

使用高效液相層析法對 Lidocaine Hydrochloride, Methyl Salicylate, Chlorpheniramine Maleate 諸成分分離定量法之探討

謝彭生 黃明權 陳玉盆

一、前言

Lidocaine Hydrochloride, Methyl Salicylate, Chlorpheniramine Maleate 等成分常見於止癢、修面後皮膚保養、刀傷、火傷等皮膚外用軟膏或霜劑，此等成分各別之含量測定法在各國藥典或有關文獻中均有收載，但欲測定其混合製劑中各成分之含量目前尚乏迅速之方法可循。本實驗係利用高效液相層析法探討此等成分之分離分析方法，以期獲得迅速可靠之含量測定法，應用於含此等成分之製劑，同時利用本實驗探討若干高效液相層析法之基本概念。

二、實驗器材

(一)儀器：

- 1 HPLC 系統：包括二部溶媒輸送系統 (Waters, Model 6000 A)，一部溶媒程式設定器 (Waters, Model 660)，逆相層析管 (Waters, 3.9 mm ID $\times$ 30 cm μ -Bondapak C₁₈)，UV 檢測器 (Waters, model 450) 及 Omniscribe recorder。
- 2 Milli-Q water purification system (Millipore Corp.)。
- 3 Solvent purification kit。
- 4 Ultrasonic bath。
- 5 Analytical balance。
- 6 Microsyringe (25 μ l)。
- 7 pH62 standard pH meter (Radiometer)。

(二)原料藥品及試藥：

- 1 Lidocaine HCl: pharmaceutical grade
- 2 Methyl Salicylate: pharmaceutical grade
- 3 Chlorpheniramine Maleate: pharmaceutical grade
- 4 Phenobarbital: pharmaceutical grade
- 5 Phosphoric Acid: reagent grade, E. Merck
- 6 Methanol: reagent grade, E. Merck
- 7 Ammonium Phosphate, Dibasic: reagent grade, E. Merck
- 8 Reagent grade water (MilliQ)

三、實驗步驟

(一)檢品溶液之配製：

- 1 Lidocaine HCl 檢液：檢品以 methanol 溶解稀釋至 0.6 mg/ml 之濃度。
- 2 Methyl Salicylate 檢液：檢品以 methanol 溶液稀釋至 0.2 mg/ml 之濃度。
- 3 Chlorpheniramine Maleate 檢液：檢品以 methanol 溶解稀釋至 0.2 mg/ml 之濃度。

4. Phenobarbital 檢液：檢品以 methanol 溶解稀釋至 0.2 mg/ml 之濃度。

- 5 Lidocaine HCl, Methyl Salicylate, Chlorpheniramine Maleate 混合檢液：稱取上述三成分之原料各適量，以 methanol 溶解稀釋至含 Lidocaine HCl 0.6 mg/ml, Methyl Salicylate 0.2 mg/ml 及 Chlorpheniramine maleate 0.2 mg/ml 之濃度。
- 6 另配製一組上述 1 2 3 5 之檢液使各含 0.2 mg/ml 濃度之 Phenobarbital 作為內部標準 (internal standard)。

(二)磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate Buffer) 及移動相 (mobile phase) 之配製：

1 磷酸鹽緩衝溶液之配製：

稱取適量之 ammonium phosphate, dibasic 以試藥級水 (reagent grade water) 溶解稀釋至 0.01 M, 0.25 M, 0.05 M, 0.75 M 及 0.1 M 五種濃度，每種濃度之溶液再分別以磷酸 (phosphoric acid) 調整其 pH，使成 pH 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 及 2.2 等五種磷酸鹽緩衝溶液，共得 25 種經調整 pH 值之磷酸鹽緩衝溶液。每種緩衝溶液分別以 0.45 μ m 之水性溶液濾清器過濾後，置於冰箱內備用。

2 移動相之配製：

臨用時取 1 項配製之磷酸鹽緩衝溶液及 methanol 以 55:45 之比例混合，在超音波浴 (ultrasonic bath) 中振盪 10 分鐘驅除氣體 (degas) 後使用之。

