

HPLC法测定联苯苄唑乳膏中8种抑菌剂和1种抗氧化剂

唐立超, 郑淑凤, 顾立强, 黄剑英, 李玲玲

厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361012

摘要: 目的 建立同时测定联苯苄唑乳膏中8种抑菌剂和1种抗氧化剂含量的方法。方法 采用CAPCELL PAK ADME色谱柱,以0.02 mol/L乙酸铵溶液-甲醇为流动相,梯度洗脱,体积流量为1.0 mL/min,柱温为30℃,检测波长为218 nm。进行专属性、线性关系、检测限与定量限、精密度、回收率、稳定性等方法学考察。检测来自13家生产企业、共37批次联苯苄唑乳膏中抑菌剂山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和抗氧化剂二丁基羟基甲苯(BHT)的含量。结果 抑菌剂山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和抗氧化剂BHT的线性范围分别为9.924~198.5、10.43~208.6、24.94~498.7、10.07~201.5、10.13~202.6、10.13~202.5、10.03~200.5、4.053~81.04、10.10~202.0 $\mu\text{g/mL}$ (r 为0.999 3~1.000 0);平均回收率为98.6%~100.9% (RSD为0.52%~1.43%)。专属性、检测限与定量限、精密度、稳定性等方法学考察均符合要求。各批次苯苄唑乳膏均未检出苯甲酸、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯和尼泊金丁酯,检出山梨酸、苯甲醇、尼泊金乙酯、苯扎溴铵和BHT。结论 建立的方法操作简便、结果准确,可用于联苯苄唑乳膏中抑菌剂和抗氧化剂含量的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法;联苯苄唑乳膏;抑菌剂;抗氧化剂;含量测定

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2439-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.015

Determination of eight bacteriostats and one antioxidant in Bifonazole Cream by HPLC

TANG Lichao, ZHENG Shufeng, GU Liqiang, HUANG Jianying, LI Lingling

Xiamen Institution for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of eight bacteriostats and one antioxidant in Bifonazole Cream. **Methods** The determination was performed on CAPCELL PAK ADME column with mobile phase consisted of 0.02 mol/L ammonium acetate solution-methanol in gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30℃, and detection wavelength was set at 218 nm. The specificity, linear relationship, limit of detection and limit of quantitation, precision, recovery, stability were investigated. The contents of sorbic acid, benzoic acid, benzyl alcohol, methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben, butyl paraben, benzalkonium bromide and antioxidant dibutyl hydroxytoluene (BHT) in 37 batches of Bifonazole Cream from 13 manufacturers were determined. **Results** The linear range of bacteriostats sorbic acid, benzoic acid, benzyl alcohol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, benzalkonium bromide and antioxidant BHT were 9.924—198.5, 10.43—208.6, 24.94—498.7, 10.07—201.5, 10.13—202.6, 10.13—202.5, 10.03—200.5, 4.053—81.04, 10.10—202.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 3\text{—}1.000\ 0$) respectively. The average recoveries were 98.6%—100.9% with the RSDs of 0.52%—1.43%. The specificity, limit of detection and limit of quantification, precision, stability and other methodological investigation met the requirements. Benzoic acid, methyl paraben, propyl paraben and butyl paraben were not detected in all batches of benzimidazole cream, but sorbic acid, benzyl alcohol, ethyl Paraben, benzalkonium bromide and BHT were detected. **Conclusions** The method is simple and accurate, and can be used for simultaneous determination of bacteriostats and antioxidant in Bifonazole Cream.

Key words: HPLC; Bifonazole Cream; bacteriostats; antioxidant; contentdetermination

联苯苄唑(白霉唑, bifonazole)是一种咪唑类广谱抗真菌药,对白色念珠菌、皮肤癣菌及酵母菌等具有较强的抗菌活性,适用于浅表皮肤真菌感

染^[1-3]。联苯苄唑乳膏收载于《中国药典》2015年版(二部)^[4],但其现行标准尚未对其中的抑菌剂和抗氧化剂含量作出规定。由于乳膏中的抑菌剂和抗

收稿日期: 2020-02-18

第一作者: 唐立超, 硕士, 主管药师, 从事药品检验工作。Tel: (0592)5619836 E-mail: tangchong100@163.com

氧剂均对人体有一定毒性,用量过多可能危害人体健康,导致患者出现皮肤刺激或过敏,尼泊金酯类抑菌剂过量使用还可能增加乳腺癌风险^[5];而抑菌剂和抗氧剂用量不足,又可能导致乳膏霉变、酸败、氧化,给患者的治疗带来安全隐患^[6]。因此,考察联苯苄唑乳膏中的抑菌剂和抗氧剂含量,对于评价其处方合理性、降低不良反应具有重要指导意义。

