

HPLC 法测定复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶中盐酸克林霉素有关物质

倪冬胜¹, 左从菊², 李小羿¹, 戴向荣^{1*}

(1. 兆科药业(合肥)有限公司, 合肥 230088; 2. 中国人民解放军陆军炮兵防空兵学院, 合肥 230031)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶中盐酸克林霉素的有关物质。**方法:** 采用 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以磷酸二氢钾溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 在 210 nm 紫外波长条件下进行检测。**结果:** 4 种已知杂质的分离度 (林可霉素 2.88, 克林霉素 B 6.73, 7-差向克林霉素 5.66, 7-表林可霉素 32.05) 和其余未知杂质以及克林霉素的分离度均大于 1.5。**结论:** 本法专属性好, 使复方制剂中的各个辅料与主成分及有关物质实现有效分离, 可以更准确测定复方凝胶中盐酸克林霉素的有关物质。

关键词: 复方凝胶; 阿达帕林; 盐酸克林霉素; 差向克林霉素; 表林可霉素; 杂质测定; 梯度洗脱; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 01-0135-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.01.18

Determination of related substances of clindamycin hydrochloride in compound adapalene and clindamycin hydrochloride gel by HPLC

NI Dong-sheng¹, ZUO Cong-ju², LI Xiao-yi¹, DAI Xiang-rong^{1*}

(1. Zhaoke Pharmaceutical (Hefei) Co., Ltd., Hefei 230088, China;

2. PLA Artillery Air Defense Academy, PLA, Hefei 230031, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of the related substances of clindamycin hydrochloride in compound adapalene and clindamycin hydrochloride gel. **Methods:** C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase consisted of potassium dihydrogen phosphate solution (A) and acetonitrile (B) in gradient elution manner, the flow rate was 0.8 mL · min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 210 nm. **Results:** The resolutions of the four known impurities (lincomycin 2.88, clindamycin B 6.73, 7-epimeric clindamycin 5.66, 7-epi-lincomycin 32.05) and unknown impurities were well separated. The resolutions between the main peak and the peak of impurities were all greater than 1.5. **Conclusion:** The method has good specificity and can effectively separate the auxiliary materials, main component and the related substances in the compound. This method can be used to determine the related substances of clindamycin hydrochloride in the compound gel.

Keywords: compound gel; adapalene; clindamycin hydrochloride; epimeric clindamycin; epi-lincomycin; impurity determination; gradient elution; HPLC

* 通信作者 Tel: (0551) 65310808-8503; E-mail: daixr@leespharm.com

第一作者 Tel: (0551) 65310808-8522; E-mail: nids@leespharm.com

复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶(复方凝胶)主要由阿达帕林、盐酸克林霉素和适宜辅料组成,阿达帕林是一种视黄醇类化合物,具有抑制人类多形核白细胞的化学趋化反应,并可通过抑制花生四烯酸化脂氧化反应转化为炎症媒介物来抑制多形白细胞的代谢,具有溶解粉刺,缓解痤疮的炎性反应;盐酸克林霉素抑制蛋白质合成过程中肽链的延长,从而影响了细菌细胞蛋白质的合成。根据目前已完成的临床试验研究,初步证明阿达帕林的抗皮脂分泌作用和盐酸克林霉素的抗痤疮丙酸杆菌作用^[1],两者配合具有协同作用而达到良好治疗目的,用于治疗寻常性痤疮。

复方制剂中的盐酸克林霉素(*clindamycin hydrochloride*)是抗生素类药物,为林可霉素的衍生物。克林霉素对革兰阳性菌和厌氧菌有良好的抗菌活性,临床供应剂型多样,无需进行皮肤过敏性试验,被广泛应用于临床各科敏感菌引起的各种感染,疗效确切^[2]。

参阅文献,大多采用质谱和梯度洗脱方式对盐酸克林霉素的有关物质进行研究。孙秋实等^[3]对盐酸克林霉素中的有关物质进行了分析研究,包括林可霉素异构体、林可霉素、克林霉素 B、7-表克林霉素、克林霉素异构体及去氢克林霉素;梁键谋等^[4]亦对克林霉素磷酸酯注射剂中林可霉素、克林霉素 B 等杂质进行了分析研究;黄明旺等^[5]对克林霉素主要杂质在合成过程中的形成机理进行研究;王建等^[6]建立全新的 HPLC-UV 梯度洗脱法测定克林霉素棕榈酸酯原料、分散片、颗粒及干混悬剂的有关物质;夏振华等^[7]在流动相体系中不含反离子试剂条件下利用紫外检测器检测,克林霉素、克林霉素 B 及其他杂质得到很好的分离。根据以上调研和本品剂型特征,克林霉素杂质谱中可能含有林可霉素、克林霉素 B、7-差向克林霉素、7-表林可霉素 4 种杂质,由于本品处方组成复杂,考虑采用梯度洗脱方式对杂质进行检测。

