

## 克霉唑乳膏中有关物质的定性与定量分析

杨晓梅<sup>1</sup>, 梁勇坤<sup>2</sup>, 余良钟<sup>2</sup>, 杨文玲<sup>1</sup>, 马海播<sup>1</sup>, 穆菁青<sup>1</sup>,  
王瑞珣<sup>1</sup>, 李清<sup>1</sup>, 刘然<sup>1</sup>, 毕开顺<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 2. 广东华润顺峰药业有限公司, 广东 佛山 528300)

**摘要:** 为了对克霉唑乳膏中的有关物质进行定性与定量分析, 采用 HPLC-Q-TOF 串联质谱系统对克霉唑乳膏中有关物质裂解途径进行分析并鉴定其结构。采用对照品对照和文献数据比对, 初步鉴定了 5 个克霉唑的有关物质, 根据《英国药典》(2018) 记载的该品种杂质名称, 分别为杂质 A [二苯基-(2-氯苯基)甲醇]、杂质 B (对-克霉唑异构体)、杂质 E (2-氯二苯甲酮)、杂质 F (*N*-三苯甲基咪唑) 和首次在该制剂中鉴定的杂质 4 [9-(2-氯苯基)芴], 并在克霉唑乳膏抽样中检出 4 个杂质, 未检出杂质 E。建立了 HPLC 法对克霉唑乳膏中的有关物质进行定量研究, 采用 Agilent Poroshell Bonuns RP 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 以磷酸氢二钾为流动相 A、乙腈为流动相 B, 进行梯度洗脱, 柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 215 nm, 该色谱条件下杂质 A、B、E、F 分离度满足分析要求, 杂质 A、B、E、F 分别在 0.20~10.02、0.20~10.00、0.20~10.10 和 0.10~5.01 μg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好 ( $r=0.9997$ 、 $r=1.0000$ 、 $r=1.0000$ 、 $r=0.9999$ ), 平均回收率分别为 94.3%、95.0%、100.0% 和 99.6%, RSD 分别为 2.8%、2.2%、1.1% 和 2.7% ( $n=9$ ), 定量限分别为 200.4、200.0、202.0 和 100.2 ng·mL<sup>-1</sup>, 检测限分别为 57.25、57.14、57.71 和 28.63 ng·mL<sup>-1</sup>, 建立的 HPLC 方法简便、准确、快速, 能同时测定克霉唑乳膏中的有关物质, 可有效对其质量进行控制。

**关键词:** 克霉唑乳膏; HPLC 法; 有关物质; 结构鉴定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2093-06

## Qualitative and quantitative analysis of related substances in clotrimazole cream

YANG Xiao-mei<sup>1</sup>, LIANG Yong-kun<sup>2</sup>, YU Liang-zhong<sup>2</sup>, YANG Wen-ling<sup>1</sup>, MA Hai-bo<sup>1</sup>,  
MU Jing-qing<sup>1</sup>, WANG Rui-xun<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, LIU Ran<sup>1</sup>, BI Kai-shun<sup>1\*</sup>

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Guangdong China Resources Shunfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Foshan 528300, China )

**Abstract:** For qualitative and quantitative analysis of related substances in clotrimazole cream, HPLC-Q-TOF spectrometer was used to analyze the fragmentation pathways and identify structures of the related substances. Five related substances named by BP (2018) were identified as impurity A ((2-chlorophenyl)-diphenylmethanol), impurity B (*para*-clotrimazole isomer), impurity E (2-chlorobenzophenone), impurity F (1-tritylimidazole) and impurity 4 (9-(2-chlorophenyl)-fluorene), respectively, by using impurity references matching and comparison with the literature data. Four related substances were detected in clotrimazole cream except impurity E, and 9-(2-chlorophenyl)-fluorene is the first identified impurity in this preparation. To establish an HPLC method

收稿日期: 2018-06-11; 修回日期: 2018-08-05.

基金项目: 辽宁省特聘教授 (2017 年) 课题.

