

HPLC法测定克霉唑栓的含量

李青翠, 田方, 任瑞莉, 孙灵爱

(山西省药品检验所, 太原 030001)

摘要 目的: 建立 HPLC法测定克霉唑栓中克霉唑的含量。方法: 色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液 - 甲醇 (25:75), 检测波长为 254 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL, 柱温 25℃。结果: 克霉唑进样量 5.0~15.0 μg 范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均回收率为 99.7% ($n=9$), 并将检测结果与非水滴定法 (中国药典方法) 进行对比。结论: 本方法简便、准确, 重复性好, 可用于克霉唑栓的含量测定和质量控制。

关键词: 克霉唑; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)08-1364-03

RP-HPLC determination of clotrimazole suppositories

LI Qing-cui, TIAN Fang, REN Rui-li, SUN Ling-ai

(Shanxi Institute of Drug Control, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective To determine the contents of clotrimazole suppositories by RP-HPLC. **Method** The chromatographic column was Agilent ZORBAX Extend C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 0.025 mol·L⁻¹ dipotassium hydrogen phosphate solution - methanol (25:75) as the mobile phase; the detection wavelength was 254 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the amount of injection was 20 μL. The temperature of column was 25℃. **Results** The calibration curve was linear ($r=0.9999$) within the range of 5.0~15.0 μg for clotrimazole. The average recovery was 99.7% ($n=9$). The method was compared with nonaqueous titration. **Conclusion** The method is simple and accurate, sensible and reproducible, which can be used for the determination of both the raw material and preparations and for the quality control of clotrimazole suppositories.

Key words clotrimazole; RP-HPLC; determination

克霉唑 (clotrimazole) 为咪唑类广谱抗真菌药, 对多种真菌尤其是白色念珠菌有较好的抗菌作用^[1,2], 克霉唑栓的质量标准收载于 2005 年版中国药典二部。含量测定 (非水滴定法) 采用双相溶液阴离子表面活性剂测定法。其原理为有机碱类化合物 (RX) 的阳离子 (R⁺) 与表面活性剂 (NaA) 的阴离子 (A⁻) 形成离子对 (R⁺A⁻), 供试品在稀酸或酸性缓冲液中, 加入有机溶剂氯仿及指示剂 (二甲基黄指示液或二甲基黄 - 溶剂蓝 19 混合指示液), 用阴离子表面活性剂的水溶液滴定, 生成的离子对可被有机相氯仿萃取, 当达到等电点后, 稍过量的滴定剂与水相中的 H⁺ 作用, 使阴离子表面活性剂由钠盐成为酸型转入有机相, 因而使有机相中的指示剂变色指示终点。由于溶剂蓝 19 不易得到, 实际多用二

甲基黄 - 亚甲蓝混合指示剂代替二甲基黄 - 溶剂蓝 19 混合指示液。终点氯仿层由绿色转变为红灰色, 两者测得的结果基本一致。但与本文 HPLC 法相比较, 非水滴定法测得结果偏高。采用本文建立的 HPLC 法测定含量准确、简便、快速, 适用于克霉唑栓的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 梅特勒分析天平。

克霉唑栓 (规格: 0.15 g): 武汉马应龙药业集团股份有限公司 (批号: 060602, 070101), 湖北东信药业有限公司 (批号: 060202), 上海医工院医药股份有限公司 (批号: 060206)。克霉唑对照品 (批号: 200306) 由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为

色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液 精密称取克霉唑对照品 50 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的克霉唑对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取克霉唑栓 10 粒, 精密称定, 置蒸发皿中, 置水浴上加热至熔化, 冷却, 并不停地搅拌, 使混合均匀, 精密称取适量 (约相当于克霉唑 50 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 置 50°C 水浴中振摇使克霉唑溶解, 放冷至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 置冰浴中放置 2 h 立即滤过, 取续滤液放至室温, 作为供试品溶液。

3 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Extend C_{18} ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾溶液 - 甲醇 (25: 75); 检测波长为 254 nm ; 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 $20 \mu\text{L}$; 柱温为室温。在本文色谱条件下, 克霉唑对照品与样品的色谱图见图 1。

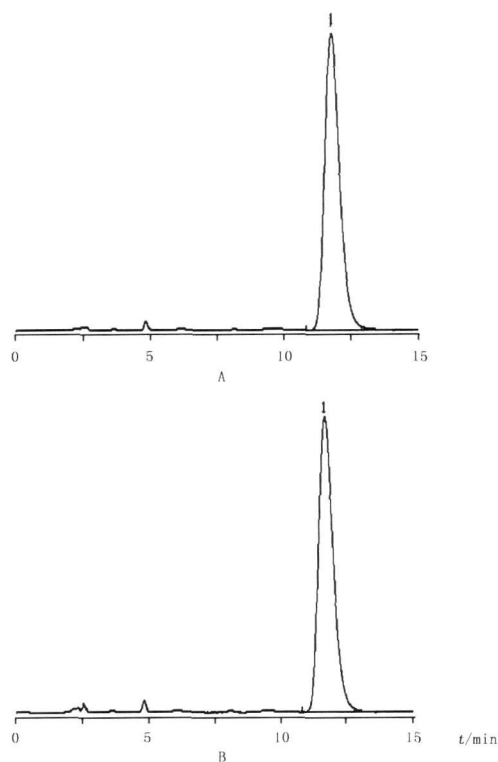


图 1 对照品 (A)、样品 (B) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

1 克霉唑 (clotrimazole)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密称取克霉唑对照品适量, 加流动相制成 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。精密吸取 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 mL , 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。按本文色谱条件各进样 $20 \mu\text{L}$ 测定, 按外标法以克霉唑面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y = 2167.1X + 8.782 \quad r = 0.9999$$

