

HPLC法测定曲安奈德益康唑乳膏中的有关物质

郭旭光^{1*}, 郑子栋¹, 郭海波²(1.河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2.河南省药品审评认证中心, 郑州 450004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1134-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.27

摘要 目的:建立测定曲安奈德益康唑乳膏中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil ASB C₁₈, 流动相 A、B 分别为甲醇-0.077% 醋酸铵溶液(20:80, V/V, 磷酸调节 pH 至 4.5)和甲醇-乙腈(40:60, V/V), 梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 225 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μl。结果:曲安西龙、硝酸咪康唑以及 3 个单个未知杂质均能与曲安奈德益康唑乳膏中的主成分完全分离;曲安西龙、硝酸咪康唑的检测质量浓度分别在 1.071~8.568、1.039~8.312 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$ 、 $0.999\ 6$), 检测限分别为 5.15、7.31 ng, 定量限分别为 15.69、21.97 ng。结论:该方法灵敏、准确、专属性强、重复性好, 可用于曲安奈德益康唑乳膏的质量控制。

关键词 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 曲安奈德益康唑乳膏; 有关物质

Determination of Related Substance in Triamcinolone Acetonide and Econazole Nitrate Cream by HPLC

GUO Xu-guang¹, ZHENG Zi-dong¹, GUO Hai-bo²(1.Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China; 2.Henan Center for Drug Evaluation and Certification, Zhengzhou 450004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of related substances in Triamcinolone acetonide and econazole nitrate cream. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Venusil ASB C₁₈ column with mobile phase A composed of methanol-0.077% ammonium acetate (20:80, V/V, pH value adjusted to 4.5 using phosphoric acid) and methanol-acetonitrile (40:60, V/V) as mobile phase B (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 225 nm, and the column temperature was 35 °C. The sample size was 10 μl. RESULTS: Fluoxyprednisolone and miconazole nitrate and unknown impurity were completely separated from main components of Triamcinolone acetonide and econazole nitrate cream. The linear range of 2 kinds of known impurities were 1.071-8.568 μg/ml ($r=0.999\ 8$) and 1.039-8.312 μg/ml ($r=0.999\ 6$). The detection limits were 5.15 ng and 7.31 ng, and quantitative limits were 15.69 ng and 21.97 ng. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate specific and reproducible, which can be used for the quality control of related substance in Triamcinolone acetonide and econazole nitrate cream.

KEYWORDS HPLC; Gradient elution; Triamcinolone acetonide and econazole nitrate cream; Related substances

曲安奈德益康唑乳膏具有广谱抗真菌、抗炎、抗过敏和止痒功效, 临床广泛用于真菌引起的皮肤病^[1], 其有关物质主要有曲安西龙、硝酸咪康唑以及 3 个单个未知杂质。该药虽然收载于《中国药典》2010 版(二部)^[2], 但其检测项下并未规定对曲安奈德益康唑乳膏的有关物质进行检测。因此, 笔者参考相关文献^[3-10], 建立了高效液相色谱(HPLC)法梯度洗脱测定曲安奈德益康唑乳膏有关物质的方法, 以更好地控制产品质量。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪, 包括 G1314A 可变波长检测器(VWD)、ChemStation 色谱工作站等(美国 Agilent 公司); ME235S 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

曲安奈德、硝酸益康唑、苯甲酸、曲安西龙、硝酸咪康唑对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100055-200302、100214-200903、100419-200301、100333-200201、100213-200705, 质量分数均为 100%); 曲安奈德益康唑乳膏(市售, 批号: 130101、

130102、130103); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil ASB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.077% 醋酸铵溶液(20:80, V/V, 磷酸调节 pH 至 4.5)为流动相 A, 甲醇-乙腈(40:60, V/V)为流动相 B, 采用梯度洗脱(梯度洗脱程序见表 1); 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 225 nm; 进样量: 10 μl。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	70	30
25	10	90
37	10	90
38	70	30
46	70	30

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 取硝酸益康唑、硝酸咪康唑、曲安奈

* 主管药师, 硕士。研究方向: 食品药品质量控制。电话: 0371-63388290。E-mail: gx0371@126.com

德、曲安西龙和苯甲酸对照品适量,制成质量浓度均为0.2 mg/ml的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取曲安奈德益康唑乳膏约1 g,置于10 ml量瓶中,加甲醇适量,50 °C水浴加热并振荡使溶解,放至室温,加甲醇定容至刻度,摇匀,冰浴1 h,滤过,取续滤液放至室温,即得。

