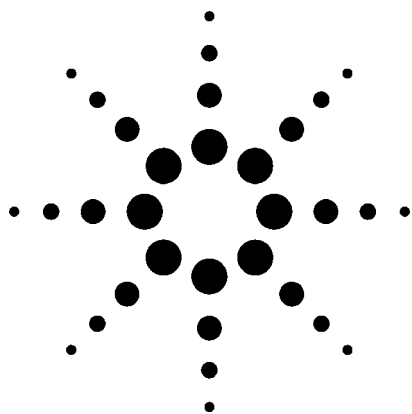


反相液相色谱分离肾上腺皮质激素



应用

药物分析

作者

John Henderson, William Long, and Ronald Majors

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808-1610

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。

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、吸入剂及外用剂，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。

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。

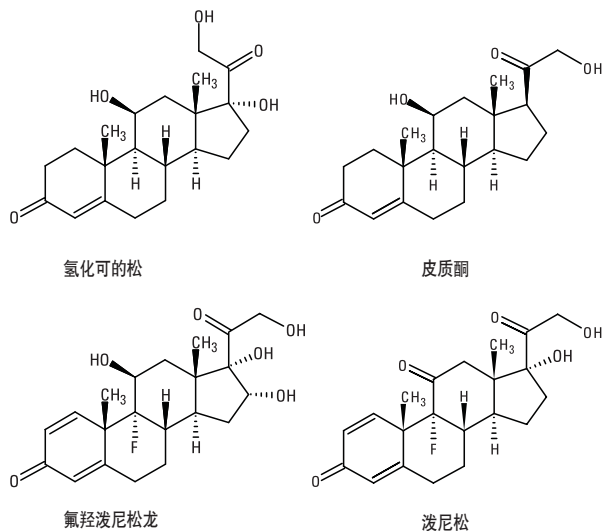


图1. 肾上腺皮质激素结构式



Agilent Technologies

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。

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，色谱柱填装的是5 μm 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%)。

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270 mg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30 mg/mL甲醇溶液，用前10倍稀释。

进样1 μL 氢化可的松标准稀释液用以考察响应因子(结果未显示)；1 μL 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。

