

HPLC法测定氯诺昔康片中有关物质的含量

叶辉岩^{1*}, 郑淑凤²(1.厦门大学附属第一医院药学部, 福建厦门 361003; 2.厦门市药品检验所, 福建厦门 361012)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3537-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.30

摘要 目的:建立测定氯诺昔康片有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Hypersil ODS, 流动相 A 为 1% 醋酸铵溶液-10% 氢氧化四丁基铵溶液-甲醇(1 000:6.4:4.4), 流动相 B 为乙腈-辛胺(99.9:0.1), 梯度洗脱, 流速为 0.5 ml/min, 可变波长检测器, 检测波长为 280 nm, 柱温为 35 ℃。测定 3 批样品中 4 种已知杂质 2-氨基吡啶、HN-40244、HN-10004、HN-10002 及其他单个杂质和总杂质含量。结果:4 种已知杂质以及其他单个杂质均能与氯诺昔康完全分离, 4 种已知杂质在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.9998$), 检测限分别为 0.64、0.28、0.29、0.24 ng, 定量限分别为 1.30、0.93、0.95、0.40 ng。结论:建立的方法结果准确, 可全面检测氯诺昔康片中有关物质的含量。

关键词 氯诺昔康片; 高效液相色谱法; 有关物质

Content Determination of the Related Substances in Lornoxicam Tablets by HPLC

YE Hui-yan¹, ZHENG Shu-feng²(1.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Fujian Xiamen 361003, China; 2.Xiamen Institute for Drug Control, Fujian Xiamen 361012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of the related substances in Lornoxicam tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo Hypersil ODS column with 1% ammonium acetate solution-10% tetrabutylammonium hydroxide solution-methanol (1 000:6.4:4.4) as the mobile phase A and acetonitrile-octylamine (99.9:0.1) as mobile phase B (gradient elution). The flow rate was 0.5 ml/min and the column temperature was 35 ℃. The detection wavelength of VWD detector was set at 280 nm. The contents of 4 kinds of known impurity (2-amino pyridine, HN-40244, HN-10004 and HN-10002), other single impurity and total impurity were all determined in 3 batches of samples. RESULTS: 4 kinds of known impurities and other single impurity were all separated from lornoxicam completely. There was a good linear relationship between calibration curve and the concentration of 4 kinds of known impurities ($r \geq 0.9998$). The limits of detection were 0.64, 0.28, 0.29 and 0.24 ng, respectively. The limits of quantification were 1.30 ng, 0.93 ng, 0.95 ng and 0.40 ng, respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate and suitable for the content determination of the related substances in Lornoxicam tablets.

KEY WORDS Lornoxicam tablets; HPLC; Related substances

氯诺昔康属非甾体类抗炎镇痛药,具有良好的镇痛抗炎作用,近年来主要用于治疗类风湿性关节炎、骨关节炎、腹痛以及外科手术疼痛等的治疗。其化学名为 6-氯-4-羟基-2-甲基-N-2-吡啶基-2H-噻吩并[2,3-e]-1,2-噻嗪-3-碳乙二酰乙二胺-1,1-二氧化物。氯诺昔康有关物质主要有 2-氨基吡啶、5-氯-3-硫代-2-噻吩羧酸(简称 HN-40244)、5-氯-3-[(甲氨基)磺酰基]硫代-2-噻吩羧酸(简称 HN-10004)、氧代(2-吡啶氨基)-醋酸(简称 HN-10002)、替诺昔康(TX)。在国际通用药典均未收载本品的质量标准,相关资料与文献^[1-5]记载有其他剂型的有关物质考察^[6],但均使用自身对照法控制杂质总量,未对具体杂质进行单独控制。为此,笔者建立了采用流动相梯度洗脱的高效液相色谱(HPLC)法,结果表明不但能有效分离各有关杂质,且可通过以氯诺昔康为对照品按外标法加校正因子的方法计算出氯诺昔康片中各有关物质的含量,从而制订各有关物质及杂质总量的限度,实现全面有效地控制氯诺昔康片的质量的要求。结合厂家提供的生产工艺流程,由于杂质 TX 已在原料药中控制,故在制剂中不再检测,因此本文未涉及 TX 的控制。

* 主管药师。研究方向:医院药学。E-mail: xmyy6232@sina.com

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 液相色谱仪,包括可变波长检测器、色谱工作站(美国 Agilent 科技有限公司);XS105 十万分之一分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