本研究在参照中国药典 2015 年版二部中盐酸克林霉素原料研究方法^[8]⁹⁷³和欧洲药典 8.0 版中盐酸克林霉素原料药有关物质检查方法^[9]的基础上,进行大量的实验摸索,重点关注复方制剂中相关的辅料对杂质检测的干扰以及强制降解试验中主药和各杂质的分离情况,最终用 HPLC 梯度洗脱的方法对本品中克林霉素的有关物质进行准确控制。

1 仪器与试药

赛默飞公司戴安 U3000 高效液相色谱仪, PDA-3000 检测器,变色龙工作站(Chromeleon 7.0);安捷伦公司 1120 高效液相色谱仪,可变波长扫描紫外检测器(VWD),EZChrom Compact 3.3.0 工作站;Waters 公司 XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶)。

复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶(兆科药业(合肥)有限公司提供,规格为 5 g:5 mg 阿达帕林与 50 mg 盐酸克林霉素,批号 20140808、20140809、20140810)。克林霉素对照品(中国食品药品检定研究院提供,批号 130422-200705,纯度 86.0%);阿达帕林对照品(USP 提供,批号 20128,纯度 99.7%);林可霉素对照品(EP 提供,批号 L0650000);克林霉素 B 对照品(中国食品药品检定研究院提供,批号 130576-200901,纯度 87.9%);7-差向克林霉素(Toronto Research Chemicals Inc 提供,批号 11-JQW-34-4)。乙腈(TEDIA 公司)为色谱纯;磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司)、氢氧化钾(国药集团化学试剂有限公司)为分析纯;水为自制超纯水。

2 色谱条件

采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以磷酸二氢钾溶液(每 1 mL 中含磷酸二氢钾 6.8 mg,用 5% 的氢氧化钾溶液调节 pH 至 7.5)为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱(0~35 min: B 相 21%; 35~40 min: B 相 21% → 35%; 40~78 min: B 相 35%; 78~79 min: B 相 35% → 21%; 79~90 min: B 相 21%),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL。

3 溶液配制

3.1 溶解溶剂 磷酸二氢钾溶液 - 乙腈(55:45)。

3.2 空白基质溶液 取空白基质 4 g,置 10 mL 量瓶中,加 15% 氯化钠溶液 0.5 mL,振摇至均匀,加溶解溶剂溶解并稀释至刻度,10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得。

3.3 供试品溶液 取本品 4 g(约相当于克林霉素 40 mg),置 10 mL 量瓶中,加 15% 氯化钠溶液 0.5 mL,振摇至均匀,加溶解溶剂溶解并稀释至刻度,10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得。

3.4 林可霉素对照品溶液 取林可霉素对照品适量,精密称定,加溶解溶剂溶解并稀释成每 1 mL 中含 50 μg 的溶液,即得。

3.5 克林霉素 B 对照品溶液 取克林霉素 B 对照品适量,精密称定,加溶解溶剂溶解并稀释成每 1 mL 中含 80 μg 的溶液,即得。

3.6 7-差向克林霉素对照品溶液 取 7-差向克林霉素对照品适量,精密称定,加溶解溶剂溶解并稀释成每 1 mL 中含 50 μg 的溶液,即得。

3.7 7-表林可霉素对照品溶液 取 7-表林可霉素对照品适量,精密称定,加溶解溶剂溶解并稀释成每 1 mL 中含 50 μg 的溶液,即得。

3.8 阿达帕林对照品溶液 取阿达帕林对照品(105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h)适量,精密称定,用四氢呋喃溶解并稀释成每 1 mL 中含 10 μg 的溶液,即得。

4 方法学考察

根据 2015 年版中国药典四部中关于药品质量标准分析方法验证指导原则^{[10]374}的要求,进行了专属性、稳定性、耐用性等方法学验证,进一步确证新开发的复方凝胶中克林霉素有关物质方法的可靠性及准确性。

