

二丙酸倍他米松有关物质的 HPLC 法测定

唐玲玲^{1,2}, 葛纪龙², 陶永新^{1*}

(1.常州大学石油化工学院,江苏常州 213164; 2.常州四药制药有限公司,江苏常州 213018)

摘要:建立了高效液相色谱法测定二丙酸倍他米松(1)中的有关物质,即倍他米松(2)、倍他米松 17-丙酸酯(3)、二丙酸倍氯米松(4)、6 α -溴倍他米松二丙酸酯(5)。色谱柱选用 COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 以 0.04% 三氟乙酸-H₂O 为流动相 A, 0.02% 三氟乙酸-乙腈为流动相 B, 梯度洗脱; 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温 40 $^{\circ}$ C。结果显示, 1 和杂质 2~5 均分离良好, 且在各自浓度范围内线性关系良好; 2~5 的平均回收率 ($n=9$) 为 99.8%~104.2%, RSD 为 4.0%~6.1%。1, 2, 4 的检测限为 0.1 μ g/mL, 3 和 5 的检测限为 0.2 μ g/mL。建立的方法准确性好、灵敏度高, 各组分分离较好, 可用于 1 中有关物质的测定。

关键词:二丙酸倍他米松; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: O657.7+2; R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2024)07-0249-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2024.07.045

Determination of related substances in betamethasone dipropionate by HPLC

TANG Ling-ling^{1,2}, GE Ji-long², TAO Yong-xin^{1*}

(1.School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;

2.Changzhou Siyao Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhou 213018, China)

Abstract: An HPLC method is established for the determination of the related substances such as betamethasone, betamethasone-17-propionate, beclomethasone dipropionate and 6- α -bromo-betamethasone dipropionate in betamethasone dipropionate. COSMOSIL 5C18-MS-II column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m) is used in the gradient elution mode, with 0.04% trifluoroacetic acid-H₂O as mobile phase A and 0.02% trifluoroacetic acid-acetonitrile as mobile phase B. The flow rate is 0.8 mL \cdot min⁻¹, the wavelength used for detection is 254 nm, and the column temperature is maintained at 40 $^{\circ}$ C. It is shown by the result that betamethasone dipropionate is separated well with the related four substances, and the peaks of the related substances show linear in their corresponding concentration ranges. The average recoveries ($n=9$) of betamethasone, betamethasone-17-propionate, beclomethasone dipropionate and 6- α -bromo-betamethasone dipropionate are in the range of 99.8% - 104.2%, with RSDs of 4.0% - 6.1%. The detection limits are 0.1 μ g \cdot mL⁻¹ for betamethasone dipropionate, betamethasone and beclomethasone dipropionate, and 0.2 μ g \cdot mL⁻¹ for betamethasone-17-propionate and 6- α -bromo-betamethasone dipropionate. The established method has good accuracy and high sensitivity as well as good separation effect for each component, which can be used for the determination of the related substances in betamethasone dipropionate.

Key words: betamethasone dipropionate; related substance; HPLC

倍他米松二丙酸酯(betamethasone dipropionate, 1)也被称为二丙酸倍他米松,是一种人体的糖皮质激素,具有强大的抗炎^[1-2]、抗风湿和抗过敏作用,抗炎效果是氢化可的松的 16 倍,是治疗慢性阻塞性肺疾病的一线药物^[3]。对于治疗消化系统炎症、皮肤黏膜炎症或者泌尿系统炎症都有很好的效果,还可以起到抑制身体长高的作用^[4-5]。临床上主要用于治疗慢性支气管炎哮喘、骨关节炎、类风湿性关节炎等慢性和急性疾病^[6-7]。

目前,倍他米松的相关原料药的有关物质分析得到了广泛的关注^[8],而 1 的有关物质分析方法少有报道,已有的分析方法主要有胶束电动色谱法^[9]、高效液相色谱法^[10]、紫外分光光度法^[11]等。高效液相色谱法因方法本身具有检测限低、灵敏度

