

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0070-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.016



高效液相色谱法测定葡萄糖酸氯己定溶液主成分及有关物质含量*

王发, 崔平, 庄瑜瑜, 李继, 刘雪峰, 乔荣霞

(陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要: 目的 建立测定葡萄糖酸氯己定溶液主成分及有关物质含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Capcell PAK C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为辛烷磺酸钠溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。结果 葡萄糖酸氯己定和特定杂质对氯苯胺质量浓度分别在 0.050~0.15 mg/mL 和 0.001 0~0.010 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 8, 0.999\ 9$), 定量限分别为 0.7 和 0.5 μg/mL, 检测限分别为 0.3 和 0.2 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 99.50% 和 101.71%, RSD 分别为 0.45% 和 0.92% ($n=6$); 3 批样品中葡萄糖酸氯己定和对氯苯胺平均含量分别为 20.33% 和 0.11%, 平均杂质总量为 2.20%。结论 所建方法操作简便, 精密度、稳定性、重复性良好, 可用于葡萄糖酸氯己定溶液主成分及有关物质的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 葡萄糖酸氯己定; 有关物质; 含量测定

Determination of Principal Component and Related Substances in Chlorhexidine Gluconate Solution by HPLC

WANG Fa, CUI Ping, ZHUANG Yuyu, LI Ji, LIU Xuefeng, QIAO Rongxia
(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the principal component and related substances in Chlorhexidine Gluconate Solution. **Methods** The chromatographic column was the Capcell PAK C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was sodium octanesulfonate solution-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of chlorhexidine gluconate and specific impurity *p*-chloroaniline were 0.050-0.15 mg/mL and 0.001 0-0.010 mg/mL ($r=0.999\ 8, 0.999\ 9$) respectively. The limits of quantification of the above two components were 0.7, 0.5 μg/mL, and the limits of detection were 0.3, 0.2 μg/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above two components were 99.50% and 101.71% with RSDs of 0.45% and 0.92% ($n=6$) respectively. The average contents of chlorhexidine gluconate and *p*-chloroaniline in three batches of samples were 20.33% and 0.11% respectively, with an average total impurity of 2.20%. **Conclusion** The established method is easy, precise, stable and repeatable, which can be used for the determination of principal component and related substances in Chlorhexidine Gluconate Solution.

Key words: HPLC; chlorhexidine gluconate; related substance; content determination

氯己定(也称洗必泰)属胍类消毒防腐剂,常见的胍盐包括盐酸氯己定、醋酸氯己定和葡萄糖酸氯己定。葡萄糖酸氯己定具有良好的溶解性、广谱的抑菌性和刺激性小、毒性低等优点^[1-6]。2020年版《中国药典(二部)》(以下简称《中国药典》)^[7], *USP-NF 2022*^[8], *JP XVIII*^[9]和 *European Pharmacopoeia 11.0*^[10] (EP 11.0)均收载本品,现行各标准中含量测定,特定杂质对氯苯胺和有关物质的检测方法均不相同,且操作相对繁杂。为此,本研究中建立了同时测定葡萄糖酸氯己定溶液、主成分及特定杂质对氯苯胺和有关物质含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

LC-30AD型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司); XPE105型电子分析天平(精度为0.01 mg), AE204型电子分析天平(精度为0.1 mg), S210K型多参数测量酸度计,均购自瑞士Mettler Toledo公司。

1.2 试剂

葡萄糖酸氯己定溶液(陕西大生制药科技有限公司,批号分别为201204, 210401, 211005); 醋酸氯己定对照品(批号为100183-201003,含量96.2%), 对氯苯胺对照品(批号为101398-201601,含量100.0%), 均

* 基金项目: 陕西省重点研发计划项目[2021SF-304]。

第一作者: 王发, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品的分析检验与质量标准, (电子信箱) wangf1974@126.com。

购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈、三乙胺均为色谱纯,冰醋酸、辛烷磺酸钠均为分析纯,水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shiseido Capcell PAK C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:辛烷磺酸钠溶液(A,取辛烷磺酸钠5.1 g,加冰醋酸310 mL,加三乙胺1 mL,加水至1 000 mL) - 乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min时73%A, 10~45 min时73%A → 40%A, 45~46 min时40%A → 73%A, 46~55 min时73%A);流速:1.0 mL/min,检测波长:254 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