以中国药典 2015 年版二部中盐酸克林霉素原料有关物质研究方法^{[8]973,974}在分析本品时,发现杂质林可霉素和 7-表林可霉素出峰的时间附近有辅料出峰,因此辅料干扰了已知杂质的检测,所以根据复方制剂中每个原料、辅料的理化性质初步确定了克林霉素有关物质研究方法的优化思路:①通过 HPLC 分析确定在有关物质色谱分析条件下出峰的各个辅料;②根据处方中原料、辅料溶解性差异,通过改变供试品溶液的配制溶剂优化条件;③通过原料、辅料极性差异调整流动相的比例优化条件。通过上述途径,经大量试验摸索最终得出复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶中盐酸克林霉素有关物质检测方法。

4.1 专属性试验 按照“2”项下的色谱条件,分别取流动相、空白基质、对照品(林可霉素、克林霉素 B、7-表林可霉素、7-差向克林霉素、阿达帕林)和复方凝胶样品的溶液进样测定,以考察流动相、空白基质和阿达帕林等是否干扰复方凝胶中盐酸克林霉素有关物质的检查。研究结果表明,阿达帕林和空白基质均不干扰复方凝胶中盐酸克林霉素有关物质的检测;4 种已知杂质林可

霉素、克林霉素 B、7-差向克林霉素、7-表林可霉素和其余的未知杂质以及克林霉素的分离度均大于 1.5;因此,可以证明此方法专属性好。色谱图见图 1。

4.2 强制降解试验 取本品 4 g(约相当于克林霉素 40 mg),分别置 10 mL 量瓶中,加 15% 氯化钠溶液 0.5 mL,振摇至均匀后,进行如下处理:(1)加 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL,放置 0.5 h,用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.5 mL 中和,加溶解溶剂稀释至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得酸破坏溶液;(2)加 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.5 mL,放置 0.5 h,用 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL 中和,加溶解溶剂稀释至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得碱破坏溶液;(3)置 4 500 lx 照度下 0.5 h,加溶解溶剂稀释至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得光照破坏溶液;(4)置 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱 2 h,加溶解溶剂稀释至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得高温破坏溶液;(5)加 3% 过氧化氢溶液 0.5 mL,放置 10 min,加溶解溶剂稀释至刻度,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液过滤,取续滤液即得氧化破坏溶液。将上述 5 种破坏溶液及“3.3”项下未破坏的供试品溶液按“2”项下色谱条件进样测定,结果表明本品在上述条件下的降解产物与主峰完全分离,杂质间分离度良好。色谱图见图 2。

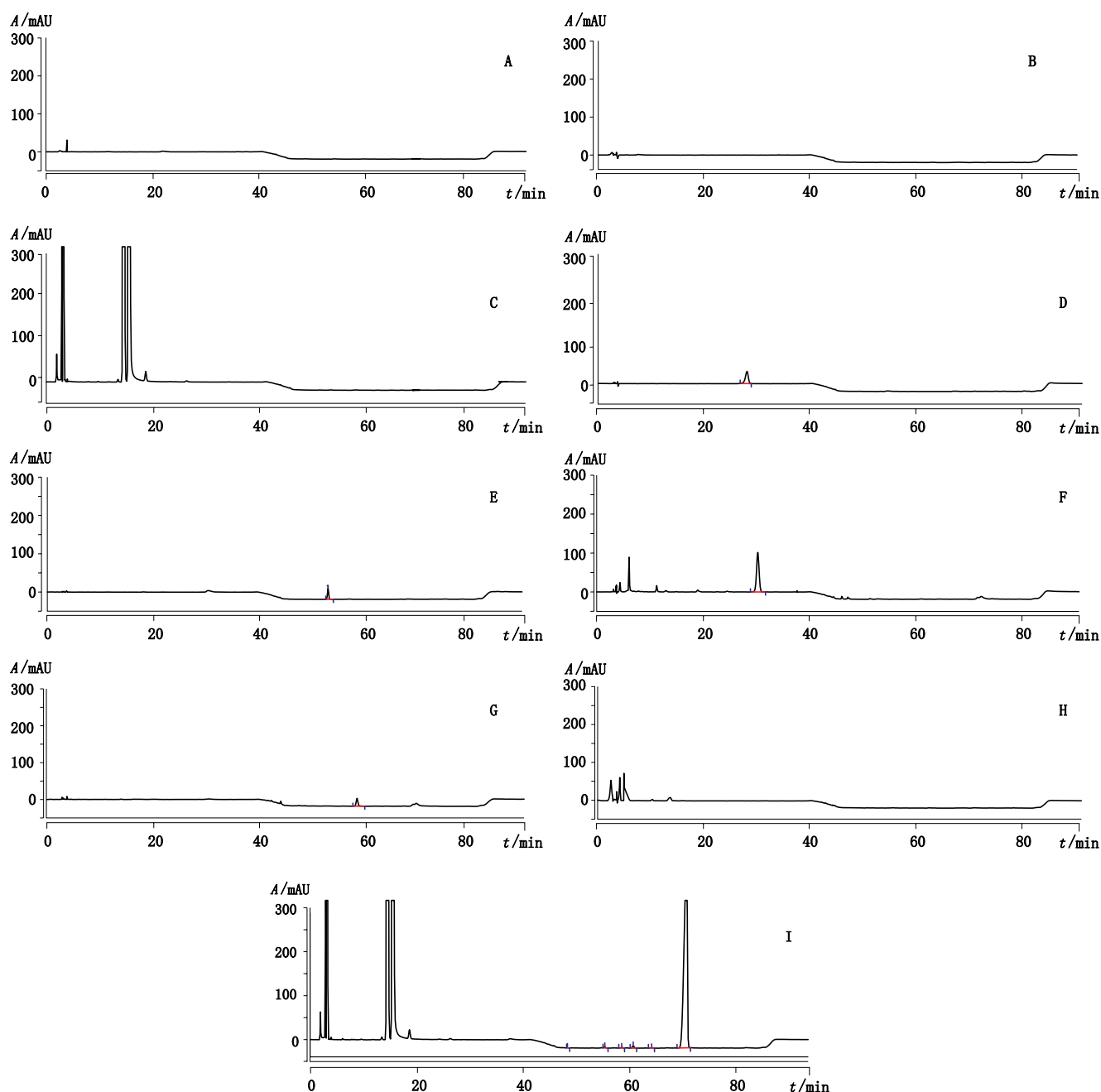
4.3 线性关系考察 取林可霉素对照品约 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加溶解溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液适量,用溶解溶剂稀释成 0.04、0.06、0.08、0.1、0.12 mg·mL⁻¹ 的溶液;精密量取上述系列溶液各 20 μL 进样测定,记录峰面积,回归方程:

$$Y=1.338 \times 10^8 X+1.738 \times 10^4 \quad r=0.9999$$

结果表明林可霉素质量浓度在 0.04~0.12 mg·mL⁻¹ 范围内呈良好线性。

取克林霉素 B 对照品约 10 mg,置 25 mL 量瓶中,加溶解溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液适量,用溶解溶剂稀释成 0.03、0.05、0.07、0.09、0.11、0.13 mg·mL⁻¹ 的溶液;分别精密量取上述系列溶液各 20 μL 进样测定,记录峰面积,回归方程:

$$Y=8.917 \times 10^7 X-2.031 \times 10^4 \quad r=0.9995$$



A. 流动相A (mobile phase A) B. 流动相B (mobile phase B) C. 空白基质 (blank matrix) D. 林可霉素对照品 (lincomycin reference substance) E. 克林霉素B对照品 (clindamycin B reference substance) F. 7-表林可霉素对照品 (7-*epi*-lincomycin reference substance) G. 7-差向克林霉素对照品 (7-*epimeric* clindamycin reference substance) H. 阿达帕林对照品 (adapalene reference substance) I. 复方凝胶样品 (compound gel sample)

图1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Chromatograms of specificity test

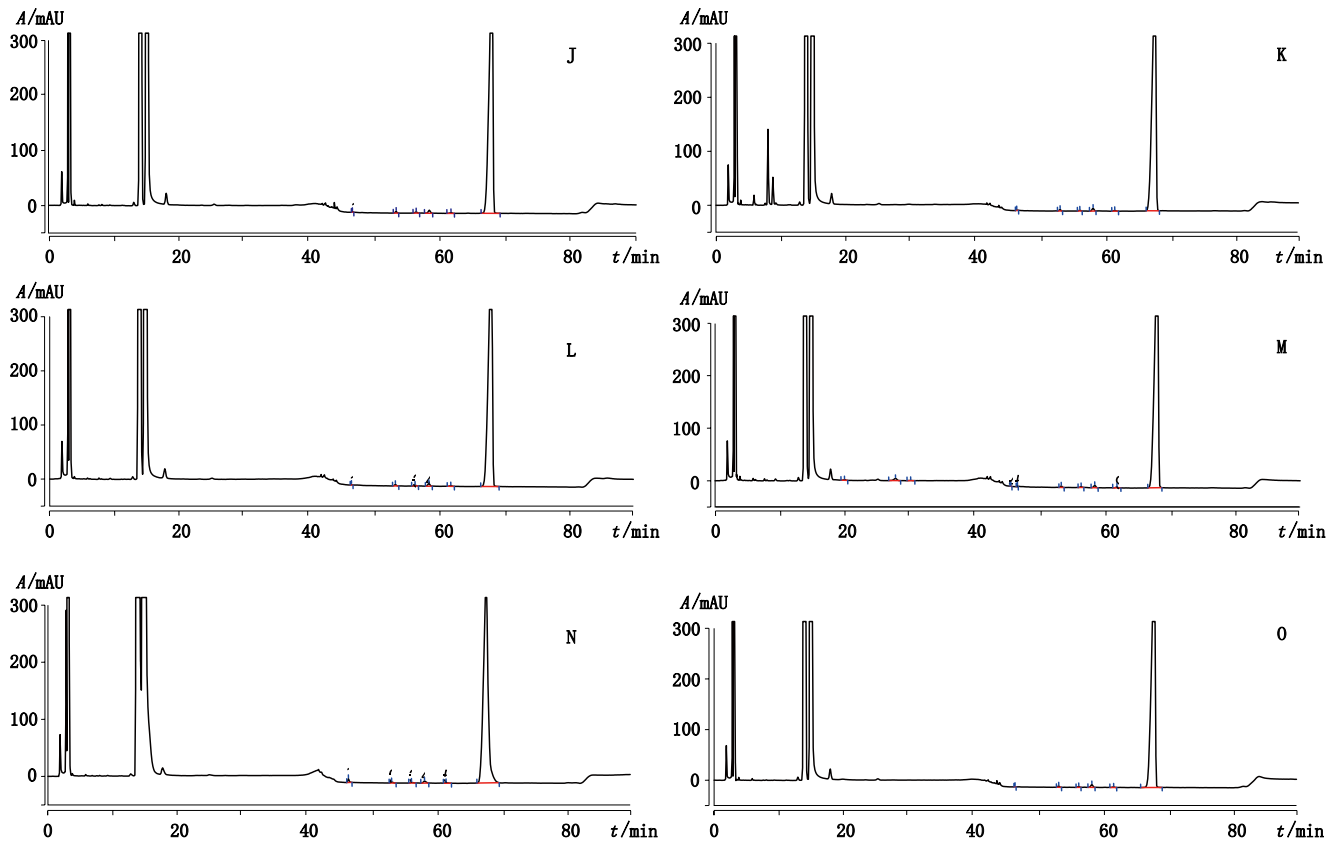
结果表明克林霉素B质量浓度在 $0.03\sim 0.13\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性。

将包装规格为 1 mg 的7-差向克林霉素对照品,置 5 mL 量瓶中,加溶解溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液适量,用溶解溶剂稀释成 0.04 、 0.06 、

0.08 、 0.1 、 $0.12\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液;分别精密量取上述系列溶液各 $20\ \mu\text{L}$ 进样测定,记录峰面积,回归方程:

