

克霉唑有关物质检查色谱条件的优化

陈忠兰, 吴先富, 王瑾*, 肖新月*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 优化并改进克霉唑有关物质检查的色谱条件。方法: 比较《中华人民共和国药典》(ChP)、《美国药典》(USP)、《英国药典》(BP)、《欧洲药典》(EP) 和《日本药局方》(JP) 中克霉唑有关物质的检测方法, 通过对各个方法优化, 确定最后的色谱条件: 色谱柱为 Repasil-pur Basic C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为磷酸盐缓冲液, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 210 nm; 柱温 25 °C; 进样体积 10 μL。结果: 有关物质咪唑与溶剂峰能有效分离。结论: 本法提高了克霉唑有关物质检查的准确性。

关键词: 克霉唑; 咪唑; 克霉唑杂质 I; 药典; 有关物质

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 09-1694-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.09.21

Optimization of the chromatographic conditions for detecting related substances in clotrimazole

CHEN Zhong-lan, WU Xian-fu, WANG Jin*, XIAO Xin-yue*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To optimize and improve the chromatographic conditions for detecting clotrimazole's related substances. **Methods:** To compare the detection methods of clotrimazole in Chinese Pharmacopoeia (ChP), United States Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP), European Pharmacopoeia (EP) and Japanese Pharmacopoeia (JP). Repasil-pur Basic C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used for comparison of pharmacopoeia in different countries. The final chromatographic conditions were as follows: the chromatographic column was Repasil-pur Basic C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); the mobile phase A was phosphate buffer solution and the mobile phase B was acetonitrile with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; the detection wavelength was set at 210 nm; the column temperature was 25 °C and the injection volume was 10 μL. **Results:** The related substance imidazole and the solvent peak could be separated effectively. **Conclusion:** This established method improves the accuracy of examination of clotrimazole related substances.

Keywords: clotrimazole; imidazole; clotrimazole impurity I; Pharmacopoeia; related substances

* 通信作者 王瑾 Tel: (010) 53852034; E-mail: ooswoo@126.com

肖新月 Tel: (010) 53852486; E-mail: xiaoxy@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 53852035; E-mail: 550736995@qq.com

克霉唑为广谱抗真菌药,对多种真菌尤其是白色念珠菌具有较好的抗菌作用^[1-2],对浅表真菌及某些深部真菌均有抗菌作用^[3]。咪唑是克霉唑主要的合成原料,作为克霉唑的有关物质,咪唑及二苯基-(2-氯苯基)甲醇(克霉唑杂质 I)在 ChP、USP、BP、