目前未见同时筛查并定量测定联苯苄唑乳膏中多种抑菌剂和抗氧剂的报道,为了考察国产联苯苄唑乳膏中抑菌剂和抗氧剂使用情况,根据2018年国家评价性抽检企业反馈资料中涉及的抑菌剂和抗氧剂,结合FDA药物非活性成分数据库及相关文献资料^[7-12],建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定联苯苄唑乳膏中8种抑菌剂和1种抗氧剂的含量,以期有效控制相关产品质量提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配置四元泵、DAD检测器、柱温箱、OpenLAB工作站,安捷伦公司);Mettler-Toledo XS105DU 电子分析天平(梅特勒公司);Milli-Q A10型超纯水仪(密理博公司)。

1.2 主要试剂

对照品:山梨酸(批号190126-201501,质量分数99.6%);苯甲酸(批号100419-201703,质量分数99.9%);苯甲醇(批号190019-201702,质量分数100.0%);尼泊金甲酯(批号100278-201404,质量分数100.0%);尼泊金乙酯(批号100847-201203,质量分数100.0%);尼泊金丙酯(批号100444-201102,质量分数99.6%);尼泊金丁酯(批号110792-200503,质量分数100.0%);二丁基羟基甲苯(以下简称BHT)(批号190065-201602,质量分数99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;苯扎溴铵(批号F023U0,质量分数100.0%)购自USP REFERENCE STANDARD。甲醇为色谱纯(Fisher Scientific),水为超纯水,乙酸铵为分析纯。

联苯苄唑乳膏来自13家生产企业(A北京华素制药股份有限公司、B遂成药业股份有限公司、C拜耳医药保健有限公司、D山东方明药业集团股份有限公司、E上海延安药业(湖北)有限公司、F江苏晨牌邦德药业有限公司、G黑龙江天龙药业有限公司、H福建太平洋制药有限公司、I湖北东信药业有限公司、J江苏远恒药业有限公司、K海南皇隆制药股份有限公司、L上海通药业股份有限公司、M南京白敬宇制药有限责任公司),共37批次,规格为1%。

企业A的乳膏不含本研究检测的8种防腐剂和1种抗氧剂,所用辅料基质基本与其他厂家样品相同,故作为阴性样品使用。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为CAPCELL PAK ADME(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为0.02 mol/L 乙酸铵(A)-甲醇(B),按表1梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;检测波长218 nm;进样量20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~2	95	5
2~5	60	40
5~10	60	40
10~20	20	80
20~37	20	80
37~40	95	5

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和BHT对照品适量,置同一量瓶中,加80%甲醇溶解并定量稀释制成含山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和BHT 496.2、521.4、1 247、503.7、506.5、506.3、501.2、202.6、505.1 μg/mL的混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液2.0 mL,置于10 mL量瓶中,用80%甲醇溶液稀释成混合对照品溶液。

