

RP-HPLC测定醋酸氟轻松的有关物质及其含量

赵喆, 唐素芳

(天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 测定醋酸氟轻松的有关物质和含量。方法: 色谱柱: Sepax Sapphire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-乙腈-水 (60:10:30), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 240 nm, 进样量: 20 μL。结果: 醋酸氟轻松有关物质线性范围为 0.0693~4.156 μg·mL⁻¹ (r=0.9992), 杂质限度范围为 0.05%~3.0%, 最低检测限为 0.6 ng (0.02%); 含量测定线性范围为 5.05~50.5 μg·mL⁻¹ (r=0.9999)。结论: 本方法准确、简便、快速, 可满足醋酸氟轻松的有关物质和含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 醋酸氟轻松; 有关物质; 含量

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2137-04

RP-HPLC determination of fluocinonide and its related substances

ZHAO Zhe, TANG Su-fang

(Tianjin Institute for Drug Control Tianjin 300070 China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of the fluocinonide and its related substances. **Method** The chromatographic column was Sepax Sapphire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-water (60:10:30) at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength was 240 nm and the injected volume was 20 μL. **Results** The linear range of the related substances was 0.0693-4.156 μg·mL⁻¹ (r=0.9992), the detection limit was 0.6 ng (0.02%), the linear range of the assay was 5.05-50.5 μg·mL⁻¹ (r=0.9999). **Conclusion** The method is simple, rapid, specific and accurate.

Key words HPLC; fluocinonide; related substances; content

醋酸氟轻松为肾上腺皮质激素药物, 主要用于治疗过敏性皮炎、神经性皮炎、接触性皮炎等皮肤常见病^[1]。醋酸氟轻松各国药典均有收载, 有关物质检查中国药典 2005^[2]采用 TLC 方法, 国外药典中除 USP 31^[3]版采用 HPLC 法外 (乙腈-水色谱系统), BP 2008^[4]及 JP15^[5]均采用 TLC 法。为提高检测方法的灵敏度, 本文采用甲醇-水色谱系统, 对本品的杂质情况进行了研究, 建立了 HPLC 测定醋酸氟轻松的有关物质的方法, 并根据专属性试验考察结果, 增加了系统适用性试验, 完善了 2005 年版中国药典的色谱系统条件, 并且将含量测定方法由内标法修订为外标法, 简化了操作, 结果准确、可靠。此项研究为 2010 年版中国药典该品种的修订提供了依据, 本文建立的方法将收载于中国药典 2010 年版。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪 (日本岛津), 包括 LC-

10AT 泵, SPD-10A 二极管阵列检测器, Class-VP 色谱工作站。醋酸氟轻松对照品由中国药品生物制品检定所提供 (批号为 100010-200507), 醋酸氟轻松原料由天津太平洋制药有限公司提供 (批号为 070202, CF080101, CF080401)。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Sepax Sapphire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-乙腈-水 (60:10:30), 调节流速使醋酸氟轻松峰的保留时间约为 12 min, 检测波长 240 nm。量取 20 μL 注入液相色谱仪, 醋酸氟轻松与杂质 (相对保留时间为 0.59) 的分离度应大于 10.0。在上述色谱条件下, 基线稳定, 主峰与各杂质峰分离良好, 理论板数按醋酸氟轻松峰计算为 12000 左右, 全部杂质峰的保留时间均在 20

min 以内, 2.5 倍主峰保留时间后基本无杂质, 表明该色谱系统基本满足醋酸氟轻松的杂质分析。

2.2 对照品溶液的制备 取醋酸氟轻松对照品约 14 mg 置锥形瓶中, 加甲醇 60 mL、乙腈 10 mL 溶解, 置水浴上加热回流 20 min, 放冷, 转移至 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 方法专属性

2.3.1 破坏试验 取本品, 加甲醇溶解并制成 $1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为储备溶液, 分别量取 5 mL, 进行如下处理。酸破坏: 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 2 mL, 水浴加热 10 min, 放冷, 用氢氧化钠试液调至 pH 为中性, 用流动相稀释至 50 mL。碱破坏: 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 0.1 mL, 水浴加热 5 min, 放冷, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调至 pH 为中性, 用流动相稀释至 50 mL。氧化破坏: 加 10% 过氧化氢溶液 2 mL, 水浴加热 5 min, 放冷, 用流动相稀释至 50 mL。高温破坏: 加流动相 5 mL, 水浴加热 40 min, 放冷, 用流动相稀释至 50 mL。光照破坏: 取供试品溶液 ($0.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 日光照射 6 d, 分别取上述 5 种溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 结果表明在上述苛刻的试验条件下, 供试品溶液检出杂质峰的个数与杂质的量均有不同程度的增加, 特别是相对保留时间约为 0.59 的杂质峰在不同的破坏条件下均有明显的增加, 色谱图中主峰与各杂质峰的分离度均良好, 说明本法的专属性较好 (见图 1)。

