

表 5 样品两种方法检测结果 (%)

样品编号	非水滴定法	UV法
1	101.37	102.21
2	101.64	102.70
3	101.78	102.68
4	101.84	102.98
5	102.01	103.46
6	100.15	100.85
7	101.39	101.13
8	94.85	96.02
9	97.50	98.98
10	98.94	98.63

0.45 μm 微孔滤膜过滤后,吸光度值相对较大,即辅料本身的背景吸收干扰较大,故选择用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液作溶剂。

3.2 本法可直接测定盐酸美西律片剂含量,操作简便快速,准确度高,可有效控制产品质量。由表 5 可知,2种方法的测定结果基本一致。根据上述结果并参考《中国药典》2005 年版二部盐酸美西律片含量测定限度,将限度定为 93.0% ~ 107.0%。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编.《中国药典》.2005 年版.二部[S]. 2005: 550-551.

HPLC法测定复方克霉唑乳膏中二苯基-(2-氯苯基)甲醇和克霉唑的含量

王勇(重庆市药品检验所,重庆 401121)

摘要 目的:建立 HPLC法测定复方克霉唑乳膏中二苯基-(2-氯苯基)甲醇和克霉唑的含量。**方法:**采用 Waters C₁₈ 色谱柱,以 0.05 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液-甲醇(3:7),用 10% 磷酸调 pH 至 5.7~5.8 为流动相,检测波长 215 nm,流速 1.5 mL·min⁻¹,柱温 30℃。**结果:**二苯基-(2-氯苯基)甲醇和克霉唑分别在 5.096×10⁻³~0.2038 μg (r=0.9999)和 0.1062~1.062 μg (r=0.9999)范围线性关系良好,平均加样回收率分别为 99.15% 和 100.69% (RSD 分别为 0.79% 和 0.66%)。**结论:**本法简便、准确、精密度高,可用于复方克霉唑乳膏的质量控制。

关键词:复方克霉唑乳膏;二苯基-(2-氯苯基)甲醇;克霉唑;HPLC法

中图分类号: 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2010)-3-227-4

Determination of Diphenyl(2-chlorophenyl)-m ethanol and Clotrimazole in Compound Clotrimazole Cream by HPLC

Wang Yong(Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121)

Abstract Objective To establish an HPLC method to determine diphenyl(2-chlorophenyl)-m ethanol and clotrimazole in Compound Clotrimazole Cream. **Method** Using Waters C₁₈ column, mixture of 0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution in methanol solution (3:7), adjusted pH value to 5.7~5.8 with 10% v/v solution of phosphoric acid as the mobile phase with flow rate of 1.5 mL·min⁻¹. Detection wavelength is 215 nm, and the column temperature was 30℃. **Results** A good linearity was obtained in the range of 5.096×10⁻³~0.2038 μg (r=0.9999) and 0.1062~1.062 μg (r=0.9999) for diphenyl(2-chlorophenyl)-m ethanol and clotrimazole respectively, and the average recovery was 99.15% (RSD=0.79%) and 100.69% (RSD=0.66%) respectively. **Conclusions** The method is convenient, accurate, precise and can be used for the quality control of the Compound Clotrimazole Cream.

Key Words Compound Clotrimazole Cream; Diphenyl(2-chlorophenyl)-m ethanol; Clotrimazole; HPLC

根据国家药典委员会国药典化发[2008]25号 “关于发送《中国药典》2010年版(二部)化学药品

科研项目会议纪要的通知”的要求,我所承担了复方克霉唑乳膏质量标准起草工作。复方克霉唑乳膏质量标准收载于《中国药典》2005年版二部,国家药典委员会对本品种提出的要求是考查有关物质和含量测定。根据国家药典委员会对该品种的修订意见,经查阅相关文献^{[1][4]}和参考国外药典^[2-3],并参考检验工作的实际情况,我们认为现行质量标准存在如下问题:

问题 1 原质量标准未进行二苯基-(2-氯苯基)甲醇检查。二苯基-(2-氯苯基)甲醇是合成克霉唑的中间体,也是克霉唑水解后的产物,因此有必要对二苯基-(2-氯苯基)甲醇进行质量控制。

问题 2 含量测定原质量标准采取滴定法,与 HPLC法相比较,不仅样品处理复杂,而且滴定终点易过,方法专属性和灵敏度不高。

在本次 2010年版药典质量标准起草工作中,我们着重对上述存在的问题进行了考察和修订。

经检索国家药品监督管理局基础数据库,查得本品共有 21个批准文号,涉及 21个生产厂家。通过给企业发函征集样品,共收到 7个厂家回函,收集到 5个生产厂家 9批样品。各厂家提供样品情况详见表 1。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配有紫外检测器及二极管阵列检测器), Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 克霉唑对照品(批号 10037-0105)、二苯基-(2-氯苯基)甲醇对照品(批号 100019-200603)均由中国药品生物制品检定所提供; 甲醇为色谱纯; 磷酸二氢钾、磷酸均为分析纯; 水为二次蒸馏水。

