

## 加校正因子的主成分自身对照法同时测定咪喹莫特 5 个杂质

鹿贵花, 杨梅, 胡丽娜

(扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司, 泰州 225321)

**摘要 目的:** 建立加校正因子的主成分自身对照法同时测定咪喹莫特 5 个杂质。**方法:** 采用高效液相色谱法。以 XBridge C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾缓冲液 (用磷酸调节 pH 至 8.0) - 乙腈 (70 : 30) 为流动相, 检测波长 238 nm, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。通过测定咪喹莫特和 5 个杂质 (杂质 A、B、C、D、E) 的线性方程, 以斜率比计算各杂质的相对校正因子, 用相对保留时间确定各杂质位置, 并进行了方法学验证。用相对校正因子计算咪喹莫特原料药中杂质 A、B、C、D、E 的含量, 并与杂质对照品外标法测定的结果进行比较, 验证校正因子的准确性。**结果:** 杂质 A、B、C、D、E 的相对保留时间分别为 0.92、0.32、1.98、0.62、1.37, 相对校正因子分别为 0.86、1.60、0.95、0.95、2.32, 检出限分别为 0.02、0.02、0.05、0.04、0.11 ng, 定量限分别为 0.08、0.05、0.17、0.13、0.35 ng。采用外标法和加校正因子的主成分自身测定的结果基本一致 (偏差在 ±10% 之内), 无显著性差异。**结论:** 方法学验证结果表明建立的方法符合杂质定量的要求, 本法能准确测定咪喹莫特原料药中杂质 A、B、C、D、E 的含量。

**关键词:** 免疫调节剂; 咪喹莫特; 杂质测定; 自身对照法; 校正因子法; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 07-1320-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.07.25

## Simultaneous determination of five impurities in imiquimod by self-contrast method with the correction factor

LU Gui-hua, YANG Mei, HU Li-na

(Yangtze River Pharmaceutical Group Jiangsu HAI-CI Biological Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 225321, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method with the correction factors for simultaneous quantification of five impurities A, B, C, D, E in imiquimod. **Methods:** The HPLC determination was performed on Waters XBridge C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a mobile phase consisted of 0.02 mol · L<sup>-1</sup> dipotassium hydrogen phosphate (adjusted pH 8.0 with phosphoric acid) - acetonitrile (70 : 30). The detection wavelength was 238 nm and the flow was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 25 °C and the injection volume was 10 μL. The linear equation of imiquimod and impurities A, B, C, D, E were determined, slope ratio was used to calculate the correction factors of impurities to imiquimod. The relative retention time was used for identification of impurities. The results obtained by the proposed method were compared with those by using external standards of the impurities

第一作者 Tel: 1506107613; E-mail: luguihua@yangzijing.com

reference substance to verify the accuracy of correction factor. **Results:** The relative retention time of impurities A, B, C, D, E were 0.92, 0.32, 1.98, 0.62 and 1.37, respectively, and the relative correction factor were 0.86, 1.60, 0.95, 0.95 and 2.32, respectively compared with imiquimod. The limits of detection and quantification were found to be 0.02, 0.02, 0.05, 0.04, 0.11 ng and 0.08, 0.05, 0.17, 0.13, 0.35 ng for impurities A, B, C, D, E, respectively. There was no significant difference (The deviation is within  $\pm 10\%$ ) between the results by relative correction factors and by external standards. **Conclusion:** The validation test showed that the proposed method met the requirements for the intended analytical applications. The method can determine the content of impurities A, B, C, D and E in imiquimod.

**Keywords:** immune modulator; imiquimod; impurity test; self-comparison; correction factor; HPLC

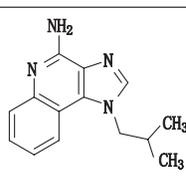
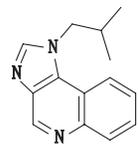
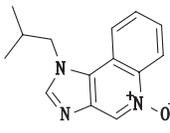
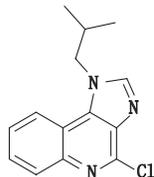
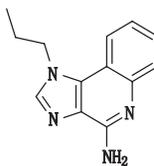
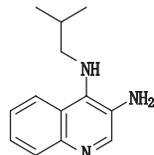
咪喹莫特是一种新型免疫调节剂<sup>[1]</sup>。目前在国内外已广泛用于治疗尖锐湿疣<sup>[2]</sup>、扁平疣<sup>[3]</sup>、生殖器疱疹,各种血管瘤及病理性瘢痕<sup>[4]</sup>,传染性软疣和浅表性基底细胞癌等<sup>[5]</sup>,咪喹莫特收载于新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z<sup>[6]</sup> 和 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z-2010<sup>[7]</sup>,国外药典 USP39<sup>[8]</sup>有收载。

