

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)16-0081-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.16.019



超高效液相色谱法测定皮肤科外用辛伐他汀乳膏中辛伐他汀含量

余辉, 徐楚, 陈志明, 刘依和, 龚春燕, 刁义平[△]

(中国医学科学院皮肤病医院, 江苏 南京 210042)

摘要:目的 建立测定辛伐他汀乳膏中辛伐他汀含量的超高效液相色谱(UPLC)法。方法 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(52:48, V/V), 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 238 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。结果 辛伐他汀质量浓度在 4.132~20.660 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9994$, $n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均回收率为 100.20%, RSD 为 2.20% ($n=9$)。结论 所建立的方法快速, 结果准确, 可用于辛伐他汀乳膏的质量控制。

关键词: 辛伐他汀乳膏; 超高效液相色谱法; 质量标准; 含量测定

Determination of Simvastatin in Simvastatin Cream Preparation for External Use in Dermatology by UPLC

YU Hui, XU Chu, CHEN Zhiming, LIU Yihe, GONG Chunyan, DIAO Yiping

(Hospital for Skin Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing, Jiangsu, China 210042)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) method for the determination of simvastatin in Simvastatin Cream Preparation. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (52:48, V/V), the flow rate was 0.6 mL/min, the detection wavelength was 238 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear range of simvastatin was 4.132–20.660 μg/mL ($R^2=0.9994$, $n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of simvastatin was 100.20% with an RSD of 2.20% ($n=9$). **Conclusion** The established method is rapid and accurate, which can be used for the quality control of Simvastatin Cream Preparation.

Key words: Simvastatin Cream Preparation; UPLC; quality standard; content determination

他汀类药物为临床常用调脂药,其作用机制为控制胆固醇的生物合成。有研究表明,外用剂型他汀类药物在皮肤科有广泛的潜在应用价值。如2.0%他汀类药物(包括洛伐他汀和辛伐他汀)/2.0%胆固醇软膏可有效缓解汗孔角化症皮损症状^[1-2];2.5%或5.0%辛伐他汀软膏可治疗单侧鱼鳞癣样红皮病伴同侧畸形(CHILD)综合征^[3];2.0%洛伐他汀/2.0%胆固醇软膏联合10.0%乙醇酸软膏可缓解常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病(ARCI)的角化鳞屑症状^[4]等。前期试验以辛伐他汀为主药,采用D相乳化法配制出2.0%辛伐他汀乳膏并用于播散性浅表性光线性汗孔角化症(DSAP),取得良好效果^[5]。本研究中建立了测定该乳膏中辛伐他汀含量的超高效液相色谱(UPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ACQUITY UPLC超高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱及Empower2软件(美国

Waters公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);HH-4型水浴锅(常州国华电器有限公司);Milli-Q Synergy超纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

辛伐他汀对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100601-201504,含量为99.4%);辛伐他汀乳膏[医院制剂中心配制,规格为每支20 g(含辛伐他汀400 mg),批号分别为20220920-1,20220920-2,20220920-3];辛伐他汀空白乳膏基质(医院制剂中心配制,规格为每支20 g,批号为20220920-0);辅料均为药用规格;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相: 乙腈-水(52:48, V/V);流

第一作者: 余辉,男,大学本科,主管药师,研究方向为皮肤病制剂,(电子信箱)yuh@pumcdern.cams.cn。

[△]通信作者: 刁义平,男,大学本科,副主任药师,研究方向为皮肤病制剂,(电子信箱)13951739981@163.com。

速:0.6 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取辛伐他汀对照品10 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加丙酮溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度为200 μg/mL);精密量取5 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取样品2.5 g,精密称定,置100 mL烧杯中,加入丙酮30 mL,水浴加热,搅拌使溶解,冰浴30 min,待基质凝固后,过滤至50 mL容量瓶中。用丙酮洗涤烧杯和玻璃棒,并全部转移至该容量瓶中,加丙酮定容,精密量取1 mL,置100 mL容量瓶,加甲醇定容,经0.45 μm有机系微孔滤膜滤过,即得。

阴性对照品溶液:取辛伐他汀空白乳膏基质适量,按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取2.2项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱在对照品溶液相应位置有吸收峰,理论板数按辛伐他汀峰计为15 143,峰形及分离良好,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下对照品贮备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置50 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以辛伐他汀质量浓度(C , μg/mL)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $A = 22\,872C - 6\,914.8$, $R^2 = 0.999\,4$ ($n = 5$)。结果表明,辛伐他汀质量浓度在4.132~20.660 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定5次,记录辛伐他汀峰面积。