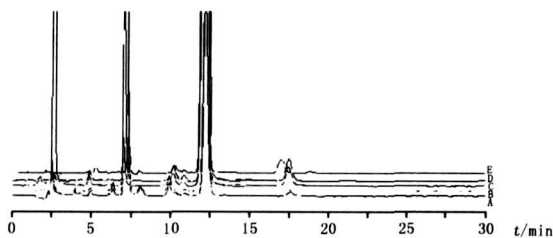


图 1 酸破坏 (A)、碱破坏 (B)、氧化破坏 (C)、热破坏 (D) 及光照破坏 (E) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of destroyed by HCl (A), destroyed by NaOH (B), destroyed by H_2O_2 (C), destroyed by heat (D) and destroyed under strong light (E)

2.3.2 系统适用性试验 量取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项色谱条件测定, 在记录的色谱图中, 主峰的保留时间约为 11.8 min, 在杂质峰中, 保留时间约为 7.0 min (相对保留时间为 0.59) 杂质峰增加明显, 二者的分离度为 10.9, 再取供试品 3 份, 同法操作, 均得到相同的结果。经分析, 该降解杂质可能为氟轻松, 因在国内外均未找到氟轻松的生产商和供应商, 无法进行结构确定。故

采用高温降解法来制备系统适用性溶液, 以便更有效地检出杂质, 同时完善了现版药典标准的色谱系统, 并且将含量测定的方法由内标法修订为外标法, 简化了操作程序 (见图 2)。

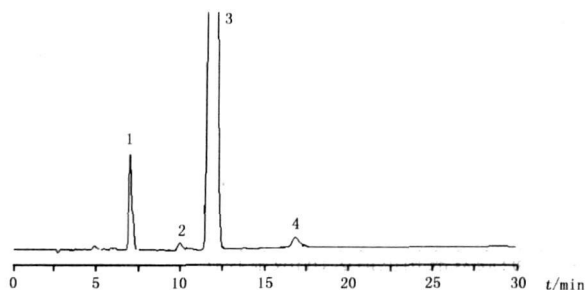


图 2 专属性试验色谱图

Fig 2 Chromatogram of specific test

1. 杂质 1 (impurity 1) 2. 杂质 2 (impurity 2) 3. 醋酸氟轻松 (fluocinonide) 4. 杂质 3 (impurity 3)

2.3.3 杂质的限度 现版药典采用 TLC 法测定杂质, 限度为 2%, 根据国外药典及目前国内杂质检测的要求, 拟定标准中规定最大单一杂质不得过 1.0%, 其他单一杂质不得过 0.5%, 杂质总量不得过 2.0%。

2.4 线性关系

2.4.1 有关物质 精密量取对照品溶液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液; 精密量取适量, 分别加流动相稀释制成浓度为 0.07, 0.14, 0.28, 0.7, 1.4, 2.8 和 $4.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 分别精密量取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项色谱条件测定, 记录色谱图; 以对照品溶液的浓度为横坐标 (C), 以峰面积为纵坐标 (A), 进行线性回归。线性方程为:

$$A = 3.86 \times 10^4 C + 6.45 \times 10^2 \quad r = 0.9992 (n = 7)$$

结果表明, 醋酸氟轻松在 $0.0693 \sim 4.156 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 相应色谱峰面积与其浓度呈良好的线性关系 (对应杂质限度范围为 0.05% ~ 3.0%)。

2.4.2 含量测定 分别精密量取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 8.0, 10.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 $5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列溶液, 分别精密量取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 以对照品溶液的浓度为横坐标 (C), 以峰面积为纵坐标 (A), 进行线性回归。线性方程为:

$$A = 3.70 \times 10^4 C - 1.09 \times 10^3 \quad r = 0.9999 (n = 7)$$

结果表明, 醋酸氟轻松在 $5.05 \sim 50.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 相应色谱峰面积与其浓度呈良好的线性关系。