新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z 和 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z-2010 标准中有关物质检查杂质限度规定比较简单,且并未详细考察具体的杂质,各杂质与主成分以及杂质之间能否有效分离未做深入的研究,USP39 咪喹莫特质量标准中有关物质控制了 3 个已知杂质,分别为杂质 A、杂质 B、杂质 C,2011 年美国药典论坛发布的咪喹莫特质量标准征求意见稿<sup>[9]</sup>中,有关物质方法二控制了已知杂质 D 和杂质 E,根据文献报道的咪喹莫特的合成工艺<sup>[10-12]</sup>,杂质 A、B、C、E 为合成咪喹莫特的中间体,易带入到成品中,杂质 D 为合成过程可能产生的副产物,有必要对以上 5 个杂质分别进行定量研究,以保证药品的质量。USP39 和 2011 年 USP 论坛均采用外标法对杂质进行定量检测,目前中国食品药品检定研究院没有咪喹莫特杂质对照品出售,必须购买进口的 USP 对照品,价格昂贵且购买周期长,造成咪喹莫特的检测费用高。

本实验对新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z-2010 咪喹莫特有关物质方法进行优化,并对优化后方法进行方法学验证,测定了咪喹莫特 5 个已知杂质(杂质 A、B、C、D、E)的相对校正因子,首次提出加校正因子的主成分自身对照法测定本品有关物质。

表 1 咪喹莫特及 5 种已知杂质结构和化学名称

Tab. 1 The structure and chemical name of imiquimod and five known impurities

名称 (name)	结构式 (structure)	化学名称 (chemical name)
咪喹莫特 (imiquimod)		1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-C]喹啉-4-胺
杂质 A (impurity A)		1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-C]喹啉
杂质 B (impurity B)		1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-C]喹啉-5-氧
杂质 C (impurity C)		1-(2-甲基丙基)-4-氯-1H-咪唑并[4,5-C]喹啉
杂质 D (impurity D)		1-丙基-1H-咪唑并[4,5-C]喹啉-4-胺
杂质 E (impurity E)		3-氨基-4-(2-甲基丙胺基)喹啉

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司); Mettler Toledo XS205 分析天平(梅特勒-托利多公司)。色谱柱 Waters XBridge C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 填料:十八烷基硅烷键合硅胶,沃特世公司)。

咪喹莫特对照品(批号 FOK063, USP 提供, 含量 99.8%), 咪喹莫特原料药(批号 12091921、12092121、12092221, 扬子江药业集团江苏海慈生物药业有限公司提供), 杂质 A 对照品(批号 FOK091, USP 提供, 含量 100.0%), 杂质 B 对照品(批号 FOK093, USP 提供, 含量 99.0%), 杂质 C 对照品(批号 FOK100, USP 提供, 含量 99.0%), 杂质 D 对照品(批号 FOK106, USP 提供, 含量 97.0%), 杂质 E 对照品(批号 FOK114, USP 提供, 含量 99.0%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 混合杂质对照品溶液** 取咪喹莫特杂质 A、B、C、D 和 E 对照品各 10 mg 分别置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并定容至刻度, 作为各杂质对照品储备液; 再精密量取各杂质对照品储备液 1 mL 置同一 100 mL 量瓶中加稀释剂至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

**2.1.2 分离度试验溶液** 精密称取咪喹莫特对照品 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加混合杂质对照品 1.5 mL, 加稀释剂定容至刻度, 即得分离度试验溶液。

**2.1.3 供试品溶液** 本品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂溶解并定容至刻度, 摇匀即得。临用新制。

**2.1.4 对照溶液** 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 再精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂制成每 1 mL 中含咪喹莫特 0.1 μg 的溶液, 作为对照溶液。

### 2.2 色谱条件及系统适用性试验

采用色谱柱 Waters XBridge C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 填料:十八烷基硅烷键合硅胶); 流动相: 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾缓冲液(用磷酸调节 pH 至 8.0) - 乙腈(70:30); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 检测波长: 238 nm; 进样量: 10 μL; 稀释剂: 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸溶液 - 乙腈(70:30)。