氯诺昔康片(批号:001、002、003,规格:每片 4 mg)、氯诺昔康对照品(批号:RS2745,纯度:99.9%),杂质 HN-10002 对照品(批号:RS3117,纯度:81.3%)、杂质 HN-10004 对照品(批号:RS3129,纯度:99.8%)、杂质 2-氨基吡啶对照品(批号:ASQ154A,纯度:99.9%)、杂质 HN-40244 对照品(批号:RS2720,纯度:85.7%)、杂质 TX 对照品(批号:RS2598,纯度:99.5%)均由某进口企业提供;醋酸铵、氢氧化四丁基铵、三乙胺、醋酸钠均为分析纯,甲醇、乙腈均为色谱纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo ODS Hypersil(100 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相(梯度洗脱):1% 醋酸铵溶液-10% 氢氧化四丁基铵溶液-甲醇(1 000:6.4:4.4)为流动相 A,乙腈-辛胺(99.9:0.1)为流

动相B,流速:0.5 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:35 °C。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient eluted procedure

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	97	3
33	70	30
37	70	30
42	97	3
43	97	3

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合溶剂的制备。取醋酸钠5 g在400 ml水中溶解,将所得溶液与600 ml甲醇混合,加入0.1 ml醋酸,混匀即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备。精密称取氯诺昔康、HN-10002、HN-10004、2-氨基吡啶、HN-40244对照品各约10 mg, TX对照品约5 mg,分别置于100 ml量瓶中,加混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得各对照品贮备液。分别精密量取氯诺昔康、HN-10002、HN-10004对照品贮备液5.0 ml及2-氨基吡啶、HN-40244、TX对照品贮备液3.0 ml置于同一100 ml量瓶中,加混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 灵敏度溶液的制备。取氯诺昔康对照品约10 mg,置于100 ml量瓶中,加混合溶剂溶解并稀释至刻度;再精密量取该溶液0.8 ml至100 ml量瓶中,加混合溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 供试品溶液的制备。精密称取样品细粉适量(约含氯诺昔康40 mg),置于25 ml量瓶中,加入20 ml混合溶剂,在振荡筛中以220 r/min振荡2 h,用混合溶剂稀释至刻度;将样品溶液转移至容器中,离心约10 min,取上清液作为供试品溶液。

2.2.5 空白辅料溶液的制备。按处方称取空白辅料适量,按“2.2.4”项下的方法制成空白辅料溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下的溶液各10 μl进样分析。混合对照品溶液测得的所有响应因子的RSD不能大于3.0%(进样5次);杂质2-氨基吡啶、HN-10002、HN-40244、HN-10004、TX与氯诺昔康主峰之间应完全分离且HN-10004与TX峰分离度应大于1.5;灵敏度溶液信噪比最小为10:1。理论板数按氯诺昔康计不低于3 000,空白辅料无干扰。色谱图见图1。

2.4 线性关系考察

分别精密称取氯诺昔康、HN-10002、HN-10004、2-氨基吡啶、HN-40244对照品约0.01 g,置于100 ml量瓶中,加混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。分别精密量取氯诺昔康、HN-10002、HN-10004对照品贮备液各0.25、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 ml,2-氨基吡啶、HN-40244对照品贮备液各0.1、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0 ml置于100 ml量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度对照品溶液。分别取上述溶液10 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,以质量浓度(x)对峰面积(y)作标准曲线,线性关系试验结果见表2。

2.5 专属性试验

分别称取本品细粉(批号:001)适量(约含氯诺昔康40 mg)和空白辅料各5份,分别按下列条件试验:(1)酸破坏:加0.5 mol/L的盐酸溶液10 ml,水浴加热30 min,放冷,用1 mol/L氢氧化钠溶液中和,离心,取上清液;(2)碱破坏:加0.5 mol/L

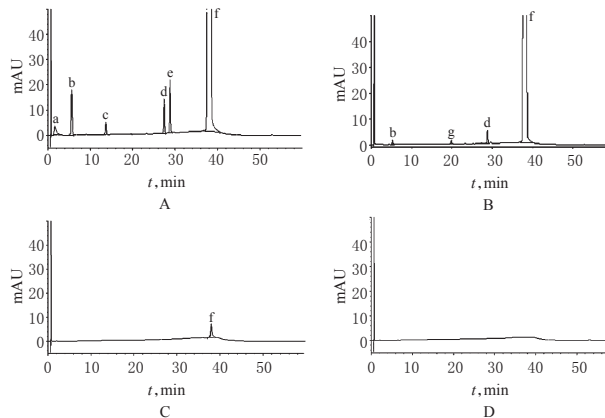


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 灵敏度溶液; D. 空白辅料溶液; a. 2-氨基吡啶; b. HN-10002; c. HN-40244; d. HN-10004; e. TX; f. 氯诺昔康; g. 其他单个杂质

