

HPLC法检查双氯芬酸钾原料药中的有关物质

李玮玲*(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R927.2;R971*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4291-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.24

摘要 目的:建立检查双氯芬酸钾原料药中有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Ultimate C₁₈,流动相为甲醇-4%冰醋酸水溶液(65:35),流速为1 ml/min,检测波长为254 nm。结果:双氯芬酸钾检测质量浓度线性范围为0.205 3~51.335 0 μg/ml($r=0.999\ 9, n=5$),检测限为1.54 ng。结论:该方法简单、灵敏,可用于双氯芬酸钾原料药中有关物质的检查。

关键词 双氯芬酸钾原料药;高效液相色谱法;有关物质;检查

Determination of Related Substance in Diclofenac Potassium Raw Material by HPLC

LI Wei-ling(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the determination of related substance in diclofenac potassium raw material. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Ultimate C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-4% acetic acid solution (65:35) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: The linear range of diclofenac potassium were 0.205 3-51.335 0 μg/ml ($r=0.999\ 9, n=5$). The lowest detection limit was 1.54 ng. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and suitable for the determination of related substance in diclofenac potassium raw material.

KEY WORDS Diclofenac potassium raw material; HPLC; Related substance; Determination

双氯芬酸钾,化学名为邻-(2,6-二氯苯胺基)-苯乙酸钾,其主要药理作用是通过抑制环氧化酶而减少前列腺素的生物合成,而前列腺素在疼痛、炎症及发热过程中起重要作用^[1]。双氯芬酸钾目前的剂型有胶囊、片剂、凝胶^[2]等,目前载的检查方法存在于国家食品药品监督管理局药品标准(简称国家药品标准)^[3]、《英国药典》^[4]、《美国药典》^[5]和进口药品注册标准^[6]中。笔者对比各检查方法,并在此基础上拟定了新的较为简单合理的双氯芬酸钾有关物质检查方法,就双氯芬酸钾的几个已知有关物质在色谱系统中进行了有效分离,测定了已知杂质相对于双氯芬酸钾的相对响应因子,最终建立了双氯芬酸钾原料药有关物质的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪、Chemstation色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司);XS-204电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

双氯芬酸钾对照品(中国食品药品检定研究院,批号:

10080-200601,纯度:100.0%);样品双氯芬酸钾原料药(A,批号:C0147,纯度:100.0%;B,批号:100819-2,纯度:100.0%;C,批号无,纯度:99.8%);杂质I、II、III对照品(北京诺华制药有限公司,批号、纯度无);甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-4%冰醋酸水溶液(65:35),流动相使用前经0.45 μm有机滤膜抽滤并脱气,流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃。

2.2 系统适用性试验

取双氯芬酸钾对照品适量,用水制成1 mg/ml的溶液。取适量,置于石英吸收池中,在紫外光灯(254 nm)下照射15 min(使产生1个稳定的杂质峰,满足系统适用性的要求,在此后的试验中无需采用昂贵的杂质对照品),此溶液作为系统适用性试验溶液。精密量取此溶液20 μl,注入色谱仪,记录色谱图。结果在与双氯芬酸钾相对保留时间约0.77处出现1个杂质峰,杂质峰与双氯芬酸钾峰的分度应大于6.0,理论板数按双氯

[5] 赵善民,晋玲,黄丽娟.不同浓度乙醇对蟾蜍血压和心率的影响[J].生物学杂志,1996,71(3):16.

[6] Morvai V. Acute effects of low doses of alcohol on the cardiovascular system in young men[J]. Acta Med Hung, 1988, 45(3/4):339.

[7] Chen RN. Review on determination of residual organic so-

*副主任药师,硕士。研究方向:化学药品检验。电话:020-26282199。E-mail:llwwling@163.com

lvents in drugs[J]. Chin J Pharma, 1997, 28(6):275.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录VE、VII E.

[9] 殷涌光,陈玉江,刘瑜,等.磷脂功能性质及其生产应用的研究进展[J].食品与机械,2009,25(3):120.

[10] 胡兴中,徐振山.我国大豆磷脂的开发利用状况与产业发展设想[J].中国油脂,1999,24(3):54.