\*通讯作者 Tel: 86-24-43520589, E-mail: kaishunbi.syphu@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0545

for determination of the related substances in Clotrimazole Cream, the Agilent Poroshell Bonuns RP column was used (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) with UV detection at 215 nm. The mobile phase was acetonitrile-10 mmol·L<sup>-1</sup> dipotassium phosphate buffer (adjusted with phosphoric acid to pH of 5.80) with a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. Gradient elution was used. The column temperature was maintained at 40 °C. A good linear behavior was achieved between component's concentrations and peak area for impurity A, B, E, F within the range of 0.20–10.02 μg·mL<sup>-1</sup>, 0.20–10.00 μg·mL<sup>-1</sup>, 0.20–10.10 μg·mL<sup>-1</sup>, 0.10–5.01 μg·mL<sup>-1</sup> with the correlation coefficients were 0.999 7, 1.000 0, 1.000 0, 0.999 9, respectively. The average recoveries were 94.3%, 95.0%, 100.0%, 99.6% with RSDs were 2.8%, 2.2%, 1.1%, 2.7%, respectively (*n* = 9). LOQ were 200.4, 200.0, 202.0, 100.2 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively. LOD were 57.25, 57.14, 57.71, 28.63 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively. The developed method was simple, rapid, accurate and effective for testing related substances in clotrimazole cream to control its quality, ensuring the safety of clinical medication.

**Key words:** clotrimazole cream; HPLC; related substances; structure identification

克霉唑 (clotrimazole) 化学名为二苯基-1-咪唑基甲醇, 是上个世纪 60 年代末德国拜耳中央研究所开发的一种咪唑类广谱抗真菌药物, 临床广泛用于多种真菌尤其是白色念珠菌感染的治疗<sup>[1]</sup>。《中国药典》(2015)、《英国药典》(2018)、《美国药典 40-国家处方集 35》均收录了克霉唑乳膏剂, 但《中国药典》(2015)、《英国药典》(2018) 仅对克霉唑乳膏中有关物质 A 作限量检测, 而《美国药典 40-国家处方集 35》并未对其有关物质进行检查<sup>[2–4]</sup>。根据生产工艺可知克霉唑乳膏除有关物质 A 外, 还可能产生其他有关物质, 但现有各国药典和相关文献<sup>[5–9]</sup>均未对克霉唑乳膏中其他杂质进行控制。故本研究建立了 HPLC-Q-TOF 质谱法对克霉唑乳膏中的有关物质进行初步鉴定, 并采用 HPLC 法对鉴定的有关物质进行含量测定, 以完善其现有的质量控制方法。

## 材料与方法

**仪器** TGL-16 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), Agilent 1260 HPLC (VWD) (安捷伦科技有限公司), Agilent 1260 HPLC (DAD) (安捷伦科技有限公司), TripleTOF<sup>TM</sup>5600<sup>+</sup> 四极杆-飞行时间串联质谱系统 (美国 Sciex 公司)。

**试剂与试剂** 杂质 A 对照品 [二苯基-(2-氯苯基)甲醇, 纯度 100.0%, 100019-200603, 中国食品药品检定研究院], 杂质 B 对照品 (对-克霉唑异构体, 纯度 99.1%, 1735-012A1, TLC Pharmaceutical Standards Ltd.), 杂质 E 对照品 (2-氯二苯甲酮, 纯度 100.0%, P500183, 西格玛奥德里奇有限公司), 杂质 F 对照品 [1-(三苯基甲基)-1*H*-咪唑, 纯度 98.0%, 3-DXX-47-1, Toronto Research Chemical], 克霉唑对照品 (纯度 100.0%, 100037-200306, 中国食品药品检定研究院), 克霉唑乳膏 (规格 50 mg/5 g, 20170401, 广东华润顺

峰药业), 空白乳膏 (20170401, 广东华润顺峰药业)。

磷酸氢二钾 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司), 磷酸 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, 西格玛奥德里奇有限公司), 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 盐酸 (分析纯, 天津凯信化学工业有限公司), 氢氧化钠 (分析纯, 天津市博迪化工有限公司), 过氧化氢 (分析纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂)。

**色谱条件** 色谱柱: Agilent Poroshell Bonuns RP (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相 A: 10 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾 (pH 5.80), 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序 (0~10 min, 69% A; 10~12 min, 69%~58% A; 12~32 min, 58%~57% A; 32~45 min, 57%~32% A); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 10 μL; 检测波长: 215 nm; 柱温: 40 °C。

