

对于 HA 治疗 KOA,近年来出现一些争议,有明确反对黏弹性补充疗法治疗 KOA。2010 年 OARSI 指出 HA 治疗的效果具有时间依赖性,评估结果的时间选取节点会明显影响效果^[9]。同年 Jorgensen 等^[10]的多中心,双盲,随机安慰剂的临床对照试验也表明关节腔内注射 HA 为期 1 年的 Lequense 指数与对照组无差异。2013 年 AAOS《膝关节骨关节炎循证医学指南》(第 2 版)强烈推荐对于症状性 KOA 患者不建议使用 HA^[11]。本研究对于 HA 治疗 KOA 的结果提示临床疗效不确定,并且作用时间难以维持,也支持上述研究对 HA 治疗 KOA 的质疑。

中西医结合保守治疗是我国未来治疗 KOA 的发展趋势,根据“骨痹”的病机出发,确立补肾活血祛湿除痹为治则的中医内治法,从整体出发,调节人体内环境,虽起效缓慢,但能标本兼治。HA 能较快减缓症状,但外源性的不能纠正膝关节内的代谢异常,远期疗效尚不确定。根据本研究结果,补肾活血祛湿除痹法联合 HA 治疗 KOA 取得了令人满意的效果,因此,笔者认为该方法是一种简便、实用且有效的保守治疗方法。

参考文献

- 1 Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1963, 22:237-255
- 2 Huskisson EC. Measurement of pain [J]. *Lancet*, 1974, 2(7889): 1127-1131
- 3 Insall JN, Dorr LD, Scott RD, *et al.* Rationale of the knee society clinical rating system [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1989,248:13-14
- 4 Lequesne MG, Mery C, Samson M, *et al.* Indexes of severity for osteoarthritis of the hip and knee. Validation - value in comparison with

- other assessment tests [J]. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1987,65:85-89
- 5 Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, *et al.* Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee [J]. *J Rheumatol*, 1988, 15(12):1833-1840
- 6 程兆明,王立新,王子矜,等. 玻璃酸钠关节腔注射结合股四头肌训练用于治疗膝关节骨性关节炎的疗效观察[J]. *中国康复医学杂志*,2011,26(11):1076-1077
- 7 Bannuru RR, Natov NS, Obadan IE, *et al.* Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and metaanalysis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 61(12):1704-1711
- 8 Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, *et al.* OARSI recommendations for the management of hips and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009 [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010,18(4):476-499
- 9 McAlindon Te, Bannuru RR. OARSI recommendations for the management of hips and knee osteoarthritis: the semantics of differences and changes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(4): 473-475
- 10 Jorgensen A, Stengaard-Pedersen K, Simonsen O, *et al.* Intra-articular hyaluronan is without clinical effect in knee osteoarthritis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study of 337 patients followed for 1 year [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(6):1097-1102
- 11 Jevsevar DS, Brown GA, Jones DL, *et al.* The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on: treatment of osteoarthritis of the knee, 2nd edition [J]. *The Journal of Bone and Joint Surgery: American*, 2013, 95(20):1885-1886

(收稿日期:2014-12-26)

(修回日期:2015-01-26)

HPLC 法测定国产莫匹罗星软膏的含量及有关物质

吕亚光 吕昭云 潘显道

摘要 **目的** 建立 HPLC 法测定莫匹罗星软膏的含量及有关物质。**方法** 有关物质采用 C₈ 柱,流动相为四氢呋喃-7.7g/L 醋酸铵(用冰醋酸调节 pH 值至 5.7)(28:72),检测波长为 240nm;含量测定采用 C₈ 柱,流动相为乙腈-0.05mol/L pH6.3 磷酸盐缓冲液(28:72),检测波长为 230nm。**结果** 在有关物质测定中,莫匹罗星线性范围为 2.5~50μg/ml, R²=0.9994,莫匹罗星与杂质能完全分离;在含量测定中,平均回收率为 100.5%。**结论** 建立了简便、准确且适合国内常规检测的方法,可以有效地控制莫匹罗星软膏质量。

关键词 高效液相色谱法 莫匹罗星软膏 含量 有关物质

作者单位:102600 北京协和药厂(吕亚光、吕昭云);100050 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所(潘显道)

通讯作者:潘显道,电子信箱:xdp@imm.ac.cn

中图分类号 R9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.039

Determination of Related Substance and Assay Method of mupirocin ointment by HPLC. *Lü Yaguang, Lü Zhaoyun, Pan Xiandao. Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 102600, China*