高等优点,成为药物分析的主流^[12]。现有的液相色谱方法分析时间长,对仪器和色谱柱的要求较高^[13],分离度低,在研发过程应用中存在不足,不能满足需要及时掌握各个参数的要求。欧洲药典 EP10.0^[14]采用内径 2 mm、粒径 2.5 μ m 的封端 C18 柱,价格高,并非常用柱,且对色谱仪器要求较高,需要使用超高效液相色谱,价格昂贵,不适合在研发过程作为预实验使用,且中国药典至今仍未有收录,因此,开发出一种快速有效的分析方法显得极为重要。

本文中开发了一种快速有效的梯度洗脱方法,采用实验室常用的 C18 色谱柱可在 15 min 内有效地分离出 1 以及 EP 杂质倍他米松(2)、倍他米松 17-丙酸酯(3)、二丙酸倍氯米松(4)和 6 α -溴倍他米松二丙酸酯(5),分离度好,定量限低,可同时定

收稿日期:2023-10-12;修回日期:2024-05-14

作者简介:唐玲玲(1989-),女,硕士,工程师,研究方向为药物分析,tl_tang@126.com;陶永新(1971-),男,博士,教授,研究方向为药物分析,通讯联系人,taoyx@cczu.edu.cn。

量 1 和这 4 种杂质, 以期为 1 原料药中有关物质的控制提供参考。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); XP56 分析天平(梅特勒托利多); FED115 热风循环干燥箱(德国宾德集团)。

1(常州四药制药有限公司, 含量 99.7%, 批号 20230210); 杂质 2 对照品(QCS 标准物质研发中心, 含量 99.89%, 批号 32826); 杂质 3 对照品(QCS 标准物质研发中心, 含量 99.58%, 批号 22739); 杂质 4 对照品(QCS 标准物质研发中心, 含量 99.65%, 批号 26942); 杂质 5 对照品(QCS 标准物质研发中心, 含量 98.56%, 批号 26997); 乙腈、甲醇和三氟乙酸(TFA)均为 HPLC 级, 其余试剂是 AR 级, 水是纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选用 COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.04% TFA-H₂O, 流动相 B 为 0.02% TFA-乙腈; 梯度洗脱(0~3 min, A 80%~50%; 3~6 min, A 50%~5%; 6~9 min, A 5%; 9~12 min, A 5%~80%; 12~15 min, A 80%); 柱温 40℃; 检测波长 254 nm; 进样量 2 μL; 流速 0.8 mL/min。

2.2 溶液配制

2~5 对照品贮备液: 精密称取 2~5 对照品各 10 mg, 分别放入 4 个 100 mL 量瓶中, 用空白溶液(乙腈: 甲醇=1:1, 体积比)溶解并定容, 摇匀, 即得(2~5 均为 100 μg/mL)。

1 对照品溶液: 精密称取 1 对照品(批号 20230210) 10 mg, 于 100 mL 的量瓶中, 使用空白溶液溶解并定容, 摇匀后即得。

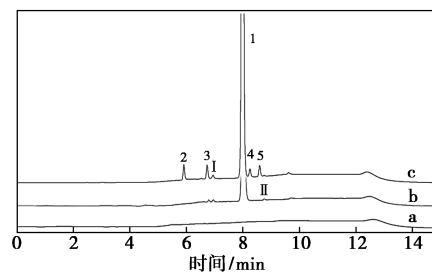
供试品溶液: 精密称取 1 原料药(批号 20230313) 50 mg, 于 50 mL 量瓶中, 使用空白溶液溶解并定容, 摇匀后即得(1 mg/mL)。

0.1% 自身对照溶液: 精密移取供试品溶液 0.1 mL, 于 100 mL 量瓶中, 空白溶液定容后摇匀即得。

2.3 系统适用性试验

精密取 100 mg 1 原料药(批号 20230313) 于 100 mL 量瓶中, 加入 2~5 对照品贮备液各 1 mL, 用

空白溶液溶解并定容, 摇匀后作为系统适用性溶液。按上述色谱条件依次进空白溶液、供试品溶液和上述系统适用性溶液, 并记录相应色谱图(图 1)。结果显示空白溶液对 1~5 各色谱峰均无干扰, 杂质 2~5 相对 1 保留时间(RRT)分别为 0.76、0.86、1.06、1.10, 系统适用性溶液中各组分色谱峰间分离度均>1.5。且供试品溶液中各色谱峰均能很好地分开。