(三)實驗分析之條件：

- 1 Column: μ -Bondapak C₁₈ (室溫)
- 2 Flow rate: 1.5 ml/min.
- 3 Detector: UV 254 nm, 0.2 AUFS
- 4 Mobile phase: Phosphate buffer, Methanol (55:45 V/V)
- 5 Chart speed: 0.25 cm/min.
- 6 Inj. volume: 20 μ l

四、結果及討論

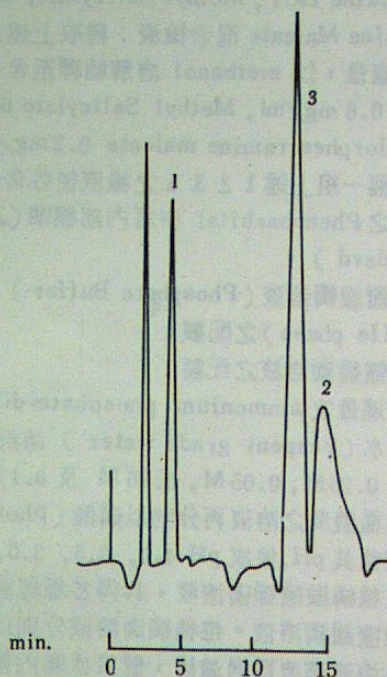
1 實驗分析之條件 (見三) 不變，而以不同緩衝溶液濃度及 pH 值之 25 個移動相分析所得結果，可知 pH 4.0 之五種不同濃度緩衝溶液均不能得到良好之分離效果；pH 3.5 者結果亦同；pH 3.0 者僅濃度為 0.75 M 及 0.1 M 之緩衝溶液獲分離之效果；pH 2.5 者除濃度為 0.01 M 者外，分離效果均佳；而 pH 2.2 者，五種濃度之緩衝溶液所獲分離情況均良好。

2 由本實驗之最初層析條件 (緩衝溶液濃度 0.01 M, pH 4.0) 所得層析圖 (圖一) 可知最主要待決

之問題為 Chlorpheniramine Maleate 成分 tailing 情況之如何改善。

圖(一)

1. Lidocaine Hydrochloride
2. Chlorpheniramine Maleate
3. Methyl Salicylate
Column: μ -Bondapak C₁₈
Mobile Phase: 0.01M(NH₄)₂HPO₄ pH 4.0: Methanol
55:45(V/V)
Detector: UV 254nm 0.1AUFS
Flow Rate: 1.5ml/min.



3. 本實驗所設計 25 種分離條件對 Chlorpheniramine Maleate 成分 K' 值 (capacity value) 之影響臚列如表(一), 縱向自上而下為緩衝溶液 pH 由 4.0 至 2.2 之五種狀況, 橫向由左向右為緩衝溶液濃度由 0.01 M 至 0.1 M 之五種狀況, 由此表可見縱向之 K' 值變化較大, 而橫向之變化較小。顯示 pH 值之變化對此一 tailing peak 之改善情形及對其滯留時間之影響較緩衝溶液濃度變化所產生之影響更為敏銳。經實驗證實, 此三成分之分離, 若不改變緩衝溶液之 pH 值而僅提高其濃度, 雖 peak tailing 之情形獲得改善, 仍不能獲致良好之分離結果。

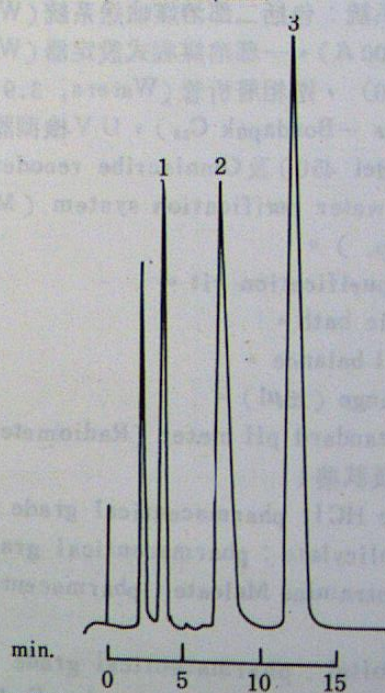
BUFFER 濃度	0.01 M		0.025 M		0.05 M		0.075 M		0.1 M	
	Sample	K'	Sample	K'	Sample	K'	Sample	K'	Sample	K'
4.0	A	5.07	F	4.67	K	4.33	F	4.25	U	4.33
3.5	B	4.25	G	4.08	L	3.66	Q	3.50	V	3.59
3.0	C	3.41	H	3.83	M	2.83	R	2.75	W	2.75
2.5	D	2.25	I	2.42	N	1.92	S	1.83	X	1.75
2.2	E	1.83	J	1.92	O	1.42	T	1.33	Y	1.16