**质谱条件** 采用电喷雾离子源 (ESI), 前级离子高分辨全扫描-信息关联采集-碎片离子高分辨扫描 (TOF MS-IDA-MS/MS) 模式, 动态背景扣除 (DBS) 功能 IDA 触发 MS/MS 扫描的条件, 以排除噪音, 保证低水平化合物的 MS/MS 图谱采集。正离子模式进行采集。每个 1 050 ms 的 IDA 循环包括一个 200 ms 的 TOF MS 扫描 (Experiment 1) 和 8 个 100 ms 的 TOF MS/MS 扫描 (Experiment 2~9), 每个一级全扫描循环后, 对质谱峰强度超过 100 cps 的 8 个前级离子进行碰撞诱导解离 (CID), 一次进样同时获得高分辨的 TOF MS 和 TOF MS/MS 数据; 4 Da 内的同位素离子峰被自动排除; 最小质量差异 (mass tolerance): 50 mDa; 雾化气和其他辅助气体均为氮气。

离子源参数如下: 离子喷雾电压: 5.5 kV (正离子); 离子源温度: 550 °C; 雾化气 (N<sub>2</sub>) 压力: 0.34 MPa; 辅助气 (N<sub>2</sub>) 压力: 0.34 MPa; 气帘气 (N<sub>2</sub>) 压力: 0.21 MPa; TOF MS 模式下扫描范围为 100~1 000 Da;

去簇电压 (DP): 100 V; 碰撞能 (CE): (35 ± 15) V; TOF MS/MS 模式下扫描范围为 100~1000 Da; 去簇电压 (DP): 100 V; 碰撞能 (CE): (35 ± 15) V; 碰撞能量散步 (CES): 15 V, 每次测定样品之前, 采用调谐液进行质量轴校准。

**HPLC 色谱柱:** Agilent Poroshell Bonuns RP (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相 A: 10 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵 (pH 5.80), 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序 (0~10 min, 69% A; 15~25 min, 69%~55% A; 25~40 min, 55%~52% A; 40~60 min, 52%~40% A); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 10 μL; 检测波长: 215 nm; 柱温: 40 °C。

**溶液配制** 供试品溶液: 取克霉唑乳膏适量 (约相当克霉唑 20 mg), 精密称定, 置 25 mL 烧杯中, 加入乙腈 10 mL, 用玻璃棒研磨至均一状态, 于 50 °C 水浴中溶解, 转移至 25 mL 量瓶内, 放冷至室温, 乙腈定容至刻度, 摇匀。取适量溶液冷冻离心, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得相当于克霉唑 800 μg·mL<sup>-1</sup> 供试品溶液, 取续滤液进样。

空白乳膏溶液: 取空白乳膏, 按供试品溶液制备方法即得空白乳膏溶液。

混合杂质对照品溶液: 分别取克霉唑有关物质 A、B、E、F 对照品适量, 精密称定, 加乙腈制成约 500 μg·mL<sup>-1</sup> 各杂质对照品储备液。分别精密量取有关物质对照品储备液 A、B、E 各 2 mL 和 F 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加乙腈稀释并定容至刻度, 摇匀, 作为混合杂质对照品储备液。精密量取混合杂质对照品储备液 2.5 mL 至 50 mL 量瓶中加乙腈稀释并定容至刻度, 摇匀, 得混合杂质对照溶液。

系统适用性溶液: 取克霉唑对照品适量, 精密称定, 加乙腈制成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的克霉唑对照品储备液。分别精密量取克霉唑储备液 4 mL 和混合杂质对照品储备液 0.1 mL 至 5 mL 量瓶中, 加乙腈稀释并定容至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。

**强制降解实验** 按“溶液配制”项下方法制备样品: ① 酸破坏: 乳膏样品研磨至均一状态后加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 的盐酸 2 mL, 水浴 50 °C 放置 1 h, 加 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠中和; ② 碱破坏: 乳膏样品研磨至均一状态后加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠 1 mL, 水浴 50 °C 放置 1 h, 加 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸中和; ③ 氧化破坏: 乳膏样品研磨至均一状态后加入质量分数为 10% 的过氧化氢溶液 1 mL, 水浴 50 °C 放置 30 min; ④ 高温破坏: 乳膏样品置 110 °C 烘箱中加热 4 h; ⑤ 高湿破坏: 乳膏样品在 25 °C 相对湿度 90% ± 5% 条件下放置

10 天; ⑥ 光照破坏: 乳膏样品在 (4500 ± 500) Lx 条件下放置 10 天。各破坏实验结束后, 样品按“溶液配制”项下自“50 °C 水浴”起操作。

**线性和范围** 分别精密量取混合杂质对照品储备液 0.10、0.25、0.50、1.00、2.50 和 5.00 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈定容, 摇匀, 得系列杂质标准溶液。