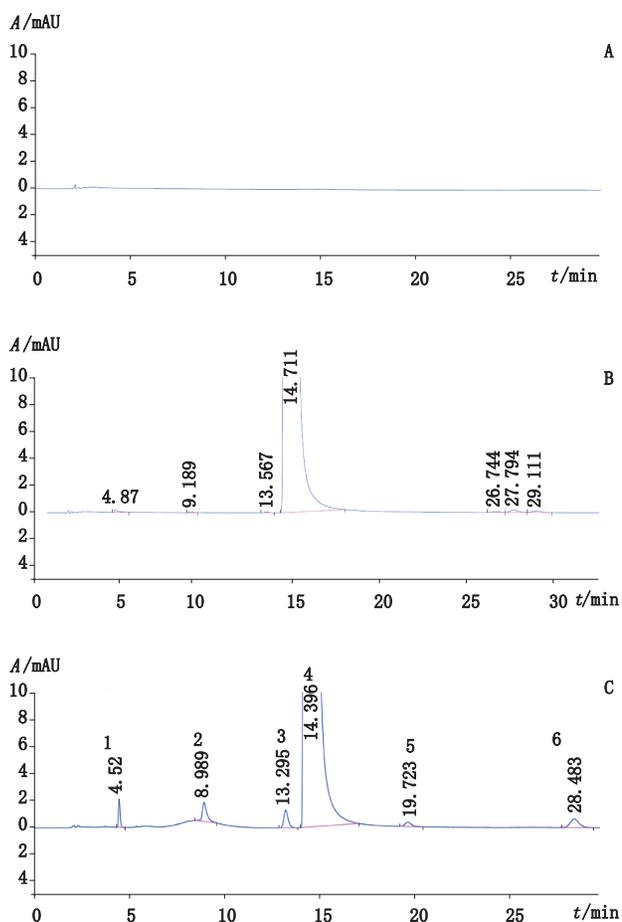
精密吸取分离度试验溶液 10 μL, 进样。理论板数按咪喹莫特峰计算不低于 10 000, 咪喹莫特峰与杂质 A 峰的分离度应大于 2.0。

### 2.3 检测波长选择

将咪喹莫特、杂质 A、B、C、D 和 E 分别进行紫外光谱扫描<sup>[13]</sup>, 结果显示在 238 nm 波长处, 各已知杂质具有较好的吸收, 为了能更好地检测到各杂质, 因此选择 238 nm 作为检测波长。

### 2.4 分离度试验

精密量取分离度试验溶液、供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 结果见图 1。分离度试验结果表明, 各杂质之间及各杂质与主成分之间均能完全分离, 分离度大于 2.0, 满足分离要求; 理论板数按咪喹莫特峰计大于 10000, 方法可行。



1. 杂质 B (impurity B) 2. 杂质 D (impurity D) 3. 杂质 A (impurity A) 4. 咪喹莫特 (imiquimod) 5. 杂质 E (impurity E) 6. 杂质 C (impurity C)

A. 空白溶液 (blank solution) B. 供试品溶液 (test solution) C. 分离度溶液 (resolution)

图 1 分离度试验色谱图

Fig. 1 The chromatograms of resolution test

### 2.5 定量限与检测限

将各杂质对照品储备液用稀释剂逐级稀释后

进样,分别以信噪比  $S/N=3$  和 10 计算咪喹莫特以及杂质 A、B、C、D 和 E 的检测限和定量限,结果见表 2。

表 2 定量限和检测限结果

Tab. 2 Results of limit of quantification and limit of detection

组分 (component)	定量限 (limit of quantification) /ng	检测限 (limit of detection) /ng
咪喹莫特 (imiquimod)	0.15	0.05
杂质 A (impurity A)	0.08	0.02
杂质 B (impurity B)	0.05	0.02
杂质 C (impurity C)	0.17	0.05
杂质 D (impurity D)	0.13	0.04
杂质 E (impurity E)	0.35	0.11

## 2.6 相对校正因子测定

根据咪喹莫特和各杂质的定量限结果,精密称取咪喹莫特、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 和杂质 E 对照品各适量,加稀释剂溶解并稀释制成浓度分别为定量限、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18、0.24、0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列溶液,分别采用 2 种仪器系统 (1 为 Agilent 1260, 2 为 Agilent 1100) 进样测定,以浓度 ( $C$ ) 为横坐标,峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标进行线性回归,主成分 (咪喹莫特) 与杂质回归方程斜率之比即为校正因子  $f$ 。结果见表 3。

## 2.7 回收率试验

精密称取同一批咪喹莫特原料药 (批号: 12091921) 9 份各 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入各杂质对照品分别制成相当于供试品浓度定量限、0.15%、0.18% 的混合溶液,每个浓度平行配制 3 份。按“2.1”项下色谱条件进样测定各杂质含量,计算回收率和 RSD,结果见表 4。杂质 A、B、C、D 和 E 平均回收率分别为 98.5%、97.3%、95.9%、96.2%、98.1%,均在 80%~120% 之间, RSD 均小于 5%,回收率良好。