Abstract Objective To establish HPLC methods for the determination of Mupirocin Ointment and its related substance. **Methods** The chromatographic analysis for the related substance was performed on C₈ column, tetrahydrofuran - 7.7g/L ammonium acetate (adjusted the pH to 5.7 by acetic acid) (28:72) as mobile phase. Detection wavelength was 240nm. The HPLC system for the assay of Mupirocin consisted of C₁₈ column with acetonitrile - 0.05mol/L pH 6.3 phosphate buffer solution (28:72) as mobile phase. The UV detector wavelength was 230nm. **Results** The linear range was 2.5 - 50.0 μg/ml ($R^2 = 0.9994$) by the determination of related substance. The related substances were separated from Mupirocin. The average recovery rate was 100.5% by the assay determination. **Conclusion** Simple, accurate and suitable methods are established for domestic routine testing, which can control quality of Mupirocin effectively.

Key words HPLC; Mupirocin ointment; Assay; Related substance

莫匹罗星, 又名假单胞菌酸 A, 是一种新型抗生素。莫匹罗星软膏适用于各种细菌性皮肤感染, 主要用于革兰阳性球菌引起的皮肤感染, 如脓疱病、疖肿、毛囊炎等原发性皮肤感染, 及湿疹合并感染, 溃疡合并感染, 创伤合并感染等继发性皮肤感染。《中国药典》(2010 年版)^[1] 未收载莫匹罗星软膏, 但《国家药品标准新药转正标准》第 23 册^[2]、美国药典 36 版 (USP36)^[3]、英国药典 2013 年版 (BP2013)^[4] 中均收载了莫匹罗星软膏。上述标准中均收录了莫匹罗星软膏含量的测定方法, 而只有 BP2013 收录了有关物质检查项。作者参照上述标准, 建立了用于莫匹罗星软膏质量控制的测定方法。

材料与方法

1. 仪器: Agilent 1200 高效液相色谱仪, 二极管阵列检测器; Mettler XS205 电子天平; PHSJ - 3F 精密 pH 计。所用仪器和量具均经检定和校正。

2. 试药: 莫匹罗星软膏 (北京协和药厂, 批号 120501); 莫匹罗星对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 130568 - 200501); 乙腈和四氢呋喃为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

3. 有关物质色谱条件的优化: (1) 对照溶液的确定: 在英国药典有关物质方法中, 采用莫匹罗星锂溶液作为对照溶液。由于莫匹罗星锂国内不易购得, 因此, 采用 1% 供试溶液浓度的溶液作为对照溶液。(2) 色谱柱的选用: 在英国药典有关物质方法中, 色谱柱采用 7 μm 的辛烷基硅烷键合硅胶柱 (C₈ 柱)。由于 7 μm 色谱柱在国内不易购得, 因此选用常规的 5 μm C₈ 色谱柱。实验表明, 5 μm C₈ 色谱柱完全能够保证杂质峰之间、杂质峰与主峰间分离度符合要求。(3) 检测波长的选择: 经高效液相 DAD 扫描图可见, 莫匹罗星和各杂质的最大紫外吸收均在 230 ~ 240nm, 因此, 仍采用 240nm 作为有关物质检测波长。(4) 优化后的有关物质测定方法: 精密称取本品适量 (约相当于莫匹罗星 25mg), 置 50ml 量瓶中, 加 0.1mol/L pH6.3 磷酸盐缓冲液溶解并定容至刻度, 作为供试品溶液; 精

密度取供试品溶液 1ml, 置 100ml 量瓶中, 加 0.1mol/L pH6.3 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 作为对照溶液。照高效液相色谱法 (中国药典 2010 年版二部附录 VD) 测定。用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (加 C8 的不锈钢预柱); 以四氢呋喃 - 7.7g/L 醋酸铵 (用冰醋酸调节 pH 值至 5.7) (28:72) 为流动相; 检测波长为 240nm, 莫匹罗星峰与其相对保留时间为 0.73 峰 (莫匹罗星杂质 C) 的分离度 ≥ 3.5。精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μl, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。