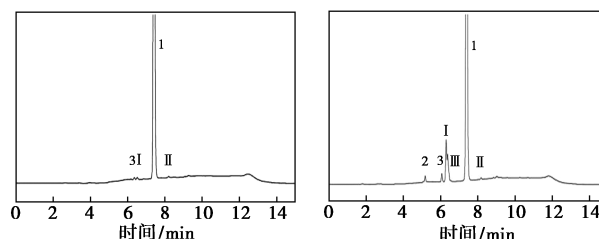


a—空白溶液; b—供试品溶液; c—系统适用性溶液

图 1 典型 HPLC 图谱

2.4 破坏性试验

称取 10 mg 1 原料药(批号 20230313), 共 6 份, 进行以下试验。①未破坏溶液: 量入乙腈 4 mL 溶解后用水定容至 10 mL, 摇匀后即得。②酸破坏溶液: 量入乙腈 4 mL 溶解后量入 0.5 mol/L HCl 2 mL, 于室温下 8 h, 加 0.5 mol/L NaOH 溶液 2 mL 中和, 再加水定容至 10 mL, 摇匀即得。③碱破坏溶液: 量入乙腈 4 mL 溶解后量入 0.2 mol/L NaOH 溶液 2 mL, 摇匀后, 加 2 mL 0.2 mol/L HCl 中和, 再用水定容至 10 mL, 摇匀后即得。④光破坏溶液: 加乙腈 4 mL 溶解后用水定容至 10 mL, 摇匀并密封, 在光照强度为 4 500±500 lx 的光照箱中放置 24 h 后取出, 即得。⑤高温破坏溶液: 量入乙腈 4 mL 溶解后加水 2 mL, 放置在 60℃烘箱中加热 14 d, 取出后加水定容至 10 mL, 摇匀后即得。⑥氧化破坏溶液: 量入乙腈 4 mL 溶解后加 30% H₂O₂ 溶液 2 mL, 于室温下放置 15 d, 用水定容至 10 mL, 摇匀后即得。按上述色谱条件对上述破坏溶液进行测定, 每个样品各进 1 针。结果见图 2。



(a) 未破坏

(b) 酸破坏

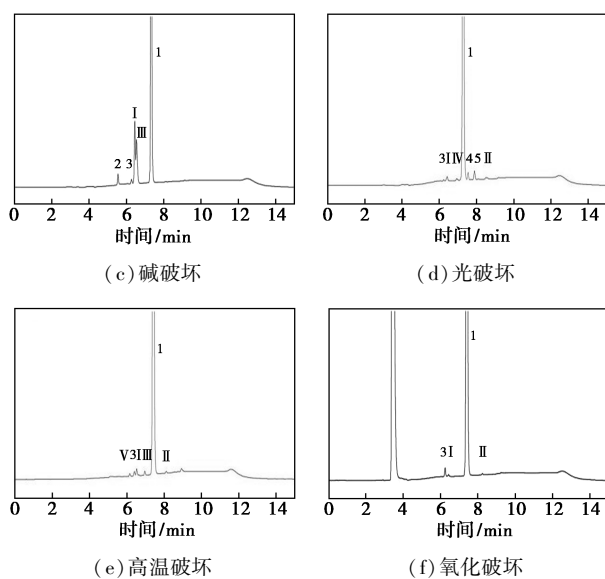


图2 破坏性试验色谱图

结果显示,1在氧化与高温条件下较为稳定;而在强酸、强碱破坏及光照条件下显著降解。经二极管矩阵监测器(PAD)吸收波长扫描,最大吸收峰大多在254 nm附近。酸性条件下产生杂质2、杂质3,和原有的未知杂质I、II以及未知降解杂质III;碱性条件产生杂质2和原有未知I以及未知降解杂质III;光照条件下产生已知杂质3和5、原有未知杂质I和未知降解杂质IV。在上述强酸、强碱、氧化、光照以及高温破坏产物与1均能较好地分离,经二极管矩阵监测器(PAD)扫描对1主峰进行峰纯度检查,结果显示1是纯的,表明在本色谱条件下,1与其他杂质分离彻底。依据峰面积可知,1与2~5各杂质总含量物料平衡。

