

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.013

高效液相色谱法检测环索奈德鼻喷雾剂的防腐剂

沈丹丹^{1,2}, 许娟³, 姜学美^{1,2}, 肖波^{3△}

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2. 重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121; 3. 重庆仁泽医药科技有限公司, 重庆 400021)

摘要:目的 建立同时测定环索奈德鼻喷雾剂中防腐剂山梨酸钾和依地酸二钠含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Inertsil® ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.02 mol/L 硼砂溶液(10:90), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 288 nm, 柱温为 30 ℃。结果 依地酸二钠和山梨酸钾色谱峰之间的分离度大于 1.5, 依地酸二钠及山梨酸钾质量浓度分别在 3.209 6~12.838 4 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 38.46~153.82 μg/mL ($r=0.999\ 8$) 范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 99.84% 和 96.96%, RSD 分别为 0.96% 和 2.17% ($n=9$); 山梨酸钾在光照条件下含量下降。结论 该方法可用于环索奈德鼻喷雾剂中防腐剂的质量控制。

关键词:环索奈德鼻喷雾剂; 依地酸二钠; 山梨酸钾; 防腐剂; 高效液相色谱; 影响因素; 质量控制

中图分类号: R927.11; R987

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)09-0046-04

Determination of Preservatives in Ciclesonide Nasal Spray by HPLC

SHEN Dandan^{1,2}, XU Juan³, JIANG Xuemei^{1,2}, XIAO Bo³

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 2. Chongqing Research Center for Drug Process and Quality Control Engineering, Chongqing, China 401121; 3. Chongqing Renzar Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Chongqing, China 400021)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and disodium edetate in Ciclesonide Nasal Spray. **Methods** The chromatographic column was Inertsil® ODS-3 C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.02 mol/L borax solution(10:90), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 288 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** The separation degree between the chromatographic peaks of disodium edetate and potassium sorbate was more than 1.5. Disodium edetate and potassium sorbate showed good relationship in the ranges of 3.209 6~12.838 4 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 38.46~153.82 μg/mL ($r=0.999\ 8$). The average recovery rates of disodium edetate and potassium sorbate were 99.84% and 96.96%, RSDs were 0.96% and 2.17% ($n=9$). The experimental results of influencing factors showed that the content of potassium sorbate decreased under illumination test. **Conclusion** The method can be used for the quality control of preservatives in Cyclosonide Nasal Spray.

Key words: Ciclesonide Nasal Spray; disodium edetate; potassium sorbate; preservatives; HPLC; influencing factors; quality control

环索奈德是由 ALTANA Pharma AG 开发的适用于支气管哮喘和过敏性鼻炎的皮质类固醇, 为前体药物, 鼻内给药的环索奈德被鼻黏膜内的酯酶水解成具有生物学活性的代谢产物-去异丁酰基环索奈德^[1-7]。由 Nycomed 公司开发的水性鼻喷雾剂在加拿大、阿根廷、巴西、墨西哥、香港、韩国、马来西亚上市, 由 Sunovion 公

司在美国上市, 商品名 Omnaris, 用于治疗成人和 12 岁以上儿童季节性和常年性过敏性鼻炎所引起的鼻部症状。目前, 国内尚无环索奈德鼻喷雾剂上市。根据 Omnaris 美国药品说明书公布^[8]的本品处方信息, 含有防腐剂山梨酸钾和防腐增效剂依地酸二钠, 其用量分别为 0.12% 和 0.01% (w/w), 根据美国食品药品监督管理局

第一作者: 沈丹丹, 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)499258077@qq.com。

△通信作者: 肖波, 男, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为制剂技术与新产品开发, (电子信箱)xiaob@renzar.com。

- [8] 罗 洁, 张德波, 邓莎细, 等. 辛脑注射剂细菌内毒素检查法研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(2): 207-208.
- [9] 张虞婷, 丁苏苏, 李倚云, 等. 细菌内毒素的研究进展及其检查法的应用[J]. 天津药学, 2015, 27(5): 67-68.
- [10] 张 娟, 祝清芬, 范治云, 等. 动态浊度法测定阿奇霉素中细菌内毒素含量[J]. 中国药业, 2014, 23(22): 47-48.
- [11] 杨 柳. 动态浊度法测定丙泊酚中细菌内毒素含量[J]. 中国药业, 2017, 26(13): 29-30.
- [12] 甄晓兰, 崔晓燕, 郭永辉. 苯巴比妥注射液细菌内毒素检

查法标准研究[J]. 中国药品标准, 2017, 18(5): 399-400.