(收稿日期:2013-02-20 修回日期:2013-03-22)

芬酸钾峰计应不低于5 000。色谱图见图1。

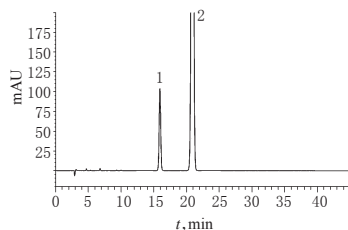


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. 杂质; 2. 双氯芬酸钾

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

1. impurity; 2. diclofenac potassium

2.3 破坏性试验

取双氯芬酸钾原料药,用甲醇制成5 mg/ml的溶液,作为贮备液。取贮备液2 ml,分别进行如下试验:(1)酸破坏:加入0.1 mol/L 盐酸溶液1 ml,在水浴中加热15 min,放冷,用0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液成中性,用甲醇稀释至10 ml。(2)碱破坏:加入0.1 mol/L 氢氧化钠溶液1 ml,在水浴中加热15 min,放冷,用0.1 mol/L 盐酸溶液调节溶液成中性,用甲醇稀释至10 ml。(3)氧化破坏:加入过氧化氢溶液1 ml,在水浴中加热15 min,放冷,用甲醇稀释至10 ml。(4)高温破坏:用甲醇稀释至10 ml,在水浴中加热30 min,放冷。(5)光照破坏:用甲醇稀释至10 ml,在254、365 nm的波长处各照射30 min。取上述5种溶液进样分析,结果杂质峰与主峰分离良好,表明本色谱条件可行。色谱图见图2。

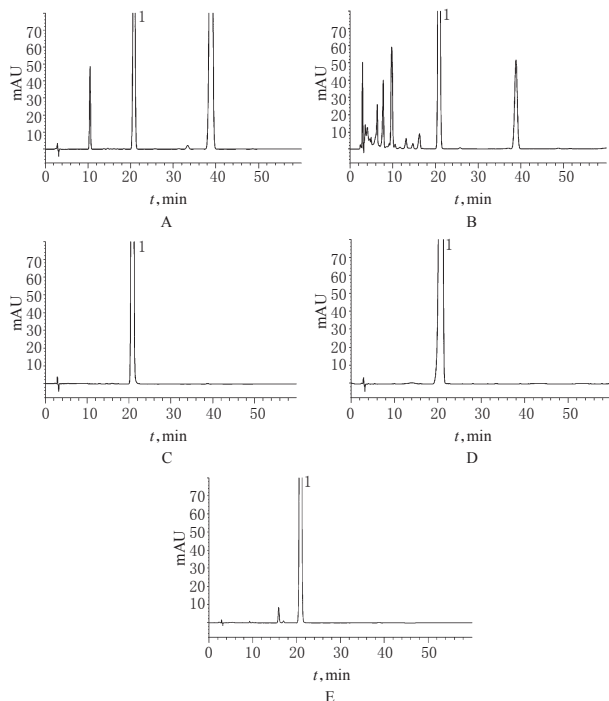


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏样品; B. 碱破坏样品; C. 氧化破坏样品; D. 高温破坏样品; E. 光照破坏样品; 1. 双氯芬酸钾

Fig 2 HPLC chromatograms of destroyed test

A. samples destroyed by acid; B. samples destroyed by alkali; C. samples destroyed by oxidation; D. samples destroyed by high temperature; E. samples destroyed by high light; 1. diclofenac potassium

2.4 线性关系试验

精密称取双氯芬酸钾对照品20.534 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备液;精密量取贮备液1 ml,置于100 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀;再精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为线性试验用溶液I;精密量取贮备液5、10、15、25 ml,分别置于100 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为线性试验用溶液II~V。精密量取上述线性溶液I~V各20 μl,分别注入色谱仪,记录色谱图。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,得到线性方程 $A=21.261 4c+0.105 1$ ($r=0.999 9$, $n=5$),表明双氯芬酸钾检测质量浓度线性范围为0.205 3~51.335 0 μg/ml。

2.5 稳定性试验

取“2.8”项下的供试品溶液分别于0、2、4、8、12、24 h时进样测定,计算得主峰峰面积的RSD=1.2%,杂质峰峰面积的RSD=1.0%~1.2% ($n=6$),样品杂质无明显变化,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.6 耐用性试验

