

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.14.017

伊曲康唑胶囊有关物质测定方法优化*

张秉华,杜亚俊,袁红梅,牛龙青,赵蒲中

(陕西省食品药品检验研究院,陕西 西安 710065)

摘要:目的 优化伊曲康唑胶囊中有关物质的检测方法。方法 色谱柱为 Aglient Proshell 120 EC - C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为 0.01 mol/L 乙酸铵溶液 - 乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。对 4 家企业的 12 批样品进行检测, 并将结果与 2020 年版《中国药典》有关物质检测方法结果进行比较。结果 伊曲康唑、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 F、杂质 G、杂质 H 质量浓度分别在 0.317 4~2.539 6 μg/mL, 0.311 8~2.494 0 μg/mL, 0.291 1~2.328 6 μg/mL, 0.306 7~2.453 6 μg/mL, 0.316 6~2.532 4 μg/mL, 0.286 0~2.288 2 μg/mL, 0.313 5~2.507 8 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999 5$); 检测限分别为 0.38, 0.37, 0.35, 0.37, 0.38, 0.57, 1.25 ng, 定量限分别为 1.27, 1.25, 1.16, 1.23, 1.27, 1.37, 3.76 ng; 重复性试验结果的 RSD 均小于 3.85% ($n = 6$); 杂质 B、杂质 F、杂质 G、杂质 H 的平均加样回收率分别为 99.42%, 99.54%, 101.74%, 105.96%, RSD 分别为 1.49%, 1.79%, 2.63%, 6.98% ($n = 9$)。4 个企业共 10 批样品检测出上述杂质, 且企业 A 检出杂质含量高于药典有关物质检测方法检出含量。结论 该方法灵敏度高, 分离效果及准确性好, 可用于伊曲康唑胶囊有关物质的检测。

关键词:伊曲康唑胶囊; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)14-0075-04

Optimization of Determination Method of the Related Substances in Itraconazole Capsules

ZHANG Binghua, DU Yajun, ZHONG Hongmei, NIU Longqing, ZHAO Puzhong

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To optimize the determination method of related substances in Itraconazole Capsules. **Methods** The chromatographic column was Aglient Proshell 120 EC - C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), the mobile phase was 0.01 mol/L ammonium acetate solution - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The content of related substances in 12 batches of samples from four manufacturers was determined, and the results were compared with the results determined by the test method for related substances in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition). **Results** The linear ranges of itraconazole, impurity B, impurity C, impurity D, impurity F, impurity G and impurity H were 0.317 4 - 2.539 6 μg/mL, 0.311 8 - 2.494 0 μg/mL, 0.291 1 - 2.328 6 μg/mL, 0.306 7 - 2.453 6 μg/mL, 0.316 6 - 2.532 4 μg/mL, 0.286 0 - 2.288 2 μg/mL and 0.313 5 - 2.507 8 μg/mL ($r > 0.999 5$), respectively. The limits of detection (LOD) were 0.38, 0.37, 0.35, 0.37, 0.38, 0.57 and 1.25 ng, respectively. The limits of quantitation (LOQ) were 1.27, 1.25, 1.16, 1.23, 1.27, 1.37 and 3.76 ng, respectively. The RSD of the repeatability test was less than 3.85% ($n = 6$). The average recoveries of impurity B, impurity F, impurity G and impurity H were 99.42%, 99.54%, 101.74% and 105.96% with RSDs of 1.49%, 1.79%, 2.63% and 6.98% ($n = 9$), respectively. Impurities were detected in 10 batches of samples from four manufacturers, and the content of impurities in samples from manufacturer A detected by the established method was higher than that detected by the method for relevant substances in the *Chinese Pharmacopoeia*. **Conclusion** The method has high sensitivity, good separation effect and accuracy, which can be used for the determination of related substances in Itraconazole Capsules.