表 1 提供样品情况表

生产厂家	批准文号	样品批号	样品效期
厂家 1	国药准字 H 37021735	070801	2009年 08月 05日
	国药准字 H 37021735	071101	2009年 11月 02日
	国药准字 H 37021735	080108	2010年 01月 14日
厂家 2	国药准字 H 20003169	070901	2009 08
厂家 3	国药准字 H 19983096	20071101	2009年 10月
厂家 4	国药准字 H 12020691	08022001	2010/01
	国药准字 H 12020691	08022002	2010/01
	国药准字 H 12020691	08022003	2010/01
厂家 5	国药准字 H 20013256	370606	2009 05
厂家 6		回函,未提供样品	
厂家 7		回函,未提供样品	

2 方法与结果

2.1 HPLC法的确定

2.1.1 检测波长的确定 《美国药典》30(USP 30)中克霉唑原料药质量标准中有关物质测定及含量测定的检测波长为 254 nm,《英国药典》2008(BP 2008 电子版)中克霉唑乳膏质量标准中有关物质及含量测定的检测波长为 215 nm。经比较,选择了灵敏度较高的 215 nm 作为检测波长,经二极管阵列检测,其峰纯度均在 999 以上。二苯基-(2-氯苯基)甲醇与克霉唑在 200~ 400 nm 波长范围的紫外光谱图见图 1~ 2。

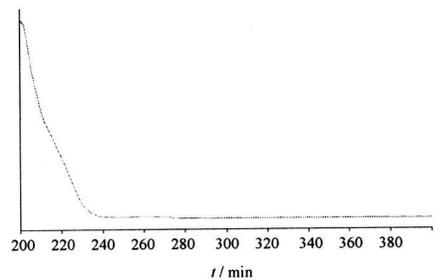


图 1 二苯基-(2-氯苯基)甲醇紫外光谱图

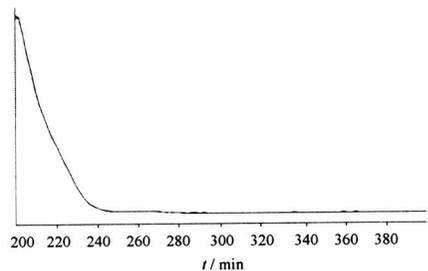


图 2 克霉唑紫外光谱图

2.1.2 流动相的筛选 在 USP 30 克霉唑原料药质量标准及 BP(2008 电子版)克霉唑乳膏质量标准中,流动相呈碱性和弱碱性,在实际考察中,克霉唑峰与二苯基-(2-氯苯基)甲醇峰分离度不是特别理想,特别是在做破坏性试验时,样品经氧化破坏后产生的杂质与主峰重合,不能有效分离。因此对流动相重新进行了筛选。经考察并优化不同的磷酸盐、不同的磷酸盐浓度、不同的 pH 值以及不同的甲醇浓度,最终确定以 0.05 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾溶液-甲醇(3/7),用 10% 磷酸调节 pH 值至 5.7~ 5.8 为流动相,各杂质峰与二苯基-(2-氯苯基)甲醇峰和克霉唑峰均能有较好的分离度,见图 3。

分别采用 Waters 公司、菲罗门公司、岛津公司生产的色谱柱和 Waters 公司生产的高效液相色谱

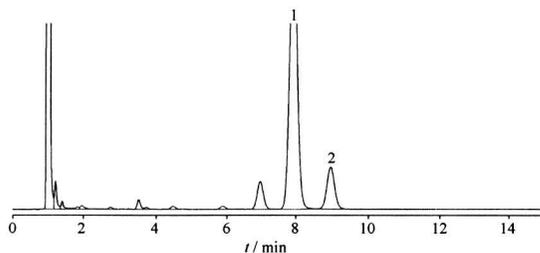


图 3 复方克霉唑乳膏氧化破坏色谱图

仪按上述条件进行试验,结果不同公司的高效液相色谱仪和色谱柱对检测结果影响不大,检测结果基本一致。说明本方法的耐用性良好。

2.2 HPLC法的方法学研究

2.2.1 拟定的 HPLC法及色谱条件

色谱柱: Waters C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m); 检测波长: 215 nm; 流动相: 0.05 mol \cdot L⁻¹的磷酸二氢钾溶液-甲醇 (3:7), 用 10%磷酸调 pH 值至 5.7~5.8; 流速: 1.5 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。理论塔板数按克霉唑峰计算不低于 4 000, 二苯基-(2-氯苯基)甲醇峰和克霉唑峰的分度大于 2.5。