按现设的色谱条件,取双氯芬酸钾对照品,杂质I、II、III对照品适量,加甲醇溶解并定量稀释制成质量浓度分别为1 mg/ml、2 μg/ml、2 μg/ml和2 μg/ml的溶液,摇匀;量取上述溶液20 μl,注入色谱仪,比较在4根不同牌号的色谱柱上的分离效果。4根色谱柱分别为色谱柱1:Ultimate C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);色谱柱2:Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);色谱柱3:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);色谱柱4:Ecosil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)。结果除Ecosil柱外,其他3个牌号色谱柱均适用,相对保留时间相对稳定,详见表1;色谱柱1的分离效果见图3。

表1 耐用性试验结果

Tab 1 Results of durability test

色谱柱	杂质I与主峰分离度	主峰理论板数	主峰保留时间, min	主峰对数因子	杂质I相对保留时间	杂质II相对保留时间	杂质III相对保留时间
色谱柱1	9.85	21 542	20.882	1.0	0.51	0.77	1.23
色谱柱2	8.27	16 832	17.656	1.0	0.55	0.78	1.25
色谱柱3	10.38	19 277	20.899	1.0	0.49	0.77	1.29
色谱柱4	8.52	10 311	18.329	1.2	0.62	0.81	1.51

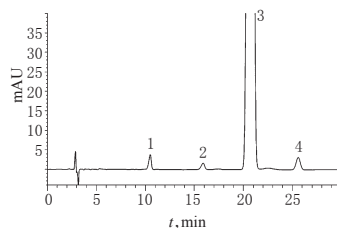


图3 色谱柱1的分离效果图

1. 杂质I; 2. 杂质II; 3. 双氯芬酸钾; 4. 杂质III

Fig 3 Separation effect of chromatographic column 1

1. impurity I; 2. impurity II; 3. diclofenac potassium; 4. impurity III

2.7 检测限试验

以信噪比为3计算,得双氯芬酸钾的检测限为1.54 ng。

2.8 有关物质检查

取样品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释制成1 mg/ml的溶液,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液适量,用甲醇

定量稀释制成2 μg/ml的溶液,作为对照溶液。量取对照溶液20 μl,注入色谱仪,调节检测灵敏度,使双氯芬酸钾峰高约为满量程的20%;再精密量取供试品溶液和对照溶液各20 μl,分别注入色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的2倍。杂质I、杂质II、双氯芬酸钾和杂质III峰的相对保留时间分别约为0.5、0.8、1.0、1.2。按校正后的峰面积计算(杂质I、杂质II和杂质III分别乘以0.7、1.1、0.5),单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积(0.2%),杂质总量不得大于对照溶液主峰面积的2.5倍(0.5%)。3批样品检查结果见表2,供试品(批号:C0147)溶液色谱图见图4。

表2 样品有关物质检查结果

Tab 2 Result of related substance in samples

厂家	已知杂质, %			未知单个杂质, %	杂质总量, %
	杂质 I	杂质 II	杂质 III		
A	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0.04	0
C	0	0	0	0.02, 0.01, 0.01, 0.02	0.1

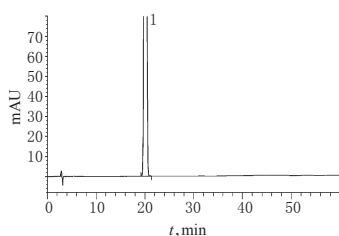


图4 有关物质检查高效液相色谱图

1. 双氯芬酸钾

Fig 4 HPLC chromatogram of related substance

1. diclofenac potassium

3 讨论

3.1 本方法与各国标准比较

《英国药典》^[4]载的已知杂质有A、B、C、D和E(杂质A、C、B分别对应杂质I、II、III,杂质D和E未收集到),但在计算时对已知杂质没有明确的规定,只计算单个杂质的量(0.2%)和总杂质的量(0.5%)(用主成分自身对照法计算)。《美国药典》^[5]规定杂质A不得过0.1%(外标法计算);单个未知杂质不得过0.1%,杂质总量不得过0.3%(用主成分自身对照法计算)。进口药品注册标准^[6]规定杂质I(相当于《英国药典》的杂质A)不得过0.2%(外标法计算),单个未知杂质不得过0.2%和杂质总量不得过0.4%(用主成分自身对照法计算)。国家药品标准限度同《英国药典》。本方法与相关研究^[1]比较,流动相条件较为简单,并且考察了相对于主峰响应因子不同的杂质峰,并制订了限度,提出了系统适用性溶液的制备方法,减少了使用对照品的麻烦。