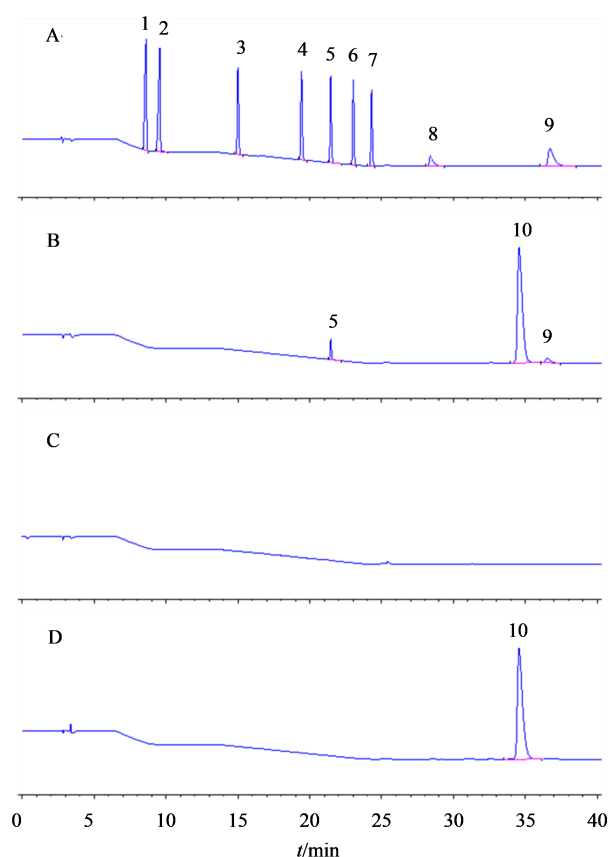
2.2.2 供试品溶液 精密称取样品0.5 g,置于20 mL量瓶中,加80%甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 空白溶液 取80%甲醇溶液作为空白溶液。

2.2.4 阴性供试品溶液 精密称取企业A样品0.5 g,置于20 mL量瓶中,加80%甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 精密量取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液和空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。在该色谱条件下,各待测组分均能达到基线分离,分离度均>1.5,理论板数均>5 000,其他杂质对测定无干扰,见图1。



1-山梨酸; 2-苯甲酸; 3-苯甲醇; 4-尼泊金甲酯; 5-尼泊金乙酯; 6-尼泊金丙酯; 7-尼泊金丁酯; 8-苯扎溴铵; 9-BHT; 10-联苯苄唑
1-sorbic acid; 2-benzoic acid; 3-benzyl alcohol; 4-methylparaben; 5-ethylparaben; 6-propylparaben; 7-butylparaben; 8-benzalkonium bromide; 9-BHT; 10-bifonazole

图1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、空白溶剂(C)和阴性供试品溶液(D)HPLC色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of mix reference solution(A), test solution(B), blank solution(C) and negative test solution(D)

2.3.2 线性关系 精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液2.0 mL,分别置于5、10、20、25、50、100 mL量瓶中,用80%甲醇溶液稀释成线性系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件试验,记录峰面积。以峰面积(y)对各对照品质量浓度(x)进行线性回归分析,计算各组分的回归方程,各对照品组分线性关系良好,结果见表2。

2.3.3 检测限与定量限 精密量取“2.2.1”项下混合对照品储备液适量,逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件,进样测定,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限。山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和BHT的检测限分别为0.23、0.26、4.51、0.35、0.36、0.37、0.41、1.22、1.86 $\mu\text{g/mL}$,定量限分别为0.78、0.88、15.02、1.17、

表2 联苯苄唑乳膏中抑菌剂和抗氧剂的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and line range of bacteriostats and antioxygen Bifonazole Cream

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
山梨酸	$y=73.40x+42.96$	1.000 0	9.924~198.5
苯甲酸	$y=70.54x+18.79$	1.000 0	10.43~208.6
苯甲醇	$y=27.45x+16.12$	0.999 9	24.94~498.7
尼泊金甲酯	$y=46.53x+207.0$	0.999 3	10.07~201.5
尼泊金乙酯	$y=42.45x+180.0$	0.999 3	10.13~202.6
尼泊金丙酯	$y=39.48x+152.2$	0.999 4	10.13~202.5
尼泊金丁酯	$y=37.59x+129.3$	0.999 6	10.03~200.5
苯扎溴铵	$y=13.81x+44.78$	1.000 0	4.053~81.04
BHT	$y=38.24x-6.029$	1.000 0	10.10~202.0

1.19、1.22、1.38、4.05、6.20 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和BHT的峰面积RSD分别为0.73%、0.72%、0.77%、1.09%、0.74%、1.46%、1.36%、1.34%、0.71% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.5 回收率试验 取空白乳膏样品(企业A提供)0.5 g,分别精密加入混合对照品储备液1.6、2.0、2.4 mL,每个浓度各3份,按供试品溶液制备方法操作并测定含量,计算平均回收率。山梨酸、苯甲酸、苯甲醇、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、尼泊金丁酯、苯扎溴铵和BHT的平均回收率分别为99.8%(RSD为0.5%)、99.8%(RSD为0.8%)、99.9%(RSD为0.7%)、100.9%(RSD为0.7%)、99.4%(RSD为0.6%)、100.7%(RSD为1.0%)、100.8%(RSD为0.6%)、99.3%(RSD为1.4%)和98.6%(RSD为1.1%)。