4. 含量测定色谱条件的优化: (1) 流动相组成比例的研究: 若采用新药转正标准含量测定项下的流动相乙腈 - 0.1mol/L 磷酸二氢钠缓冲液 (用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.3) (25:75) 时柱压较高。因此按照 BP2013 将上述流动相比例调至 28:72, 流速 1.0ml/min。此色谱条件下主峰保留时间为 9.8min, 柱压 172bar。(2) 缓冲盐浓度的研究: 在实验中发现, Agilent TC - C18 (2) 色谱柱在使用几次的情况下, 出现主峰拖尾情况。为了延长色谱柱使用寿命, 提高柱效和测定的准确性, 考察 0.1、0.05、0.02、0.01mol/L 不同浓度的缓冲盐对主峰峰形和杂质与主峰分离情况的影响, 结果主峰峰形均良好, 主峰与杂质 C 分离度分别为 8.36、8.14、7.60、7.03。因此确定以 USP35 的乙腈 - 0.05mol/L pH 6.3 磷酸盐缓冲液 (28:72) 作为流动相。(3) 对照品的确定: 在药典标准中, 含量测定使用的对照品均为莫匹罗星锂, 而中国药品生物制品检定所现已有莫匹罗星的对照品出售, 且在软膏新药转正标准含量测定项下规定的对照品也是莫匹罗星。因此, 采用莫匹罗星对照品进行含量测定。(4) 波长的确定: 采用高效液相 UV - DAD 对莫匹罗星进行光谱扫描, 莫匹罗星紫外最大吸收波长为 225 ~ 230nm, 因此, 含量测定波长设定为 230nm 是合理的, 与 BP2013 相同。(5) 优化后的含量测定方法: 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈: 0.05mol/L pH 6.3 磷酸盐缓冲液 (28:72) 为流动相; 检测波长为 230nm。莫匹罗星峰与其相对保留时间为 0.75 峰 (莫匹罗星杂质 C) 的分离度 ≥ 1.5。测定法精密称取本品适量 (约相当于莫匹罗星 12.5mg), 置 50ml 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 20 μl 注

入液相色谱仪,记录色谱图;另取莫匹罗星对照品,同法测定。按外标法以峰面积计算,即得。

结 果

1. 有关物质研究方法学: (1) 系统适用性: 取供试品溶液 20 μ l 注入色谱仪, 莫匹罗星与其相对保留时间为 0.73 的峰(莫匹罗星杂质 C) 分离度 ≥ 3.5 , 见图 1。 (2) 专属性考察: 取本品 625mg(约相当于莫匹罗星 12.5mg), 分取 5 份, 分别加 0.1mol/L 盐酸溶液 5ml 超声溶解, 室温放置 8min; 加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 5ml 超声溶解, 室温放置 12min; 在 100℃ 中加热 22h, 冷却至室温; 4500lx 强度的光照下破坏 6 天; 用 30% 过氧化氢溶液 10ml 超声溶解, 40℃ 水浴条件下放置 2h, 上述样品照有关物质测定项下的方法配制成 0.25mg/ml 浓度的溶液, 作为酸破坏、碱破坏、高温破坏、光照破坏、氧化破坏试验的溶液。精密称取莫匹罗星软膏辅料 625mg, 置 50ml 量瓶中, 用 0.1mol/L pH 6.3 磷酸盐缓冲液溶解并定容至刻度。照上述色谱条件试验。结果表明, 在酸、碱、高温、氧化破坏条件下, 相对保留时间 0.73 的杂质峰(杂质 C) 增加不明显, 在保留时间 10min 附近产生两个较大的杂质峰, 各杂质峰与主峰之间分离良好。在 4500lx 强度的光照下破坏 6 天后, 杂质峰未见明显增加, 主峰含量几乎无变化, 可见莫匹罗星软膏对光较稳定。除溶剂峰外, 辅料溶液色谱图中未见辅料色谱峰, 即辅料不影响莫匹罗星有关物质的测定, 见图 2 ~ 图 7。 (3) 线性关系: 精密称取莫匹罗星软膏 1250mg(约相当于莫匹罗星 25mg), 置 50ml 量瓶中, 0.1mol/L pH 6.3 磷酸盐缓冲液使溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为溶液 B。分别精密量取溶液 B 0.5、1.0、1.5、3.0ml 分别至 100ml 量瓶中, 分别精密量取溶液 B 2.0、2.5、3.0、4.0、5.0ml 分别至 50ml 量瓶中, 用 0.1mol/L pH 6.3 磷酸盐缓冲液稀释并定容至刻度, 摇匀。分别精密量取有关物质线性溶液各 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 X(μ g/ml) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 拟合线性回归方程为: $Y = 13.43X + 3.331$, 相关系数为 0.9994, 表明在对照溶液 2.5 ~ 50.0 μ g/ml (50% ~ 1000% 对照溶液) 浓度范围内, 峰面积与浓度线性关系良好。 (4) 重复性: 取对照溶液连续进样 6 次, 记录色谱图, 以峰面积计算, RSD 为 0.45% ($n = 6$), 方法重复性良好。 (5) 检测限和定量限: 取对照溶液逐步稀释进样, 记录色谱图。结果莫匹罗星检测限浓度为 0.10 μ g/ml ($S/N = 3$), 定量限浓度为 0.50 μ g/ml ($S/N = 10$)。