$$Y=8.414\times 10^7X-2.932\times 10^4\quad r=0.9999$$

结果表明7-差向克林霉素质量浓度在 $0.04\sim 0.12\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性。



J. 酸破坏样品 (acid degradation sample) K. 碱破坏样品 (alkali degradation sample) L. 光破坏样品 (light degradation sample) M. 热破坏样品 (heat degradation sample) N. 氧化破坏样品 (oxidative degradation sample) O. 未破坏样品 [testing sample (not degraded)]

图2 强制降解试验色谱图

Fig. 2 Chromatograms of forced degradation test

取林可霉素对照品约 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加溶解溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取该溶液适量, 用溶解溶剂稀释成 0.04、0.06、0.08、0.1、0.12 mg · mL⁻¹ 的溶液; 精密量取上述系列溶液各 20 μL 进样测定, 记录峰面积, 回归方程:

$$Y = 1.338 \times 10^8 X + 1.738 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

结果表明林可霉素质量浓度在 0.04~0.12 mg · mL⁻¹ 范围内呈良好线性。

4.4 检测限及定量限测定 取线性关系考察项下 0.03 mg · mL⁻¹ 克林霉素 B 溶液, 用溶解溶剂稀释成一系列浓度, 照上述色谱条件进样测定, 结果检测限按信噪比 = 3 计算为 0.04 μg, 定量限按信噪比 = 10 计算为 0.12 μg。

取线性关系考察项下 0.04 mg · mL⁻¹ 7- 差向克林霉素溶液, 用溶解溶剂稀释成一系列浓度, 照上述色谱条件进样测定, 结果检测限按信噪比 = 3 计算为 0.08 μg, 定量限按信噪比 = 10 计算为 0.2 μg。

取线性关系考察项下 0.04 mg · mL⁻¹ 林可霉素溶

液, 用溶解溶剂稀释成一系列浓度, 照上述色谱条件进样测定, 结果检测限按信噪比 = 3 计算为 0.000 16 μg, 定量限按信噪比 = 10 计算为 0.008 μg。