2.2.3 空白基质溶液 取缺少苯甲酸、曲安奈德和硝酸益康唑的空白基质,按“2.2.2”项下方法制备溶液,即得。

2.2.4 破坏性试验贮备液 精密称取样品5.1061 g,置于25 ml量瓶中,加甲醇适量,50 °C水浴使溶解,放至室温,加甲醇定容至刻度,摇匀,冰浴1 h,滤过,取续滤液放至室温,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下系统适用性溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,色谱见图1。结果,相邻峰的分度均大于1.5,表明系统适用性试验结果符合要求。

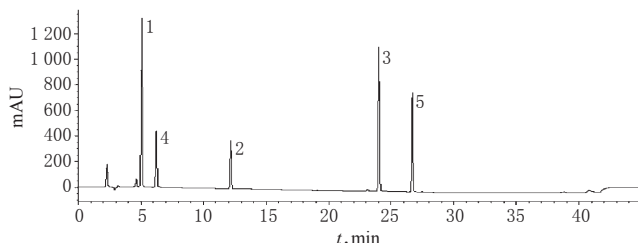


图1 高效液相色谱图

1. 苯甲酸; 2. 曲安奈德; 3. 硝酸益康唑; 4. 曲安西龙; 5. 硝酸咪康唑

Fig 1 HPLC chromatograms

1. benzoic acid; 2. triamcinolone acetonide; 3. econazole nitrate; 4. triamcinolone; 5. miconazole nitrate

2.4 专属性试验

2.4.1 空白基质干扰试验 取“2.2.3”项下空白基质溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,色谱见图2。由图2 G可见,空白基质不干扰有关物质的测定。

2.4.2 破坏性试验 (1)酸破坏:取“2.2.4”项下贮备液2 ml,加入1 mol/L的盐酸溶液1 ml,放置1 h,用1 mol/L的氢氧化钠溶液调pH至中性,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。(2)碱破坏:取“2.2.4”项下贮备液2 ml,加0.2 mol/L的氢氧化钠溶液1 ml,放置1 h,用1 mol/L的盐酸溶液调pH至中性,用甲醇稀释至4 ml,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。(3)氧化破坏:取“2.2.4”项下贮备液2 ml,加30%双氧水1 ml,摇匀,放置5 h,用甲醇稀释至4 ml,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。(4)高温破坏:取“2.2.4”项下贮备液2 ml,置于密封小瓶中,100 °C烘箱中放置5 h,取出,放至室温,用甲醇稀释至4 ml,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。(5)光照破坏:取“2.2.4”项下贮备液2 ml,置于透明密封小瓶中,4 000 lx下照射8 h,用甲醇稀释至4 ml,按“2.1”项下色谱条件进样测定。破坏性试验色谱见图2。由图2可见,酸、碱、氧化、高温、光照破坏条件下的降解产物峰与主峰分离均良好。

2.5 线性关系考察

精密称取苯甲酸对照品10.92 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取5 ml,置于50 ml量瓶中。精密称取曲安奈德对照品11.48 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取1 ml,置于同一50 ml量瓶中。精密称取硝酸益康唑对照品12.74 mg、曲安西龙对照品10.71 mg和硝酸咪康唑对照品10.39 mg,置于上述同一50 ml量瓶中,

