

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.18.015

高效液相色谱法同时测定硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中 羟苯乙酯和羟苯丙酯含量*

张秉华, 梁亚伟, 王小亮, 席志芳, 袁红梅, 赵蒲中

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立同时测定硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中羟苯乙酯、羟苯丙酯含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为Phenomenex Synergi™ Polar-RP柱(150 mm×4.6 mm, 4 μm), 流动相为甲醇-水(58:42, V/V), 流速为1.25 mL/min, 检测波长为254 nm, 柱温为40℃, 进样量为10 μL。结果 羟苯乙酯与羟苯丙酯质量浓度分别在2.729 3~8.187 8 μg/mL与1.415 3~4.245 9 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好, 检测限分别为0.136 5 ng和0.141 5 ng, 定量限分别为0.272 9 ng和0.707 7 ng。精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%; 平均加样回收率分别为98.89%和98.94%, RSD分别为0.90%和0.90%(n=9)。3批样品中羟苯乙酯与羟苯丙酯的平均含量分别为93.77%和87.97%(n=4)。结论 该方法准确, 操作简便, 灵敏度高, 重复性和稳定性良好, 可用于同时测定硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中羟苯乙酯与羟苯丙酯的含量。

关键词: 硝酸咪康唑阴道软胶囊; 羟苯乙酯; 羟苯丙酯; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)18-0066-04

Simultaneous Determination of Ethylparaben and Propylparaben in the Capsule Shell of Miconazole Nitrate Vaginal Soft Capsules by HPLC

ZHANG Binghua, LIANG Yawei, WANG Xiaoliang, XI Zhifang, ZHONG Hongmei, ZHAO Puzhong

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of ethylparaben and propylparaben in the capsule shell of Miconazole Nitrate Vaginal Soft Capsules. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Synergi™ Polar-RP column (150 mm×4.6 mm, 4 μm), the mobile phase was methanol-water (58:42, V/V), the flow rate was 1.25 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of ethylparaben and propylparaben were 2.729 3–8.187 8 μg/mL and 1.415 3–4.245 9 μg/mL, the limits of detection (LOD) were 0.136 5 ng and 0.141 5 ng, respectively. The limits of quantitation (LOQ) were 0.272 9 ng and 0.707 7 ng, respectively. The RSDs of the precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0%, and the average recoveries of ethylparaben and propylparaben were 98.89% and 98.94% with RSDs of 0.90% and 0.90% (n=9), respectively. The average contents of ethylparaben and propylparaben in the three batches of samples were 93.77% and 87.97% (n=4), respectively. **Conclusion** The method is accurate, simple, sensitive, reproducible and stable, which can be used for the simultaneous determination of ethylparaben and propylparaben in Miconazole Nitrate Vaginal Soft Capsules.

Key words: Miconazole Nitrate Vaginal Soft Capsules; ethylparaben; propylparaben; HPLC; content determination

硝酸咪康唑属三唑类广谱抗真菌药, 临床主要用于局部治疗念珠菌性外阴阴道病和革兰阳性菌引起的双重感染^[1-2], 其作用机制为影响细胞色素P450酶的活性, 从而抑制真菌细胞膜合成, 使细胞内重要物质外漏。硝酸咪康唑阴道软胶囊的胶囊壳含有二氧化钛、甘油、明胶等成分, 可干扰过氧化酶和氧化酶的活性, 引起细胞内的过氧化氢积聚, 从而导致细胞亚结构变性和细胞坏死, 有效缓解疾病症状^[3-5]。目前, 国内市售的该软胶囊囊壳处方中均添加有适量抑菌剂羟苯乙酯和羟苯丙酯, 两者属对羟基苯甲酸酯类, 具有广泛的抗菌活性^[6-8]。但这类化合物具有低毒性, 用量过多可危害

人体健康, 引起过敏性皮炎、DNA损伤、染色体畸变、生殖系统和内分泌毒性, 同时还可增加乳腺癌风险^[9-12]; 用量不足则无法有效抑制微生物污染, 可导致药品的酸败和霉变, 影响药品质量和用药安全。硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中抑菌剂加入量应按2020年版《中国药典(二部)》抑菌效力检查法确定处方最低有效量, 并通过理化测定法监测羟苯乙酯和羟苯丙酯的加入量, 确保制剂货架期的抑菌效力和药品质量安全^[13-15]。为提高该制剂的质量控制标准, 本研究中建立了同时测定硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中羟苯乙酯、羟苯丙酯含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

*基金项目: 陕西省重点研发计划项目[2019SF-027]。

第一作者: 张秉华, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物质量控制, (电子信箱)huabingzhang@126.com。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); XPE205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q IQ 7000型超纯水系统(德国Merck Millipore公司); HY-4型调速多用振荡器(天津鑫博得仪器有限公司); HH-2A型恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 试剂