- [13] 马 莉, 张 淞, 王安航等. 细菌内毒素定量检测方法的常见问题剖析[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(9): 733-734.
- [14] 苏 苗, 路显锋, 刘江华. 盐酸莫西沙星葡萄糖注射液细菌内毒素检查方法验证[J]. 中国药师, 2011, 14(3): 432-433.
- [15] 张 横, 蔡 彤, 高 华. 盐酸莫西沙星注射液细菌内毒素检查方法学研究[J]. 中国药事, 2014, 28(12): 1300-1302.

(收稿日期: 2018-09-26)

(FDA)药品评价与研究中心(CDER)的行业指南文件《鼻腔喷雾剂,吸入溶液、混悬液,及喷雾药品-化学、制造及控制文件》(CMC),若处方中使用了防腐剂、抗氧化剂、螯合剂或其他稳定剂(如苯扎氯铵、苯乙醇、依地酸盐),应对这些成分进行专属性含量测定,并制订验收标准。本研究建立了一种同时测定山梨酸钾和依地酸二钠含量的色谱方法,逆向解析产品中防腐剂用量,为本品的处方工艺研究提供依据,同时保证产品的安全性、有效性及可控性。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);K51502653 型电子天平(德国赛多利斯<中国>有限公司)。

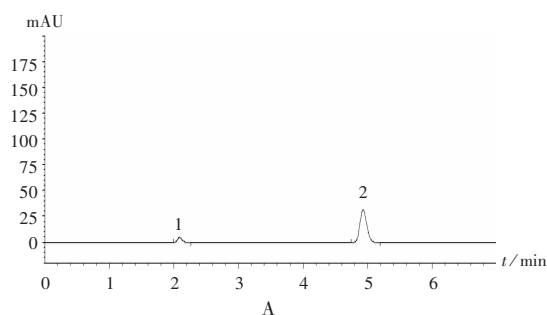
1.2 试剂

山梨酸钾对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 101075-201602,含量为 99.7%);依地酸二钠(南京化学试剂股份有限公司,批号为 20161104,含量为 99.0%);环索奈德鼻喷雾剂(商品名 Omnaris, Sunovion 制药有限公司,批号为 183844,规格为每瓶 12.5 g);硼砂、硫酸铜为分析纯,乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil® ODS-3 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.02 mol/L 硼砂溶液(10:90);检测波长:288 nm;柱温:30 °C;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。



2.2 溶液制备

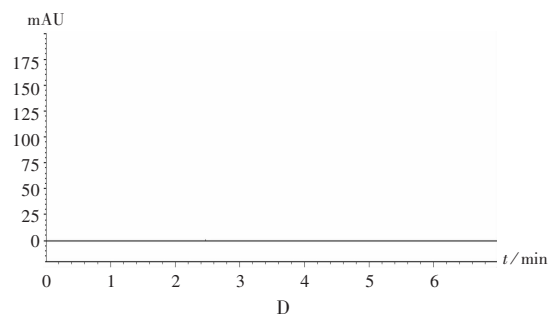
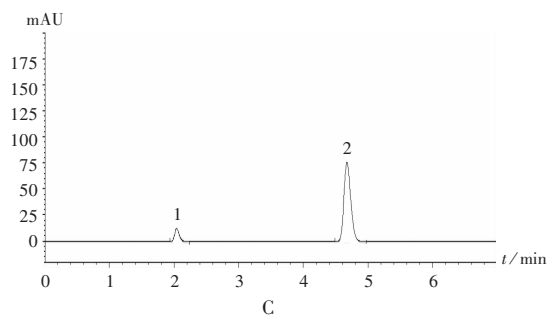
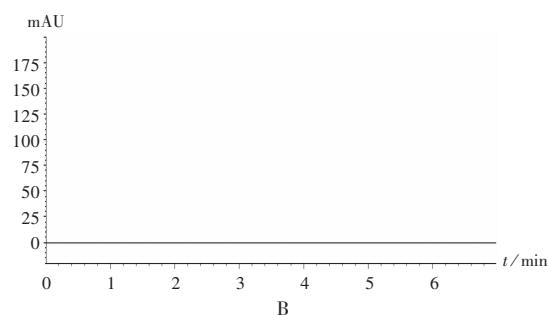
取样品 2.0 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加 0.1% CuSO₄ 溶液 0.5 mL,用水稀释至刻度,摇匀,离心,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。另取依地酸二钠对照品约 40 mg、山梨酸钾对照品约 481 mg,精密称定,置 500 mL 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 5.0 mL,加 0.1% CuSO₄ 溶液 1 mL,再用水稀释至 50 mL,摇匀,即得每 1 mL 约含依地酸二钠 8 μg 和山梨酸钾 96 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:按照处方工艺配制混合辅料,精密量取辅料适量,按 2.2 项下供试品溶液制备方法配制辅料空白溶液;吸取 0.1% CuSO₄ 溶液 0.5 mL,用水稀释至 25 mL,摇匀,即得空白溶剂。精密量取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪,测定,记录色谱图(图 1)。在此条件下,空白溶剂、辅料空白溶液不干扰依地酸二钠和山梨酸钾的测试,依地酸二钠和山梨酸钾之间的分离度远大于 1.5,理论板数均大于 3 000,专属性良好。