**准确度** 取空白乳膏约 2 g, 精密称定, 置 25 mL 烧杯中, 共 9 份, 分别精密加入混合杂质对照品储备液 1.00、1.25、1.50 mL, 按“溶液配制”项下方法每个浓度平行制备 3 份, 作为低、中、高 3 个浓度的供试品溶液。

**精密度** 仪器精密度, 取混合杂质对照品溶液, 重复测定 6 次; 重复性, 按“溶液配制”项下方法配制 6 份供试品溶液, 进样分析。

**耐用性** 分别在流速 (1.0 ± 0.2) mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 (40 ± 5) °C; 流动相 pH (5.80 ± 0.04) 条件下, 取系统适用性实验用溶液进样分析, 考察各杂质峰间的分离度。

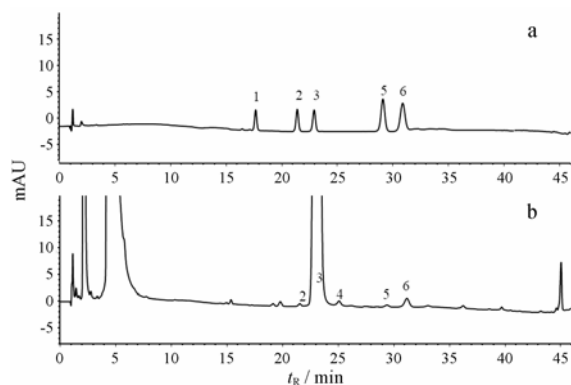
**溶液稳定性** 取供试品溶液, 20 °C 避光放置 0、3、6、8、10、12 和 24 h, 分别取各时间点样品测定。

## 结果

### 1 克霉唑乳膏中有关物质的高分辨质谱鉴定

**1.1 克霉唑乳膏中的有关物质** 按色谱峰保留时间顺序将各化合物编号为 1~6。对克霉唑乳膏供试品进行 HPLC 分析, 结果表明, 克霉唑乳膏中检测到 4 个有关物质, 为编号 2、4、5、6 号峰, 编号 1 号峰为杂质 E, 供试品中未检出, 破坏实验时降解产生, 3 号峰为主药克霉唑 (图 1)。

**1.2 克霉唑乳膏中的有关物质鉴定** 采用液相色谱-

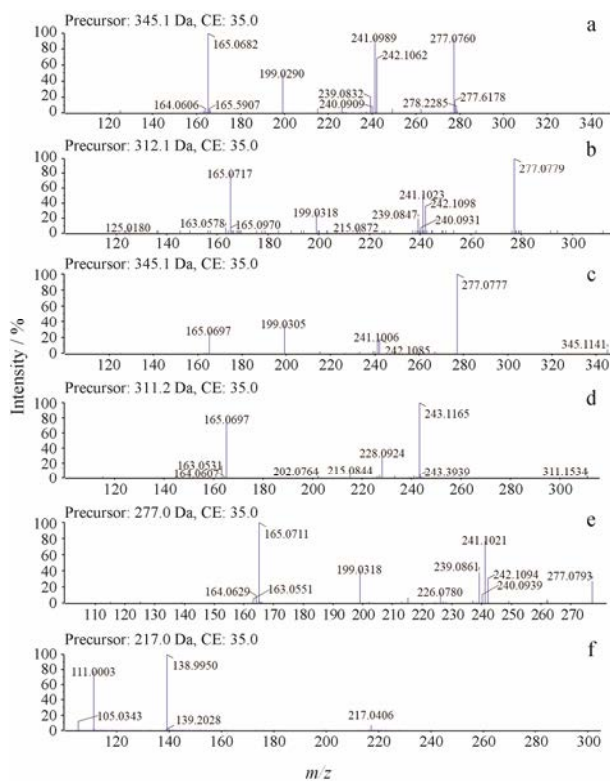


**Figure 1** The HPLC chromatograms of test sample of the mixed reference substances (a) and compound clotrimazole cream (b). 1: Impurity E; 2: Impurity F; 3: Clotrimazole; 4: 9-(2-Chlorophenyl)-fluorene; 5: Impurity B; 6: Impurity A

