

HPLC法测定氯苯扎利二钠片中有关物质含量

潘柏良^{1*}, 王臣寻²(1.重庆市中医院, 重庆 400011; 2.成都市高新区药工医药生物技术研究所, 成都 610041)

中图分类号 R927.2; R971.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1999-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.28

摘要 目的:建立测定氯苯扎利二钠片中有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法测定3批样品中杂质A(邻氨基苯甲酸)和杂质B(2,4-二氯苯甲酸)及其他有关物质的检查。色谱柱为TianHe C₁₈,流动相为乙腈-磷酸二氢钾溶液(pH 3.2)(50:50),流速为1.0 ml/min,检测波长为222 nm,柱温为30 ℃。结果:氯苯扎利二钠检测质量浓度线性范围为0.260 8~2.608 μg/ml($r=0.999\ 4$),平均回收率为99.85%,RSD=0.22%($n=9$)。氯苯扎利二钠、杂质A、杂质B的检测限分别为0.202 24、0.374 4、0.838 4 ng。结论:本法灵敏、准确,可作为氯苯扎利二钠片有关物质的测定方法。

关键词 高效液相色谱法;氯苯扎利二钠片;有关物质

Content Determination of Related Substances in Lobenzarit Disodium Tablets by HPLC

PAN Bai-liang¹, WANG Chen-xun²(1.TCM Hospital of Chongqing, Chongqing 400011, China; 2.Yaogong Institute of Medicinal Biotechnology of Chengdu High-tech Zone, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of related substances of Lobenzarit disodium tablets. METHODS: HPLC method was adopted to determine impurity A (anthranilate), impurity B (2,4-dichlorobenzoic acid) and other related substances of 3 batches of samples. The determination was performed on TianHe C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-monomopotassium phosphate (pH 3.2) (50:50) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 222 nm and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of lobenzarit disodium were 0.260 8-2.608 μg/ml ($r=0.999\ 4$) with average recovery of 99.85% (RSD=0.22%, $n=9$). The detection limits of lobenzarit disodium, impurity A and impurity B were 0.202 24 ng, 0.374 4 ng and 0.838 4 ng. CONCLUSIONS: The method is sensitive and accurate, and it is suitable for the determination of related substances in Lobenzarit disodium tablets.

KEY WORDS HPLC; Lobenzarit disodium tablets; Related substance

氯苯扎利二钠(Lobenzarit disodium, LD)系二苯胺类衍生物,属于非甾体抗炎药,为免疫调节剂,可用于治疗类风湿性关节炎^[1]。该药物属于化学药品注册分类3.1类品种,国外已有上市销售其原料药及制剂,但在中国尚未上市。目前,国内尚无可参考的关于其有关物质检测的文献报道,其具有参考价值的唯一信息来自于国家食品药品监督管理局药品审评中心“日本药品体外溶出试验信息库”中关于LD的有关物质检测方法,但是该方法为薄层色谱法。有关物质检查作为产品质量标准的重要检验项目之一,对产品质量的控制具有极其重要的作用。相对于薄层色谱法,高效液相色谱(HPLC)法更加精确、灵敏。笔者采用自身对照加校正因子法对LD片中的杂质进行了检查,并增加了对杂质A(化学名:邻氨基苯甲酸)、杂质B(化学名:2,4-二氯苯甲酸)的检查。因此,笔者建立的检查方法较之前的检查方法更具优势,详细报道如下。

1 材料

奥泰426液相色谱仪、SS420X色谱工作站(美国科学系统公司)。

LD片(批号:cf04、20110101、20110102、20110103,规格:每片40 mg)、LD对照品(批号:101001,纯度:99.92%)、杂质A对照品(批号:20100824043,纯度:99.9%)、杂质B对照品(批号:20100712,纯度:99.2%)均由成都市高新区药工医药生物

技术研究所提供;乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱为TianHe C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾4.0 g,加水1 000 ml溶解后,用磷酸调节pH值至3.2)(50:50),流速为1.0 ml/min;检测波长为222 nm;柱温为30 ℃;进样量为20 μl。理论板数按LD峰计应不低于2 000。

2.2 对照品溶液的制备

取杂质A对照品,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成每1 ml中含0.02 mg的溶液,作为杂质A对照品溶液;取杂质B对照品,精密称定,加甲醇溶解并定量稀释制成每1 ml中含0.02 mg的溶液,作为杂质B对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品细粉(相当于LD 15 mg),精密称定,置于25 ml量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,过滤;精密量取续滤液2 ml,置于5 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 对照溶液的制备

精密量取供试品溶液1 ml,置于200 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 空白辅料溶液的制备