3.2 杂质计算方法

本文检查的已知杂质有杂质I[1-(2,6-二氯苯基)-1,3-吡啶酮]、II[邻-(2,6-二氯氨基)-苯甲醇]、III[邻-(2,6-二氯氨基)-苯甲醛],分别对应于《英国药典》的杂质A、C、B。已知杂质采用加校正因子的主成分自身对照法计算,未知杂质采用主成分自身对照法计算。

3.3 已知杂质的定位和峰面积校正因子

本试验得到北京诺华制药有限公司的支持,提供了杂质I、II和III的对照品,但这些对照品今后将难以提供,故对已知杂质采用相对保留时间定位,用加校正因子的主成分自身对照法计算含量。经试验,杂质I、II和III的相对保留时间分别为0.51、0.77、1.23,峰面积校正因子为0.7、1.1、0.5。但杂质III的校正因子为0.5,并且在制剂中该杂质普遍存在,在计算中是否应该引入该校正因子还有待进一步研究。

3.4 流动相的筛选

在试验中,比较了本方法、《英国药典》^[4]、《中国药典》^[7]2010年版二部收载的双氯芬酸钠^[7]有关物质检查项下所用的流动相,在同一色谱柱上本方法流动相下峰形和理论板数优于《英国药典》;采用《英国药典》流动相及C₈柱测定,发现色谱峰理论板数相对较低,峰形不佳;而参照《中国药典》^[7]方法,用拟定标准的流动相,在240 nm波长处测定,基线噪音较大;并且冰醋酸浓度越低,双氯芬酸钾主峰保留时间越长,与杂质分离度反而变差。双氯芬酸钠原料药有关物质检查方法^[7]和本方法所用的醋酸溶液浓度不同,前者为0.12%,后者为4%。

3.5 检测波长

《英国药典》^[4]、《美国药典》^[5]、进口药品注册标准的检测波长均为254 nm,国家药品标准为257 nm,本文暂定为254 nm。

3.6 系统适用性试验参比物

《英国药典》^[4]、进口药品注册标准^[6]、国家药品标准^[3]所用的系统适用性试验参比物基本相同,均使用N-2,6-二氯苯基-2-吡啶酮作为参比物(杂质A)。笔者采用双氯芬酸钾水溶液(1 mg/ml)在紫外光灯(254 nm)下照射产生的降解产物作为参比物,该降解产物能恒定产生。在现设的色谱条件下,保留时间为15.936 min的峰为降解产物峰,相对保留时间约0.8(见图1),此降解产物目前仍为未知化合物(从保留时间来看与杂质II相同,但是否为杂质II尚待确定),如此这样可简化操作并可免于使用N-2,6-二氯苯基-2-吡啶酮对照品。

参考文献

- [1] 周波,邹春阳,庞小琳,等.HPLC法测定双氯芬酸钾中有关物质[J].辽宁化工,2012,41(3):322.
- [2] 胡英,陈心舒.不同透皮促进剂对双氯芬酸钾凝胶剂体外透皮效果的影响研究[J].中国药房,2009,20(19):1468.
- [3] 国家药品监督管理局.WS₁-(X-248)-2004Z 双氯芬酸钾[S].2005-09-01.
- [4] British Pharmacopoeia Commission. *British pharmacopoeia*[S].2012 ed. London: The Stationery Office, 2012:90.
- [5] The United States Pharmacopoeial Convention. *USP 32*[S]. Washington D.C: The United States Pharmacopoeial Convention, 2009:2544.
- [6] 国家药品监督管理局.JX20000129 国家食品药品监督管理局进口药品注册标准[S].2000.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:73.

(收稿日期:2013-01-24 修回日期:2013-03-09)