表 3 咪喹莫特杂质相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of imiquimod impurities

成分 (component)	仪器系统 (system)	回归方程 (linear equation)	$r$	$f$	$\bar{f}$
咪喹莫特 (imiquimod)	1	$A=120.2C-0.11$	0.999 7	1.00	
	2	$A=118.8C-0.15$	0.999 7	1.00	
杂质 A (impurity A)	1	$A=145.4C+0.03$	1.000	0.83	0.86
	2	$A=135.5C+0.03$	0.999 8	0.88	
杂质 B (impurity B)	1	$A=76.67C-0.03$	0.999 8	1.57	1.6
	2	$A=72.91C+0.03$	0.999 4	1.63	
杂质 C (impurity C)	1	$A=130.2C-0.02$	0.999 9	0.92	0.95
	2	$A=122.2C+0.33$	0.999 7	0.97	
杂质 D (impurity D)	1	$A=126.9C-0.03$	0.999 9	0.95	0.95
	2	$A=124.6C-0.06$	0.999 8	0.95	
杂质 E (impurity E)	1	$A=50.47C-0.16$	0.999 6	2.38	2.3
	2	$A=52.82C+0.03$	0.999 4	2.25	

## 2.8 专属性

**2.8.1 强白光破坏** 取本品,置光照下放置 5 d。破坏结束,取光照破坏样品 10.36 mg,置 100 mL 量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为光照破坏溶液。

**2.8.2 紫外光破坏** 取本品,置紫外灯下放置 5 d。破坏结束,取破坏样品 10.17 mg,置 100 mL 量瓶中加

稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为固态下紫外光破坏溶液。

**2.8.3 高温破坏** 取本品,置 105 °C 烘箱中放置 4 d。破坏结束,取高温破坏样品 9.99 mg,置 100 mL 量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为高温破坏溶液。

表 4 回收率试验结果 ( $n=9$ , %)

Tab. 4 Results of the recovery test

浓度 (concentration)	杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	杂质 E (impurity E)
LOQ	100.7	102.3	91.7	94.9	96.5
	98.0	98.1	94.9	88.0	98.3
	96.7	94.3	88.8	90.3	94.9
0.15%	98.2	96.6	97.9	98.5	96.9
	97.7	96.0	96.8	97.7	99.0
	97.6	96.2	97.5	97.5	97.6
0.18%	98.2	96.4	97.4	99.2	99.2
	99.7	98.0	99.2	99.5	101.1
	99.5	97.5	99.4	100.2	99.8
平均值 (average)	98.5	97.3	95.9	96.2	98.1
RSD/%	1.3	2.3	3.7	4.5	1.9