取空白辅料37.8 mg,置于25 ml量瓶中,加水超声溶解并定容至刻度,摇匀,过滤,即得。

2.6 限度要求

*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:023-63715677。E-mail: PBL2007@tom.com

精密量取对照溶液 20 μl 进样分析, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 20%; 精密量取供试品溶液、对照溶液、杂质 A 对照品溶液、杂质 B 对照品溶液各 20 μl , 分别进样分析, 记录供试品色谱图至主峰保留时间 3 倍之后。供试品溶液的色谱图中如显杂质 A、杂质 B 的峰, 按校正后的峰面积计算[分别乘以校正因子 0.39(杂质 A)、1.71(杂质 B)], 均不得大于对照溶液的主峰面积的 1/5(0.1%); 其余最大单个杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积的 1/5(0.1%), 杂质总和不得过 0.5%。

2.7 干扰试验

取 LD 对照品、杂质 A 对照品、杂质 B 对照品、空白辅料、LD 对照品+空白辅料、杂质 A 对照品+空白辅料、杂质 B 对照品+空白辅料各溶液进样。结果加入空白辅料的对照品杂质个数及杂质量均未增加, 由此可知, 辅料不干扰本品有关物质的测定。色谱见图 1。

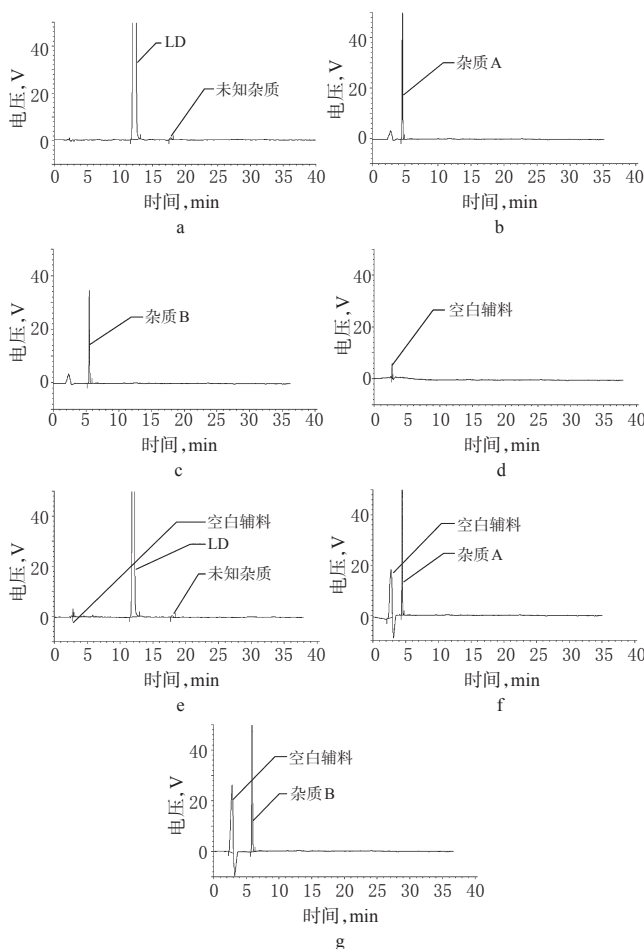


图 1 干扰试验高效液相色谱图

a. LD 对照品; b. 杂质 A 对照品; c. 杂质 B 对照品; d. 空白辅料; e. LD 对照品+空白辅料; f. 杂质 A 对照品+空白辅料; g. 杂质 B 对照品+空白辅料

Fig 1 HPLC chromatogram of interference test

a. LD control; b. impurity A control; c. impurity B control; d. blank excipients; e. LD control+blank excipients; f. impurity A control+blank excipient; g. impurity B control+blank excipients

2.8 线性关系考察

精密称取 LD 对照品适量, 加水溶解并稀释成每 1 ml 含 0.260 8、0.521 6、1.043 2、1.304、2.608 μg 的溶液。精密量取各溶

液进样分析, 记录色谱图, 以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标作图, 得线性方程 $y=544\ 40x+144\ 43$ ($r=0.999\ 4$)。同法得杂质 A 对照品和杂质 B 对照品的线性方程分别为 $y=141\ 834x+511.74$ ($r=0.999\ 0$)、 $y=282\ 73x-2\ 193.1$ ($r=0.999\ 1$)。结果表明, LD、杂质 A、杂质 B 的检测质量浓度线性范围分别为 0.260 8~2.608、0.072 96~0.456、0.322 56~2.016 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.9 降解试验

