

HPLC法测定联苯苄唑原料药中的有关物质

韩春晖*,裘一兰,栾 爽#,耿 欣(大连市药品检验所,辽宁 大连 116021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1713-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.43

摘 要 目的:建立测定联苯苄唑原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸(用三乙胺调节pH至7.5)(70:30, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为258 nm,进样量为20 μl,柱温为40 ℃。结果:联苯苄唑、杂质A(联苯苄醇)和杂质B(4-C异构体)的检测质量浓度线性范围均为0.05~0.25 μg/ml(*r*分别为0.999 6、0.999 7、0.999 5);检测限分别为8.2、7.5、8.4 ng/ml,定量限分别为27.1、24.7、27.8 ng/ml;精密度、重复性试验的RSD<1%;杂质B加样回收率为95.13%~101.29%,RSD=1.89%(*n*=9);3批样品中均检出杂质A和杂质B。结论:该方法准确、灵敏度高、重复性好,可用于联苯苄唑原料药中有关物质的测定。
关键词 高效液相色谱法;联苯苄唑原料药;有关物质

Determination of Related Substances of Bifonazole Raw Material by HPLC

HAN Chunhui, QIU Yilan, LUAN Shuang, GENG Xin(Dalian Institute for Drug Control, Liaoning Dalian 116021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in bifonazole raw material. METHOD: HPLC method was performed on the column of Kromasil C₁₈ with mobile phase of methanol-0.02 mol/L phosphoric acid (adjusted pH to 7.5 with triethylamine) (70:30, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 258 nm, volume injection was 20 μl, and the column temperature was 40 ℃. RESULTS: The linear range was 0.05-0.25 μg/ml for bifonazole (*r*=0.999 6), 0.05-0.25 μg/ml for impurity A (bifonol) (*r*=0.999 7) and 0.05-0.25 μg/ml for impurity B (4-C isomer) (*r*=0.999 5); the detection limits were 8.2 ng/ml, 7.5 ng/ml and 8.4 ng/ml, and the quantification limits were 27.1 ng/ml, 24.7 ng/ml and 27.8 ng/ml, respectively; RSDs of precision and reproducibility tests were lower than 1%; recovery of impurity B was 95.13%-101.29% (RSD=1.89%, *n*=9); both impurity A and impurity B were detected in the 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive and reproducible, and can be used for the determination of the related substances in bifonazole raw material.
KEYWORDS HPLC; Bifonazole raw material; Related substances

联苯苄唑(白霉唑, Bifonazole), 是德国拜耳公司研究中心合成的一种不含卤素的咪唑类抗真菌药, 化学名为1-(*p*, *α*-二苯基苄基)咪唑, 其抗菌谱与克霉唑和益康唑类似, 但有很强的皮肤渗透性, 在表皮深层药物浓度可达其对皮肤真菌体外最低抑菌浓度的几倍。该药临床上主要用于急性及慢性皮肤真菌病, 特别是皮肤毛癣菌属、小孢子菌属、絮状表皮癣菌、酵母菌、霉菌、棒状杆菌等所致皮肤浅表感染。联苯苄唑原料药

质量标准在《中国药典》2015年版(二部)、《美国药典》36版、《欧洲药典》8.0版均有收录, 对其有关物质仅限于单独检测合成过程中残留的联苯苄醇, 而没有对所残留的4-C异构体进行定性定量研究, 难以保证药品质量。为此, 本试验采用高效液相色谱(HPLC)法建立了新的联苯苄唑原料药有关物质检测方法, 在中国食品药品检定研究院尚不能批量提供4-C异构体对照品的国情下, 通过标准曲线法计算杂质校正因子, 采用加