2.3.6 稳定性试验 取含不同抑菌剂的同一批号的乳膏样品按“2.2.2”项下制备供试品溶液,分别于溶液制备后的0、5、10、20、40 h进样分析,山梨酸(企业D,批号1711131)、苯甲醇(企业C,批号BJ40038)、尼泊金乙酯(企业B,批号1704031)、苯扎溴铵和BHT(企业F,批号201705311)的峰面积RSD分别为1.5%、0.8%、1.4%、1.8%和1.7%,表明在15 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下,供试品溶液中的抑菌剂和抗氧剂在40 h内稳定。取“2.2.1”项下混合对照品溶液,分别于0、5、10、20、40 h进样分析,研究中的8种抑菌剂和抗氧剂BHT的峰面积RSD均小于2.0%,表明

在 15 °C 避光条件下,混合对照品溶液中的抑菌剂和抗氧剂在 40 h 内稳定。

3 结果

取 37 批乳膏样品,按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,记录峰面积并计算抑菌剂和抗氧剂的含量,各批次均未检出苯甲酸、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯和尼泊金丁酯。检出山梨酸、苯甲醇、尼泊金乙酯、苯扎溴铵和 BHT,见表 3。

表 3 联苯苄唑乳膏中抑菌剂和抗氧剂的检出情况

Table 3 Bacteriostats and antioxygen that be detected in Bifonazole Cream

企业	批号	成分	标示量/ (mg·g ⁻¹)	测定量/ (mg·g ⁻¹)	企业	批号	成分	标示量/ (mg·g ⁻¹)	测定量/ (mg·g ⁻¹)
A	1710171	—	—	—		201801161			0.12
	1504243	—	—	—		201711281			0.12
	1702061	—	—	—		201711081			0.11
B	1704031	尼泊金乙酯	0.20	0.21		201804181			0.11
	1704021			0.20	G	170904	尼泊金乙酯	0.09	0.08
	1704022			0.21		170103			0.08
	1710181			0.21		170901			0.09
B	1704031	苯扎溴铵	0.02	0.02	H	160401	尼泊金乙酯	0.10	0.10
	1704021			0.02		170602			0.09
	1704022			0.02		160701			0.11
	1710181			0.02	I	170704	—	—	—
C	BJ40038	苯甲醇	1.00	0.94		170202	—	—	—
	BJ26358			0.93		170703	—	—	—
D	1711131	山梨酸	0.30	0.26	J	17092804	尼泊金乙酯	0.10	0.10
	1702282			0.24		16112401			0.12
E	20170101	—	—	—		17011001			0.11
F	201705311	尼泊金乙酯	0.09	0.08		17092905			0.10
	201705051			0.09	K	20170201	尼泊金乙酯	—	0.10
	201801161			0.10		20160801		—	0.10
	201711281			0.09	L	161102	尼泊金乙酯	0.20	0.21
	201711081			0.10		161101			0.20
	201804181			0.09	M	BCA170901	尼泊金乙酯	0.10	0.10
F	201705311	BHT	0.10	0.10		BCA170703			0.10
	201705051			0.12					

“—”未检出

“—”undetected

4 讨论

4.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 波长进行扫描,结果显示,山梨酸和尼泊金酯类在 254 nm 波长处、苯甲酸在 230 nm 波长处、苯甲醇和苯扎溴铵及 BHT 在 218 nm 波长处有最大吸收;考虑到苯扎溴铵和 BHT 的处方含量较低,而其他组分在 218 nm 处也有较高的响应,因此选择 218 nm 作为检测波长。

4.2 提取条件的选择

通过比较不同比例含水甲醇作为溶剂的提取

效果,发现纯甲醇为提取溶剂时,色谱中杂质峰较多,而当溶剂中的含水量高于 20% 时,乳膏样品的浑浊度显著上升,难以滤过,最终确定 80% 的甲醇溶液为本试验的提取溶剂。

