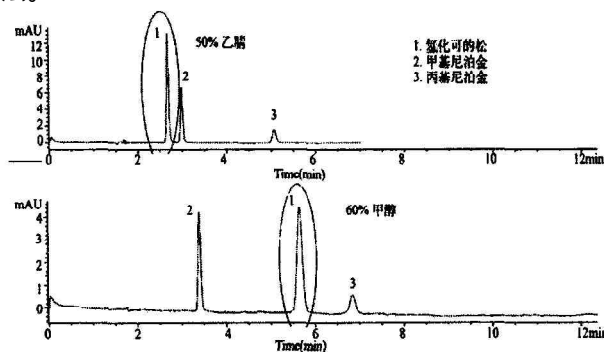


图5 等效洗脱强度流动相选择性对比

参考文献

- [1] C. Woodward, "Small Scale Preparative Isolation of Corticosteroid Degradation Products Using Mass-Based Fraction Collection", Agilent Technologies, publication 5989-2683EN, www.agilent.com/chem
- [2] C. Woodward and R. Majors, "Preparative Purification of Corticosteroids by HPLC Scalability and Loadability using Agilent Prep C18 HPLC Columns", Agilent Technologies, publication 5989-2484EN, www.agilent.com/chem
- [3] R. Ricker, "Steroids", Agilent Technologies, publication 5988-6409EN, www.agilent.com/chem
- [4] I. Miksik, M. Vylitova, J. Pacha, and Z. Deyl, (1999) J. Chromatogr. B, Biomedical Applications, 726(1-2), 59-69
- [5] S. Ahmed and M. Riaz, (1991) 31 Chromatographia, (1-2), 67-70
- [6] United States Pharmacopeia Method USP27-NF22 Page 922.
- [7] C. Barbas, J. Ruperez, A. Dams, and R. Majors, "Separation of Paraben Preservatives by Reversed-Phase HPLC", Agilent Technologies, publication 5989-3635E, www.agilent.com/chem