以下样品均为批号为 cf.04 的 LD 片, 光照降解因变化不大未列出。

2.9.1 未降解。取样品细粉 51.8 mg, 置于 25 ml 量瓶中, 加水超声溶解并稀释至刻度, 过滤, 取续滤液 20 μl 进样, 色谱见图 2A。

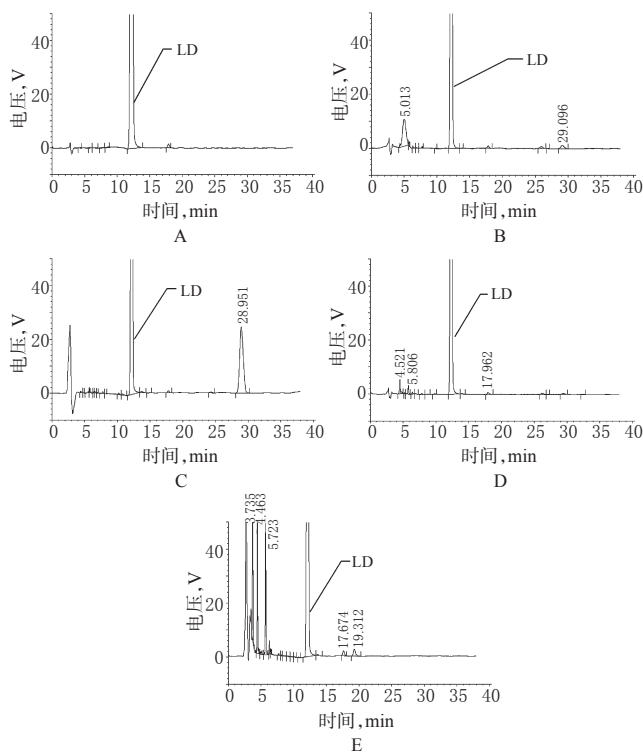


图 2 降解试验高效液相色谱图

A. 未降解样品; B. 热降解样品; C. 酸降解样品; D. 碱降解样品; E. 氧化降解样品

Fig 2 HPLC chromatogram of degradation test

A. undegraded sample; B. sample degraded by high temperature; C. sample degraded by acid; D. sample degraded by alkali; E. sample degraded by oxidant

2.9.2 热降解。取样品细粉约 31.2 mg, 放入 270 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热 2 h, 取出, 放冷, 置于 25 ml 量瓶中, 加水超声溶解并稀释至刻度, 过滤, 取续滤液进样, 色谱见图 2B。结果经计算, 与降解前比较, 主峰约降解了 3%, 主要降解得保留时间为 5.013、29.096 min 的 2 个杂质峰, 其余小杂质也有所增加, 主峰与各降解杂质分离较好。

2.9.3 酸降解。取样品细粉约 25.5 mg, 加 2 mol/L 盐酸 10 ml, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 2 h, 取出、放冷, 加氢氧化钠溶液调至中性, 再加水稀释至 25 ml, 过滤, 取滤液进样, 色谱见图 2C。结果经计算, 与降解前比较, 主峰约降解了 7%, 主要降解得保留时间为 28.951 min 的 1 个杂质峰, 其余小杂质也有所增加, 主

峰与降解杂质分离较好。

2.9.4 碱降解。取样品细粉 26.9 mg,加 0.1 mol/L 氢氧化钠 10 ml,放入 80 ℃水浴中加热 2 h,取出,放冷,加盐酸溶液调至中性,加水稀释至 25 ml,过滤,取续滤液进样,见图 2D。结果经计算,与降解前比较,主峰约降解了 1%,主要降解得保留时间为 4.521、5.806、17.962 min 的 3 个杂质峰,其余小杂质有所增加,主峰与各降解杂质分离较好。

2.9.5 氧化降解。取样品细粉约 35.6 mg,加 30% 双氧水 10 ml,放入 80 ℃水浴中加热 2 h,取出,放冷,置于 25 ml 量瓶中,加水超声溶解并稀释至刻度,过滤,取续滤液进样,色谱见图 2E。结果经计算,与降解前比较,主峰约降解了 7%,主要降解得保留时间为 3.735、4.463、5.723、17.674、19.312 min 的 5 个杂质峰,其余小杂质也有所增加,主峰与各降解杂质分离较好。

从热、酸、碱及氧化降解可以看出,此液相条件能较好检测出降解产物,且降解产物与主峰分离较好,降解杂质基本均在主峰保留时间的 3 倍内出峰,说明此液相色谱条件适用于检查本品的有关物质。

2.10 检测限的确定

取 LD 对照品 15.8 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,逐步稀释至 10.112 ng/ml 的溶液,进样 20 μ l,得信噪比约为 3:1 的峰,此即得 LD 的检测限 0.202 24 ng;取杂质 A 对照品 11.7 mg,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,逐步稀释至 18.72 ng/ml 的溶液,进样 20 μ l,得信噪比约为 3:1 的峰,此即得杂质 A 的检测限 0.374 4 ng;取杂质 B 对照品 13.1 mg 至 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,逐步稀释至 41.92 ng/ml,进样 20 μ l,得信噪比约为 3:1 的峰,此即得杂质 B 的检测限 0.838 4 ng。