测定法: 二苯基-(2-氯苯基)甲醇 取本品适量 (相当于克霉唑 10 mg), 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水-甲醇溶液 (3:7) 适量, 置 50 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min, 时时振摇, 然后取出强烈振摇 5 min, 放冷至室温, 用水-甲醇溶液 (3:7) 稀释至刻度, 摇匀, 置冰浴中放置 30 min, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液放至室温, 作为供试品溶液。另取二苯基-(2-氯苯基)甲醇对照品适量, 精密称定, 加水-甲醇溶液 (3:7) 溶解并定量稀释制成 1 mL 中约含 2 μ g 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 1.5 倍, 供试品溶液的色谱图中如有与对照品溶液相对应的二苯基-(2-氯苯基)甲醇色谱峰, 按外标法以峰面积计算, 即得。

克霉唑含量测定 精密称取本品适量 (约相当于克霉唑 2 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加水-甲醇溶液 (3:7) 适量, 置 50 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min, 时时振摇, 然后取出强烈振摇 5 min, 放冷至室温, 用水-甲醇溶液 (3:7) 稀释至刻度, 摇匀, 置冰浴中冷却 30 min, 用 0.45 μ m 滤膜滤过, 取续滤液放至室温, 精密量取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取克霉唑对照品适量, 精密称定, 加水-甲醇溶液 (3:7) 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.04 mg 的溶液, 同法测定。按外标法以峰面积计算, 即得。

2.2.2 线性试验

二苯基-(2-氯苯基)甲醇 精密

称取二苯基-(2-氯苯基)甲醇对照品 0.010 19 g 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇-水溶液 (7:3) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量, 用甲醇-水 (7:3) 溶液制成每 1 mL 含 10.19, 5.095, 2.548, 2.038, 1.274, 1.019, 0.815, 2.05095, 0.2548 μ g 的溶液。分别精密量取上述溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度为横坐标 x , 峰面积为纵坐标 y , 绘制标准曲线图, 计算回归方程: $y = 68.91x + 0.386$ $r = 0.9999$, 表明二苯基-(2-氯苯基)甲醇进样量在 $5.096 \times 10^{-3} \sim 0.2038$ μ g 间的线性良好。

克霉唑 精密称取克霉唑对照品 0.010 62 g 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇-水溶液 (7:3) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量, 用甲醇-水溶液 (7:3) 制成每 1 mL 含 10.62, 21.24, 42.48, 63.72, 84.96, 106.2 μ g 的溶液。分别精密量取上述溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度为横坐标 x , 峰面积为纵坐标 y , 绘制标准曲线图, 计算回归方程: $y = 36.872496.796774x + 5.250.211872$ $r = 0.9999$, 表明克霉唑进样量在 0.1062~1.062 μ g 间的线性关系良好。

2.2.3 进样精密密度试验

二苯基-(2-氯苯基)甲醇: 取加样回收率试验项下一份供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得峰面积 RSD 为 0.23%; 克霉唑: 取重复性试验项下供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得峰面积 RSD 为 0.058%。表明本法精密密度良好。

2.2.4 稳定性试验

二苯基-(2-氯苯基)甲醇: 取回收率试验项下一份供试品溶液分别于 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7, 8, 10 h 进样测定, 峰面积的 RSD 为 1.26%; 克霉唑: 取重复性试验项下供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 h 进样测定, 峰面积 RSD 为 0.35%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.5 加样回收率试验

二苯基-(2-氯苯基)甲醇: 取已知杂质含量的样品适量 (相当于克霉唑约 10 mg), 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 加水-甲醇溶液 (3:7), 置 50 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min, 取出, 强烈振摇 5 min, 迅速放冷至室温, 精密加入 21.88 mg \cdot L⁻¹ 的二苯基-(2-氯苯基)甲醇对照品溶液 4.5, 6 mL, 各 3 份 (80%, 100% 和 120%), 摇匀, 照 2.2.1 项下的方法制备供试品和对照品溶液, 按外标法以峰面积计算回收率 ($n = 9$) 为 99.15%, RSD 为 0.79%。

克霉唑: 取已知杂质含量的样品适量 (相当于

克霉唑约 20 mg, 10 mg), 精密称定, 置 200 mL (80%) 和 100 mL 量瓶 (100%、120%) 中, 精密称取克霉唑对照品适量 (80%、100% 和 120%) 置于其中, 照 2.2.1 项下的方法制备供试品和对照品溶液, 按外标法以峰面积计算回收率 ($n = 9$) 为 100.69%, RSD 为 0.66%。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品适量 (相当于克霉唑 10 mg), 共 6 份, 精密称定, 照 2.2.1 项下的方法制备供试品和对照品溶液, 按外标法以峰面积计算, 克霉唑的含量 ($n = 6$) 为 100.24%, RSD 为 0.27%。