EP 和 JP 中均有具体限度的要求^[4]。

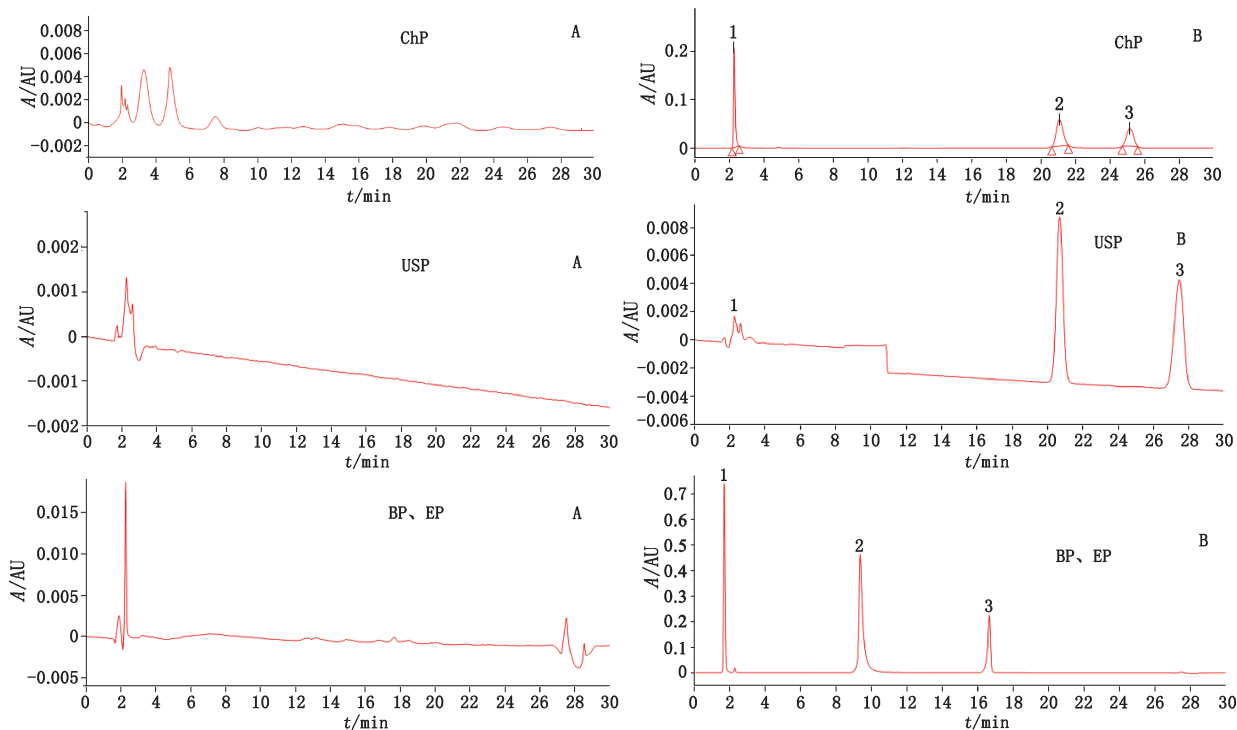
ChP 2015、USP 41-NF36、BP 2018、EP 8.0 和 JP 17.0 中克霉唑有关物质项下的色谱条件和限度要求对比见表 1。各种方法系统适用性试验结果见图 1。

表 1 药典比较结果

Tab. 1 Results of Pharmacopoeia comparison

药典 (Pharmacopoeia)	色谱柱 (chromatographic column)	流速 (flow rate)/ (mL·min ⁻¹)	波长 (wavelength)/ nm	流动相 (mobile phase)	溶剂 (solvent)
ChP 2015 ^[5]	C ₁₈	/	215	磷酸二氢钾-甲醇(3:7)(potassium dihydrogen phosphate-methanol)(3:7)	70% 甲醇 (70% methanol)
EP 8.0 ^[6]	C ₈	1.0	210	磷酸二氢钾、四丁基硫酸氢铵-乙腈(梯度) (potassium dihydrogen phosphate, tetrabutylammonium hydrogensulfate sulfate-acetonitrile)(gradient elution)	乙腈 (acetonitrile)
BP2018 ^[7-8]	C ₈	1.0	210	磷酸二氢钾、四丁基硫酸氢铵-乙腈(梯度) (potassium dihydrogen phosphate, tetrabutylammonium hydrogensulfate sulfate-acetonitrile)(gradient elution)	乙腈 (acetonitrile)
*USP 41 ^[9] 克霉唑杂质 I (clotrimazole impurity I)	C ₁₈	1.5	254	磷酸氢二钾-乙腈(1:3) potassium phosphate dibasic-acetonitrile(1:3)	甲醇 (methanol)
JP 17.0 ^[10]	TLC				

注(note): *USP 41 咪唑检测方法是 TLC^[9](The detection method of imidazole was TLC^[9])



1. 咪唑(imidazole) 2. 克霉唑(clotrimazole) 3. 克霉唑杂质 I(clotrimazole impurity I)

A. 空白溶液(blank solution) B. 系统适用性溶液(system suitability solution)

图 1 有关物质色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of related substances

实验发现,咪唑在 ChP 2015 色谱条件下与溶剂峰重合; EP 8.0 和 BP 2018 使用 Spherical end-capped C_8 色谱柱,色谱峰在溶剂峰中间,且分离度不好; USP 41 咪唑检测方法为 TLC 法,检测灵敏度低,克霉唑杂质 I 检测方法为 HPLC 法,检测波长为 254 nm; JP 17.0 使用 TLC 方法检测,灵敏度低,无法准确定量。本文对以上药典方法进行优化,使克霉唑有关物质的检测定量更为准确。

1 仪器和试剂

Waters UPLC 高效液相色谱仪(Waters 公司),配有紫外检测器、溶剂管理器、自动进样器; METER TOLEDO MX5 百万分之一电子分析天平; 密理博(Milli-Q)超纯水仪。