4. 就本實驗結果所得數種良好分離條件中, 最佳之選擇應為磷酸鹽濃度 0.05 M, pH 2.5 之緩衝溶液, 如圖(二)。如再提高磷酸鹽之濃度或降低 pH 值, 亦均能獲得良好之分離效果; 但必須考慮: μ -Bondapak C₁₈ 層析管適用之 pH 範圍為 2-8, 緩衝

溶液之 pH 值過低對層析管可能造成不良影響, 如破壞其填充物上 alkyl group 連結鍵及腐蝕其不銹鋼部分⁽¹⁾等; 又, 緩衝溶液之作用在改變分離成分中化學官能基之特性, 降低分離成分間分子靜電斥力⁽⁴⁾, 同時根據「Residual Silanol Interaction」之概念⁽¹⁾, 緩衝鹽類可覆蓋層析管填充物質之殘留矽烷基 (residual silanol group), 使其極性更低, 因此磷酸鹽濃度達到某一限度後, 作用效果已達頂點, 繼續增濃對分離效果助益無多, 而通常較高濃度之緩衝溶液用後之清洗亦較費時, 偶未能將整個系統清洗完全, 即可能引致管道阻塞, 壓力突然上升等情形, 對注射器 (Injector) 泵 (Pump) 及層析管均有不良影響⁽³⁾。

圖(二)

1. Lidocaine Hydrochloride
2. Chlorpheniramine Maleate
3. Methyl Salicylate
Column: μ -Bondapak C₁₈
Mobile Phase: 0.05M(NH₄)₂HPO₄ pH 2.5: Methanol
55:45(V/V)
Detector: UV 254nm 0.1AUFS
Flow Rate: 1.5ml/min.



5. 關於 Chlorpheniramine 成分之分析, 有以乙腈 (acetonitrile) 及磷酸鹽緩衝溶液之混合液為移動相⁽²⁾, 獲致良好分離效果者。因甲醇 (methanol) 具有(一)售價較低廉(二)毒性較低(三)對含無機鹽之緩衝溶液溶解度較佳等優點, 故本實驗採用甲醇 (methanol) 作移動相中之有機溶媒。

6. 由分析圖三及圖四, 可見 pH 值及磷酸鹽緩衝溶液濃度之改變均可引起 Chlorpheniramine Maleate 溶提次序 (elution order) 之改變。設若於最初層析條件下, Lidocaine HCl 及 Methyl Salicylate 亦均有 tailing 現象, 則溶提次序可能另有變化, 故此種由 pH 值高低及緩衝溶液濃度變化所引起之溶提次序變化現象, 應為相對性而非絕對性者。

圖(三)