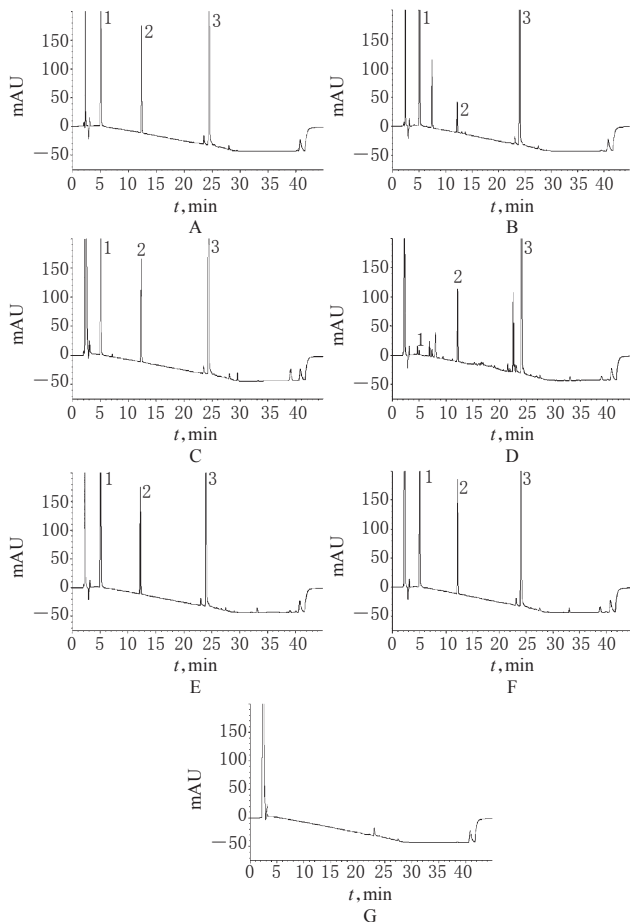


图2 专属性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏样品; B. 碱破坏样品; C. 氧化破坏样品; D. 高温破坏样品; E. 光破坏样品; F. 未破坏样品; G. 空白基质; 1. 苯甲酸; 2. 曲安奈德; 3. 硝酸益康唑

Fig 2 HPLC chromatograms of destruction tests

A. destroyed by acid; B. destroyed by alkali; C. destroyed by oxidation; D. destroyed by heat; E. destroyed by light; F. undestroyed; G. blank matrix; 1. benzoic acid; 2. triamcinolone acetonide; 3. econazole nitrate

加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,再精密量取1、3、4、5、6、8 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程和线性范围见表2。

表2 回归方程和线性范围(n=6)

Tab 2 Regression equation and linear range(n=6)

有关物质	回归方程	线性范围, μg/ml	r
苯甲酸	$y=46.566x-4.290$	1.092~8.736	0.999 8
曲安奈德	$y=12.819x-0.277$	0.229 6~1.836 8	0.999 7
硝酸益康唑	$y=35.686x-8.095$	2.548~20.384	0.999 8
曲安西龙	$y=17.827x-1.623$	1.071~8.568	0.999 8
硝酸咪康唑	$y=25.782x-2.998$	1.039~8.312	0.999 6

2.6 检测限和定量限试验

以信噪比3:1测得苯甲酸、曲安奈德、硝酸益康唑、曲安西龙和硝酸咪康唑的检测限分别为1.11、3.27、5.59、5.15、7.31 ng;以信噪比10:1测得各成分定量限分别为3.28、9.77、17.03、

15.69、21.97 ng。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下的系统适用性溶液适量,分别连续进样6次测定。结果,苯甲酸、曲安奈德、硝酸益康唑、曲安西龙和硝酸咪康唑峰面积的RSD分别为0.5%、0.5%、0.6%、0.7%和0.6%,说明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取样品(批号:130101)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在常温下放置0、2、4、6、8、12 h时进样测定。结果,样品的杂质峰数目、单个杂质的峰面积和总杂质峰面积(RSD=0.09%)均无明显变化,说明供试品溶液在12 h内稳定。

2.9 重复性试验

取样品(批号:130101)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,测定总杂质峰面积。结果,总杂质峰面积平均值为34 654.4,RSD=0.7%,说明本方法重复性较好。

2.10 耐用性试验

分别选用Venusil ASB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)和Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)在2台仪器上测定3批样品的有关物质。结果,不同色谱柱检测到的杂质峰数目、出峰顺序、分离效果和总杂质峰面积(RSD=0.17%)均无明显变化,说明本方法耐用性良好。

2.11 样品有关物质测定

采用主成分自身对照法测定样品中的有关物质。取3批样品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液。精密量取供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。精密量取对照溶液10 μl,注入HPLC仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的20%。取上述供试品溶液、对照溶液和“2.2.1”项下系统适用性溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样。系统适用性溶液中相邻峰的分度均不应小于1.5;供试品溶液色谱中如有杂质峰,除去空白基质峰及苯甲酸、曲安奈德和硝酸益康唑峰外,单个杂质峰的峰面积不得大于对照溶液中硝酸益康唑峰面积的0.5倍(0.5%),而各杂质峰的面积之和不得大于对照溶液中硝酸益康唑峰面积的1.5倍(1.5%)。结果表明,3批样品有关物质均符合规定,详见表3。