2.5 线性试验

精密移取1~5溶液各1 mL置同一20 mL量瓶中,加空白溶液定容,摇匀后制成质量浓度均为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合线性贮备液,再分别配制成质量浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列线性试验溶液。

按上述色谱条件,分别进上述系列线性试验溶液,分别以质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,做线性回归,分别以杂质2~5的拟合方程斜率与1拟合方程斜率的比值为杂质2~5的相对校正因子。结果如表1所示,杂质2~5的校正因子为0.84~1.50。

2.6 定量限和检测限

精密移取2.5项下的5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合线性贮备液,用空白溶液稀释定容成系列浓度溶液,按上述色

表1 线性试验结果

化合物	线性方程	相关系数 r	校正因子
1	$y=2.8605x+1.8898$	0.9999	1.00
2	$y=4.2797x+0.00685$	1.0000	1.50
3	$y=3.7261x-0.5280$	0.9999	1.30
4	$y=2.3909x-0.2085$	0.9998	0.84
5	$y=3.2881x+0.0626$	0.9999	1.15

谱条件进行进样测定,分别按信噪比(S/N) ≥ 10 计算定量限和(S/N) ≥ 3 计算检测限。结果显示1、2、3、4、5的定量限为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;1、2、4的检测限为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,3和5的检测限为0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验结果表明该分析方法有较好的灵敏度。

2.7 回收率试验

精密称取1原料药(批号20230210)100 mg置100 mL量瓶中,共计9份,分别加入2~5对照品贮备液适量配制成低、中、高水平(添加质量浓度分别为1、3、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(按2.2项下操作),每个水平各3份,按上述色谱条件进行进样测定,计算平均回收率。结果显示,2~5的回收率 RSD 分别为4.0%、6.1%、5.0%、4.1%,平均回收率($n=9$)分别为99.8%、102.7%、103.2%、104.2%。

2.8 精密度试验

精密移取2.3项下系统适用性溶液,在上述色谱条件下连续进样6次,计算2~5对应的峰面积 RSD 值。实验表明该方法具有较好的精密度,2~5的 RSD ($n=6$)分别为2.5%、1.7%、2.6%、3.0%。

2.9 重复性试验

按上述供试品溶液的制备方法配置供试品6份,在上述色谱条件下测其峰面积,各峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $<3\%$,表明重复性符合要求。

2.10 稳定性试验

室温下,新鲜配制的系统适用性溶液和样品溶液,分别于0、2、4、6、8、12、24 h进样,记录色谱图,有关物质2~5峰面积 A 的 RSD 分别为1.5%、1.3%、1.0%、1.6%,表明供试品溶液室温下至少可稳定放置24 h。

2.11 耐用性试验

在上述色谱条件下考察2.3项下系统适用性溶液。考察检测波长(254 \pm 2 nm)、柱温(40 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$)、流速(0.8 \pm 0.2 mL/min)、色谱柱[COSMOSIL 5C18-

MS- II (4.6 mm×150 mm)、Kromasil 100-5-C18 4.6×250 mm]对 1 与其他杂质分离效果的影响。结果表明,该方法在色谱条件规定的变动范围内测定,1 和其他各杂质峰之间的分离度仍满足大于 1.5 的要求,表明此方法耐用性好,方法稳定可靠。

2.12 样品有关物质测定

取 3 批 1 原料药(批号分别为 20230211、20230212、20230213),采用上述色谱条件对 2.2 项下方法制备供试品溶液和自身对照液进行测定,外标法计算待测物质含量。结果见表 2,除列出杂质外,其余均未检出。

表 2 有关物质测定结果 %

批号	1	3	I	II	总杂质
20230211	99.73	0.18	0.03	0.06	0.27
20230212	99.71	0.19	0.04	0.06	0.29
20230213	99.72	0.16	0.05	0.07	0.28