[7] 覃华亮, 韦怡, 黄慧良. HPLC法测定石淋能片中夏佛塔苷的含量[J]. 中国药品标准, 2014, 15(6): 417.
[8] 凌庆辉, 马健雄. 高效液相色谱法测定石淋通片中槲皮素的含量[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(11): 74.
[9] 解世全, 杨欣欣, 姜楠, 等. 高效液相色谱法测定复方石淋通片中绿原酸含量[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(3): 17.
[10] 马杰, 童珂, 罗晖明, 等. 高效液相色谱法测定复方石淋通胶囊中夏佛塔苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(7): 539.
[11] 周子力, 肖峰, 杨静, 等. RP-HPLC同时测定广金钱草中的vicenin-1、夏佛塔苷和vicenin-3[J]. 华西药杂志, 2013, 28(6): 609.
[12] 唐海明, 陈建南, 张扬, 等. HPLC法同时测定不同来源溪黄草药材中8个水溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 228.
[13] 蒲晓辉, 赵辉, 袁琦, 等. RP-HPLC法同时测定广金钱草中夏佛塔苷和异夏佛塔苷[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1 909.
[14] 黄劲通. HPLC法测定石淋通颗粒中夏佛塔苷的含量[J]. 中国医药指南, 2012, 10(36): 445.
[15] 张素中, 曾彩芳, 黄月纯, 等. 指纹图谱追踪石淋能片工艺过程中黄酮类成分的转移率[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1): 108.

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药品与食品检验。电话: 0411-84255236
通信作者: 副主任药师, 硕士。研究方向: 药品与化妆品检验。电话: 0411-84255311

(收稿日期: 2015-10-18 修回日期: 2016-02-02)
(编辑: 刘 柳)

校正因子的主成分自身对照法测定4-C异构体的含量,从而提高了其有关物质控制的准确性,有助于更好地对联苯苄唑原料药的质量进行评价。

1 材料

1.1 仪器

HPLC 仪为 2695e/2489, 包含 Empower 工作站(美国 Waters 公司);BP211D、BP221S 十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

联苯苄唑(杂质 A)、联苯苄唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100327-200201、100326-201302,纯度均为100%);4-C 异构体(杂质 B)工作对照品(某企业提供,批号:CHD0395,纯度:99.18%);联苯苄唑原料药(某企业提供,批号:BXN0N4N、BXN0N6F、BXN0N6W);甲醇、磷酸、三乙胺为色谱纯(美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯(天津科密欧化学试剂有限公司),水为本单位质保科提供的纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1-8]

色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.02 mol/L 磷酸(用三乙胺调节 pH 至 7.5)(70:30, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:40 ℃;检测波长:258 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取联苯苄唑原料药适量,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 中约含 0.2 mg 的溶液,即得。

2.2.2 对照溶液 精密量取“2.2.1”项下供试品溶液适量,加甲醇定量稀释制成每 1 ml 中约含 0.2 μg 的溶液,即得。

2.2.3 对照品溶液 精密称取联苯苄唑对照品适量,用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 约含 0.2 μg 的溶液,作为联苯苄唑对照品溶液。精密称取杂质 A 对照品适量,用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 约含 0.2 μg 的溶液,作为杂质 A 对照品溶液。精密称取杂质 B 对照品适量,用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 约含 0.2 μg 的溶液,作为杂质 B 对照品溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 取联苯苄唑、杂质 A 和杂质 B 对照品各适量,精密称定,用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 中分别含 0.2 mg、0.2 μg、0.2 μg 的混合溶液。

2.3 系统适用性考察

取“2.2.4”项下系统适用性溶液、供试品溶液各 20 μl,分别注入 HPLC 仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可见,联苯苄唑的保留时间约为 15 min;杂质 B 与联苯苄唑的分离度为 2.2,杂质 A 与杂质 B 的分离度为 4.6,理论板数按联苯苄唑峰计不低于 5 000^[9]。

2.4 线性关系考察

分别取联苯苄唑、杂质 A 和杂质 B 对照品各适量,均用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 μg/ml 的系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。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,回归方程和线性范围见表 1。

2.5 检测限与定量限

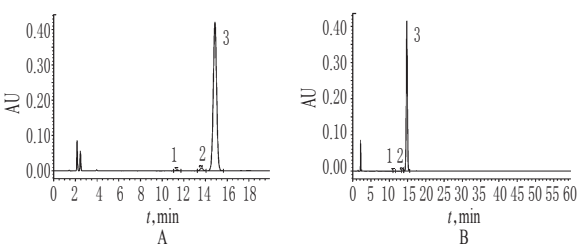


图 1 高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.供试品溶液;1.杂质 A;2.杂质 B;3.联苯苄唑

Fig 1 HPLC chromatograms

A.system suitability solution; B.test sample solution; 1.impurity A; 2.im-purity B; 3.bifonazole

表 1 回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equations and linear range