Key words: Itraconazole Capsules; HPLC; related substances

伊曲康唑为三唑类抗真菌药物, 主要通过干扰真菌细胞膜麦角固醇的生物合成来抑制真菌增殖、促进真菌死亡, 具有抗菌谱广、毒性低的特点, 临床适用于浅表真菌感染和深部真菌引起的系统感染, 及其他抗真菌药物不适用或无效的系统性感染^[1-4]。伊曲康唑胶囊为我院 2021 年国家评价性抽检品种, 抽检执行 2015 年版《中国药典(第一增补本)》^[5]和 2020 年版《中国药典(二部)》^[6]中有关物质检查方法。在实际检验中发现, 系统适用性溶液制备困难, 难以达到系统适用性要求; 部

分样品相邻杂质峰分离效果欠佳, 影响结果。查阅文献[7]发现, 药典中有关物质检测方法为 2010 年前起草, 杂质 E 峰的相对保留时间可能存在偏差, 企业反映该相对保留时间的杂质峰无法通过强制降解试验得到, 造成在未达到系统适用性要求的情况下开展检验。此外, 随着伊曲康唑生产工艺的变化和对其杂质谱研究的深入, 药典中相关物质检测方法仅对单个杂质和杂质总量进行控制, 难以真实反映各企业的产品质量。本研究采用高效液相色谱法对现行有关物质检测方法进行

* 基金项目: 陕西省重点研发计划项目[2019SF-027]; 陕西省创新能力支撑计划项目[2020PT-041]。

第一作者: 张秉华, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药品检验、质量标准研发和起草复核, (电子信箱)huabingzhang@126.com。

改进,以期建立灵敏度高、分离效果好、检测效率高、对环境友好的测定方法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、Shimadzu LC-2030 3D型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);XPE205型、ME204型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Milli-Q高纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试药

伊曲康唑对照品(批号100631-201402,含量99.2%)、杂质A对照品(批号130686-201501,含量99.5%)、杂质B对照品(批号130687-201501,含量97.5%)、杂质C对照品(批号130688-201501,含量96.3%)、杂质D对照品(批号130689-201501,含量95.1%)、杂质E对照品(批号130690-201501,含量97.1%)、杂质F对照品(批号130691-201501,含量98.0%)、杂质G对照品(批号130692-201501,含量95.5%),均购自中国食品药品检定研究院;伊曲康唑杂质H对照品(企业D,批号WVLA_0062_003_1,含量97.2%)。伊曲康唑胶囊为2021年国家评价性抽检样品,此次抽样涉及A、B、C、D 4个生产企业,各3批。原辅料为生产企业A、B、C提供;四氢呋喃、甲醇、乙腈均为色谱纯,四丁基硫酸氢铵、乙酸铵均为分析纯,水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Proshell 120 EC-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,2.7 μm);流动相:0.01 mol/L乙酸铵溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min时62%A,3~6 min时62%A→45%A,6~11 min时45%A;11~19 min时45%A→34%A,19~36 min时34%A;36~38 min时34%A→62%A,38~40 min时62%A);流速:0.8 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

稀释剂:稀释剂I为甲醇-乙腈(3:1,V/V);精密量取稀释剂I 700 mL,加0.01 mol/L乙酸铵溶液300 mL,混匀,即得稀释剂II。

对照品溶液:取杂质B对照品0.012 79 g、杂质F对照品0.0129 2 g、杂质G对照品0.011 98 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,加稀释剂I 70 mL使溶解,加稀释剂II定容,摇匀,即得杂质B、F、G的混合对照品溶液。取杂质H对照品0.004 30 g,精密称定,置20 mL容量瓶中,加稀释剂I 14 mL使溶解,加稀释剂II定容,摇匀,即得杂质H对照品溶液。分别取杂质A对照品、杂质B对照品、杂质C对照品、杂质D对照品、杂质E对照品、

杂质F对照品、杂质G对照品、杂质H对照品约12 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加稀释剂I 70 mL使溶解,再加稀释剂II定容,摇匀;精密量取1 mL,加入伊曲康唑对照品40 mg,置100 mL容量瓶中,加稀释剂I 70 mL使溶解,再加稀释剂II定容,摇匀,制成每1 mL中含各杂质1.2 μg和含伊曲康唑0.4 mg的混合对照品溶液。

供试品溶液:取伊曲康唑胶囊内容物适量(约相当于伊曲康唑100 mg),精密称定,置250 mL容量瓶中,加稀释剂I 175 mL使溶解,加稀释剂II定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