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A. mixed control solution; B. sample solution; C. sensitivity solution; D. blank excipients solution; a. 2-amino pyridine; b. HN-10002; c. HN-40244; d. HN-10004; e. tenoxicam; f. lornoxicam; g. other single impurities

表2 各检测物的线性关系试验及检测限、定量限结果

Tab 2 The linear range, detection limit and quantitation limit of each component

组分	线性范围, μg/ml	r	线性方程	检测限, ng	定量限, ng
氯诺昔康	0.247 8~9.910 1	0.999 93	$y=10.339 23x-0.548 275$	0.49	0.98
2-氨基吡啶	0.106 8~6.407 6	0.999 89	$y=9.699 56x-0.409 691$	0.64	1.30
HN-40244	0.186 6~5.609 9	0.999 98	$y=7.628 99x+0.013 828 5$	0.28	0.93
HN-10004	0.200 0~7.999 9	0.999 99	$y=9.539 65x-0.128 386$	0.29	0.95
HN-10002	0.238 3~9.530 9	0.999 99	$y=19.492 41x+0.187 322$	0.24	0.40

的氢氧化钠溶液10 ml,水浴加热30 min,放冷,用1 mol/L盐酸溶液中和,离心,取上清液;(3)氧化破坏:加浓过氧化氢溶液2 ml,水浴加热60 min,放冷后加混合溶剂至10 ml,离心,取上清液;(4)加热破坏:120 °C放置过夜后,取出按“2.2.4”项下供试品溶液制备方法制备;(5)光照破坏:置于(4 500 ± 500) lx强光下照射3 d后,取出按“2.2.4”项下供试品溶液制备方法制备。分别取10 μl注入色谱仪进行分析。结果表明,本品在强酸条件下几乎不溶,无降解产物;在强碱和高温条件下较为稳定,除产生少量TX外,变化不大;在氧化和强光条件下不稳定,杂质HN-10002、HN-40244、TX量相应增大,且其他杂质的个数也有所增加。各降解产物与主成分峰均能达到良好分离,HN-10004与TX的分离度均大于1.5,破坏后的空白辅料对测定无影响。色谱图见图2。

2.6 检出限与定量限试验

将混合对照品溶液逐级稀释,进样,记录色谱图,根据信噪比为3、10时分别计算各有关杂质和氯诺昔康的检测限及定量限,结果见表2。

2.7 重复性试验

按“2.2.4”项下的方法制备供试品溶液(批号:001)6份,进样,记录色谱图。结果样品中杂质HN-10004、HN-10002及其他单个杂质含量的RSD分别为0.9%、1.4%、2.0%(n=6)。

2.8 稳定性试验

取“2.9”项下批号为001的供试品溶液,分别在0、2、4、8、

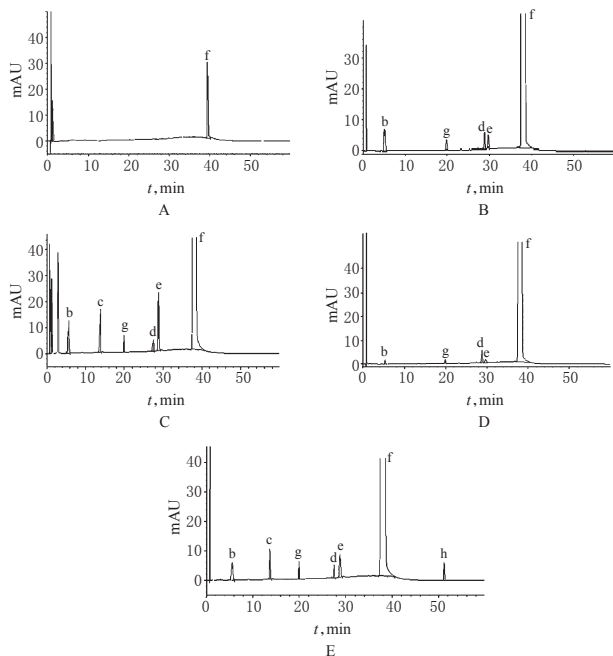


图2 专属性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏样品; B. 碱破坏样品; C. 氧化破坏样品; D. 加热破坏样品; E. 光照破坏样品; b. HN-10002; c. HN-40244; d. HN-10004; e. TX; f. 氯诺昔康; g, h. 其他单个杂质

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity 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 light radiation; b. HN-10002; c. HN-40244; d. HN-10004; e. tenoxicam; f. lornoxicam; g, h. other single impurities