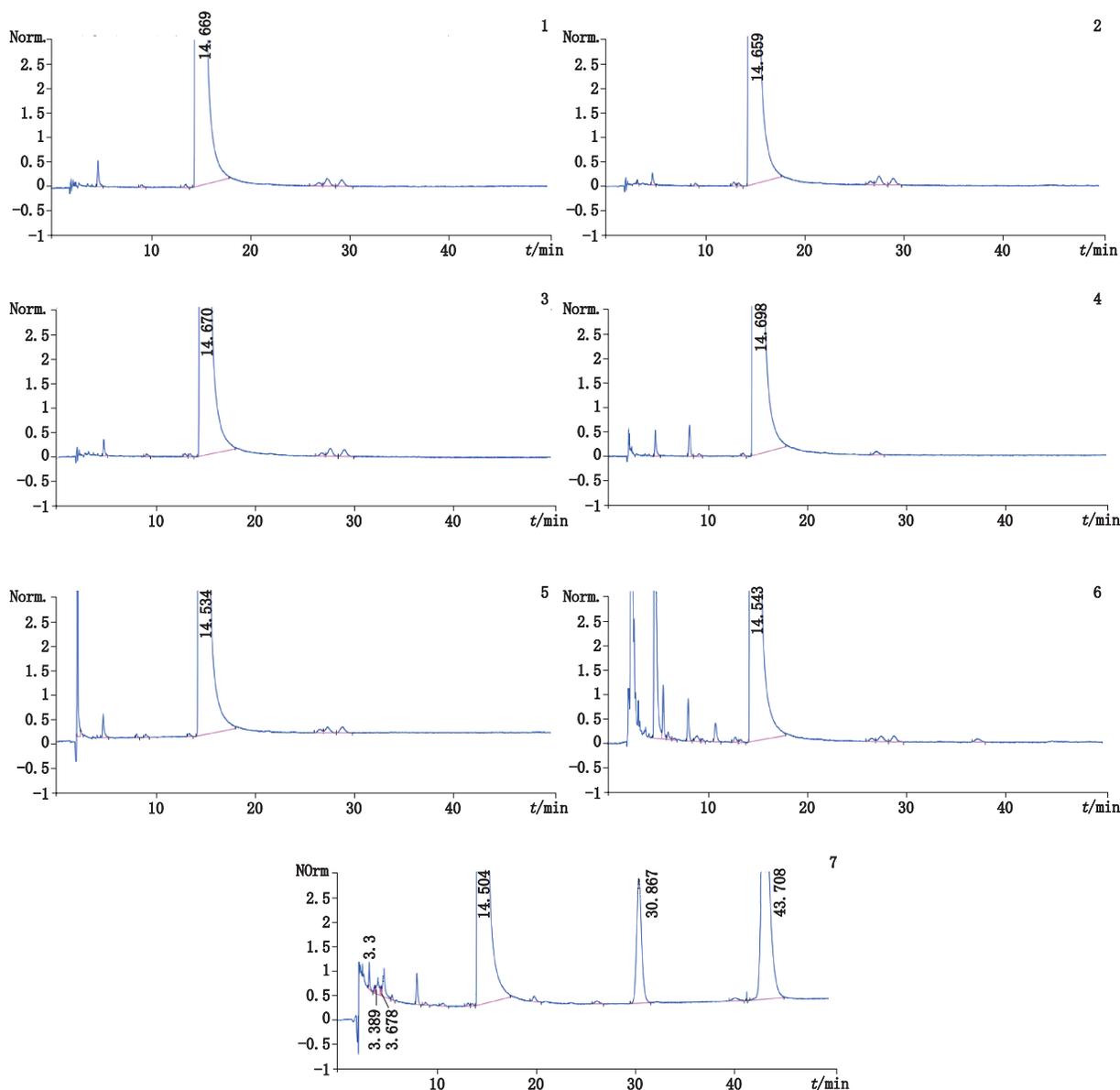
**2.8.4 氧化破坏** 取本品 10.38 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 2 mL 稀释剂,加 10% 过氧化氢 2 mL,摇匀,90 °C 加热 1 h,破坏结束后,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为氧化破坏溶液。

**2.8.5 酸性氧化破坏** 取本品 10.33 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 2 mL 稀释剂,加 10% 过氧化氢 2 mL、6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL,摇匀,90 °C 加热 3 h,破坏结束后,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 2 mL 中和,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为酸性氧化破坏溶液。

**2.8.6 酸破坏** 取本品 10.08 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加稀释剂 2 mL 使溶解,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL,摇匀,置 90 °C 水浴中放置 12 h,破坏结束后,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 2 mL 中和,摇匀,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为强酸破坏溶液。

**2.8.7 碱破坏** 取本品 10.32 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加稀释剂 2 mL 使溶解,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 2 mL,摇匀,置 90 °C 水浴中放置 13 h,破坏结束后,加 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 2 mL,摇匀,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为强碱破坏溶液。

取各破坏试验供试品溶液按“2.1”色谱条件进样测定,考察各破坏试验条件下降解杂质与已知杂质、主成分的分离情况,见图 2。咪唑莫特原料药经酸、碱、光照和高温破坏后,杂质含量无明显变化,表明本品在上述条件下比较稳定,咪唑莫特在氧化条件下特别在酸存在下不稳定,主成分含量从 99.84% 降至 96.53%,DAD 检测结果表明,各降解条件下主峰纯度因子均大于 990,且各杂质均能与咪唑莫特主峰良好的分离,物料平衡均在 98.31%~104.06% 之间,符合专属性要求。



1. 强白光破坏 (light damage) 2. 紫外破坏 (UV damage) 3. 高温破坏 (heat damage) 4. 酸破坏 (acid damage) 5. 碱破坏 (base damage) 6. 氧化破坏 (oxidative damage) 7. 酸性氧化破坏 (acid oxidative damage)

图2 咪喹莫特破坏试验高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of degradation tests of imiquimod

### 2.9 溶液稳定性

按照“2.2.2”项下配制供试品溶液,分别于室温放置0 h、6 h、10 h、24 h后测定溶液稳定性,面积归一法计算主峰纯度分别为99.88%、99.89%、99.90%、99.90%,24 h内杂质没有增长,但供试品溶液放置6 h后杂质个数由6个减少至5个,为真实反映杂质的含量,故本品溶液应在6 h内检测。