Concentration of Buffer Solution: 0.01M(NH₄)₂HPO₄
 pH strength: (A) 4.0

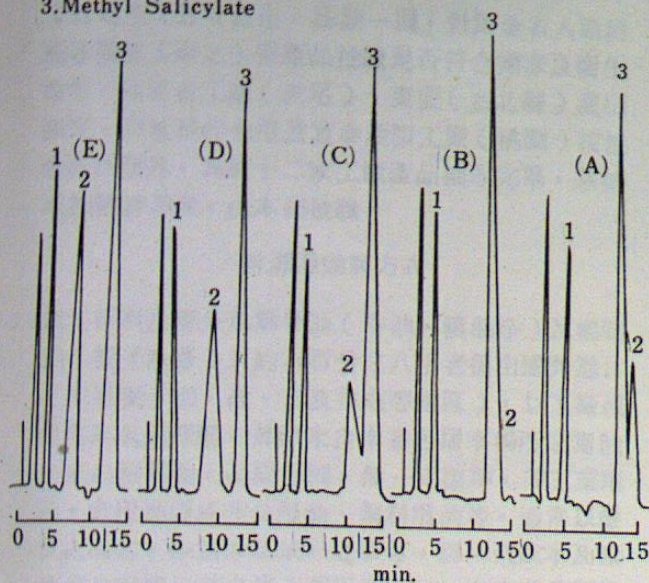
(B) 3.5

(C) 3.0

(D) 2.5

(E) 2.2

1. Lidocaine Hydrochloride
 2. Chlorpheniramine Maleate
 3. Methyl Salicylate



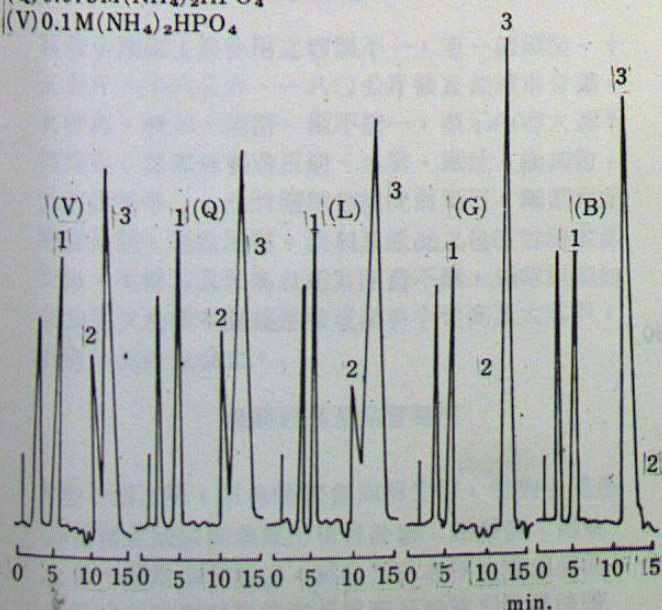
圖(四)

pH strength: 3.5

Concentration of Buffer Solution

(B) 0.01M(NH₄)₂HPO₄(G) 0.025M(NH₄)₂HPO₄(L) 0.55M(NH₄)₂HPO₄(Q) 0.075M(NH₄)₂HPO₄(V) 0.1M(NH₄)₂HPO₄

1. Lidocaine Hydrochloride
 2. Chlorpheniramine Maleate
 3. Methyl Salicylate



7. Lidocaine HCl 成分之分析，有以 pH 7.9⁽⁷⁾，4.8⁽⁸⁾，及 4.45⁽⁹⁾ 之磷酸鹽為緩衝溶液均獲致良好分離效果之報導，而本實驗之最初層析條件為 pH 4.0 之磷酸緩衝溶液，故可預期獲致 Lidocaine HCl 之良好層析圖。

8. HPLC 在分配層析法中，若分離成分具強極性或離子化之性質時，可能有 peak tailing, peak leading 現象，甚或出現不易判定之 peak。此狀況多不能僅賴調整移動相之混合比例即獲改善，而必須調整其 pH。此即所謂 Ion Suppression⁽¹⁾、⁽⁶⁾ 之技巧，亦即共同離子效應 (common ion effect) 之作用。例如：在 $HX \rightleftharpoons H^+ + X^-$ 之情形下，降低 pH 值使平衡向左，即可改善 tailing 現象，此時改變移動相之 pH 值或緩衝溶液濃度，甚至改變移動相溶媒之種類，以提高分離成分對移動相之親和力，多可獲致良好分離效果。