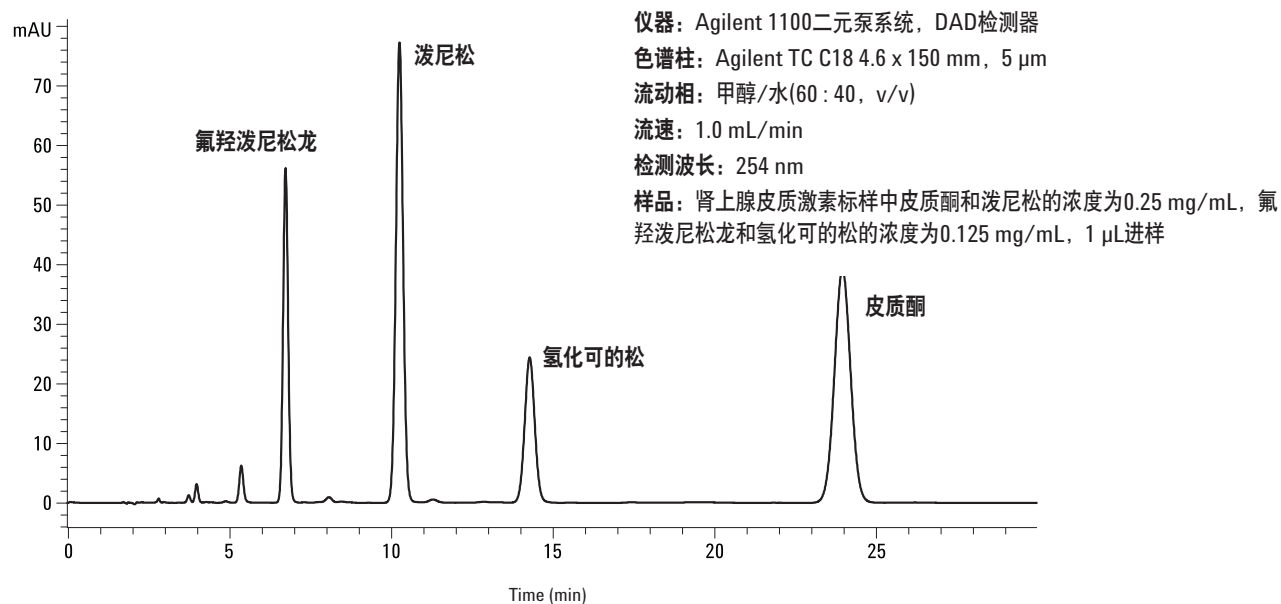


图2. 肾上腺皮质激素混合标样的甲醇/水等度分离

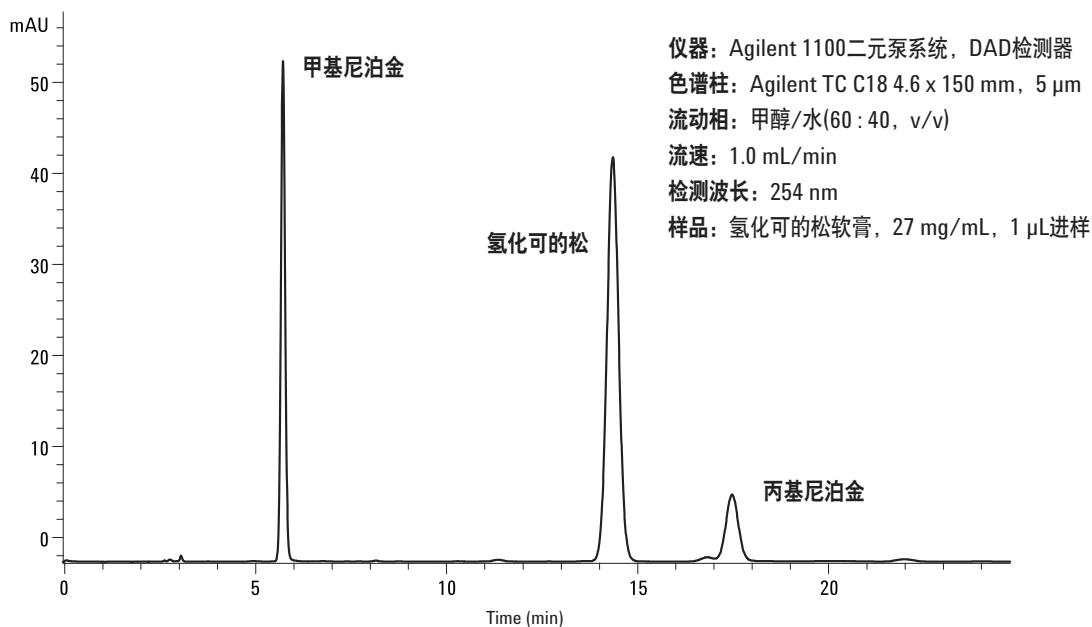


图3. 反相色谱水/甲醇等度分离1%氢化可的松软膏

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。

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。

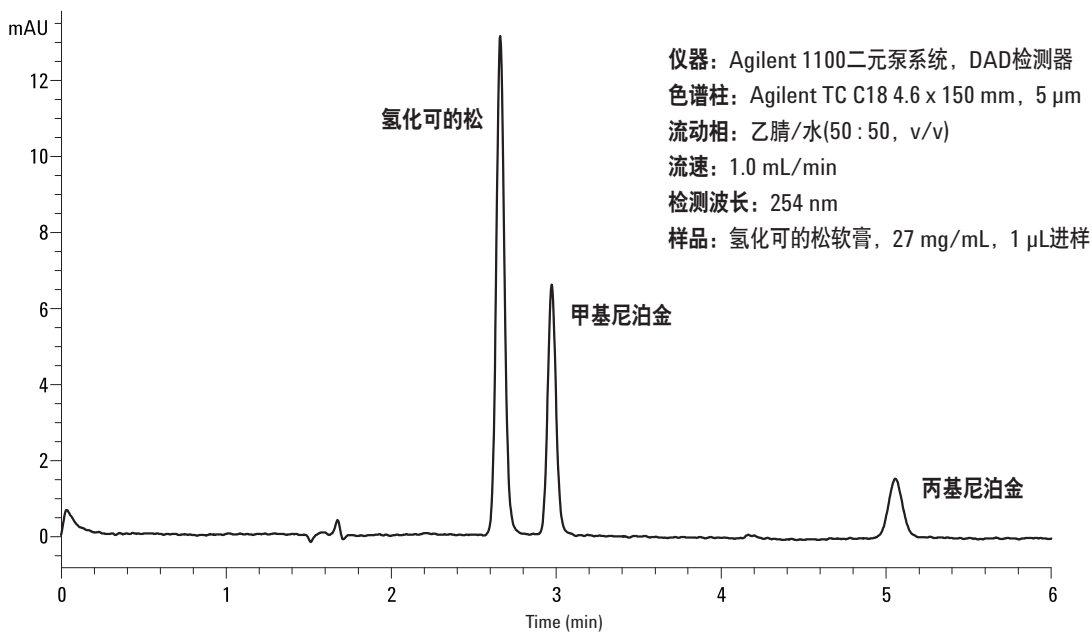


图4. 反相色谱水/乙腈等度分离1%氢化可的松软膏

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。

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。

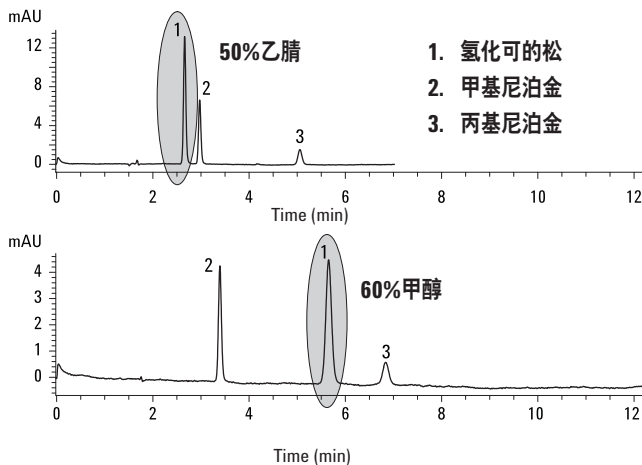


图5. 等效洗脱强度流动相选择性对比

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.

如需了解更多信息

如需了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明，如有更改，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2005

中国印刷
2005年10月11日
5989-4095CHCN