硝酸咪康唑阴道软胶囊(西安杨森制药有限公司, 批号分别为068968, 068772, 068462, 编号分别记为样1, 样2, 样3, 标示量羟苯乙酯均为1.83 mg/粒, 羟苯丙酯均为0.94 mg/粒; 羟苯乙酯对照品(批号为100847-201604, 含量99.9%), 羟苯丙酯对照品(批号为100444-201804, 含量99.6%), 均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Synergi™ Polar-RP柱(150 mm × 4.6 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇-水(58:42, V/V); 流速: 1.25 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

取羟苯乙酯对照品与羟苯丙酯对照品各适量, 精密称定, 加稀释液[水-甲醇(60:40, V/V), 下同]溶解并稀释, 制成每1 mL中含羟苯乙酯0.272 9 mg与羟苯丙酯0.141 5 mg的溶液, 作为混合对照品贮备液; 精密量取4 mL, 置200 mL容量瓶中, 加水10 mL, 1 mol/L盐酸溶液1 mL及乙醚3 mL, 加稀释液定容, 静置30 min, 加稀释液再次定容, 摇匀, 作为混合对照品溶液。取样品3粒, 置1 000 mL容量瓶中, 加水50 mL, 0.1 mol/L盐酸溶液5 mL, 35 °C水浴并时时振摇分散所有囊壳后, 加入乙醚15 mL, 振摇15 min, 加入500 mL稀释液, 振摇

30 min, 加稀释液定容, 静置30 min, 加稀释液再次定容, 摇匀, 弃去上层漂浮物, 将上层溶液滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。取混合辅料(液体石蜡、白凡士林)0.469 8 g, 精密称定, 置100 mL容量瓶中, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

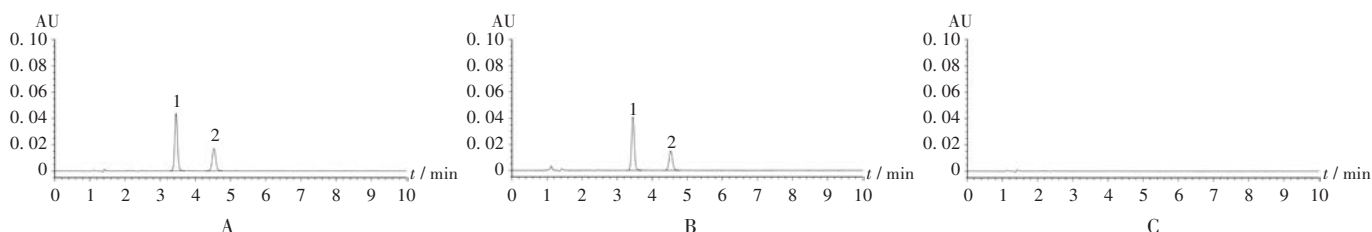
2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验: 分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。供试品溶液在与对照品溶液保留时间相同处有相应色谱峰, 羟苯乙酯峰与羟苯丙酯峰的分离良好(分离度>1.5), 拖尾因子均为1.0, 阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察: 分别精密量取混合对照品贮备液2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 置200 mL容量瓶中, 按2.2项下方法制备系列混合对照品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录羟苯乙酯峰与羟苯丙酯峰面积。分别以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , μg/mL)为横坐标进行线性回归, 得回归方程, 羟苯乙酯为 $Y_1 = 4.64 \times 10^4 X_1 - 6.63 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 8$, $n = 5$), 羟苯丙酯为 $Y_2 = 4.37 \times 10^4 X_2 - 5.29 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 7$, $n = 5$)。结果表明, 羟苯乙酯与羟苯丙酯质量浓度分别在2.729 3~8.187 8 μg/mL和1.415 3~4.245 9 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察: 取羟苯乙酯、羟苯丙酯质量浓度分别为2.729 3 μg/mL和1.415 3 μg/mL的混合对照品溶液适量, 逐级稀释, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以信噪比(S/N)为3和10的待测成分质量浓度分别作为检测限和定量限, 结果羟苯乙酯与羟苯丙酯的检测限分别为0.136 5 ng和0.141 5 ng, 定量限分别为0.272 9 ng和0.707 7 ng。

精密度试验: 取混合对照品溶液, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果羟苯乙酯和羟苯丙酯峰面积的 RSD 分别为0.08%和0.25% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。



1. 羟苯乙酯 2. 羟苯丙酯

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Ethylparaben 2. Propylparaben