结果表明克霉唑进样量在 $5.0 \sim 15.0 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

4.2 精密度试验 精密称取克霉唑对照品适量, 用甲醇配制高、中、低 3 种浓度 (1.0 0.5 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的溶液, 分别重复进样 5 次, 结果高、中、低 3 种浓度的精密度 RSD 分别为 0.46% , 0.61% , 0.52% 。说明精密度符合要求。

4.3 重复性试验 分别平行配制同一批样品 (武汉马应龙药业集团股份有限公司, 批号 060602) 的供试品溶液 5 份, 在本文色谱条件下进样测定, 克霉唑含量的 RSD 为 0.81% , 结果证明重复性良好。

4.4 稳定性试验 取同一批次供试品溶液, 按本文色谱条件于 2 4 6 8 h 分别进样 $20 \mu\text{L}$ 测定, 结果峰面积的 RSD 为 0.71% , 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

4.5 加样回收率试验 精密称取已经测知含量的克霉唑栓 (约相当于克霉唑 25 mg) 各 3 份, 分别置 100 mL 量瓶中, 再分别加入克霉唑对照品 20 25 30 mg 按“2.2”项下供试品溶液制备方法同法操作。测得克霉唑低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 99.7% , 99.5% , 99.9% ; RSD 分别为 0.51% , 0.64% , 0.69% 。9 份样品平均回收率为 99.7% ($n = 9$)。

4.6 样品含量测定 取克霉唑栓 10 粒, 精密称定, 置蒸发皿中, 水浴上加热至熔化, 冷却, 不停搅拌使混合均匀, 精密称取适量 (约相当于克霉唑 50 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 置 50°C 水浴中振摇使克霉唑溶解, 放冷至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 置冰浴中放置 2 h 立即滤过, 取续滤液放至室温, 作为供试品溶液, 按本文色谱条件进样, 结果见表 1。

表 1 克霉唑栓的含量测定结果 ($n = 2$)
Tab 1 The results of clotrimazole suppositories

批号 (Lot No)	标示量 (labelled amount%) %			
	HPLC	RSD %	滴定法 ^[3] (titration)	RSD %
060206	99. 0	0. 5	102. 3	0. 3
060202	91. 0	0. 3	93. 2	0. 5
060602	99. 1	0. 3	101. 1	0. 4
070101	101. 4	0. 7	103. 5	0. 4

5 讨论

5. 1 通过本文试验, 比较 2 种分析方法, 非水滴定法比 HPLC 法含量结果高出 2% ~ 3%。由于非水滴定法终点颜色转变不敏锐, 另外滴定法不能很好的分离工艺合成中的原料、中间体及水解产物等有关物质, 对滴定会有一定干扰, 这些是造成含量偏高的主要原因。

5. 2 样品的前处理是本试验方法的关键, 取供试品 10 粒水浴加热融化, 冷却, 同时应不停搅拌使其充分混合均匀, 保证称量时样品的均匀度; 供试品溶液置冰浴中放置 2 h 后应立即过滤, 否则随着温度升高, 少量的基质会溶于介质中, 供试品溶液注入液相色谱仪后会积存在色谱柱上, 柱压会突然增高, 影响

柱子的使用寿命。

5. 3 试验中选择了 3 种不同品牌的色谱柱, 结果表明 Agilent ZORBAX Extend C₁₈ (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), Waters XTerr RP C₁₈ (250 mm × 4. 6 mm, 5 μm), 均可用于本品的含量测定, 本文所使用的流动相 pH 为 10. 0 Agilent 色谱柱可适用于 pH 2. 0~ 11. 0 Waters 色谱柱可适用于 pH 2. 0~ 12. 0 均为耐酸耐碱色谱柱, 经考察该流动相系统不会影响色谱柱使用寿命。

参考文献

1 YAN Zhen(严珍), KAI Ning-ding(凯尼丁). Studies on bacteriostasis of canesten vaginal tablet to candida strains isolated from clinical vaginitis specimens(阴道片对霉菌性阴道炎病原菌的抑制作用的研究). *StraitPham J* (海峡药理学杂志), 2005, 17(6): 91
2 WAN Qiong-fen(王琼芬), XIA Ying-ying(夏瑛瑛). Determination of clotrimazole in compound neomycin sulfate oral ulcer pellicles by HPLC(HPLC测定复方硫酸新霉素口腔溃疡药膜中克霉唑的含量). *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2006, 21(3): 290
3 ChP(中国药典). 2005. VolII (二部): 236
(本文于 2008 年 11 月 12 日收到)