### 2.10 重复性试验

取同一批号供试品,按照“2.2.2”和“2.2.3”

项下配制供试品溶液和对照溶液,并按照上述色谱条件进行测定,结果表明6份供试品中杂质A均为0.01%,RSD为0;杂质C均为0.03%,RSD为0;杂质D均为0.01%,RSD为0;杂质B和杂质E均未检出;其他单杂均为0.04%,RSD为0;杂质总量分别为0.12%、0.13%、0.13%、0.14%、0.13%、0.14%,RSD为5.7%,表明该方法重复性良好。

表 5 重复性试验结果(%)

Tab. 5 The results of repeatability test

序号 (No.)	杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	杂质 E (impurity E)	其他单杂 (single largest impurity)	杂质总量 (total impurities)
1	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.12
2	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.13
3	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.13
4	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.14
5	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.13
6	0.01	未检出 (not detected)	0.03	0.01	未检出 (not detected)	0.04	0.14
RSD/%	0	0	0	0	0	0	5.7

### 2.11 样品检测

分别采用杂质对照品外标法与校正因子的主成分自身对照法,测定 3 批咪喹莫特原料药中各杂质的

含量,结果见表 6。用加校正因子的主成分自身对照法和对照品外标法杂质的检测结果基本一致,无统计学差异,终点验证了校正因子的准确性。

表 6 样品测定结果(%)

Tab. 6 The results of sample analysis

批号 (Lot No.)	杂质 A (impurity A)		杂质 B (impurity B)		杂质 C (impurity C)		杂质 D (impurity D)		杂质 E (impurity E)	
	I	II								
1	0.16	0.14	0.15	0.14	0.21	0.20	0.18	0.18	0.16	0.15
2	0.16	0.15	0.15	0.14	0.21	0.21	0.18	0.18	0.15	0.15
3	0.15	0.15	0.15	0.15	0.22	0.22	0.18	0.18	0.15	0.15

注(note): 批号 1、批号 2、批号 3 分别为批号 12091921、批号 12092121、批号 12092221 加一定量杂质对照品得到的;“I”表示采用杂质对照品外标法;“II”表示加校正因子的主成分自身对照法。

(Lot No.1, Lot No.2, Lot No.3 were obtained by adding a certain amount of impurity reference substance with Lot 12091921, 12092121, 12092221 respectively; “I” indicates impurity reference external standard method; “II” indicates self-contrast method with the correction factor.)

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的筛选

USP39 收录的咪喹莫特标准和新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z 有关物质方法对已知杂质的分离均存在一定的缺陷,其中 USP39 收录的咪喹莫特标准有关物质方法杂质 E 与主成分相互干扰,不能实现完全分离,流动相含离子对试剂,对色

谱柱伤害大,分析时间较长;新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z 有关物质方法咪喹莫特与相邻杂质的分离度达不到分离要求,其中咪喹莫特与杂质 A 的分离度只有 0.89,咪喹莫特与杂质 E 与的分离度只有 1.36。新药转正标准 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z-2010 中有关物质方法各已知杂质之间及与主成分之间均能完全分离,且流动相组成简单,分

析时间较美国药典方法短,故咪唑莫特原料药有关物质选择 WS<sub>1</sub>-(X-125)-2005Z-2010 收载的方法。

### 3.2 稀释剂的选择

由于咪唑莫特原料药在水和有机溶剂中溶解度均不佳<sup>[14-15]</sup>,在酸性条件溶解性较好<sup>[16-17]</sup>,稀释剂宜选择酸性溶液,考虑到杂质的溶解性,故选择 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸溶液-乙腈(70:30)作为稀释剂。

### 3.3 流动相比比例的选择

减少乙腈比例有利于提高杂质 B 与未知相邻杂质的分离度,但却会降低杂质 C 与相邻杂质的分离度。综合考虑杂质 B、杂质 C 与相邻杂质的分离度,通过多次调节流动相的组成和比例,最终确定以 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾缓冲液(用磷酸调节 pH 至 8.0)-乙腈(70:30)为流动相,杂质 B、杂质 C 与相邻杂质分离度达到最佳。