精密度试验:精密吸取对照品溶液 20 μL,平行 6 针,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果依地酸二钠和山梨酸钾峰面积的 RSD 分别为 1.1% 和 1.4% (n=6)。

线性关系考察:取依地酸二钠对照品约 0.04 g 和山梨酸钾约 0.48 g,精密称定,加水溶解并稀释至同一 500 mL 容量瓶中,摇匀,作为依地酸二钠与山梨酸钾对照品贮备液。精密吸取依地酸二钠与山梨酸钾对照品贮备液 2,3,4,5,6,7,8 mL,加 0.1% CuSO₄ 溶液 1 mL,再



1. 依地酸二钠 2. 山梨酸钾
A. 对照品溶液 B. 辅料空白溶液 C. 供试品溶液 D. 空白溶剂

图 1 专属性试验高效液相色谱图

用水稀释至 50 mL, 摇匀, 即得系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液系列各 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。以质量浓度 (C) 为横坐标、峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程, 依地酸二钠为 $A = 7.6756C + 0.2536$ ($r = 0.9999$), 山梨酸钾为 $A = 5.7136C + 20.4779$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 依地酸二钠进样质量浓度线性范围是 3.2096 ~ 12.8384 μ g/mL, 山梨酸钾进样质量浓度线性范围是 38.46 ~ 153.82 μ g/mL。

稳定性试验: 取 2.2 项下同一供试品溶液, 分别于 0, 6, 12, 18, 24 h 时吸取 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定。结果记录色谱图, 依地酸二钠和山梨酸钾峰面积的 RSD 分别为 0.91% 和 0.48% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性好。

重复性试验: 取样品 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法进样测定。结果依地酸二钠与山梨酸钾的平均含量分别为 0.0101% 和 0.1199%, RSD 分别为 0.7% 和 1.1% ($n = 6$)。

定量限与检测限确定: 取依地酸二钠和山梨酸钾对照品适量, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备每 1 mL 中约含依地酸二钠 8 μ g 和山梨酸钾 96 μ g 的对照品溶液。精密量取 1.0 mL, 用水逐级稀释成系列浓度, 吸取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以信噪比 (S/N) 为 3:1 计算检测限, 以 S/N 为 10:1 计算定量限。结果依地酸二钠和山梨酸钾检测限分别为 7.2 ng 和 5.0 ng, 定量限分别为 24.0 ng 和 16.4 ng。

加样回收试验: 精密称取依地酸二钠对照品约 0.04 g 和山梨酸钾约 0.48 g, 加水溶解并稀释至同一 500 mL 容量瓶内, 摇匀, 作为依地酸二钠与山梨酸钾对照品贮备液。精密称取样品辅料空白约 2 g, 平行 9 份, 分别置 25 mL 容量瓶中, 3 份加入依地酸二钠和山梨酸钾对照品贮备液 1.0 mL, 3 份加入依地酸二钠和山梨酸钾对照品贮备液 2.5 mL, 3 份加入依地酸二钠和山梨酸钾对照品贮备液 4.0 mL, 再分别加 0.1% CuSO_4 溶液 0.5 mL, 用水稀释至 25 mL, 摇匀, 离心, 用微孔滤膜滤过, 弃去前滤液, 取续滤液作为供试品溶液。精密吸取 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定记录色谱图, 计算回收率。结果见表 1。