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择

取 1 对照品(批号 20230210)及有关物质 2、3、4、5 各适量,分别加乙腈-甲醇(体积比 1:1)溶解并定容到相应刻度,制得 10 μg/mL 的溶液,在 190~400 nm 范围进行全波长扫描,因 1 和有关物质 2、3、4、5 的较大吸收均在 254 nm 附近,故选用该波长。

3.2 色谱条件优化

考察了 EP 的色谱条件下 1 与各已知杂质的分离度及分离时间,结果显示 EP 的分析时间较长,且对色谱柱与仪器的要求较高。因此,开发了梯度洗脱方法,并对实验室常用色谱柱进行了筛选。分别选取了 Agilent Eclipse Plus C8 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)和 COSMOSIL 5C18-MS-II(4.6 mm×150 mm,5 μm)。经对比,最终采用峰形、柱效与分离度均较好的 COSMOSIL 5C18-MS-II(4.6 mm×150 mm,5 μm);优化流动相体系方面,在 EP 的流动相体系上增加了梯度考察,并分别在 A 相中添加 0.04% TFA 和 B 相中添加 0.02% 的 TFA,最终采用上述色谱条件。通过实验表明,该色谱条件不仅有不错的峰形,且各峰之间完全分离,可以满足 1 有关物质的检测要求。

参考文献

- [1] Rhen T, Cidlowski J A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 353(16):1711-1723.
- [2] Coutinho A E, Chapman K E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights [J]. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 2011, 335(1):2-13.
- [3] Kovacs L, Davis G M, Faucher D, et al. Efficacy of sequential early systemic and inhaled corticosteroid therapy in the prevention of chronic lung disease of prematurity [J]. *Acta Paediatrica*, 1998, 87(7):792-798.
- [4] Cucuzza L S, Pregel P, Biolatti B, et al. FKBP5 gene expression in skeletal muscle as a potential biomarker for illegal glucocorticoid treatment in veal calves [J]. *Research In Veterinary Science*, 2020, 133:157-162.
- [5] Eisenberg S W F, Cacciatore G, Klarenbeek S, et al. Influence of 17β-oestradiol, nortestosterone and dexamethasone on the adaptive immune response in veal calves [J]. *Research In Veterinary Science*, 2008, 84(2):199-205.
- [6] 钱斌, 杨龙, 李雪松, 等. 注射用多索茶碱与倍他米松磷酸钠的配伍稳定性考察 [J]. *中国药师*, 2010, 13(1):150-151.
- [7] Huang C, Liu J, Xia C. Melatonin combined with compound beta-methasone for articular cartilage lesions in rats with knee osteoarthritis [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2010, 14(46):8737.
- [8] 狄会峰, 高莹, 吴海燕, 等. 醋酸倍他米松有关物质的 HPLC 法测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2018, 49(2):219-223.
- [9] Lin M, Wu N. Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone Dipropionate, Clotrimazole and their related substances [J]. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 1999, 19(6):945-954.
- [10] Bhosale S D, Rajput S J. RP-HPLC method for simultaneous determination of butenafine hydrochloride and betamethasone dipropionate in a cream formulation [J]. *Journal of Aoac International*, 2011, 94(1):106-109.
- [11] Sakur A A, Zakri D A L. A new selective colorimetric method coupled with a high-resolution UV method for the consecutive quantification of three drugs in semi-solid preparations [J]. *Heliyon*, 2022, 8(10):e11003.
- [12] 于彩霞, 杨丽娜, 夏林涛, 等. HPLC 法测定盐酸妥洛特罗中的有关物质 [J]. *中国医药工业志*, 2022, 53(8):1186-1191, 1226.
- [13] Bjerring P. Comparison of the bioactivity of mometasone furoate 0.1% fatty cream, betamethasone dipropionate 0.05% cream and betamethasone valerate 0.1% cream in humans [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 1993, 6(3):187-192.
- [14] European Pharmacopoeia [EP]. Version 10.0:1968-1970. ■