### 3.4 色谱柱的筛选

本实验考察采用 Agilent XDB-C<sub>18</sub>、Waters Sunfire C<sub>18</sub>、Waters XBridge C<sub>18</sub> 等色谱柱对各杂质相对保留时间与分离度的影响,结果表明色谱柱品牌和型号对主峰出峰时间、已知杂质的相对保留时间、主峰与相邻杂质的分离度有显著影响,特别是杂质 A 的相对保留时间,甚至会引起杂质 A 与主成分出峰顺序的不同,Waters XBridge C<sub>18</sub> 适合咪唑莫特有关物质的测定方法,且不同批次的色谱柱各已知杂质的相对保留时间与分离度一致,方法可重现。

### 3.5 相对保留时间考察

取“2.4”项下分离度试验溶液在“2.1”色谱条件基础上微小变动,分别考察流速、柱温、流动相比比例、流动相中磷酸氢二钾溶液的 pH、色谱柱批次对杂质相对保留时间的影响,结果见表 7。改变流速、柱温、流动相比比例、流动相 pH、不同批次的色谱柱,各已知杂质的相对保留时间耐用性良好。

表 7 各种影响因素对相对保留时间的影响 (n=10)

Tab. 7 Effects of various factors on the relative retention time

影响因素 (influence factor)		相对保留时间 (the relative retention time)				
		杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	杂质 E (impurity E)
	正常条件 (normal)	0.92	0.31	1.98	0.62	1.37
流速 (flow rate) / mL·min <sup>-1</sup>	0.9	0.92	0.31	1.98	0.62	1.37
	1.1	0.92	0.31	1.98	0.62	1.37
柱温 (column temperature) / °C	20	0.91	0.30	1.96	0.63	1.35
	30	0.93	0.32	1.99	0.62	1.39
流动相比比例 (mobile phase ratio)	72:28	0.92	0.28	1.98	0.60	1.35
	68:32	0.94	0.36	1.96	0.66	1.39
流动相 pH (mobile phase pH)	7.8	0.93	0.33	1.98	0.63	1.35
	8.2	0.91	0.31	1.96	0.62	1.40
色谱柱 (column)	批次 1 (serial number 1)	0.92	0.31	1.98	0.62	1.37
	批次 2 (serial number 2)	0.94	0.32	2.05	0.62	1.40
平均值 (average)		0.92	0.32	1.98	0.62	1.37
RSD/%		1.16	6.57	1.32	2.41	1.46

注 (note): “批次 1” 为色谱柱 Waters XBridge C<sub>18</sub> SN: 01453131813805; “批次 2” 为色谱柱 Waters XBridge C<sub>18</sub> SN: 01523305913888 (The “Serial number 1” column was Waters XBridge C<sub>18</sub> SN: 01453131813805; The “Serial number 1” column was Waters XBridge C<sub>18</sub> SN: 01523305913888.)

### 3.6 小结

本文通过测定咪喹莫特杂质 A、B、C、D 和 E 的相对校正因子,建立加校正因子的主成分自身对照法测定咪喹莫特原料药的有关物质,解决杂质对照品不易获得的难题,同时避免不加校正因子的主成分自身对照法定量不准确的缺陷,本法测定结果与杂质对照品外标法测定的结果一致,终点验证校正因子的准确性。建立的方法进行了系统的方法学验证,结果表明该方法灵敏度、准确度、专属性、重复性、溶液稳定性均符合要求。采用加校正因子的主成分自身对照法测定咪喹莫特有关物质无需长期购买杂质对照品,大大降低了检验成本和检验人员的劳动程度,故本文建立的加校正因子的主成分自身对照法可用于咪喹莫特有关物质的测定,方法简单、专属性强、结果准确可靠。