2.4 耐用性试验

色谱柱: 选用 Agilent Eclipse Plus - C_{18} 柱及 Inertsil® ODS - 3 C_{18} 柱对供试品溶液进行测定, 其他条件保持不变。结果不同种类的色谱柱对分离度无明显影响, 依地酸二钠与山梨酸钾平均含量分别为 0.0100% 和 0.1194%, 表明所选色谱柱耐用性强。

流动相比比例: 选用色谱柱 Inertsil® ODS - 3 C_{18} 柱,

表 1 加样回收试验结果 ($n = 9$)

加入量 (μ g)		测得量 (μ g)		回收率 (%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
80.3	936.8	80.7	904.9	100.50	96.59				
80.3	936.8	80.7	915.9	100.50	97.77				
80.3	936.8	81.3	914.2	101.25	97.59				
200.8	2342.0	199.9	2312.5	99.55	98.74				
200.8	2342.0	201.9	2312.5	100.55	98.74	99.84	96.96	0.96	2.17
200.8	2342.0	200.5	2333.5	99.85	99.64				
321.2	3747.3	318.8	3507.5	99.25	93.60				
321.2	3747.3	317.2	3594.4	98.75	95.92				
321.2	3747.3	315.8	3525.2	98.32	94.07				

注: A 为依地酸二钠, B 为山梨酸钾。

改变流动相比比例, 其他条件保持不变, 取 2.2 项下供试品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定。结果乙腈在 $\pm 5\%$ 变化范围内, 分离度均大于 2.0, 表明流动相比比例耐用性强。

流速: 将流速分别设定为 0.8, 1.0, 1.2 mL/min, 其他条件保持不变, 取 2.2 项下供试品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定。结果流速在 0.8 ~ 1.2 mL/min 范围内变化, 分离度均大于 2.0, 表明流速耐用性强。

0.1% CuSO_4 溶液加入量: 取本品, 分别将供试品溶液配制过程中的 0.1% CuSO_4 溶液的加入量设定为 0.25, 0.50, 1.00 mL, 其他条件不变, 按拟订色谱条件, 取 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定。结果依地酸二钠平均含量分别为 0.0101%, 0.0101%, 0.0100%, RSD 为 0.6% ($n = 3$); 山梨酸钾平均含量为 0.1206%, 0.1205%, 0.1197%, RSD 为 0.4% ($n = 3$)。可见, 加入 0.25 ~ 1.00 mL 的 0.1% CuSO_4 溶液均能完全络合样品中的依地酸二钠, 对测试结果无影响。

柱温: 将柱温分别设定为 20, 25, 30 $^{\circ}\text{C}$, 其他条件保持不变, 取 2.2 项下供试品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 测定。结果柱温在 20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内变化, 分离度均大于 2.0, 表明柱温耐用性强。

2.5 影响因素试验

高温: 取样品分为正立和倒立放置, 分别于 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 d, 于第 5 天和第 10 天取样, 作为高温 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 的破坏样品。

高湿: 取样品分为正立和倒立放置, 分别于 (92.5 $\pm$ 5)% 相对湿度下放置 10 d, 于第 5 天和第 10 天取样, 作为高湿破坏样品。

光照: 取样品去除铝塑外包装 (为棕色瓶包装), 分为正立和倒立放置, 于 (4500 $\pm$ 500) lx 光照箱中放置 10 d, 于第 5 天和第 10 天取样。另取本品, 将喷雾剂药液转移出棕色瓶, 装入无色透明的玻璃容器内, 横放于

表2 高温试验测定结果(%)

防腐剂	60℃					40℃			
	正立 0 d	正立 5 d	正立 10 d	倒立 5 d	倒立 10 d	正立 5 d	正立 10 d	倒立 5 d	倒立 10 d
山梨酸钾	0.119 2	0.123 1	0.117 4	0.124 2	0.112 5	0.124 5	0.115 5	0.122 5	0.120 3
依地酸二钠	0.009 9	0.009 8	0.010 4	0.010 5	0.010 2	0.010 1	0.010 8	0.010 2	0.010 4

表3 光照试验测定结果(%)

防腐剂	棕色瓶包装					无色瓶包装	
	正立 0 d	正立 5 d	正立 10 d	倒立 5 d	倒立 10 d	横放 5 d	横放 10 d
山梨酸钾	0.119 2	0.110 8	0.117 7	0.110 6	0.117 4	0.095 9	0.094 6
依地酸二钠	0.009 9	0.009 6	0.010 4	0.009 7	0.010 5	0.010 4	0.009 8