串联高分辨质谱法对克霉唑及其杂质 A、B、E、F 对照品溶液进行分析, 解析各化合物裂解途径, 总结其裂解规律, 依据文献数据提供的质谱信息初步鉴定了 5 个有关物质, 分别为克霉唑杂质 A、B、E、F 和 9-(2-氯苯基) 芴, 对供试品溶液进行杂质定性分析, 鉴定出 4 个杂质, 未检出杂质 E。5 个杂质和克霉唑的二级质谱图、质谱信息见图 2 和表 1。

克霉唑杂质 A 产生  $m/z$  312.115 0 的  $[M+NH_4]^+$  峰, 杂质 B、F 和 9-(2-氯苯基) 芴分别产生  $m/z$  345.115 3、311.154 2、277.079 3 的  $[M+H]^+$  峰。以上杂质在裂解过程中均产生  $m/z$  241.103 5、199.032 2、165.071 1 的特征碎片离子, 分别由克霉唑母核脱咪唑基, 及进一步脱苯基或氯苯产生, 二级质谱图见图 2 (a)。除以上碎片离子外, 6 号物质  $m/z$  312.115 0 的  $[M+NH_4]^+$  峰脱  $NH_3 \cdot H_2O$  ( $-35$  Da) 产生  $m/z$  277.080 1 碎片离子, 推测 6 号物质是克霉唑杂质 A, 二级质谱图见图 2 (b)。5 号物质  $m/z$  345.115 3 的  $[M+H]^+$  脱  $C_3N_2H_4$  ( $-68$  Da) 产生  $m/z$  277.077 8 的碎片离子, 推测 5 号物质是克霉唑杂质 B, 二级质谱图见图 2 (c)。2 号物质  $m/z$  311.154 2 的  $[M+H]^+$  脱  $C_3N_2H_4$  ( $-68$  Da) 产生  $m/z$  243.116 1 的碎片离子, 或脱  $C_6H_6$  ( $-78$  Da) 产生  $m/z$  233.107 3 的碎片离子, 推测 2 号化合物是克霉唑杂质 F, 二级质谱图见图 2 (d)。4 号物质  $m/z$  277.079 3 的  $[M+H]^+$  脱  $C_6H_6$  ( $-78$  Da) 产生  $m/z$  199.031 8 的碎片离子, 或脱  $HCl$  ( $-36$  Da) 产生  $m/z$  241.102 1 的碎片离子, 推测 4 号物质为 9-(2-氯苯基) 芴, 二级质谱

图见图 2 (e)。1 号物质  $m/z$  217.041 4 的  $[M+H]^+$  脱  $-C_6H_6$  ( $-78$  Da) 产生  $m/z$  138.995 4 的碎片离子, 或  $[M+H]^+$  裂解得到  $m/z$  110.999 6 和  $m/z$  105.033 4 的碎片离子, 推测 1 号化合物是克霉唑杂质 E, 二级质谱



**Figure 2** Product ion MS/MS spectrum of clotrimazole (a), impurity A (b), impurity B (c), impurity F (d) and 9-(2-chlorophenyl)-fluorene (e) and impurity E (2-chlorobenzophenone, f)

**Table 1** Identification of chemical constituents of preparations by HPLC-QTOF-MS

Peak No.	$t_R$ /min	Compound	Ion adduction	Formula	Theoretical $m/z$ / Da	Measured $m/z$ / Da	Error ppm	Fragment ions
3	49.09	Clotrimazole	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{17}ClN_2$	345.108 0	345.115 3	1.2	165.071 1 $[C_{13}H_9]^+$ 199.032 2 $[C_{13}H_8Cl]^+$ 241.103 5 $[C_{19}H_{13}]^+$ 277.080 1 $[C_{19}H_{14}Cl]^+$
6	58.11	Impurity A	$[M+NH_4]^+$	$C_{19}H_{15}ClO$	312.081 1	312.115 0	1.4	165.071 1 $[C_{13}H_9]^+$ 199.032 2 $[C_{13}H_8Cl]^+$ 241.103 5 $[C_{19}H_{13}]^+$ 277.080 1 $[C_{19}H_{14}Cl]^+$
5	56.17	Impurity B	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{17}ClN_2$	345.108 0	345.115 3	0.9	165.069 8 $[C_{13}H_9]^+$ 199.030 9 $[C_{13}H_8Cl]^+$ 241.101 2 $[C_{19}H_{13}]^+$ 277.077 8 $[C_{19}H_{14}Cl]^+$
1	41.15	Impurity E	$[M+H]^+$	$C_{13}H_9ClO$	217.034 2	217.041 4	1.2	105.033 4 $[C_7H_5O]^+$ 110.999 6 $[C_6H_4Cl]^+$ 138.994 5 $[C_7H_4ClO]^+$ 217.041 4 $[C_{13}H_{10}ClO]^+$
2	46.31	Impurity F	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{18}N_2$	311.147 0	311.154 2	0.5	165.069 8 $[C_{13}H_9]^+$ 233.107 3 $[C_{16}H_{13}N_2]^+$ 243.116 8 $[C_{19}H_{15}]^+$
4	50.80	9-(2-Chlorophenyl)-fluorene	$[M+H]^+$	$C_{19}H_{13}Cl$	277.080 0	277.079 3	1.3	199.031 8 $[C_{13}H_8Cl]^+$ 165.071 1 $[C_{13}H_9]^+$ 241.102 1 $[C_{19}H_{13}]^+$