### 参考文献

- [ 1 ] 王琨. 咪喹莫特的临床应用新进展 [ J ]. 临床皮肤科杂志, 2016, 45 ( 1 ): 72  
WANG K. New advances in clinical application of imiquimod [ J ]. *J Clin Dermatol*, 2016, 45 ( 1 ): 72
- [ 2 ] 王强, 倪立燕, 姚学军. 外用咪喹莫特预防尖锐湿疣复发的疗效及其机制 [ J ]. 中国临床医学, 2010, 17 ( 6 ): 921  
WANG Q, NI LY. Clinical observation on externally use dimiquimod cream 5% in preventing recurrence of condyloma acuminata and its pathogenesis, 2010, 17 ( 6 ): 921
- [ 3 ] 李剑峰, 章诗富. 咪喹莫特的免疫调节机制及临床应用进展 [ J ]. 医学综述, 2009, 15 ( 9 ): 1394  
LI JF, ZHANG SF. Immunoregulatory in mechanism and the clinical application of imiquimod [ J ]. *Med Recapit*, 2009, 15 ( 9 ): 1394
- [ 4 ] 闫伦. 咪喹莫特对兔耳瘢痕模型增生抑制作用的实验研究 [ D ]. 桂林: 桂林医学院, 2013  
YAN L. Imiquimod Inhibit Scar Formation in Rabbit Ear Hypertrophic Scar Model [ D ]. Guilin: Guilin Medical University, 2013
- [ 5 ] 朱小华, 徐金华. 5% 咪喹莫特乳膏治疗基底细胞癌 Meta 分析 [ J ]. 中国皮肤性病杂志, 2006, 20 ( 9 ): 568  
ZHU XH, XU JH. Meta analysis of the effectiveness of 5% imiquimod in treatment of basal cell carcinoma [ J ]. *Chin J Derm Venereol*, 2006, 20 ( 9 ): 568
- [ 6 ] 新药转正标准: 第 65 册 [ S ]. 2005: 170  
New Positive Standard. Vol 65 [ S ]. 2005: 170
- [ 7 ] 国家药品标准颁布件: 咪喹莫特 [ S ]. 2010  
National Drug Standard Issue Part: Imiquimod [ S ]. 2010
- [ 8 ] USP 39-NF32 [ S ]. 2014: 4288
- [ 9 ] 美国药典论坛第一版: 咪喹莫特 [ S ]. 2011  
Authorized USP Pending Monograph Version 1: Imiquimod [ S ]. 2011
- [ 10 ] 章雁, 程文香, 甘斌, 等. 咪喹莫特的合成 [ J ]. 中国药师, 2010, 13 ( 2 ): 209  
ZHANG Y, CHENG WX, GAN B, *et al.* Synthesis of imiquimod [ J ]. *China Pharm*, 2010, 13 ( 2 ): 209
- [ 11 ] 张逸伟, 陈海权, 何伟彪, 等. 咪喹莫特合成工艺的改进 [ J ]. 华南理工大学学报 自然科学版, 2007, 35 ( 7 ): 78  
ZHANG YW, CHEN HQ, HE WB, *et al.* Improved synthesis of imiquimod [ J ]. *J South China Univ Technol ( Nat Sci Edit )*, 2007, 35 ( 7 ): 78
- [ 12 ] 沈敬山, 李剑峰, 李卉君, 等. 咪喹莫特的合成研究 [ J ]. 化学研究与应用, 2001, 13 ( 3 ): 249  
SHEN JS, LI JF, LI HJ, *et al.* Synthesis research of imiquimod [ J ]. *Chem Res Appl*, 2001, 13 ( 3 ): 249
- [ 13 ] 夏广新, 张容霞, 索瑾, 等. 咪喹莫特的波谱学数据与结构表征 [ J ]. 分析化学研究报告, 2003, 31 ( 10 ): 1185  
XIA GX, ZHANG RX, SUO J, *et al.* Spectroscopic data and structural characterization of imiquimod [ J ]. *Chin J Anal Chem*, 2003, 31 ( 10 ): 1185
- [ 14 ] 孙镜沂, 孙永超, 丁平田. 促渗剂对咪喹莫特体外经皮渗透的影响 [ J ]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25 ( 2 ): 85  
SUN JX, SUN YC, DING PT. Effects of penetration enhancers on the transdermal permeation of imiquimod [ J ]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2008, 25 ( 2 ): 85
- [ 15 ] 许莉勇. 顶空气相色谱法测定咪喹莫特中有机溶剂残留量 [ J ]. 药物分析杂志, 2010, 30 ( 6 ): 1086  
XU LY. Headspace GC determination of residual solvents in imiquimod [ J ]. *Chin J Pharm Anal* 2010, 30 ( 6 ): 1086
- [ 16 ] 郑萍, 杜开蓉, 王舸. 反相高效液相色谱法测定咪喹莫特乳膏的有关物质及含量 [ J ]. 中国抗生素杂志, 2004, 29 ( 10 ): 600  
ZHENG P, DU KR, WANG K. Determination of content and related substances in imiquimod cream by RP-HPLC [ J ]. *Chin J Antibiot*, 2004, 29 ( 10 ): 600
- [ 17 ] 曹琳, 周征, 毛亚珠. 高效液相色谱法测定咪喹莫特乳膏的含量 [ J ]. 中国药品标准, 2008, 9 ( 3 ): 227  
CAO L, ZHOU Z, MAO YZ. Determination of imiquimod cream by HPLC [ J ]. *Drug Stand China*, 2008, 9 ( 3 ): 227

( 本文于 2016 年 7 月 5 日收到 )