(4 500 ± 500)lx 光照箱中,于第5天和第10天取样。以上2种条件下的样品均作为光照破坏样品。

将破坏后的样品按2.2项下方法制备供试品溶液,在拟订色谱条件下进样分析,记录色谱图。与未经破坏的防腐剂含量测定结果比较,详见表2至表4。结果表明,与0d比较,高温及高湿条件下,依地酸二钠与山梨酸钾含量均无显著变化,质量稳定,说明对高温及高湿不敏感,包装密封性好;在无色透明玻璃容器内进行的光照试验中,防腐剂山梨酸钾含量降低,说明样品对光敏感,应采用避光包装;光照试验中,依地酸二钠与山梨酸钾含量无显著变化,质量稳定,说明棕色瓶避光包装有利于本品的稳定。

表4 高湿试验测定结果(%)

防腐剂	正立 0 d	正立 5 d	正立 10 d	倒立 5 d	倒立 10 d
山梨酸钾	0.119 2	0.120 3	0.114 6	0.122 4	0.115 2
依地酸二钠	0.009 9	0.010 3	0.010 5	0.010 2	0.010 5

3 讨论

3.1 流动相选择

流动相的筛选是参照文献[9]中288nm波长测定。通过紫外光谱(UV)扫描可知,依地酸二钠UV吸收很弱,无法测试,与铜络合后生成乙二胺乙酸铜钠(EDTA-Cu),在200~300nm波长范围内均有较强吸收。山梨酸钾在255nm波长有最大吸收,吸收很强,在288nm波长处有一定吸收,本研究选择288nm作为山梨酸钾和依地酸二钠的检测波长。本研究中对0.1% CuSO₄溶液的加入量进行了考察,结果表明,在加入0.25~1.00 mL的0.1% CuSO₄溶液均能完全络合样品中的依地酸二钠,对测试结果无影响。本研究建立的色谱条件能同时测定山梨酸钾和依地酸二钠的含量,缩短分析时间,2个主峰均有效洗脱,并与相邻峰分离良好。

3.2 影响因素试验

在高温及高湿条件下,随着时间的增加,山梨酸钾和依地酸二钠含量均无明显变化;在光照条件下,棕色

瓶包装的依地酸二钠与山梨酸钾含量无显著变化,质量稳定,将环索奈德鼻喷雾剂药液装入无色透明的玻璃容器内进行光照试验,防腐剂山梨酸钾含量降低,说明本品对光敏感,应采用避光包装。

环索奈德鼻喷雾剂处方中含有防腐剂山梨酸钾和防腐增效剂依地酸二钠,其用量分别为0.12%和0.01%(w/w),本研究建立了专属性的含量测定方法,结果表明国外上市样品中山梨酸钾均在标示量(0.12%,g/g)的90%(0.108%,w/w)~110%(0.132%,g/g)范围内,依地酸二钠均在标示量(0.01%,g/g)的90%(0.009%,g/g)~110%(0.011%,g/g)范围内。国内企业研发该品种时应加强对处方防腐剂的质量控制,从而使产品处方、质量水平与原研产品达到一致,弥补该品种在国内市场的空白。

参考文献:

- [1] 马锦芳,郑劲平.环索奈德粉雾剂治疗支气管哮喘的临床疗效观察[J].海峡药学,2015,27(1):129-131.
- [2] 姚远兵,王玲,夏悦,等.治疗哮喘新药——环索奈德[J].中国药房,2010,21(17):1616-1618.
- [3] 刘静.哮喘治疗药物环索奈德[J].世界临床药物,2007,28(7):57.
- [4] 马杏娟.环索奈德与布地奈德治疗儿童支气管哮喘的临床观察[J].中国药房,2015,26(3):322-324.
- [5] 姚鹏,宫平.环索奈德[J].中国药物化学杂志,2007,17(5):337.
- [6] 肖志梅. Altana公司的环索奈德首次获得批准[J].中国药师,2004,7(9):676.
- [7] 林科雄,夏前明,朱运奎,等.环索奈德气雾剂治疗轻中度哮喘疗效观察[J].药物与临床,2010,21(18):1677.
- [8] Sunovion Pharmaceuticals Inc. Full Prescribing Information for Omnisar[EB/OL]. (2013-3-22) [2018-06-02]. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022004s013lbl.pdf.
- [9] 张化锋,田世雄,王征,等.液相色谱测定隐形眼镜保护药水中EDTA二钠和山梨酸钾的含量[J].同济医科大学学报,1992,21(3):178-180.

(收稿日期:2018-08-23)