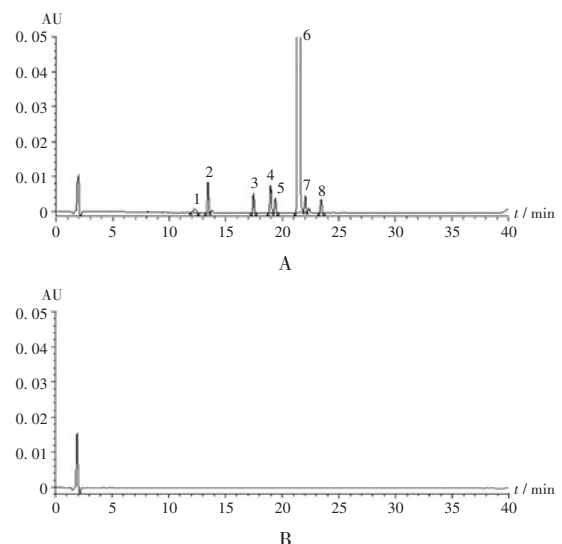
对照溶液:精密量取供试品溶液1 mL,置25 mL容量瓶中,加稀释剂I 17.5 mL,加稀释剂II定容,摇匀;精密量取1 mL,置20 mL容量瓶中,加稀释剂I 14 mL,加稀释剂II定容,摇匀,即得。

阴性对照品溶液:按辅料用量最多的生产企业的处方工艺及比例制备缺伊曲康唑的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下混合对照品溶液和阴性对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。可见,杂质C与杂质D为异构体,保留时间相同,其余各峰之间分离度均大于1.5,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:分别取伊曲康唑、杂质B对照品、杂质C对照品、杂质D对照品、杂质F对照品、杂质G对



1. 杂质H 2. 杂质A 3. 杂质B 4. 杂质C(或杂质D) 5. 杂质E 6. 伊曲康唑 7. 杂质F 8. 杂质G
A. 混合对照品溶液 B. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Impurity H 2. Impurity A 3. Impurity B 4. Impurity C/D
5. Impurity E 6. Itraconazole 7. Impurity F 8. Impurity G
A. Mixed reference solution B. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

照品、杂质 H 对照品适量,精密称定,加入 70% 体积的稀释剂 I 使溶解,再加入稀释剂 II 定容,倍比稀释,制成质量浓度分别为 0.3,0.6,1.2,1.8,2.4 μg/mL 的系列混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,以斜率计算相对校正因子。结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果($n = 5$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n = 5$)				
组分	线性方程	r	线性范围(μg/mL)	校正因子
杂质 B	$Y_1 = 30\,500X_1 + 81.1$	0.999 9	0.311 8~2.494 0	1.02
杂质 C	$Y_2 = 30\,900X_2 - 41.6$	0.999 9	0.291 1~2.328 6	1.01
杂质 D	$Y_3 = 30\,800X_3 + 269$	0.999 9	0.306 7~2.453 6	1.01
杂质 F	$Y_4 = 30\,100X_4 - 1\,152$	0.999 9	0.316 6~2.532 4	1.03
杂质 G	$Y_5 = 22\,400X_5 - 245$	0.999 9	0.286 0~2.288 2	1.39
杂质 H	$Y_6 = 19\,200X_6 - 1\,050$	0.999 6	0.313 5~2.507 8	1.62
伊曲康唑	$Y_7 = 31\,100X_7 + 243$	0.999 9	0.317 4~2.539 6	

定量限与检测限考察:取线性关系考察项下的系列混合对照品溶液,倍比稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比为 3:1 和 10:1 时的质量浓度分别作为检测限和定量限。结果伊曲康唑、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 F、杂质 G、杂质 H 的检测限分别为 0.38, 0.37, 0.35, 0.37, 0.38, 0.57, 1.25 ng, 定量限分别为 1.27, 1.25, 1.16, 1.23, 1.27, 1.37, 3.76 ng。

重复性试验:取企业 D 同一批样品适量,共 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。由于样品中单个杂质含量较低(均小于 0.05%),6 份样品中单个杂质含量测定结果的 RSD 均小于 3.85%,杂质总量的 RSD 为 0,表明方法重复性良好。