2.5 最低检出限 取有关物质线性关系项下的稀

溶液,用流动相逐级稀释,进样测定, $SN = 3$ 时,醋酸氟轻松的最低检出量为 0.6 ng (0.02%)。为增强质量标准的可操作性,在拟定标准中规定检出限以下的色谱峰面积可忽略不计。

2.6 进样精密度 取“3.1”项下醋酸氟轻松 1% 对照溶液连续进样 6 针,按醋酸氟轻松峰面积计算 RSD 为 0.2%。取“3.2”项下醋酸氟轻松对照品溶液连续进样 6 针,按醋酸氟轻松峰面积计算 RSD 为 0.5%。

2.7 重复性试验

2.7.1 有关物质 取样品 6 份,精密称定,照“3.1”项下方法配制供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件测定,计算,结果单一最大杂质平均为 0.92% ($n = 6$), RSD 为 3.8%; 杂质总量平均为 1.6% ($n = 6$), RSD 为 3.2%, 具有良好重复性。

2.7.2 含量测定 取样品 6 份,精密称定,照“3.2”项下方法配制供试品溶液 6 份,按“2.1”项下色谱条件测定,计算,醋酸氟轻松含量平均为 100.2% ($n = 6$), RSD 为 0.8%, 具有良好重复性。

2.8 稳定性试验 取“3.1”项下的对照溶液和供试品溶液分别在 0 6 12 18 24 h 进样测定,考察对照溶液的峰面积和杂质量的稳定性,结果表明对照溶液在 24 h 内基本稳定,醋酸氟轻松峰面积的 RSD 为 1.5%, 供试品溶液在 24 h 内杂质个数没有增加,最大单一杂质的量基本稳定(相对保留时间 1.42 杂质 3),但相对保留时间 0.59 的杂质(杂质 1)量逐渐增大,相对保留时间 0.89 的杂质(杂质 2)量逐渐减小,杂质总量也在逐渐增加,表明供试品溶液在放置过程中杂质量逐渐增大(见图 2),故在拟定标准中规定供试液应临用现配。取“3.2”项下的对照品溶液和供试品溶液分别在 0, 4, 8, 24 h 进样测定,结果表明对照品溶液和供试品溶液在 24 h 内基本稳定,醋酸氟轻松峰面积的 RSD 均为 0.5%。

2.9 粗放度试验

方法 1: Sepax Sapphire C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 新柱; 方法 2 Sepax Sapphire C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 旧柱; 方法 3 Agilent Extend C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)。结果见表 1。

上述结果表明,采用不同的色谱柱测定,杂质个数有 1~2 个差别,是由于不同色谱柱的最小检出限不同,多检出的杂质均在检出限附近,但对杂质总量的测定结果没有影响;总体看,3 批样品在不同的色谱柱上有关物质和含量测定的结果基本一致,表明本方法的粗放度较好,适用于不同型号的 C_{18} 色谱柱。

表 1 粗放度试验结果 (% , $n = 3$)

Tab 1 The results of feasibility

方法 (method number)	批号 (Lot No)	杂质个数 (numbers of impurities)	最大杂质 (the biggest impurity)	杂质总量 (total impurities)	含量 (content)
1	070201	6	0.95	1.6	99.5
	CF080101	5	0.94	1.5	99.9
	CF080401	7	0.40	1.0	100.6
2	070201	6	0.91	1.6	98.9
	CF080101	5	0.92	1.5	99.5
	CF080401	8	0.41	0.9	100.0
3	070201	7	0.81	1.6	99.2
	CF080101	7	0.84	1.8	100.1
	CF080401	8	0.48	0.9	99.9

3 样品测定

3.1 有关物质 取本品 14 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 60 mL 与乙腈 10 mL 使溶解,用水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液(临用现配);精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。照“2.1”项下的色谱条件,量取对照溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10%~20%,再精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2.5 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,最大单一杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积 (1.0%),其他单一杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 1/2 (0.5%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍 (2.0%) (供试品溶液中任何小于对照溶液主峰面积 0.02 倍的色谱峰可忽略不计)。按上述方法测定 3 批样品,检验结果均符合规定,见表 2 并将测定结果与 USP31 版测定方法进行比较。色谱图见图 3。

表 2 3 批样品有关物质测定结果 (% , $n = 3$)

Tab 2 Results of related substances of samples

批号 (Lot No)	杂质个数 (numbers of impurities)		最大杂质 (the biggest impurity)		杂质总量 (total impurities)	
	本法	USP	本法	USP	本法	USP
	(this method)		(this method)		(this method)	
070202	6	8	0.95	0.95	1.6	1.7
CF080101	6	4	0.94	0.93	1.5	1.6
CF080401	7	8	0.40	0.33	1.0	0.8