图见图 2 (f)。

**1.3 定性结果验证** 根据 HPLC-QTOF-MS/MS 定性结果分析, 初步鉴定了 5 个杂质, 分别为克霉唑杂质 A、B、E、F 和 9-(2-氯苯基) 茚, 通过与对照溶液中各对照品保留时间的进一步比对, 鉴定克霉唑乳膏供试品中 4 个杂质分别为 2 号峰为杂质 F, 5 号峰为杂质 B, 6 号峰为杂质 A, 4 号峰通过相对保留时间初步鉴定为 9-(2-氯苯基) 茚, 未检出杂质 E, 各杂质结构见图 3。

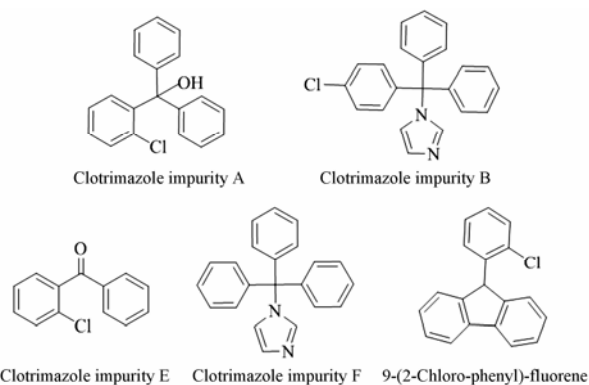


Figure 3 The structure of impurities

## 2 方法学考察

**2.1 系统适用性** 取系统适用性溶液进样分析, 各色谱峰分离度良好, 理论塔板数按克霉唑色谱峰计不低于 4000, 拖尾因子均在 0.80~1.20 之间, 各杂质峰面积 RSD < 2.0% ( $n=6$ ), 重复性及灵敏度均满足分析要求。

**2.2 专属性** 分别取供试品溶液、混合对照品溶液、空白乳膏溶液及强制降解溶液进样分析, 结果表明各待测化合物均分离良好, 空白辅料无干扰, 克霉唑乳膏在酸、碱、氧化条件下不稳定, 各有关物质峰与克霉唑峰均有良好分离, 专属性良好。

**2.3 线性与范围** 杂质 A、B、E、F 分别在 0.20~10.02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9997$ )、0.20~10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=1.0000$ )、0.20~10.10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=1.0000$ )、0.10~5.01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9999$ ) 浓度内与峰面积线性关系良好。

**2.4 检测限与定量限** 杂质 A、B、E、F 定量限分别为 200.4、200.0、202.0 和 100.2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 检测限分别为 57.25、57.14、57.71 和 28.63  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.5 准确度** 杂质 A、B、E、F 回收率均在 90.0%~108.0% 内, RSD% 均 < 3.0%, 方法准确度良好。

**2.6 精密度** 有关物质 A、B、E、F 峰面积 RSD 均 < 2.0% ( $n=6$ ), 仪器精密度良好。供试品中有关物质 E 未检出, 有关物质 A、B、F 含量 RSD 均 < 3.0% ( $n=6$ ),

方法的重复性良好。

**2.7 溶液稳定性** 供试品溶液在 20 °C 避光放置 24 h 内稳定。

## 3 有关物质检查

对 5 批克霉唑乳膏中的有关物质的含量进行测定, 5 批样品中均未检出杂质 E, 以外标法计算克霉唑杂质 A、B、F 含量, 以不加校正因子主成分自身对照法计算杂质 4 含量, 结果见表 2。