结果的 RSD 为1.19% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录辛伐他汀峰面积。结果的 RSD 为0.36% ($n = 5$),表明供试品溶液室温下放置8 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品适量,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录辛伐他汀峰面积,并按外标法计算平均含量。结果平均含量为标示量的99.25%, RSD 为0.82% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

回收试验:取辛伐他汀对照品105.20 mg,精密称定,配制成质量浓度为10.52 mg/mL的溶液,分别量取4.0、5.0、6.0 mL,置2.5 g辛伐他汀空白乳膏基质中,搅拌均匀,按2.2项下方法制成低、中、高质量浓度的供试品溶液,共9份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

耐用性试验:取样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件[分别设置色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)和Agilent Eclipse Plus RRHD C_{18} 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)]进样测定,记录峰面积。结果表明,色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,取供试品溶液和对照品溶液各5 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果批号为20220920-1,20220920-2,20220920-3样品的含量分别为98.73%,96.31%,95.65%,平均含量为96.90%, RSD 为1.67% ($n = 3$)。

3 讨论

有研究发现,局部外用他汀类药物可用于治疗某

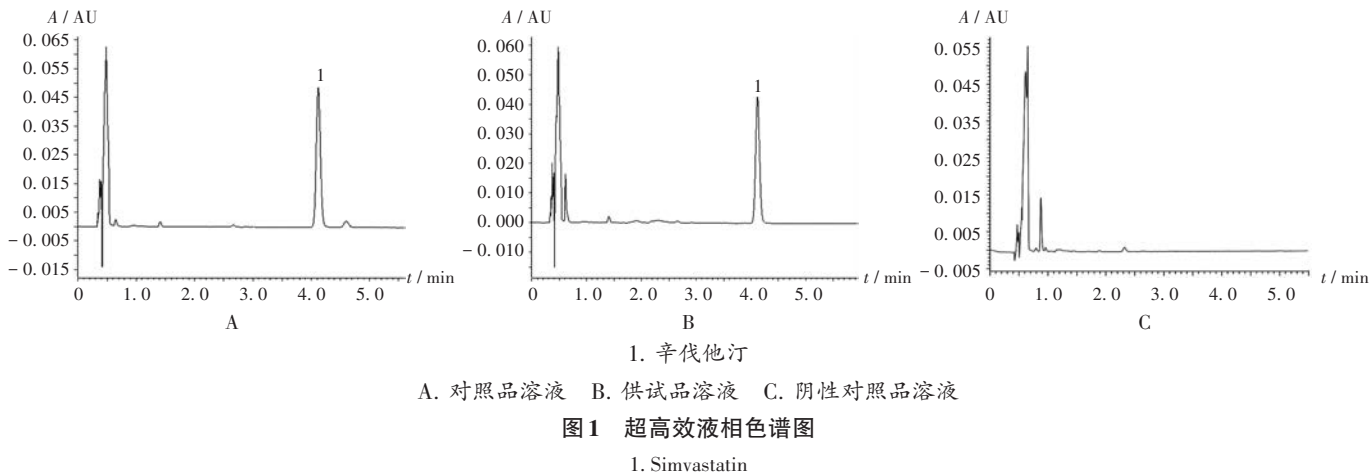


Fig.1 UPLC chromatograms

表1 回收试验结果($n=9$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
42.08	42.55	101.12	100.20	2.20
42.08	42.27	100.45		
42.08	41.98	99.76		
52.60	53.15	101.05		
52.60	53.91	102.49		
52.60	54.60	103.80		
63.12	61.34	97.18		
63.12	61.77	97.86		
63.12	61.93	98.11		

些常见及罕见遗传性皮肤病,如汗孔角化症、斑块状银屑病、CHILD综合征等,普遍认为其作用机制为拮抗3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的活性,从而阻止甲羟戊酸途径的毒性代谢物累积,并抑制炎症途径中组蛋白修饰诱导的先天免疫细胞的活化^[1,6]。尽管已有诸多文献报道外用他汀类药物的安全性和有效性,但临床并未见已上市相关制剂。本研究中以2.0%辛伐他汀乳膏为研究对象进行质量控制研究,为药物的转化开发提供了支持。

本制剂为水包油(O/W)型乳膏,以单/双硬脂酸甘油酯、液体石蜡、白凡士林、十八醇等为油相,以聚乙二醇4000、纯化水等为水相,以吐温80为表面活性剂,以丙二醇为溶剂,以羟苯乙酯为防腐剂。具有外用乳膏制剂的基本成分,试制了较完善的乳膏制剂处方,成分安全,刺激性小^[7-9]。相比普通乳化技术,本制剂采用D相乳化法配制^[10],可得到微细的O/W乳化粒子,增加了乳膏的稳定性,使获得的乳膏性状、涂抹性良好,肤感细腻^[11-12]。