取克林霉素对照品约 10 mg, 精密称量, 置 10 mL 量瓶中, 加溶解溶剂溶解并稀释至刻度, 得克林霉素对照品储备液; 将克林霉素对照品储备液用溶解溶剂稀释成一系列浓度, 照上述色谱条件进样测定, 结果检测限按信噪比 = 3 计算为 0.02 μg, 定量限按信噪比 = 10 计算为 0.1 μg。

4.5 精密度试验 取线性关系考察项下 0.08 mg · mL⁻¹ 林可霉素溶液、0.09 mg · mL⁻¹ 克林霉素 B 溶液、0.08 mg · mL⁻¹ 7- 差向克林霉素溶液以及检测限及定量限测定项下 0.1 mg · mL⁻¹ 克林霉素溶液分别连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果林可霉素、克林霉素 B、7- 差向克林霉及克林霉素峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.51%、0.38% 及 0.47%, 表明精密度良好。

4.6 加样回收率试验 取林可霉素对照品 11.33 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加溶解溶剂溶解并定容, 摇匀,

即得林可霉素对照品储备液;精密量取林可霉素对照品储备液 2.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加溶解溶剂稀释至刻度,得林可霉素对照品溶液。精密称取本品适量(约相当于克林霉素 40 mg),置 10 mL 量瓶中,加 15% 氯化钠溶液约 0.5 mL,分别精密加入林可霉素

对照品储备液 1.0、2.0 和 3.0 mL,以溶解溶剂稀释至刻度,10 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液,滤过,即得供试溶液。每个浓度梯度配制 3 份供试溶液,共 9 份溶液。取对照品溶液及供试溶液进样测定,按外标法以峰面积计算回收率。结果见表 1。

表 1 林可霉素回收率试验
Tab. 1 The recoveries of lincomycin

水平 (level)	称取量 (weighing)/g	理论加入量 (theoretical amount added)/mg	测得量 - 已有量 (measured amount - known amount)/mg	回收率 (recovery)/%	平均值 (average)/%	RSD /%
0%	4.0316	0	—	—	—	—
低 (low)	4.0205	0.3984	0.3996	100.3	100.6	0.44
	4.0250	0.3984	0.4000	100.4		
	4.0372	0.3984	0.4028	101.1		
中 (middle)	4.0240	0.7967	0.8065	101.2	102.0	0.98
	4.0133	0.7967	0.8107	101.8		
	4.0592	0.7967	0.8219	103.2		
高 (high)	4.0517	1.1951	1.2450	104.2	104.3	0.33
	4.0267	1.1951	1.2426	104.0		
	4.0406	1.1951	1.2505	104.6		

4.7 耐用性试验 按照“3.3”项下方法配制供试品溶液;精密量取供试品溶液 1.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加溶解溶剂稀释至刻度,摇匀,即得自身对照溶液。在柱温变化为 ± 5 $^{\circ}\text{C}$,检测波长变化为 ± 5 nm 及流动相 pH 变化为 ± 0.2 的试验条件下进样,分别计算最大单杂(林可霉素)及总杂(林可霉素、克林霉素 B、7-差向克林霉素及未知杂质)的量。结果柱温变化(25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$),总杂含量分别为 1.45%、1.45%、1.41%,最大单杂含量分别为 0.67%、0.66%、0.66%;检测波长变化(205 nm, 210 nm, 215 nm),总杂含量分别为 1.46%、1.45%、1.46%,最大单杂含量分别为 0.73%、0.66%、0.70%;流动相 pH 变化(7.30, 7.50, 7.70),总杂含量分别为 1.37%、1.45%、1.36%,最大单杂含量分别为 0.76%、0.66%、0.63%。结果表明,最大单杂和总杂含量变化均在 $\pm 0.1\%$ 内,表明本法对柱温、检测波长、流动相 pH 变化的耐用性较好。

4.8 稳定性试验 取供试品溶液、自身对照溶液分别在配制后 0、3、6、9 h 进样测定,记录峰面积,供试品溶液主峰面积的 RSD 为 0.70%,自身对照溶液峰

面积的 RSD 为 0.22%。在 0、3、6、9 h 时总杂质含量分别为 1.58%、1.56%、1.56% 和 1.48%,说明供试品溶液和自身对照溶液在 0~9 h 内,杂质无明显变化,因此供试品溶液和自身对照溶液可于室温稳定保存 9 h。