2.11 回收率试验

2.11.1 样品回收率试验。分别精密称取 LD 对照品约 64、80、96 mg,按处方量加入空白辅料混合均匀;分别称取该混合物细粉约 35 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,过滤,取续滤液 2 ml,置于 10 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得。另精密称取 LD 对照品,用水稀释制成每 1 ml 含 LD 160 μ g 的溶液,作为对照品溶液。精密量取上述 2 种溶液各 20 μ l,分别进样,记录色谱图,用外标法计算回收率,结果平均回收率为 99.85%,RSD=0.22%,表明本法准确度较好。

2.11.2 杂质 A 回收率试验。精密称取杂质 A 对照品 32 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为母液;取已知杂质 A 含量的 LD 片(批号:cf.04,含杂质 A 0.006%)约 60 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水适量使溶解,精密加入杂质 A 母液适量(0.8、1.0、1.2 ml),加水稀释至刻度,摇匀,过滤;取续滤液 2 ml,置于 5 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得。另精密称取杂质 A 对照品,用水稀释制成每 1 ml 含杂质 A 22 μ g 的溶液,作为对照品溶液。精密量取上述 2 种溶液各 20 μ l,分别进样,记录色谱图,用外标法计算回收率。结果杂质 A 平均回收率为 100.17%,RSD=1.67%。

2.11.3 杂质 B 回收率试验。精密称取杂质 B 对照品 32 mg,

置于 25 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为母液;取已知杂质 B 含量的 LD 片(批号:cf.04,杂质 B 未检出)约 60 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水适量使溶解,精密加入杂质 B 母液适量(0.8、1.0、1.2 ml),加水稀释至刻度,摇匀,过滤;取续滤液 2 ml,置于 5 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得。另精密称取杂质 B 对照品,用水稀释制成每 1 ml 含杂质 B 22 μ g 的溶液,作为对照品溶液。精密量取上述 2 种溶液各 20 μ l,分别进样,记录色谱图,用外标法计算回收率。结果杂质 B 平均回收率为 102.40%,RSD=2.44%。

2.12 样品进样精密度试验

取 LD 对照品溶液连续进样 5 次,结果 RSD=0.10%,表明本法进样精密度较好。

2.13 样品放置稳定性试验

取 LD 对照品溶液,分别放置 0、1、2、3、5、8 h 后进样测定,结果杂质峰个数均未增加,总杂质 RSD=0.42%,表明溶液在室温下放置 8 h 基本稳定。

2.14 校正因子测定

精密称取 LD 对照品及杂质 A 对照品和杂质 B 对照品适量,配制成含 LD、杂质 A、杂质 B 各 2 μ g/ml 的混合溶液,精密量取 20 μ l 进样。经不同品牌液相色谱柱[品牌 1:月旭液相色谱柱 C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μ m);品牌 2:TianHe 液相色谱柱 C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μ m)],不同试验人员(2 名试验人员)测定。结果,杂质 A 校正因子均值为 0.39,RSD=0.42%;杂质 B 校正因子均值为 1.71,RSD=0.40%。

2.15 样品中有关物质测定

分别精密量取由批号为 20110101、20110102、20110103 制备的供试品溶液,以及样品自身对照溶液、杂质 A 对照品溶液、杂质 B 对照品溶液进样分析,记录色谱图,按校正后的峰面积计算[分别乘以校正因子 0.39(杂质 A)、1.71(杂质 B)]3 批样品的有关物质。测得 3 批样品的有关物质含量分别为:杂质 A:0.004%、0.004%、0.004%;杂质 B:均未检出;其余最大单个杂质质量分别为:0.07%、0.08%、0.08%;杂质总量分别为:0.10%、0.11%、0.11%。

3 讨论

在选择检测波长 222 nm 的情况下,笔者在前期试验中曾比较不同流动相[乙腈-水(7:3)、乙腈-磷酸二氢钾溶液(取磷酸二氢钾 4 g 加水 1 000 ml 溶解)(50:50)]的分析效果。在保证各成分保留时间、峰形、理论板数及各成分的分离度均达到要求的前提下,最终确定流动相为乙腈-磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 值 3.2)(50:50),并通过强制降解试验验证了方法的可行性。

参考文献

[1] 孙文萍,薛伟,宋延平.新型抗炎抗风湿药氯苯扎利钠的研究[J].山东医药工业,1999,18(1):1.

(收稿日期:2012-06-12 修回日期:2013-02-25)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