对照品克霉唑(批号 100037-201407)、咪唑(批号 100045-201304)、克霉唑杂质 I(批号 100019-201304),中国食品药品检定研究院; 乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 磷酸二氢钾和四丁基硫酸氢铵(分析纯, 国药集团化学试剂公司); 水(超纯水); 克霉唑(市售,批号 20140207)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Repasil-pur Basic C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为 1.0 g 磷酸二氢钾和 0.5 g 四丁基硫酸氢铵加水至 1 000 mL, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱(表 2); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L。

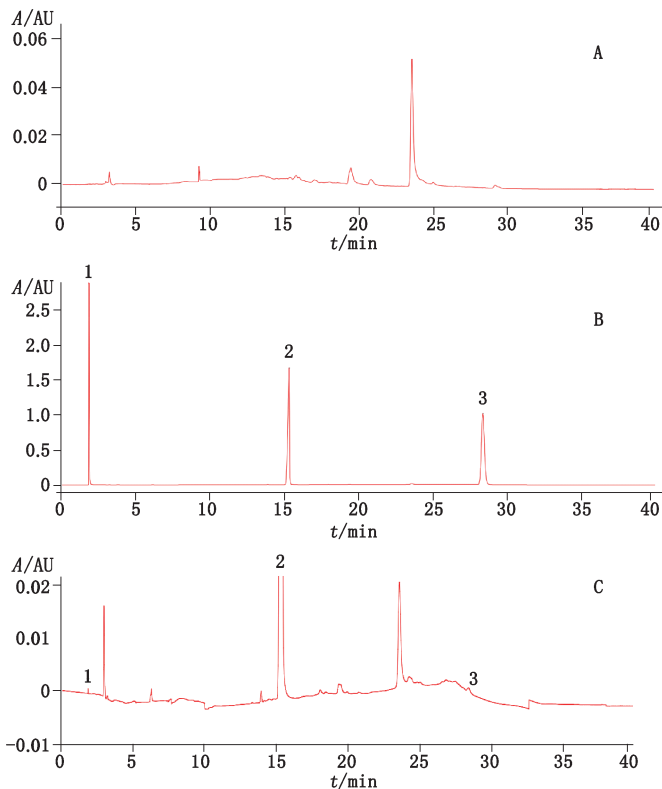
表 2 流动相洗脱梯度

Tab. 2 Gradient elution procedure

时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (mobile phase B)/%
0	75	25
3	75	25
25	20	80
30	75	25
40	75	25

2.2 系统适用性试验 精密称取克霉唑 1.982 mg、克霉唑杂质 I 2.133 mg 和咪唑 2.162 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液, 进样 10 μ L 测定。见图 2。

2.3 供试品溶液 取克霉唑适量, 精密称定, 加乙腈溶解并稀释, 摇匀, 制成每 1 mL 含克霉唑 0.2 mg 的溶液。



1. 咪唑(imidazole) 2. 克霉唑(clotrimazole) 3. 克霉唑杂质 I (clotrimazole impurity I)

A. 空白溶液(blank solution) B. 系统适用性溶液(system suitability solution) C. 克霉唑样品(clotrimazole sample)

图 2 优化方法有关物质色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of related substances determined by the optimized method

2.4 检测下限和定量下限 取克霉唑对照品, 精密称定 4.712 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 倍比稀释后进样, 记录色谱图, 计算。以信噪比 3 : 1 为检测下限, 结果为 0.019 ng; 以信噪比 10 : 1 为定量下限, 结果为 0.064 ng。

2.5 精密度试验 取克霉唑对照品, 精密称定 4.712 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积的 RSD ($n=6$) 为 0.12%, 说明该方法精密度良好。

2.6 重复性试验 取供试品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 计算结果见表 3。

3 讨论

3.1 方法优势 采用 Repasil-pur Basic C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 检测波长 210 nm, 流动相采用流动相梯度洗脱(见表 2), 咪唑与溶剂峰可以完全分离, 具有检测灵敏度高、重复性好等优点。