12 h时测定,以各杂质含量及杂质总量的变化考察溶液的稳定性,结果供试品溶液中杂质含量无明显变化,2-氨基吡啶、HN-40244、HN-10004、HN-10002、氯诺昔康、杂质总量的RSD分别为0、0、0.16%、0.21%、1.4%、0.08% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定。

2.9 样品有关物质测定

取供试品(批号:001、002、003)细粉适量,按“2.2.4”项下的方法制备供试品溶液。精密量取供试品溶液和混合对照品溶液各10 μ l,分别进样,记录色谱图;供试品溶液色谱图中如显与2-氨基吡啶、HN-40244、HN-10004、HN-10002保留时间一致的峰,以氯诺昔康为对照品,按下式计算:

$$\text{杂质} = \frac{f \times A \times \text{稀释倍数} \times \bar{W}}{W \times \text{氯诺昔康标示量}} \times f_i \times 100\%$$

A为供试品溶液图谱中各杂质的峰面积, f 为氯诺昔康对照品的校正因子, f_i 为各杂质的相对校正因子, \bar{W} 为平均片重(g), W 为样品称样量(g)。

含2-氨基吡啶、HN-40244、HN-10004与HN-10002分别不得过0.1%、0.3%、0.5%与0.5%;其他单个杂质(不包括TX)不得过0.3%;杂质总量(不包括TX)不得过1.5%。有关物质测定结果见表3。

3 讨论

(1)笔者在前期试验了相关文献^[2,4]使用的流动相0.05 mol/L的KH₂PO₄溶液-乙腈-甲醇(60:23:7)和0.05 mol/L的乙酸钠溶液(pH 6.0)-甲醇(45:55)。结果HN-10004与TX的分

表3 样品中有关物质测定结果(%)

Tab 3 Determination of related substance in samples (%)

杂质名称	批号		
	001	002	003
2-氨基吡啶	未检出	未检出	未检出
HN-40244	未检出	未检出	未检出
HN-10004	0.08	0.08	0.07
HN-10002	0.06	0.06	0.06
其他单个杂质	0.03	0.03	0.03
杂质总量	0.20	0.20	0.20

离度均小于1.5,通过调节流动相比例和适当改变pH值,仍不能有效分离。由于氯诺昔康为弱酸性物质,加入适当的反相离子对试剂能改善分离效果,通过以四丁基溴化铵和氢氧化四丁基铵分别作离子对的分析结果进行了比较,表明氢氧化四丁基铵更适合该系统的分析。故在本文确立的流动相中,在流动相A中加入反相离子对试剂氢氧化四丁基铵,结果能有效分离HN-10004与TX,平衡时间相应较长。

(2)本文提及的各有关物质对照品均为某进口企业提供,在市面上较难采购得到,因此考虑可否采用各杂质与氯诺昔康的相对保留时间来确定各杂质的出峰位置。试验比较了3种色谱柱对各有关物质的保留情况,结果各有关物质在不同色谱柱中相对保留时间及相对校正因子基本一致。因此,在无法获取各有关物质对照品的条件下,可考虑采用各杂质与氯诺昔康的相对保留时间来确定各杂质的出峰位置。3种色谱柱分析结果比较详见表4。

表4 3种色谱柱分析结果比较

Tab 4 Comparison of 3 kinds of chromatographic columns

色谱柱	杂质名称	相对保留时间	f_i
Waters Spherisorb ODS (150 mm × 4.6 mm)	2-氨基吡啶	0.05	0.81
	HN-40244	0.43	1.41
	HN-10004	0.75	1.08
	HN-10002	0.18	0.65
	TX	0.76	
	其他杂质		1
	Hypersil ODS (125 mm × 4.6 mm)	2-氨基吡啶	0.05
HN-40244		0.42	1.41
HN-10004		0.73	1.09
HN-10002		0.18	0.66
TX		0.75	
其他杂质			1
Thermo Hypersil ODS (100 mm × 2.1 mm)		2-氨基吡啶	0.05
	HN-40244	0.45	1.39
	HN-10004	0.77	1.08
	HN-10002	0.17	0.66
	TX	0.79	
	其他杂质		1

综上所述,本方法简便、灵敏、快速,结果准确,重现性好,可全面检测氯诺昔康片中有关物质的含量。

参考文献

- [1] 付桂英,温明玲,郭晓华.HPLC法测定注射用氯诺昔康含量与有关物质[J].药物分析杂志,2004,24(4):434.
- [2] 王建.氯诺昔康有关物质及含量测定方法的建立[J].药物分析杂志,2001,21(6):389.
- [3] 王建,胡小君.氯诺昔康的HPLC分析[J].中国药学杂志,