(6) 耐用性: 通过改变不同的色谱条件, 流动相组成比例四氢呋喃 - 7.7g/L 醋酸铵(用冰醋酸调节 pH 值至 5.7) 分别为 (26:74) 和 (30:70); 不同厂家的色谱柱 Kromasil C₁₈、Dikma C₁₈, 对莫匹罗星软膏中有关物质进行测定, 记录的色谱图峰形均良好, 莫匹罗星与杂质 C 分离度均 >3.5 , 耐用性好。 (7) 溶液的稳定性: 取同一供试品溶液, 于 0、6、10、24h 分别测得莫匹罗星峰面积的 RSD 为 0.09%, 总杂质峰面积的 RSD 为 2.82%, 说明供试品溶液在室温条件下 24h 内稳定。

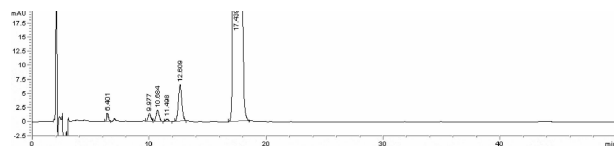


图 1 有关物质系统适用性色谱图

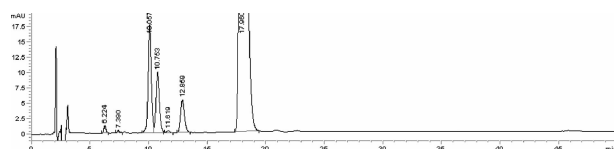


图 2 酸破坏高效液相色谱图

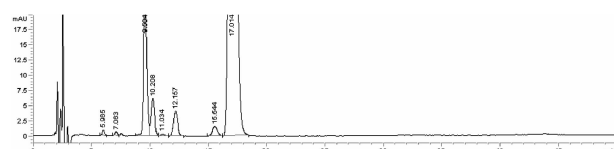


图 3 碱破坏高效液相色谱图

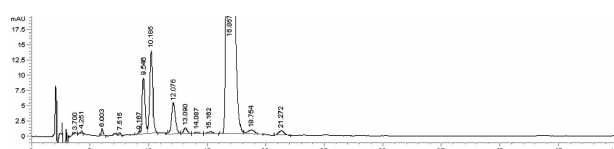


图 4 高温破坏高效液相色谱图

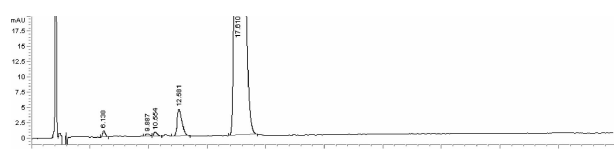


图 5 光破坏高效液相色谱图

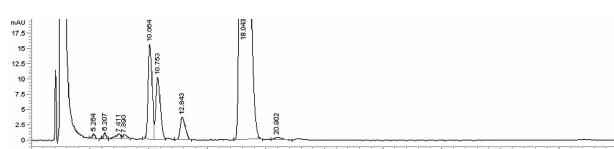


图 6 氧化破坏高效液相色谱图

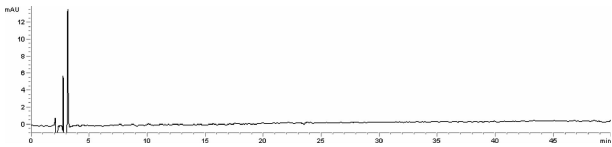


图 7 空白辅料高效液相色谱图

2. 含量测定方法学: (1) 系统适用性: 莫匹罗星主峰理论板数为 16327, 莫匹罗星与其相对保留时间为 0.75 的峰(杂质 C)分离度为 9.06, 符合 ≥ 1.5 的要求, 见图 8。(2) 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 室温放置 24h。于 0、4、8、12、24h 分别精密量取 20 μ l 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。测得莫匹罗星峰面积的 RSD 为 0.68%, 表明莫匹罗星软膏供试品溶液在 24h 内稳定。(3) 线性关系: 精密称取莫匹罗星软膏 6.25g 至 50ml 量瓶中, 用流动相溶解并定容至刻度, 混合, 作为溶液 A。分别精密量取溶液 A 2.5、4.0、5.0、6.0、7.5ml 分别至 50ml 量瓶中, 用流动相稀释并定容至刻度, 摇匀。分别精密量取上述溶液各 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 X (μ g/ml) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 拟合线性回归方程为: $Y = 25549X + 24.386, R^2 = 0.9995$, 结果表明, 在对照溶液 0.125 ~ 0.375mg/ml (50% ~ 150% 对照溶液) 浓度范围内, 峰面积与浓度线性关系良好。(4) 加样回收率试验: 精密称取莫匹罗星原料 10.0、12.5、15.0mg, 分别置 50ml 量瓶中, 分别称取莫匹罗星空白辅料 612.5mg, 加流动相超声溶解并定容至刻度, 制成相当于含量测定浓度的 80%、100% 和 120% 的溶液, 3 个浓度各测定 3 次, 计算回收率, 低、中、高 3 个浓度的回收率分别为 99.8%、99.9% 和 101.7%; 平均回收率为 100.5%, 详见表 1。(5) 精密度试验: 取同一对照品溶液, 连续 6 次进样, 主峰面积相对标准偏差为 0.04%, 精密度良好。