表3 样品有关物质测定结果(%)

Tab 3 Content determination of related substances(%)

批号	曲安西龙	硝酸咪康唑	单个未知杂质1	单个未知杂质2	单个未知杂质3	总杂质
130101	未检出	0.036	0.126	0.209	0.212	0.583
130102	未检出	0.036	0.127	0.208	0.211	0.582
130103	未检出	0.037	0.126	0.208	0.212	0.583

3 讨论

3.1 流动相梯度洗脱程序的选择

笔者比较了3种不同的流动相梯度洗脱程序。结果,本研究选取的流动相梯度洗脱程序各主成分峰之间均能完全分离,且对称性良好。

3.2 流动相A的pH选择

因本研究流动相要分离的组分中酸性组分多,所以流动

相的pH对分离效果影响较明显。笔者比较了流动相A的不同pH(pH 4.3、pH 4.5、pH 4.7),结果显示流动相A的pH在4.3~4.7范围内均满足系统适用性要求,但以pH 4.5最佳。

3.3 检测波长的选择

本品中硝酸益康唑的处方量为曲安奈德的10倍,故有关物质检测以硝酸益康唑的杂质为主要杂质,曲安奈德的杂质为次要杂质。检测波长选择主要考虑到硝酸益康唑杂质的最大检出。笔者参考相关文献^[2-4],发现硝酸益康唑引入的杂质主要为硝酸咪康唑及硝酸益康唑杂质A、B、C(即单个未知杂质1、2、3),且225 nm波长为其最大吸收波长,因此本研究选择225 nm波长为有关物质的检测波长。

3.4 杂质限度的确定

《中国药典》2010年版(二部)硝酸益康唑有关物质检测项下提及的唯一杂质为硝酸咪康唑,要求其主峰的分度大于8.0(本方法的实测分度为15.2),要求单个杂质不得过0.2%,总杂质不得过0.5%;曲安奈德有关物质检测项下提及曲安奈德引入的主要杂质为曲安西龙,规定单个杂质不得过0.3%,总杂质不得过0.8%,但未对曲安西龙与曲安奈德的分度进行规定。本研究3批样品有关物质测定结果显示,单个杂质均小于0.3%,总杂质均小于1.0%,故拟定本品有关物质限度为:单个杂质不得大于0.5%,总杂质不得过1.5%。

综上所述,本方法灵敏、准确、专属性强、重复性好,可用于曲安奈德益康唑乳膏的质量控制。

参考文献

- [1] 王丽随.曲安奈德益康唑乳膏(派瑞松)治疗体股癣54例的疗效观察[J].海峡药学,2011,23(12):103.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:269,954.
- [3] 张慧文,林玲,关倩明.梯度洗脱HPLC法测定硝酸益康唑的有关物质[J].药物分析杂志,2010,30(5):911.
- [4] 英国药典委员会.英国药典[S].2012年版.伦敦:英国国家文书出版署,2012:784.
- [5] 翁水旺,高祖钦.HPLC法测定曲安奈德益康唑乳膏中两组分的含量[J].解放军药学学报,2007,23(3):233.
- [6] 郭江红,赵亚萍,姜红,等.RP-HPLC法测定曲安奈德氯霉素溶液的含量及有关物质[J].药物分析杂志,2012,32(2):323.
- [7] 王昕,左文坚.曲安奈德有关物质检查方法的研究[J].天津药学,2005,17(2):27.
- [8] 王守箐.HPLC测定枸橼酸莫沙必利片的有关物质[J].药物分析杂志,2011,31(12):2330.
- [9] 李美芳,刘敏,王晓冲,等.RP-HPLC梯度洗脱测定盐酸伊托必利的有关物质[J].药物分析杂志,2012,32(8):1453.
- [10] 曹全胜,胡敏,黄伟,等.盐酸异丙肾上腺素及注射液的有关物质研究[J].药物分析杂志,2012,32(5):838.

(收稿日期:2013-09-30 修回日期:2014-01-25)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