加样回收试验:参考欧洲药典和美国药典相关标准及文献[8],以 0.3% 为各杂质限度,制备样品中检出率较高的杂质 B、杂质 F、杂质 G、杂质 H 的回收率溶液。称取各杂质含量已知的同一批样品适量(约相当于伊曲康唑 100 mg),精密称定,置 250 mL 容量瓶中,分别加入杂质 B、F、G 的混合对照品溶液和杂质 H 对照品溶液适量,制成杂质含量分别为 0.12%, 0.3%, 0.5% 的溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率[9]。结果见表 2。

2.4 样品检测

取 4 个企业的 12 批样品适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别加入对照溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用主成分自身对照法计算杂质 B、C、D、F 和其他单个杂质含量,杂质 G 和杂质 H 含量按加校正因子的主成分自身对照法计算,含量低

表 2 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 9$)						
待测成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
杂质 B	43.630 0	124.702 5	167.523 8	99.35		
	43.722 7	124.702 5	168.183 6	99.81		
	43.732 0	124.702 5	167.786 1	99.48		
	43.667 1	311.756 2	357.208 2	100.57		
	43.620 8	311.756 2	357.085 2	100.55	99.42	1.49
	43.694 9	311.756 2	353.630 3	99.42		
	43.713 4	498.810 0	543.372 1	100.17		
	43.657 8	498.810 0	541.277 9	99.76		
	43.704 2	498.810 0	520.945 9	96.68		
杂质 F	0	126.616	128.455 1	101.45		
	0	126.616	129.053 2	101.92		
	0	126.616	129.140 4	101.99		
	0	316.54	314.929 4	99.49		
	0	316.54	313.135 4	98.92	99.54	1.79
	0	316.54	311.474 3	98.40		
	0	506.464	495.880 4	97.91		
	0	506.464	496.553 2	98.04		
	0	506.464	494.755 0	97.69		
杂质 G	8.320 1	114.409	128.136 2	104.73		
	8.337 8	114.409	129.927 5	106.28		
	8.339 6	114.409	127.868 3	104.47		
	8.327 2	286.022 5	297.617 2	101.14		
	8.318 4	286.022 5	295.067 0	100.25	101.74	2.63
	8.332 5	286.022 5	291.925 2	99.15		
	8.336 0	457.636	467.070 3	100.24		
	8.325 4	457.636	466.757 8	100.17		
	8.334 3	457.636	462.304 7	99.20		
杂质 H	20.293 0	104.49	139.661 5	114.24		
	20.336 1	104.49	141.341 1	115.81		
	20.340 4	104.49	142.311 2	116.73		
	20.310 3	318.47	345.390 6	102.08		
	20.288 7	318.47	337.005 2	99.45	105.96	6.98
	20.323 2	318.47	335.162 8	98.86		
	20.331 8	522.45	555.234 4	102.38		
	20.306 0	522.45	561.269 5	103.54		
	20.327 5	522.45	545.735 7	100.57		

于 0.05% 的杂质忽略不计。结果见表 3。

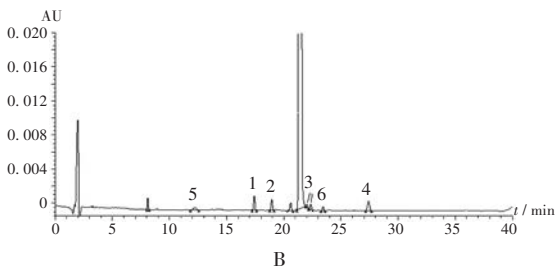
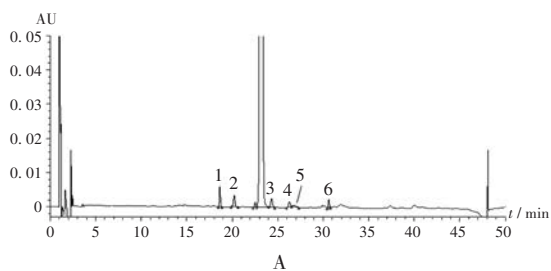
2.5 不同测定方法结果比较

采用药典[5-6]中有关物质检查方法,对 4 个企业同批号的 12 批样品进行含量测定,并与本研究中新建方法结果进行比较。结果表明,2 种方法检测的企业 B、C、D 样品含量的结果基本一致,采用新建方法测得企业 A 3 批样品的杂质总量(0.31%, 0.43%, 0.21%)高于药典

表3 伊曲康唑胶囊有关杂质检测结果(%)

Tab.4 Results of content determination of related substance in Itraconazole Capsules (%)