5 样品测定

采用本文方法对 3 批样品(20140808、20140809、20140810)进行有关物质检测,记录色谱图,按外标法计算已知杂质林可霉素,按照自身对照法计算其他已知杂质和未知单杂及总杂含量,3 批样品的有关物质测定结果见表 2。

6 讨论

6.1 处理溶剂的选择 由于本品是卡波姆作为溶胀基质,采用 15% 氯化钠溶液预处理样品,对水凝胶中高分子链产生影响^[11],再以流动相溶解和稀释样品,保证样品以溶液状态进样分析,且 15% 氯化钠溶液在本色谱条件下无明显信号,因此本系统中采用氯化钠溶液对本品进行前处理是该检测方法成功的前提。

表 2 样品有关物质测定结果

Tab. 2 Results of relative substance test

批号 (lot No.)	有关物质含量 (content of relative substance) /%					
	林可霉素 (lincomycin)	7-表林可 霉素 (7- <i>epi</i> - lincomycin)	克林霉素 B (clindamycin B)	7-差向克林霉 素 (7- <i>epimeric</i> clindamycin)	未知最大单杂 (unknown maximum impurity)	总杂 (total impurities)
20140808	0.19	未检出 (not detected)	0.22	0.43	0.19	1.40
20140809	0.16	未检出 (not detected)	0.22	0.45	0.16	1.43
20140810	0.15	未检出 (not detected)	0.30	0.47	0.19	1.50

6.2 辅料对杂质检测的影响 复方阿达帕林盐酸克林霉素凝胶的辅料组成中包含凝胶基质、保湿剂、附加剂、pH 调节剂和注射用水。通过各辅料 HPLC 检测图谱分析,对羟基苯甲酸甲酯、乙二醇苯醚、依地酸二钠、三乙醇胺卡波姆 980 等辅料均存在干扰盐酸克林霉素有关物质检查的可能,其中依地酸二钠、三乙醇胺和卡波姆 980 出峰时间相对靠前,约在 2 min 左右,但是对羟基苯甲酸甲酯和乙二醇苯醚均在 5 min 之后出峰(对羟基苯甲酸甲酯保留时间为 5.8 min,乙二醇苯醚保留时间为 5.7 min),因此对羟基苯甲酸甲酯和乙二醇苯醚干扰有关物质检查风险较大。

由于凝胶剂相对于一般固体制剂,其处方组成相对复杂,且本品为水性凝胶,加入防腐剂保证产品的质量和有效期,鉴于每类防腐剂都有对其不敏感的微生物存在,采用复合防腐剂无疑可以扩大抑菌谱^[12],同时借鉴复方克林霉素磷酸酯维 A 酸凝胶(商品名: ZIANA®, MEDICIS 公司)的说明书,综合考虑本品为水性凝胶更容易被微生物污染,因此本品在处方设计中采用 2 种防腐剂(对羟基苯甲酸甲酯和乙二醇苯醚)联合使用。通过对防腐剂等辅料和杂质的结构分析,并根据其极性差异优化检测方法,从而保证杂质的有效检出和分离。

6.3 样品溶解溶剂的选择 由于辅料中对羟基苯甲酸甲酯在 210 nm 处有强吸收,但是此辅料是极微溶于水,而盐酸克林霉素易溶于水,因此初步尝试用纯水做溶解溶剂配制供试品溶液,并降低供试品浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,结果是杂质林可霉素保留时间为 4.6 min,7-表林可霉素保留时间为 5.2 min,辅料峰明显减少,但是在 5~7 min 处仍然有干扰杂质林可霉素和 7-表林可霉素检测的辅料峰。因此需要继续优化,

参考中国药典 2010 年版二部盐酸克林霉素有关物质项下色谱条件,将溶解溶剂更换为磷酸二氢钾溶液-乙腈(55:45),并尝试对流动相的比例和洗脱时间进行优化。

6.4 流动相的选择和梯度优化 在参照 2015 年版中国药典中盐酸克林霉素胶囊^{[8]974}品种项下有关物质色谱条件,进行优化,并将等度洗脱改为梯度洗脱,再根据本品中所使用的辅料与盐酸克林霉素的相关工艺杂质的极性差别,在反相 HPLC 色谱系统中,化合物极性越大,就越容易被先洗脱出来,基于本品中辅料极性较大,盐酸克林霉素及其工艺杂质极性相对较小,因此调整流动相中水相和有机相的比例和洗脱时间,使有机相 B 相比比例由原来的 40% 降低至 20%,这样可以让辅料峰先洗脱出来,再将有机相 B 相比比例升高,使盐酸克林霉素及其杂质后洗脱出来。本系统分析时间较长,但能够保证本品中辅料峰不干扰杂质峰检出,且各杂质组分完全分离。通过摸索,最终确定了其梯度洗脱方法。