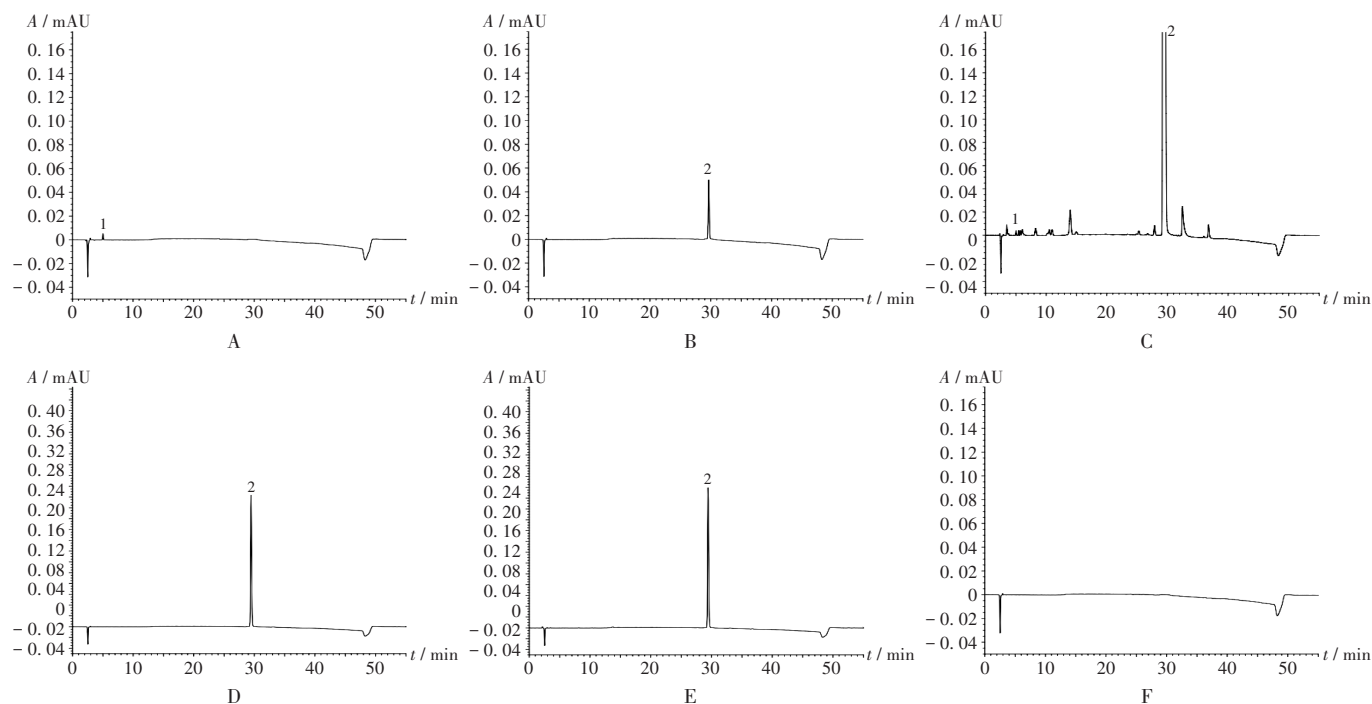
取醋酸氯己定对照品约14 mg,精密称定,置200 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,即得每1 mL含葡萄糖酸氯己定0.1 mg的含量测定对照品溶液。精密量取样品适量,加水稀释制成每1 mL约含葡萄糖酸氯己定0.1 mg的含量测定供试品溶液。精密量取样品适量,加水稀释制成每1 mL约含葡萄糖酸氯己定2 mg的有关物质供试品溶液;精密量取有关物质供试品溶液适量,加水稀释,制成每1 mL约含葡萄糖酸氯己定20 μg的有关物质