4.3 色谱柱的选择

由于山梨酸、苯甲酸、苯甲醇和苯扎溴铵极性较大,而尼泊金酯类和 BHT 极性较小,所测定的组分极性跨度大,曾试用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱和 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱均不能有效分离所有组分,换用金刚烷基键合相的 CAPCELL PAK ADME 色谱柱后,分离效果有很大改善,故选定

CAPCELL PAK ADME 色谱柱作为研究用柱。

4.4 流动相的选择

参考文献^[4]的色谱条件,比较了甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵、乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵等度洗脱和梯度洗脱,发现乙腈洗脱力较强,部分组分出峰过快,改变梯度后依然分离不佳,故选用甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵为流动相,并优化梯度洗脱程序,使各组分出峰时间适宜并分离良好。

4.5 样品测定结果分析

结果显示,9家企业的抑菌剂和抗氧化剂含量均在处方量的80%~120%;企业A、E、I处方中不含本研究中的8种防腐剂和BHT,但含有2种抑菌剂重氮烷基脲和三氯叔丁醇,这2种抑菌剂在本色谱系统中无响应(数据见表3,典型色谱图见图1D),采用HPLC-CAD和GC-FID分别测定后,结果与企业处方标示量相符。企业K检出了其说明书中未标注的尼泊金乙酯。分析测定结果发现,不同企业的联苯苄唑乳膏中尼泊金乙酯含量差异较大,最高值0.26 mg/g约为最低值0.08 mg/g的3倍,建议企业应根据《中国药典》2015年版四部通则的抑菌效力检查法,进一步优化处方,以保证其抑菌剂用量是最低有效剂量。

4.6 建立抑菌剂和抗氧化剂筛查方法的必要性

《药品说明书和标签管理规定》第十一条规定,非处方药的药品说明书应列出所用的全部辅料名称。本次实验发现个别企业说明书不规范,检出了说明书中未标注的抑菌剂,说明由于目前乳膏中的抑菌剂和抗氧化剂缺乏法定测定方法,个别企业可能违规投料或擅改工艺,存在监管风险。建立通用有效的检测方法,对于填补联苯苄唑乳膏中抑菌剂和抗氧化剂的监测空白,开展相关产品的质量评价,具有重要意义。

本实验建立的测定方法,操作简便、结果准确,

可同时测定联苯苄唑乳膏中8种抑菌剂和1种抗氧化剂的含量,为联苯苄唑乳膏的质量控制提供了参考依据。

参考文献

- [1] 韩春晖,裘一兰,奕爽,等. HPLC法测定联苯苄唑原料药中的有关物质 [J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1713-1715.
- [2] 王佳乐,关延彬,周树瑶,等. 联苯苄唑栓剂制备工艺与质量评价研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(7): 1308-1310.
- [3] 曹月霞,蔡果. 高效液相色谱法测定复方联苯苄唑乳膏中氢化可的松和联苯苄唑含量 [J]. 中国药业, 2016, 25(23): 65-67.
- [4] 中国药典 [S]. 二部. 2015: 1263.
- [5] 林忠洋,马万里,齐迹. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂的人体暴露 [J]. 化学进展, 2015, 27(5): 614-622.
- [6] 成海平. 药品研发中防腐剂的应用及质控 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(8): 954-956.
- [7] 赵敬丹,秦峰,杨燕,等. 滴眼液中抑菌剂的快速高通量测定及抑菌效力的研究初探 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(4): 308-313.
- [8] 李树英,王英新,刘玲,等. HPLC同时测定丙戊酸钠口服溶液中丙戊酸钠及防腐剂的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 711-714.
- [9] 林文鑫,孙逸威,管章委,等. 硝酸咪康唑乳膏中9种抑菌剂的HPLC法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(1): 103-106.
- [10] 王鑫,赵硕,刘志杰,等. HPLC-DAD波长切换法同时测定维C银翘片中对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、绿原酸、牛蒡苷 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(10): 1823-1826.
- [11] 沈惠芬,郑艾妮,余诺君,等. HPLC法测定富马酸喹硫平缓释片含量及有关物质 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 594-598.
- [12] 魏文芝,王天学,张敏娟,等. HPLC法同时测定复方磷酸可待因口服溶液中3种有效成分及2种抑菌剂的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(18): 2501-2504.