Table 2 Results of different batches of samples ( $n=5$ ). “-” not detected

Analytes	Impurity	Impurity	Impurity	Impurity	Impurity
	A/%	B/%	E/%	F/%	4/%
20171101	0.06	0.01	-	0.02	0.04
2017081	0.13	0.02	-	0.01	0.05
2016022	0.22	0.02	-	0.02	0.05
2015062	0.53	0.03	-	0.02	0.05
2015012	0.36	0.02	-	0.03	0.06

## 讨论

《中国药典》(2015) 对克霉唑乳膏中的有关物质检查时, 流动相采用甲醇, 检测波长 215 nm。由于甲醇截止波长为 210 nm, 乙腈截止波长为 190 nm 且洗脱能力较强, 故选择乙腈为流动相。通过考察了不同性能填料的色谱柱: 普通 C18 柱 Agilent zorbax SB C18 (150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、耐 100% 水相的 C18 柱 Agela Venusil MP C18 (150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、耐 100% 水相三封端全多孔填料的色谱柱 Agilent zorbax Bonuns RP (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、耐 100% 水相三封端核壳型高效柱 Agilent poroshell Bonuns RP (100 mm × 4.6 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), 从对称因子、分析时间、分离度等方面对克霉唑乳膏进行综合评价, 最终选择 Agilent poroshell Bonuns RP 色谱柱, 其对克霉唑具有出色的峰形且在较低柱压下能实现快速高效的分离。

根据文献报道, He 等<sup>[10]</sup>对克霉唑阴道片中的杂质 A、B、E 和 F 4 种杂质进行了分离测定, 但其采用了离子对试剂, 而本文所建立的 HPLC 法采用磷酸盐缓冲体系不仅能有效测定分离杂质 A、B、E、F, 且避免了使用离子对试剂时平衡时间长、色谱柱使用寿命短等缺点。

本文分别对在凉暗处储存了 12、24 和 36 个月的样品进行有关物质分析, 由结果可知, 随克霉唑乳膏储存时间的延长, 杂质 A 含量逐渐增加, 未检测到杂质 E, 而杂质 4、B、F 含量未有明显变化。故杂质 A

作为克霉唑乳膏的主要杂质,在质量标准制定中应对其进行限量检查;杂质 B、F 则是克霉唑合成工艺中引入的副产物,应在原料药质量标准制定中对其进行限量检查;杂质 E 在制剂中未检出,但是药品在剧烈破坏条件下可能产生,在样品储存、运输以及药物稳定性研究时应重点检查;杂质 4 是本文首次鉴定的杂质,由于无法购得对照品,采用主成分自身对照法对其进行含量测定,它是克霉唑乳膏制剂制备过程中引入的工艺杂质,在制剂质量标准制定中应对其进行限量检查。本研究通过对克霉唑乳膏中可能存在的有关物质进行分析并建立了其中 5 种有关物质的含量测定方法,为制定克霉唑各杂质限度提供了重要依据,也为完善其质量控制方法奠定基础。

## References

- [1] Yan LL, He BJ, Feng T, et al. Detection and stability analysis of clotrimazole cream [J]. J North Pharm (北方药学), 2017, 14: 6.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 2. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 448.
- [3] The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia/National Formulary [S]. USP40-NF35. The United States Pharmacopoeial Convention, 2017.
- [4] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia [S]. 2018. Vol III. British Pharmacopoeia Commission, 2017.
- [5] Zhou L, Wang BC. Study on related substances and assay method of clotrimazole suppository [J]. China Pharm (中国药业), 2011, 20: 22–24.
- [6] Huo J, Xu XH. RP-HPLC determination of the related substances of clotrimazole suppositories [J]. Sichuan Med J (四川医学), 2010, 31: 1355–1356.
- [7] Zhou L, Zeng T. HPLC determination of the contents and related substances in clotrimazole solution by HPLC [J]. West China J Pharm Sci (华西药科学杂志), 2010, 25: 193–195.
- [8] He D, Yang L. RP-HPLC determination of content and related substances of clotrimazole cream [J]. China J Antibiot (中国抗生素杂志), 2011, 36: 285–387.
- [9] Liu MP, Zhang GZ. RP-HPLC determination of content and related substances of clotrimazole vaginal effervescent tablets [J]. China J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28: 618–621.
- [10] 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 (药学与临床研究), 2016, 24: 315–317.