组分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
联苯苄唑	y=458 740.84x-14.528 162	0.999 6	0.05~0.25
杂质 A	y=271 220.14x-12.547 847	0.999 7	0.05~0.25
杂质 B	y=753 845.36x+10.248 644	0.999 5	0.05~0.25

取“2.4”项下最低质量浓度对照品溶液适量,采用逐步稀释法稀释,当信噪比为 3 时,联苯苄唑、杂质 A 和杂质 B 检测限分别为 8.2、7.5、8.4 ng/ml;当信噪比为 10 时,联苯苄唑、杂质 A 和杂质 B 定量限分别为 27.1、24.7、27.8 ng/ml。

2.6 精密度试验

分别取“2.2.3”项下联苯苄唑、杂质 A、杂质 B(0.2 μg/ml)对照品溶液各适量,分别按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,联苯苄唑、杂质 A、杂质 B 峰面积的 RSD 分别为 0.1%、0.4%、0.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.1”项下供试品溶液(批号:BXN0N6F)适量,平行操作 12 份。其中 6 份于室温下放置 0、4、8、16、24 h 时进样测定^[10],记录峰面积。结果,联苯苄唑、杂质 A、杂质 B 峰面积的 RSD 分别为 0.4%、3.5%、5.9%(n=5)。另外 6 份于 3 000 lx 照度下光照 0、4、8、16、24 h 时进样测定^[11],记录峰面积。结果,联苯苄唑、杂质 A、杂质 B 峰面积的 RSD 分别为 0.3%、4.2%、5.3%(n=5)。说明供试品溶液在室温、光照条件下 24h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:BXN0N6F)适量,平行操作 6 份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,联苯苄唑、杂质 A、杂质 B 峰面积的 RSD 分别 0.2%、0.4%、0.3%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 耐用性考察

采用 6 种不同品牌与型号的色谱柱考察其对有关物质测定结果的影响。结果,选择 Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Waters SymmetryShield RP18(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Tigerkin ODS3(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Supelco Discovery C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Thermo Hypersil GOLD-ODS2(250 mm×4.6 mm,5 μm)6 种不同品牌与型号的色谱柱时均可适用,杂质 B 与联苯苄唑的分离度均>2.0,并且杂质 A 与杂质 B 相对于联

苯苄唑的相对保留时间变化极小,表明该色谱条件适用范围较广。

本试验还比较了不同流动相组成比例、pH、柱温、流速、检测波长等对测定结果的影响。结果显示,在pH 8.7~6.8、柱温35~45 ℃、检测波长256~260 nm、流动相比比例(72:28, *V/V*)~(68:32, *V/V*)、流速0.9~1.1 ml/min 范围内,杂质A与杂质B的相对保留时间稳定,杂质B与联苯苄唑的分离度均符合要求,已知杂质与联苯苄唑在该色谱系统中保留行为较为稳定,受色谱条件的微小变化及环境因素影响较小,色谱系统耐用性良好。

2.10 杂质B加样回收率试验

分别精密称取联苯苄唑原料药样品(批号:BXN0N6F)9份,每份20 mg,置于100 ml量瓶中,精密加入制备的杂质B对照品贮备液(10 μg/ml)1.6、2.0、2.4 ml,加溶剂溶解并定量稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算低、中、高、3种质量浓度的加样回收率,结果见表2。

表2 杂质B加样回收率试验结果(*n*=9)

Tab 2 Results of recovery test of impurity B(<i>n</i> =9)					
样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.214 3	0.161 7	0.357 7	95.13		
0.213 8	0.161 7	0.362 4	96.51		
0.215 4	0.161 7	0.365 5	96.92		
0.217 7	0.202 1	0.412 5	98.26		
0.220 1	0.202 1	0.411 7	97.51	98.10	1.89
0.217 8	0.202 1	0.425 3	101.29		
0.218 9	0.242 6	0.456 9	99.00		
0.216 5	0.242 6	0.451 2	98.28		
0.215 8	0.242 6	0.458 3	99.98		