对照溶液。取对氯苯胺对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释,制成每1 mL约含对氯苯胺5 μg的对氯苯胺对照品溶液。精密量取有关物质对照溶液1 mL,置20 mL容量瓶中,加水定容,即得灵敏度溶液。以水作空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取上述除灵敏度溶液外各溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果有关物质供试品溶液主峰与相邻色谱峰分离度符合要求,且空白无干扰。详见图1。

线性关系考察:1)含量测定线性范围。取醋酸氯己定对照品71.76 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加水定容,即得醋酸氯己定对照品贮备液。取5份,用水稀释制成质量浓度分别为0.034 52, 0.051 77, 0.069 03, 0.086 29, 0.103 5 mg/mL的醋酸氯己定系列对照品溶液1。精密量取20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以醋酸氯己定质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 41\,233\,052.70 X_1 + 45\,924.12$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,醋酸氯己定质量浓度在0.035 ~ 0.10 mg/mL(折合葡萄糖酸氯己定0.050 ~ 0.15 mg/mL)范围内



1. 对氯苯胺 2. 氯己定

A. 对氯苯胺对照品溶液 B. 有关物质对照溶液 C. 有关物质供试品溶液 D. 含量测定对照品溶液 E. 含量测定供试品溶液 F. 空白溶液

图1 高效液相色谱图

1. *p*-Chloroaniline 2. Chlorhexidine

A. Reference solution of *p*-chloroaniline B. Reference solution of related substances C. Test solution of related substances D. Reference solution of content determination E. Test solution of content determination F. Blank solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果 ($n = 6$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺	葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺	葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺	葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺	葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺	葡萄糖酸氯己定	对氯苯胺
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	10.021 6	0.511 6	99.80	102.02				
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	10.032 6	0.513 2	100.03	102.55				
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	9.998 3	0.509 9	99.33	101.46	99.48	101.69	0.36	0.93
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	9.990 6	0.506 8	99.18	100.43				
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	9.989 8	0.514 1	99.16	102.84				
5.077 5	0.203 1	4.953 8	0.302 4	10.000 2	0.508 1	99.37	100.86				

与峰面积线性关系良好。

2) 有关物质线性范围。取对氯苯胺对照品 10.08 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加水定容。各取适量, 用水稀释制成质量浓度分别为 0.034 52, 0.051 77, 0.069 03, 0.086 29, 0.103 5 mg/mL 的对氯苯胺系列对照品溶液。取上述醋酸氯己定对照品贮备液适量, 用水稀释制成质量浓度分别为 0.001 401, 0.002 802, 0.007 006, 0.014 01, 0.021 02, 0.028 02 mg/mL 的醋酸氯己定系列对照品溶液 2。精密量取 20 μ L, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度 (X , mg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得对氯苯胺、醋酸氯己定回归方程分别为 $Y_2 = 6\,538\,832.62 X_2 + 394.00$ ($r = 0.999\,9$)、 $Y_3 = 40\,162\,417.36 X_3 + 30\,441.22$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明, 氯苯胺、醋酸氯己定质量浓度分别在 0.001 0 ~ 0.010 mg/mL、0.001 4 ~ 0.028 mg/mL (折合葡萄糖酸氯己定 0.002 0 ~ 0.040 mg/mL) 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察: 分别精密量取 0.034 52 mg/mL 的对氯苯胺对照品溶液、0.001 401 mg/mL 含量测定对照品溶液各适量, 倍比稀释, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比 10:1、3:1 时的质量浓度分别记作定量限、检测限。结果对氯苯胺、醋酸氯己定定量限分别为 0.50 μ g/mL、0.70 μ g/mL (折合葡萄糖酸氯己定 1.00 μ g/mL), 检测限分别为 0.20 μ g/mL、0.35 μ g/mL (折合葡萄糖酸氯己定 0.50 μ g/mL)。