2.3 样品含量的测定 (滴定法与 HPLC 法比较)

见表 2。

表 2 滴定法与 HPLC 法克霉唑含量结果比较

生产厂家	批号	HPLC 法		滴定法
		二苯基-(2-氯苯基)甲醇 /%	克霉唑 /%	(克霉唑) /%
厂家 1	070801	0.126	100.50	100.09
	071101	0.180	100.34	99.78
	080108	0.107	100.24	99.02
厂家 2	070901	0.394	98.21	96.07°
厂家 3	20071101	0.587	96.79	96.00
厂家 4	370606	0.117	99.58	97.63°
厂家 5	08022001	0.891	99.86	96.24°
	08022002	0.854	99.82	96.55°
	08022003	0.882	100.04	96.70°

注: 带“*”者为样品处理时样品与容器壁存在明显附着现象的样品。

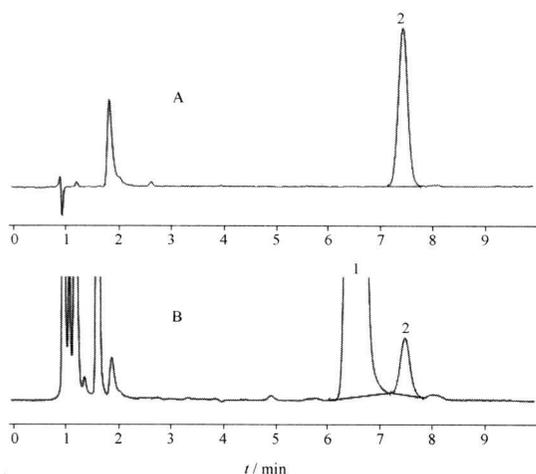


图 4 二苯基-(2-氯苯基)甲醇含量测定色谱图
A. 对照品; B. 供试品; 1. 克霉唑; 2. 二苯基-(2-氯苯基)甲醇

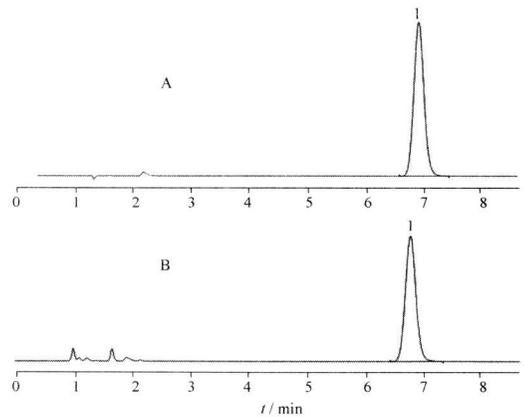


图 5 克霉唑含量测定供试品色谱图
A. 对照品; B. 供试品; 1. 克霉唑; 2. 二苯基-(2-氯苯基)甲醇

3 讨论

3.1 流动相的 pH 值越小, 二苯基-(2-氯苯基)甲醇和克霉唑的分离度越大, 同时保留时间变短, 但是克霉唑主峰和氧化杂质不易分离, 因此流动相的 pH 值在 5.7~5.8 最为适宜, 此时克霉唑主峰与二苯基-(2-氯苯基)甲醇峰和氧化杂质均能较好分离。

3.2 HPLC 法的方法学研究表明本方法精密度高、专属性强, 操作简便。由于二苯基-(2-氯苯基)甲醇含量很低 (在 1.0% 以内), 因此其重复性的 RSD 稍稍偏大, 但每次测定值的绝对差值是很小的, 能够满足检测要求。

3.3 各个生产厂家所采用的处方辅料差异较大, 且都未提供空白辅料。厂家 1 生产的样品相对而言辅料种类最多, 因此在进行回收试验时, 采用厂家 1 的样品 (批号 070801) 进行加样回收试验。

3.4 两种测定方法结果的比较 采取滴定法进行含量测定不仅操作复杂, 而且滴定终点易过。从表 2 可知, 滴定法的结果偏低, 特别是样品与容器壁附着明显时, 测得结果明显偏低, 可见滴定法存在明显的系统误差和偶然误差。

参考文献

[1] 国家药典委员会编. 《中国药典》. 2005 年版二部 [S]. 2005 236.
 [2] 《美国药典》. 30 [S]. 2008 1807.
 [3] 《英国药典》. 2008 [S]. 电子版.
 [4] 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]. 华西医学杂志. 2007, 22(4): 443-445.