生产 企业	批次	单个杂质					其他单个 最大杂质	总杂 质
		杂质B	杂质C/D	杂质F	杂质H	杂质G		
A	1	0.08	0.09		0.07		0.08	0.31
	2	0.10	0.08		0.06		0.10	0.43
	3	0.08					0.10	0.21
B	1	0.05	0.05		0.20			0.32
	2	0.20	0.06		0.20	0.10		0.51
	3	0.10	0.06		0.20		0.09	0.45
C	1	0.10					0.10	0.32
	2	0.10			0.07		0.05	0.22
	3	0.09			0.09		0.06	0.23
D	1							
	2						0.09	0.087
	3							



1. 杂质B 2. 杂质C和D 3. 杂质F与未知杂质 4. 未知杂质
5. 杂质H 6. 杂质G
A. 现行标准方法(主药质量浓度2 mg/mL) B. 新建方法(主药
质量浓度0.4 mg/mL)

图2 不同方法测定同批号伊曲康唑胶囊有关物质色谱图

1. Impurity B 2. Impurity C/D 3. Impurity F and unknown
impurity 4. Unknown impurity 5. Impurity H 6. Impurity G
A. Current standard method (the mass concentration of main drug is
2 mg/mL) B. New method (the mass concentration of main drug is
0.4 mg/mL)

Fig.2 Chromatograms of related substances in Itraconazole Capsules with same batch number determined by different methods

中的方法(0.25%,0.28%,0.15%)。比较企业A同批号样品色谱图(图2)发现,新建方法的杂质检出个数更多。

3 讨论

3.1 检测波长选择

预试验中对混合对照品溶液和供试品溶液进行全

波长扫描,发现伊曲康唑、杂质A~G在(260±2) nm波长处、杂质H在(248±2) nm波长处有最大吸收峰,为保证多数杂质的检出灵敏度,选择260 nm作为检测波长。

3.2 耐用性考察

取混合对照品溶液和供试品溶液,通过更换不同型号高效液相色谱仪(Agilent 1260型、岛津LC2030C 3D型),不同色谱柱[Aglient Proshell 120 EC-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,2.7 μm)、Welch Boltimate EXT-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,2.7 μm)],以及改变柱温(±3℃),各杂质均可有效分离,表明方法耐用性良好。

3.3 出峰情况

药典中有关物质检测采用甲酸破坏法制备系统适用性溶液,检验中发现主峰前后的杂质峰难以强制降解得到,生产企业均反映受此问题困扰。本研究中尝试多种方法制备系统适用性溶液效果均不佳,建议采用杂质C(或杂质D)、杂质E、伊曲康唑、杂质F制备系统适用性溶液,杂质C(或杂质D)峰与杂质E峰、伊曲康唑峰与杂质F峰分离度应符合要求。

综上所述,本研究前期对4个生产企业131批样品的杂质进行含量测定,结果杂质B、杂质F、杂质G、杂质H的检出率较高,故本研究中主要对这4种杂质的含量测定进行方法学考察。结果显示,所建有关物质检测方法灵敏度高、分离效果好,运行时间短,流速低,有机溶剂用量少,对环境更友好,可满足4个生产企业的伊曲康唑胶囊产品质量控制要求。

参考文献

- [1] 陈江飞,苗彩云,朱素燕,等. 抗真菌药伊曲康唑的临床药理学研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2009,25(2):153-157.
- [2] 王进,肖永红. 伊曲康唑的药理作用和临床应用[J]. 中国实用内科杂志:临床版,2006,26(5):387-388.
- [3] 聂舒,朱红梅,温海. 国产伊曲康唑在中国十年的应用[J]. 中国真菌学杂志,2014,9(2):123-127.
- [4] 吕雪莲,刘维达. 伊曲康唑治疗浅部真菌感染的疗效分析——中国上市16年中文文献回顾[J]. 中国真菌学杂志,2010,5(1):31-39.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一增补本)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2018:231-232.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:467-468.
- [7] 张琳,袁雯玮,曹晓云. HPLC梯度洗脱法测定伊曲康唑有关物质的方法研究[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(2):112-115.
- [8] YBH12752020,国家药品监督管理局标准[S].
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.

(收稿日期:2021-11-08;修回日期:2022-01-16)