紫外分光光度法测定甲磺酸罗哌卡因注射液的含量

雷晓雪*,陶元景,陈文芝,王丽楠[†](扬子江药业集团南京海陵药业有限公司,南京 210049)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3540-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.31

摘要 目的:建立快速测定甲磺酸罗哌卡因注射液生产中中间产品含量的方法。方法:采用紫外分光光度法。以0.9%氯化钠溶液为溶剂,检测波长为262 nm,同时与高效液相色谱法含量测定结果比较。结果:甲磺酸罗哌卡因检测质量浓度线性范围为37~740 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 8$),平均回收率为99.80% ($\text{RSD}=0.4\%$, $n=9$)。2种方法含量测定结果一致。结论:建立的方法简便、准确、快速,可用于甲磺酸罗哌卡因注射液大生产过程中中间产品的质量的控制。

关键词 紫外分光光度法;甲磺酸罗哌卡因注射液;含量测定

Content Determination of Ropivacaine Mesylate Injection by UV Spectrophotometry

LEI Xiao-xue, TAO Yuan-jing, CHEN Wen-zhi, WANG Li-nan (Yangtze River Pharmaceutical Group Nanjing Hailing Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210049, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid method for the content determination of intermediate product of Ropivacaine mesylate injection. METHODS: UV spectrophotometry was adopted. 0.9% sodium chloride solution was taken as solvent and the detection wavelength was set at 262 nm. Result of the method was compared with that of HPLC method. RESULTS: The linear range of ropivacaine mesylate were 37-740 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 8$) with an average recovery of 99.80% ($\text{RSD}=0.4\%$, $n=9$). Results of content determination by 2 kinds of methods were the same to each other. CONCLUSIONS: Established method is simple, accurate and rapid, and it can be used for quality control of intermediate product of Ropivacaine mesylate injection.

KEY WORDS UV spectrophotometry; Ropivacaine mesylate injection; Content determination

甲磺酸罗哌卡因注射液(Ropivacaine mesylate injection)是一种酰胺类局麻药,主要成分为甲磺酸罗哌卡因,化学名称为(S)-N-(2,6-二甲基苯基)-1-丙基-2-哌啶甲酰胺甲磺酸盐。甲磺酸罗哌卡因在紫外光区有很强的吸收^[1],已有文献报道采用高效液相色谱(HPLC)法测定甲磺酸罗哌卡因注射液的含量^[2-3]。但由于HPLC法检测过程较烦琐,不适合大生产过程中对中间产品快速分析的要求,所以笔者采用紫外分光光度法测定甲磺酸罗哌卡因注射液的含量^[4]。结果表明建立的方法操作简便、准确、快速。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);AG285型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甲磺酸罗哌卡因对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100548-200401,纯度:100%);甲磺酸罗哌卡因注射液(自制,批号:12110711、12112011、12112111,规格:89.4 mg:10

ml)。

2 方法与结果

2.1 对照品贮备液的配制

精密称取甲磺酸罗哌卡因对照品适量,加0.9%氯化钠溶液制成每1 ml含甲磺酸罗哌卡因1.85 mg的溶液,即得。

2.2 供试品溶液的配制

精密量取甲磺酸罗哌卡因注射液适量(约相当于甲磺酸罗哌卡因8.94 mg),置于25 ml量瓶中,加0.9%氯化钠溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 测定波长的选择

精密量取甲磺酸罗哌卡因对照品贮备液10 ml至50 ml量瓶中,用0.9%氯化钠溶液稀释至刻度,作为对照品溶液,以0.9%氯化钠溶液为空白,在200~400 nm波长范围内进行扫描。结果甲磺酸罗哌卡因对照品在262 nm波长处有最大吸收,故选择262 nm作为测定波长。

2.4 专属性试验

取按处方制法制得不含甲磺酸罗哌卡因的阴性模拟样品适量,按供试品溶液制备法同法制得阴性样品液,用0.9%氯化

2002,37(1):54.

[4] 张建军,高缘,樊伟明.氯诺昔康注射液的HPLC测定[J].

* 硕士。研究方向:药品质量标准。电话:025-58616120。E-mail:10270555@qq.com

[†] 通信作者:工程师。研究方向:药品质量标准。电话:025-58616120

中国医药工业杂志,2004,35(7):427.

[5] 黄剑英,杨红娟.高效液相色谱法测定氯诺昔康速释片的含量[J].海峡药学,2005,17(3):55.

[6] 俞平.HPLC法测定头孢泊肟酯分散片中有关物质的含量[J].中国药房,2011,22(40):3 822.

(收稿日期:2013-06-20 修回日期:2013-08-08)