上述结果表明,两种方法测定结果基本一致,色谱行为也大致相同。

3.2 含量测定 取本品 14 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 60 mL 与乙腈 10 mL 使溶解,用

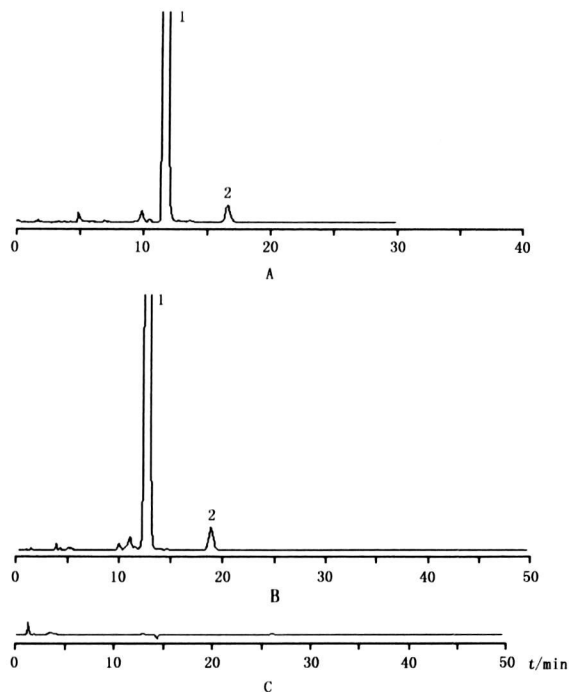


图3 样品有关物质色谱图

Fig 3 Chromatograms of reference substances in sample

A. 本法测定 (this method) B USP C 溶剂 (solvent by this method)

1. 醋酸氟轻松 (fluocinonide) 2 最大单一杂质 (the biggest impurity)

水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取该溶液 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 照“2.1”项下的色谱条件, 取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取醋酸氟轻松对照品适量, 精密称定, 同法测定。按外标法以峰面积计算, 即得。按上述方法测定 3 批样品, 检验结果均符合规定, 见表 3, 并将测定结果与中国药典 2005 年版测定方法进行比较。

表 3 3 批样品含量测定结果 (% , $n = 3$)

Tab 3 Results of determination of samples

批号 (Lot No)	本法 (this method)	ChP2005
070201	99.5	98.9
CF080101	99.9	98.2
CF080401	100.6	99.5

4 讨论

4.1 检测波长的选择 经对醋酸氟轻松破坏试验得到的溶液进行 DAD 检测, 其降解杂质的最大吸收波长均在 240 nm 左右, 与醋酸氟轻松的最大吸收波长基本一致, 故将测定波长确定为 240 nm。

4.2 色谱系统的选择 参考醋酸氟轻松含量测定项下的色谱条件, 选用甲醇-水系统测定有关物质, 与含量测定方法一致, 简化实验操作程序。

4.3 中国药典 2005 年版比较 按照中国药典 2005 二部 TLC 法检验 3 批样品, 结果 3 批样品均仅检出 1 个杂质 (R_f 值约为 0.26), 颜色浅于对照溶液主斑点; 而拟定有关物质检查法采用灵敏度较高的 HPLC 法, 不仅杂质检出的个数多 (6~7 个), 而且各杂质质量能较为准确的测定, 明显优于原方法。

4.4 供试品的溶解 醋酸氟轻松的溶解过程必须先加入有机相 (按照流动相组成比例) 溶解后, 再加水稀释至刻度, 直接加入流动相则不能完全溶解。

4.5 结语 本文建立的方法同样适用于醋酸氟轻松乳膏剂的含量测定, 经采用收集到的 4 个生产企业的 8 批样品验证, 结果满意, 与原方法测定结果基本一致, 简化了操作程序, 克服了原方法^[3] 色谱系统中含有乙醚造成的对主峰保留时间的影响, 优于原方法。

参考文献

- 1 New Edition Pharmacology (新编药理学). 14th Ed (第 14 版). Beijing (北京): People Health Publishing House (人民卫生出版社). 1997: 427
- 2 ChP (中国药典). 2005. Vol III (二部): 848
- 3 USP. 31. 2187
- 4 BP 2008. 934
- 5 JP. XV. 672

(本文于 2009 年 7 月 17 日修改回)