精密度试验: 取 2.2 项下含量测定对照品溶液、有关物质对照溶液和对氯苯胺对照品溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 主峰峰面积的 RSD 分别为 0.32% 和 0.10%, 对氯苯胺峰面积的 RSD 为 1.04% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 2.2 项下含量测定供试品溶液适量, 于室温下放置 12 h, 每间隔 1 h, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果主峰峰面积的 RSD 为 0.33%; 杂质检出数量无变化, 对氯苯胺和其他杂质峰面积基本无变化, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重复性试验: 精密量取同一批样品适量, 各 6 份, 按 2.2 项下方法制备含量测定供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果葡萄糖酸氯己定平均含量为 20.31%, RSD 为 0.62%; 对氯苯胺分别为 0.10% 和 2.02%; 总杂质分别为 2.13% 和 1.48%。表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量样品适量, 共 12 份, 分别加入一定质量的含量测定对照品溶液和对氯苯胺对照品溶液 (各 6 份), 按 2.2 项下方法制备含量测定供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算回收率。详见表 1。

2.4 有关物质测定

取样品适量, 按 2.2 项下方法制备有关物质供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。灵敏度溶液色谱图中, 主峰的信噪比为 16:1; 有关物质供试品溶液色谱图中, 如有与对氯苯胺保留时间一致的色谱峰, 按外标法以峰面积计算, 小于灵敏度溶液主峰面积的峰忽略不计 (0.05%)。详见表 2 (其中, UV 法为紫外分光光度法, HPLC 法为高效液相色谱法)。

表 2 主成分和有关物质含量测定结果 ($n = 3$)

Tab. 2 Results of content determination of and related substances in samples ($n = 3$)

批号	主成分(g/mL)		有关物质(%)				
	UV法	HPLC法	对氯苯胺	最大未知杂质	次大未知杂质	未知杂质	杂质总和
201204	20.59	20.31	0.10	0.59	0.41	0.23	2.13
210401	20.61	20.52	0.10	0.49	0.34	0.23	2.06
211005	20.55	20.17	0.14	0.59	0.57	0.28	2.40

2.5 含量测定

取样品适量, 按 2.2 项下方法制备含量测定供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 按外标法以峰面积计算 (结果乘以 1.435 2)。结果与《中国药典》方法 (UV 法) 基本一致。详见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

葡萄糖酸氯己定在溶剂中离解的氯己定阳离子易

与C₁₈柱残余的硅羟基反应,造成色谱峰拖尾、重现性差等现象。采用离子对色谱法可提高离子型化合物的分离系数,改善分离效果。在流动相中加入三乙胺作为竞争性胺类与硅羟基反应,可进一步抑制峰拖尾,峰形对称性较好^[11-14]。本研究中,在辛烷磺酸钠溶液中加入0.1%三乙胺作为流动相A(pH约为2.7),乙腈为流动相B,梯度洗脱。以此色谱条件检测样品,对氯苯胺在5 min左右出峰,相比于USP-NF 2022方法对氯苯胺在主峰后出峰,提高了检测灵敏度;进一步改善了峰形,提高了样品测定的准确度和方法的重现性。

3.2 检测波长选择

预试验中,有2种供试品溶液的检测波长分别采用239 nm^[15]、254 nm^[16-17]和259 nm^[18],比较色谱图,结果254 nm与259 nm比较,其他杂质检出数量和响应基本一致,但对氯苯胺和氯己定的响应值均较高;254 nm与239 nm比较基线噪音更低,故选择254 nm。

3.3 对照品校正系数计算

醋酸氯己定相对分子量为625.55,葡萄糖酸氯己定相对分子量为897.76。本方法采用醋酸氯己定为对照品,因此在计算含量应乘以校正系数1.4352。

3.4 有关物质限度确定

《中国药典》中对氯苯胺限度为0.25%,其他单个杂质不得过0.5%,大于2.0%单个杂质不得超过2个,对杂质总量无限制,在此规定下,杂质总量限度应为4.0%;USP-NF 2022和EP 11.0限度相同,对氯苯胺限度为0.05%,单个未知杂质不得过0.1%,另外还控制了11个已知杂质,限度为0.2%~1.0%,杂质总量不得过3.0%。结合3批样品测试结果,按限度适度从严原则,拟定限度为:对氯苯胺不得过0.25%;其他单个杂质不得过0.5%,如有1~2个杂质超过时,应不得大于1.0%,各杂质总和不得过3.0%。