2.11 样品有关物质测定

量取“2.2”项下供试品溶液、对照溶液、对照品溶液各20 μl,分别注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件记录色谱至主峰保留时间的4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,杂质A按外标法以峰面积计算,不得过0.2%;杂质B的峰面积乘以校正因子0.609(联苯苄唑与杂质B的标准曲线斜率之比),不得大于对照溶液主峰峰面积的1.5倍(0.15%);其他单个未知杂质不得大于对照溶液主峰峰面积(0.1%),杂质总量不得过1.0%。供试品溶液中任何小于对照溶液主峰面积0.1倍的峰可忽略不计。3批样品有关物质测定结果见表3。

表3 样品有关物质测定结果(*n*=3, %)

Tab 3 Results of related substances in samples(<i>n</i> =3, %)				
样品批号	杂质A	杂质B	其他单个未知杂质	杂质总量
BXN0N4N	0.11	0.10	0.07	0.3
BXN0N6F	0.10	0.07	0.06	0.2
BXN0N6W	0.10	0.10	0.04	0.2

3 讨论

笔者曾采用梯度洗脱的方式进行有关物质检查,由于不同的仪器间梯度准确度的差异会导致分离重复性差;不同色谱柱对于梯度的耐受力也不同,同一梯度下不同品牌与型号的色谱柱间杂质A、杂质B和联苯苄唑的保留行为有较大差异,从而导致色谱系统耐用性很差。而等度洗脱的方式重复

性较好,各有关物质间的分离度均>2.0,有关物质的定量准确度也不受影响,因此本试验最终采用等度洗脱的方式。

杂质A(联苯苄醇),在各国药典中均作为已知杂质单独定量计算,目前中国食品药品检定研究院能够提供该对照品,故本试验对其仍采用外标法计算含量。杂质B(4-C异构体)目前该院无法提供其对照品,在充分考虑国内实际检验条件的前提下,采用加校正因子的主成分自身对照法,避免了对照品的持续使用。其他杂质采用不加校正因子的主成分自身对照法。

4-C异构体作为副产物在目前联苯苄唑的合成路线中大约有5%的残留量,后续工艺有对其分离脱除手段,但是考虑其对人体危害性较大,本试验将其列为重点考察的有关物质。3批原料药的检测结果表明,4-C异构体在联苯苄唑原料中是普遍存在的,虽然含量不高,但是对其加以控制是有实际意义的。

综上所述,本方法准确、灵敏度高、重复性好,可用于联苯苄唑原料药中有关物质的测定。

参考文献

[1] 郭兴杰,魏宗有,李发美.高效液相色谱法测定乳膏剂中的联苯苄唑[J].色谱,2001,19(3):279.

[2] 张慧兰,王延杰,申云飞.高效液相色谱法测定联苯苄唑乳膏中联苯苄醇含量[J].中国药业,2009,18(6):42.

[3] 吴兵兵.高效液相色谱法测定联苯苄唑凝胶的含量[J].医药导报,2006,25(6):575.

[4] 单萍萍,申国庆.高效液相色谱法测定复方联苯苄唑搽剂中联苯苄唑和氢化可的松的含量[J].江苏药学与临床研究,2006,14(1):26.

[5] 张天虹,徐文,崔升森,等.高效液相色谱法测定联苯苄唑凝胶中联苯苄唑的含量[J].实用药物与临床,2003,6(4):174.

[6] 江生,张晓松.高效液相色谱法测定联苯苄唑凝胶的含量[J].中国药业,2005,14(5):34.

[7] 刘艳娥,苗惠珠,刘玉波.高效液相色谱法测定联苯苄唑乳膏中联苯苄唑的含量[J].解放军药科学学报,2001,13(1):44.

[8] 王艳,徐晖,刘玉强,等.HPLC法测定乳膏中联苯苄唑和醋酸曲安奈德的含量[J].中国新药杂志,2007,16(8):631.

[9] 黄志东,李荣生,李海生.用离子对色谱技术同时测定复方联苯苄唑制剂中三种组分的研究[C]//天津市第八次色谱学术交流会论文集,天津:天津市色谱研究会,1993:4.

[10] 杨柳,陈俊波,林白云,等.联苯苄唑乳膏处方工艺的改进及稳定性考察[J].食品与药品,2012(11):426.

[11] 乞永超,郭兴杰.紫外分光光度法测定联苯苄唑凝胶剂的含量[J].中国药师,2000,3(6):340.

(收稿日期:2015-05-30 修回日期:2016-03-10)

(编辑:周 箐)