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

稳定性试验:取供试品溶液(批号为068968)适量,分别于室温下放置0,4,8,12 h,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果羟苯乙酯与羟苯丙酯含量的RSD分别为0.33%和0.23%($n=4$),表明供试品溶液室温下放置12 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为068968)适量,按供试品溶液制备方法平行制备6份溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果羟苯乙酯和羟苯丙酯的平均含量分别为94.00%和86.00%,RSD分别为0.75%和1.46%($n=6$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:取羟苯乙酯对照品0.110 47 g、羟苯丙酯对照品0.056 84 g,精密称定,置同一100 mL容量瓶中,加稀释液定容,摇匀,作为羟苯乙酯、羟苯丙酯回收率贮备液。取样品9份,每份3粒,分别置2 000 mL容量瓶中,加入精密量取的羟苯乙酯、羟苯丙酯回收率贮备液1.0,5.0,8.0 mL,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
5.166 1	2.467 5	1.103 6	0.566 1	6.267 2	3.032 2	99.77	99.75				
5.166 1	2.467 5	1.103 6	0.566 1	6.256 8	3.038 4	98.83	100.85				
5.166 1	2.467 5	1.103 6	0.566 1	6.279 2	3.023 4	100.86	98.20				
5.166 1	2.467 5	5.518 0	2.830 6	10.612 8	5.240 4	98.71	97.96				
5.166 1	2.467 5	5.518 0	2.830 6	10.619 8	5.265 6	98.83	98.85	98.89	98.94	0.90	0.90
5.166 1	2.467 5	5.518 0	2.830 6	10.599 2	5.250 0	98.46	98.30				
5.166 1	2.467 5	8.828 8	4.529 0	13.836 0	6.931 6	98.20	98.57				
5.166 1	2.467 5	8.828 8	4.529 0	13.828 4	6.955 8	98.11	99.10				
5.166 1	2.467 5	8.828 8	4.529 0	13.840 6	6.945 4	98.25	98.87				

注:A为羟苯乙酯,B为羟苯丙酯。

Note: A is ethylparaben and B is propylparaben.

2.4 耐用性试验

取2.2项下混合对照品溶液和供试品溶液,更换不同型号高效液相色谱仪(UltiMate3000型、Shimadzu LC2030C 3D型)和不同品牌色谱柱[Aglient Proshell 120 EC - C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 4 μm)、Diamonsil Plus C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 4 μm)],改变柱温(±3℃),按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果分离情况均符合要求,表明方法耐用性良好。

2.5 样品含量测定

取不同批号3批样品依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定4次,以外标法计算样品中2种抑菌剂的含量。结果见表2。

3 讨论

目前,国内药品的质量标准对抑菌剂含量的测定

表2 样品中羟苯乙酯与羟苯丙酯含量测定结果(%, $n=4$)

Tab. 2 Results of content determination of ethylparaben and propylparaben in samples (%, $n=4$)

编号	羟苯乙酯		羟苯丙酯	
	平均含量	RSD	平均含量	RSD
样1	94.10	0.07	87.50	0.18
样2	95.50	0.12	90.10	0.44
样3	91.70	0.00	86.30	0.13
$\bar{X}$	93.77		87.97	

存在缺失,对外用制剂的抑菌剂添加量不够重视,患者外用硝酸咪康唑阴道软胶囊后常出现不适感,而抑菌剂会对皮肤黏膜产生刺激,也可通过皮肤黏膜进入体循环,应关注其过量使用的危害。故该制剂中抑菌剂的用量应为最低有效量,即保证有效性的同时尽量少添加,以最大限度地降低对皮肤的刺激。硝酸咪康唑阴道软胶囊抑菌剂的含量测定方法未见报道,现行质量标准也未对抑菌剂进行限度检查,为了更好地控制产品质量安全,保证制剂货架期抑菌效力,有必要对两种抑菌剂进行常规监测。

本研究中结合历年药品检验工作中抑菌剂检查所用方法,建立了同时测定硝酸咪康唑阴道软胶囊囊壳中羟苯乙酯和羟苯丙酯含量的HPLC法,旨在提高该制剂的质量标准,同时为监管部门和生产企业提供技术支持。后续将进一步测定市售该药其他厂家样品中抑菌剂的含量,并开展抑菌效力测定,通过对比分析,确定其抑菌剂的最低有效量,确保外用制剂的用药安全。

参考文献

- [1] 李辉,杨晓莉,梁泽梅,等.不同剂型硝酸咪康唑微生物限度检查方法适用性研究与评价[J].中国抗生素杂志,2018,43(1):80-84.
- [2] 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.
- [3] 薛蓉莉.康复新液外用联合硝酸咪康唑阴道软胶囊治疗老年真菌性阴道炎的效果及对血清炎症因子的影响[J].临床医学研究与实践,2020,5(25):104-106.
- [4] 张平世.硝酸咪康唑阴道软胶囊与氟康唑联用对真菌性阴道炎患者的临床疗效及其对症状改善的影响[J].抗感染药学,2019,16(3):527-529.
- [5] 吴红琴.硝酸咪康唑阴道软胶囊治疗真菌性阴道炎的临床观察[J].临床医学研究与实践,2017,2(2):77-78.
- [6] 谢莹莹,赵勇,栗贵.HPLC法测定羟苯乙酯中对羟基苯甲酸的含量[J].中国药师,2019,22(11):2145-2147.
- [7] 魏文芝,王天学,张敏娟.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种防腐剂的含量[J].中国药房,2018,29(18):2501-2504.
- [8] YE J, CAO XJ, CHENG Z, et al. Rapid determination of para-