3.5 方法评价

葡萄糖酸氯己定溶液现行《中国药典》标准对氯苯胺采用比色法进行限度控制,有关物质采用薄层色谱法,含量测定采用UV法;JP XVIII对氯苯胺采用比色法进行限度控制,含量测定采用容量法,对有关物质未进行控制;USP-NF 2022均采用HPLC法,但色谱条件不同;EP 11.0中对氯苯胺采用UV法,有关物质采用HPLC法,含量测定采用容量法。本研究中所建立的HPLC法,可同时测定葡萄糖酸氯己定溶液的含量、特定杂质对氯苯胺和有关物质,减少了试剂使用种类,降低了检测成本,提高了工作效率,为样品生产过程中的质量控制提供了重要的技术支撑。

参考文献

- [1] 杨亚红,黄 勋,周鹏程,等. 氯己定擦浴在预防医院感染中的作用研究进展[J]. 中国感染控制杂志,2016,15(12): 978-983.
- [2] 张卓娜,林少彬,杨艳伟. 市售氯己定类消毒剂复配现状及其含量调查[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(6):551-553.
- [3] 周丽静,戴东晓,石亚红. 重组人碱性成纤维细胞生长因子外用联合氯己定湿敷治疗复发性唇疱疹临床研究[J]. 中国药业,2021,30(20):102-104.
- [4] 黄 娟,白玲玲,王 婷,等. 醋酸氯己定冲洗剂细菌内毒素检查法研究[J]. 中国药业,2021,30(7):55-57.
- [5] 郑云燕,严 峻,朱周靓,等. 葡萄糖酸氯己定消毒液的亚急性毒性观察[J]. 中国消毒学杂志,2022,39(6):420-422.
- [6] 陈俐志,刘 莹,杜 彪. 含乙醇手消毒剂研究进展[J]. 中国药业,2022,31(11):128-131.
- [7] 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,2020:1524-1525.
- [8] USP. Chlorhexidine Gluconate Solution[EB/OL]. [2022-05-01] (2023-06-25). https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-8DB32701-2059-41F1-A428-9705E1241D77_3_en-US?source=Search%20Results&highlight=Chlorhexidine%20Gluconate%20Solution.
- [9] Japanese Pharmacopoeia Committee. Japanese Pharmacopoeia: JP XVIII [M]. Tokyo: Japanese Pharmacopoeia Commission, 2021:735.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 11.0 [M]. Strasbourg: European Directorate for Quality of Medicines & HealthCare, 2022:2297-2299.
- [11] 孙金影,刘金明,徐小燕. 超高效液相色谱法测定两种氯己定含量方法的建立[J]. 中国消毒学杂志,2022,39(5): 337-339.
- [12] 张 柯,胡 巖. 高效液相色谱法测定复配消毒凝胶中的葡萄糖酸氯己定[J]. 河南医学研究,2022,31(15):2746-2750.
- [13] 熊 英,雷 健,邢 茂. 高效液相色谱法同时测定口腔溃疡油中盐酸达克罗宁和醋酸氯己定含量[J]. 中国药业, 2022,31(13):67-70.
- [14] 王轶楠. 葡萄糖酸氯己定消毒凝胶的高效液相色谱测定方法研究[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(2):91-94.
- [15] 孙晶晶,杨 旭,宁科权,等. 反相-高效液相色谱法测定软膏剂中葡萄糖酸氯己定含量[J]. 中国当代医药,2023, 30(10):26-29.
- [16] 陈彦凤,李 俐,孙艳芳,等. 反相高效液相色谱法测定消毒产品中葡萄糖酸氯己定含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2017,27(14):2000-2008.
- [17] 王 发,郭欢迎,王嫦鹤,等. HPLC法测定盐酸氯己定的有关物质和含量[J]. 中国药师,2021,24(8):586-589.
- [18] 范 馨,屠宝英,卢碧意. HPLC法同时测定葡萄糖酸氯己定软膏中杂质和主成分的含量[J]. 北方药学,2020,17(7):3-5.

(收稿日期:2023-12-25;修回日期:2024-07-12)