以往对辛伐他汀口服制剂的质量控制方法主要采用高效液相色谱法、紫外吸收光谱法等^[13-14]。与之相比,本研究中采用的UPLC法快速、灵敏,结果准确,分离度高^[15]。此外,该方法的流动相无离子对试剂,操作简便,平衡时间短,且不易对色谱柱造成损伤,便于后续进行制剂稳定性试验和破坏性试验等研究,以及未来大样本量的常规检测。

预试验中分别采用甲醇、乙醇、甲醇/水、环己烷、四氢呋喃等溶剂提取制剂主要成分,通过增加提取次数或进行超声提取,均未能完全提取主药。改以丙酮为提取溶剂后提取率达到要求,并尝试以丙酮作为定容溶剂进样,结果保留时间较不稳定,原因可能为常温下丙酮的饱和蒸气压较高、易挥发,将其改为甲醇定容进样后可获得较稳定的测定结果^[16]。预试验中还对流动相进行了研究,发现以乙腈/水体系作为流动相即可获得良好的分离度及峰形,当流动相为乙腈-水(52:48,

V/V),流速为0.6 mL/min时,主药保留时间约为4.15 min^[16-19],分离效果较好。

本研究也存在一定局限性,如尚未完成制剂长期稳定性试验、加速试验,以及高温、高湿、强光照试验,故辛伐他汀乳膏尚不能作为新制剂应用于临床。据国外文献报道,外用他汀类药物时通常会辅以胆固醇作为联合用药,或将其制成复方制剂使用。他汀类药物诱导的胆固醇缺乏可引起表皮板层小体数量和内容的减少,导致皮肤产生鱼鳞状改变^[4,6]。可见,胆固醇在表皮屏障中具有关键作用,若单独外用辛伐他汀乳膏可能会导致不良反应。因此,未来将进一步开发辛伐他汀/胆固醇的复方外用制剂,并对其进行质量控制。

综上所述,本研究中所建立的方法快速,结果准确,可用于辛伐他汀乳膏的质量控制。

参考文献

[1] ATZMONY L, LIM YH, HAMILTON C, et al. Topical cholesterol/lovastatin for the treatment of porokeratosis: A pathogenesis-directed therapy [J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 82(1): 123-131.

[2] ALBANELL-FERNANDEZ M, LUQUE-LUNA M, LOPEZ-CABEZAS C, et al. Treatment of Porokeratosis Ptychotropa With a Topical Combination of Cholesterol and Simvastatin [J]. JAMA Dermatol, 2023, 159(4): 458-460.

[3] YU X, CHEN L, YANG Z, et al. An excellent response to topical therapy of four congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects syndrome patients with an increased concentration of simvastatin ointment [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020, 34(1): e8-e11.

[4] KHALIL S, BARDAWIL T, SAADE S, et al. Use of Topical Glycolic Acid Plus a Lovastatin-Cholesterol Combination Cream for the Treatment of Autosomal Recessive Congenital Ichthyoses [J]. JAMA Dermatol, 2018, 154(11): 1320-1323.

[5] HABJANIC N, LUZAR-STIFFLER V, KEREK-KOS M, et al. Efficacy of Calcipotriol-Betamethasone Ointment in Patients with Mild to Moderate Plaque Psoriasis: Subgroup Analyses [J]. Dermatology, 2019, 235(6): 501-508.

[6] SANDOVAL KR, MACHADO MCR, OLIVEIRA ZNP, et al. CHILD syndrome: successful treatment of skin lesions with topical lovastatin and cholesterol lotion [J]. An Bras Dermatol, 2019, 94(3): 341-343.

[7] KOVÁCS A, PÉTER-HÉDERI D, PEREI K, et al. Effects of Formulation Excipients on Skin Barrier Function in Creams Used in Pediatric Care [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(8): 729.

[8] 龙 凤, 彭贤东, 唐志立, 等. 面部用赛庚啶尿素乳膏的制备及质量控制 [J]. 中国药业, 2015, 24(4): 19-20.

[9] 苗 杰, 王爱武, 杨 柳, 等. 盐酸普萘洛尔乳膏的研制及质量标准研究 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(6): 409-411.

[10] 胡秋明, 张 浩, 钟美莹, 等. D相乳化技术在乳化体系中的应用效果 [J]. 香料香精化妆品, 2023(3): 93-97.