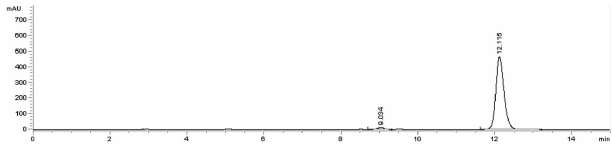


图 8 含量测定系统适用性色谱图

讨 论

在有关物质检查方法学研究过程中, 笔者注意到质量标准中要求杂质 E 峰面积不得大于对照溶液主

表 1 莫匹罗星回收率 (n = 9)

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)
9.92	9.90	99.82
9.92	9.91	99.87
9.92	9.91	99.85
12.66	12.65	99.91
12.66	12.65	99.90
12.66	12.65	99.90
15.08	15.42	102.30
15.08	15.28	101.30
15.08	15.29	101.40

平均回收率为 100.5%, RSD 为 0.9%

峰面积的 10 倍 (10%), 因此线性考察范围上限延伸至对照溶液浓度的 10 倍, 保证了杂质检测的准确性。莫匹罗星软膏空白辅料在溶剂峰前有明显色谱峰, 与主成分及其他杂质峰分离良好, 不干扰有关物质测定, 建议在标准中注明扣除辅料峰。本研究莫匹罗星软膏有关物质是参照英国药典同品种的限定制订的, 杂质 C、D 和 E 限度分别为不得过 4%、5% 和 10%, 杂质总量不得过 20%, 限度较宽。企业可根据稳定性试验资料, 严格限度, 制定适当的放行标准^[5,6]。

与美国药典、英国药典收载的方法比较, 笔者从色谱柱的选用、对照 (品) 溶液、流动相组成比例的研究等方面建立了适合国内常规检测的莫匹罗星软膏的有关物质和含量测定方法。结果表明, 建立的方法简便、准确, 可用于莫匹罗星软膏的质量控制。

参考文献

1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 29-31

2 国家药典委员会. WS1-(X-114)-2000Z, 国家药品标准. 新药转正标准第 23 册. 莫匹罗星软膏[S]. 2000: 786-787

3 The United States Pharmacopeial Convention. USP36[S], 2013: 4419

4 British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia[S]. 2013: 3192-3193

5 范莹, 杨钊. HPLC 法测定莫匹罗星喷雾剂的含量[J]. 中国药房杂志, 2013, 24(33): 3143-3144

6 耿悦, 赵恂, 袁耀佐, 等. HPLC-UV/MS² 法考察国产莫匹罗星软膏的杂质谱[J]. 药学与临床研究杂志, 2013, 6: 610-613

(收稿日期: 2014-12-11)

(修回日期: 2015-01-13)