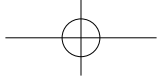


表 3 重复性结果

Tab. 3 Repetitive result

编号 (No.)	质量 (mass)/mg	克霉唑面积 (clotrimazole area)	克霉唑 (clotrimazole) A/W	咪唑面积 (imidazole area)	咪唑 (imidazole) A/W	克霉唑杂质 I (clotrimazole impurity I)
1	4.775	12 558 378	2 630 026.8	1 609	336.963 4	未检出 (not detected)
2	6.080	15 647 333	2 573 574.5	2 019	332.072 4	未检出 (not detected)
3	5.628	14 715 268	2 614 653.2	1 953	347.014 9	未检出 (not detected)
4	5.992	15 776 264	2 632 887.9	2 051	342.289 7	未检出 (not detected)
5	3.810	10 142 424	2 662 053.5	1 271	333.595 8	未检出 (not detected)
6	4.511	11 963 510	2 652 074.9	1 556	344.934 6	未检出 (not detected)
RSD/%			1.2	1.8		

3.2 色谱柱的选择 通过各国药典比较,采用 EP 的流动相,使用常用的 C₁₈ 色谱柱,同时更换几种不同类型的 C₁₈ 色谱柱,发现咪唑峰与溶剂峰、其他杂质色谱峰均能分离。

3.3 波长的选择 克霉唑和咪唑的紫外最大吸收波长分别为 209.1 nm 和 220 nm^[13],本研究对比了 210 和 215 nm 波长处的检测结果,发现 210 nm 灵敏度高,基线平直,故采用 210 nm 进行检测。

参考文献

- [1] 刘娜,谢子立,吴小英,等. HPLC 法测定克霉唑阴道片中咪唑含量的方法研究[J]. 广州化工, 2017, 45(18): 92
LIU N, XIE ZL, WU XY, *et al.* Determination of imidazole in clotrimazole vaginal tablets by high performance liquid chromatography[J]. Guangzhou Chem Ind, 2017, 45(18): 92
- [2] 周琳,曾檀. HPLC 测定克霉唑溶液的含量及有关物质[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(2): 193
ZHOU L, ZENG T. HPLC determination of clotrimazole solution and related substances[J]. West China J Pharm Sci, 2010, 25(2): 193
- [3] 周琳,王伯初. 克霉唑栓含量和有关物质的测定[J]. 中国药业, 2011, 20(5): 22
ZHOU L, WANG BC. Study on related substances and assay method of clotrimazole suppository[J]. China Pharm, 2011, 20(5): 22
- [4] 毕云生,魏纪鲁,胡冠时. HPLC 法同时测定克霉唑中两种有关物质的含量[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(2): 146
BI YS, WEI JL, HU GS. HPLC determination of content of two

related substances in clotrimazole[J]. Pharm Care Res, 2006, 6(2): 146

- [5] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 446
ChP 2015. Vol II[S]. 2015: 446
- [6] EP 8.0[S]. 2014: 1931
- [7] BP 2018[S]. 2018: 757
- [8] 杨晓梅,梁勇坤,余良钟,等. 克霉唑乳膏中有关物质的定性定量分析[J]. 药学报, 2018, 53(12): 2093
YANG XM, LING YK, YU LZ, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of substances in clotrimazole cream[J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(12): 2093
- [9] USP 41-NF36[S]. 2018: 1040
- [10] JP 17.0[S]. 2016: 742
- [11] 何淑旺,王雪敏,谢晓燕,等. HPLC 法同时测定克霉唑片中多种有关物质[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(4): 315
HE SW, WANG XM, XIE XY, *et al.* Simultaneous determination of a variety of related substances in clotrimazole tablets by HPLC[J]. Pharm Clin Res, 2016, 24(4): 315
- [12] 余进,黄毅岚,张丹,等. HPLC 测定克霉唑阴道片的主药及有关物质[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(4): 443
YU J, HUANG YL, ZANG D, *et al.* HPLC determination of clotrimazole vaginal tablets and related substances[J]. West China J Pharm Sci, 2007, 22(4): 443
- [13] 何丹,杨林. RP-HPLC 法测定克霉唑乳膏的含量和有关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(4): 285
HE D, YANG L. RP-HPLC determination of content and related substances of clotrimazole cream[J]. Chin J Antibiot, 2011, 36(4): 285

(本文于 2018 年 9 月 13 日收到)