6.5 盐酸克林霉素及其制剂杂质检测方法和标准制定概述 经检索,现行版各国药典收录的盐酸克林霉素及其制剂标准中有关物质检查方法,均采用等度洗脱,针对本品制剂处方的实际情况,开发出适合本品制剂的杂质检测的新方法,该方法专属性好,能够有效检出和分离各已知杂质和未知杂质。

本品标准中杂质限度制定,参照了国家食品药品监督管理局颁布的盐酸克林霉素注射液标准(W51-(X-029)-2003Z-2011)^[13],具体为:林可霉素按外标法计算不得大于 3.0%,克林霉素 B(相对保留时间约为 0.78)及 7-差向克林霉素(相对保留时间约为 0.86)不得大于对照溶液主峰面积 0.5 倍(1.0%),

其他单个杂质不得大于对照溶液主峰面积 0.5 倍 (1.0%), 各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积 3 倍 (6.0%)。经检索, 该标准其杂质限度要求比该品种其他制剂高。

参考文献

- [1] 陈兴平, 李慎秋, 李家文, 等. 盐酸克林霉素凝胶治疗寻常性痤疮的临床研究[J]. 医药导报, 2002, 21(6): 346
CHEN XP, LI SQ, LI JW, *et al.* Clinical study of clindamycin hydrochloride gel in the treatment of Acne Vulgaris[J]. Her Med, 2002, 21(6): 346
- [2] 陶文筠, 郭代红, 谭次娥. 279 例克林霉素临床用药分析. 中国药师, 2005, 8(8): 658
TAO WJ, GUO DH, TAN CE. Elinical analysis of clindamycin in 279 cases[J]. China Pharm, 2005, 8(8): 658
- [3] 孙秋实, 李悦, 王慧敏, 等. LC-MS 法研究盐酸克林霉素中的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(6): 1059
SUN QS, LI Y, WANG HM, *et al.* LC-MS studies on related substances in clindamycin hydrochloride[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(6): 10593
- [4] 梁键谋, 王知坚, 阮昊, 等. HPLC 梯度洗脱法检测克林霉素磷酸酯及其注射剂的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(8): 726
LIANG JM, WANG ZJ, RUAN H, *et al.* HPLC gradient elution determination of related substances of clindamycin phosphate and its injection[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2012, 29(8): 726
- [5] 黄明旺, 杨伟强, 徐峰, 等. 克林霉素工艺的改进及其主要杂质形成机理的研究[J]. 广东化工, 2016, 43(1): 79
HUANG MW, YANG WQ, XU F, *et al.* Improved synthesis of clindamycin and study the formation mechanism of its main impurities[J]. Guangdong Chem Ind, 2016, 43(1): 790
- [6] 王建, 王红波, 孟磊, 等. 梯度洗脱 HPLC 法测定盐酸克林霉素棕榈酸酯及制剂的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 314
WANG J, WANG HB, MENG L, *et al.* Isocratic HPLC determination of related substances of clindamycin palmitate hydrochloride and its drug products[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(2): 314
- [7] 夏振华, 张国峰, 缪刚. HPLC 测定盐酸克林霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(6): 33
XIA ZH, ZHANG GF, MIU G. Determination of clindamycin hydrochloride by HPLC[J]. Chin J Pharm Anal, 1994, 14(6): 33
- [8] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 973, 974
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 973, 974
- [9] EP 8.0[S]. 2014: 1912
- [10] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 374, 375, 376
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 374, 375, 376
- [11] 刘超英, 张慧慧. HPLC 法测定复方苯妥英钠凝胶剂中苯妥英钠的含量[J]. 中国药师, 2015, 15(3): 345
LIU CY, ZHANG HH. Determination of phenytoin sodium in compound phenytoin sodium gels by HPLC[J]. China Pharm, 2015, 15(3): 345
- [12] 钱木水, 叶兴法, 倪赤杭, 等. 液体制剂中防腐剂选用的体会[J]. 海峡药学, 2009, 2(3): 32
QIAN MS, YE XF, NI CH, *et al.* The experience of preservatives in liquid preparations[J]. Strait Pharm, 2009, 2(3): 32
- [13] WS1-(X-029)-2003Z-2011 盐酸克林霉素注射液标准[S]. 2011
WS1-(X-029)-2003Z-2011 Clindamycin Hydrochloride Injection Standards[S]. 2011

(本文于 2017 年 12 月 8 日修改回)