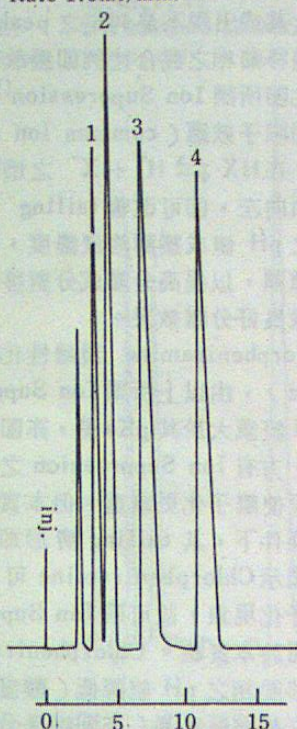
9. 本實驗中 Chlorpheniramine 為鹼性化合物 (basic compound)，由以上所謂 Ion Suppression 之概念而言，pH 值須大於其 pKa 值，亦即移動相必須傾向於鹼性，方有 Ion Suppression 之效果，降低 pH 值可能反使離子化更嚴重。但本實驗五種不同酸性 pH 值條件下，其 tailing 情形却獲改善而未更趨嚴重，顯示 Chlorpheniramine 可能在實驗過程中並無離子化現象，故可謂 Ion Suppression 之概念並不適用於本實驗。Chlorpheniramine 為鹼性化合物，移動相之 pH 值降低 (酸度提高)，使其對移動相之溶解度提高 (亦即提高分離成分對移動相之親和力)，因而改善 tailing 情形，以此解釋本實驗中 Chlorpheniramine 成分 tailing 改善之作用機序，似較適宜，據此觀點似亦可預期：若 pH 值繼續降低 (如層析管及其填充物質能適用於強酸性)，則 Chlorpheniramine 之 K' 將繼續降低，溶提次序亦可能改變。最後由於 Chlorpheniramine 對移動相之溶解度過高 (亦即親和力過大)，以致在固定相全無或僅具極微小之滯留能力。

10. 自表 (一) 之數據以觀，緩衝溶液濃度之變化，對 K 值變化影響頗不明顯，顯示緩衝溶液濃度之改變，對分離成分在移動相中之溶解度並無顯著影響。

11. 於本實驗所獲得最佳分析條件，亦即選用磷酸鹽濃度 0.05 M，pH 2.5 緩衝溶液為移動相水層之條件下加入內部標準品 (internal standard) phenobarbital 時，其 peak 不會與 Lidocaine HCl, Methyl Salicylate 及 Chlorpheniramine Maleate 等諸目的成分重疊。如圖五。

圖(五)

1. Lidocaine Hydrochloride
 2. Phenobarbital
 3. Chlorpheniramine Maleate
 4. Methyl Salicylate
 Column μ -Bondapak C₁₈
 Mobile Phase 0.05M(NH₄)₂HPO₄ PH 2.5: Methanol
 55:45(V/V)
 Detector: UV 254nm 0.1 AUFS
 Flow Rate 1.5ml/min.



12. 本實驗能於15分鐘內分離 Lidocaine HCl, Methyl Salicylate, Chlorpheniramine Maleate 及 Phenobarbital (internal standard) 等四種成分, 且效果良好。堪稱簡易、迅捷。今後將以本實驗為基礎, 就應用於含此等成分外用製劑之分析續予探討。

參考文獻

1. Brian A. Bidlingmeyer: J. Chromatogr. Sci. 18 525 (1980)
2. Narayan K. Athanikar, Geoffrey W. Peng, Roger L. Nation, Shiew Mei Huang and Win L. Chiou: J. Chromatogr. 162 (1979) 367.
3. Fredic M. Robel: J. Chromatogr. Sci. 18 394 (1980)
4. Csaba Horvath and Wayne Melander: J. Chromatogr. Sci. 15 393 (1977)
5. G.B. Cox: J. Chromatogr. Sci. 15 334 (1977)
6. Ronald E. Majors: J. Chromatogr. Sci. 15 334 (1977)
7. C.P. Leung: J. Chromatogr. 178 (1979) 579
8. Per Helboe and Mogens Thomsen: Inter. J. Pharm. 2 (1979) 317

9. James G. Flood, George N. Bowers and Robert B. Mc Comb: Clin. Chem. 26/2 (1980) 197
10. Merck Index 9th
11. JP. IX
12. NF XI V

本案係奉行政
 八九號函
 2日起至9月
 油等精製工廠
 標準, 除泉州
 關開, 現址移
 無法找到外,
 取樣總計30件

加工原料油概
 油(椰子油等
 (來自美、加
 代理商名義探
 進口原料油
 油、食用油脂
 價之高低, 作
 低港口稅率,
 沒有標明究
 有精煉廠及調
 融, 視純度及
 脫臭及氫化等
 述之硬化油,
 製油廠代製
 飾或市場需要

目前各油脂工
 五公斤、十六
 其容器、標示
 件規定(諸如
 保存期限等)
 錄及批號, 追
 複雜, 有桶裝
 命罐桶及油罐
 污染可能性也

大型油脂工廠
 品也僅依國家
 化價、融點測
 委託食品工業
 其餘工廠既
 行政院衛生署
 美北卡