

RP-HPLC法检查利克飞龙片中的有关物质

王海玲^{1*}, 高海鹰¹, 丁阳²(1.吉林省药物研究院, 长春 130060; 2.吉林大学白求恩医学部临床医学院, 长春 130021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2359-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.20

摘要 目的: 建立利克飞龙片中有关物质的检查方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈, 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(60:40, V/V), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为222 nm, 柱温为25℃, 进样量为10 μl; 采用主成分自身对照法计算总杂质质量。结果: 主峰与相邻峰的分度良好, 利克飞龙检测质量浓度线性范围为8.1~162 μg/ml($r=0.9999$), 检测限及定量限分别为0.25、0.89 ng; 3批样品总杂质质量≤0.31%。结论: 建立的方法灵敏度高、精密度好、专属性强, 可用于利克飞龙片中有有关物质的检查。

关键词 利克飞龙片; 有关物质; 反相高效液相色谱法

Determination of Related Substances in Licofelone Tablets by RP-HPLC

WANG Hai-ling¹, GAO Hai-ying¹, DING Yang²(1. Jilin Provincial Institute of Pharmaceutical Research, Changchun 130060, China; 2. School of Clinical Medicine, Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of the related substances in Licofelone tablets. METHOD: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphate solution (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 222 nm and column temperature was 25℃. The injection volume was 10 μl. The total impurities was calculated by main component self contrast method. RESULTS: The main peak was well-separated from the adjacent peak. The linear range of licofelone were 8.1-162 μg/ml ($r=0.9999$). The detection limit and quantitation limit were 0.25 ng and 0.89 ng, respectively. Total contents of impurities were lower than 0.31% in 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The method is sensitive, precise and specific, and can be used to determine the related substances in Licofelone tablets.

KEYWORDS Licofelone tablets; Related substances; RP-HPLC

非甾体类消炎镇痛药是全球处方量最大的药物之一^[1], 主要通过抑制环氧合酶发挥镇痛作用, 但具有胃肠道、心血管等

方面的不良反应^[2]。利克飞龙是一种环氧合酶、5-脂氧合酶双重抑制药, 是具有双重抗炎作用^[3]的新型非甾体类消炎镇痛

中残留β-丙内酯的检测提供了经验和借鉴。

参考文献

- [1] Lawrence SA. β-propiolactone: viral inactivation in vaccines and plasma products[J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2000, 54(3):209.
- [2] Perrin P, Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone[J]. *Biologicals*, 1995, 23(3):207.
- [3] 杨健, 高军, 张庆义, 等. β-丙内酯含量气相色谱检测方法的建立及其水解情况分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(3):323.
- [4] National Toxicology Program. Department of Health and Human Services. β-Propiolactone[DB/OL].[2014-02-12]. <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12>.
- [5] 张玉慧, 高春润, 潘广域, 等. Vero 细胞人用狂犬病疫苗
- [6] 陈伟, 李忠义, 刘江秋, 等. β-丙内酯在 Vero 细胞 HFRS 疫苗中的应用[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(6):669.
- [7] 李福安, 窦志勇, 潘丽静. 狂犬疫苗灭活后 β-丙内酯水解的最佳 pH 值的选择[J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(11):964.
- [8] 刘兆文, 李福安, 钱浩. β-丙内酯在人用纯化地鼠肾细胞狂犬疫苗制备中的应用研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(6):71.
- [9] 徐英, 魏然, 姜英, 等. 气相色谱法对轮状病毒疫苗中 β-丙内酯测定的研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2010, 38(3):21.
- [10] 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 194.

(收稿日期: 2013-09-23 修回日期: 2014-02-21)

* 助理研究员。研究方向: 药物分析。E-mail: 2585688655@qq.com

药,在关节炎等疾病的抗炎治疗中已显示出良好的临床应用前景^[4]。国外Ⅲ期临床研究表明:利克飞龙用于治疗骨关节炎与萘普生疗效相似,且能改善胃肠道安全性,耐受性优于萘普生^[5],目前尚在进行临床研究中,国内目前对该药也正处于在研制阶段,尚无可参考的关于其有关物质检查的文献报道。经过考察摸索,笔者建立了其有关物质检查的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,结果表明该方法灵敏度高、精密度好、专属性强,可用于利克飞龙片中有关物质的检查,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A HPLC仪,包括四元梯度泵、二极管阵列检测器、UV-2450PC紫外分光光度计(日本岛津公司);KQ-50E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);New Classic MS105DU型全自动电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

利克飞龙对照品(加拿大TRC公司,批号:7-mak-90-1,纯度:98.50%);利克飞龙片(吉林省药物研究院,批号:20120501、20120502、20120503,规格:均为每片250 mg);乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液(60:40, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:222 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μl。

2.2 有关物质检查溶液的配制

2.2.1 供试品溶液:避光操作,精密称取样品细粉适量(相当于利克飞龙原料药20 mg),置于25 ml量瓶中,加2 ml乙酸乙酯超声(50 W, 40 kHz)处理5 min,取出放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,即得。

2.2.2 自身对照溶液:避光操作,精密量取供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,即得。

2.2.3 空白辅料溶液:取空白辅料80 mg,置于25 ml量瓶中,加2 ml乙酸乙酯超声处理5 min,取出放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,即得。

2.3 系统适用性试验

因本品对光不稳定,因此选择光降解产物进行系统适用性试验。精密称取样品细粉(批号:20120501,相当于利克飞龙原料药20 mg)及空白辅料适量,分别置于25 ml量瓶中,加2 ml乙酸乙酯超声处理5 min,取出放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,同置于强度4 500 lx光照箱内照射0.5 h后,摇匀过滤。精密量取10 μl,注入液相色谱仪,结果显示,主峰与相邻杂质峰分离度分别为3.6、5.7,分离度良好,理论板数以利克飞龙峰计为6 000,空白辅料未见干扰,色谱图见图1(A、G)。

2.4 专属性试验

为考察利克飞龙可能的降解产物及色谱条件的选择是否合理,采用酸、碱、氧化、高温和光照对其进行破坏处理。取利克飞龙细粉6份(批号:20120501,每份相当于原料药20 mg),分别置于25 ml量瓶中,加乙酸乙酯2 ml超声5 min,取出放冷,分别进行以下处理。

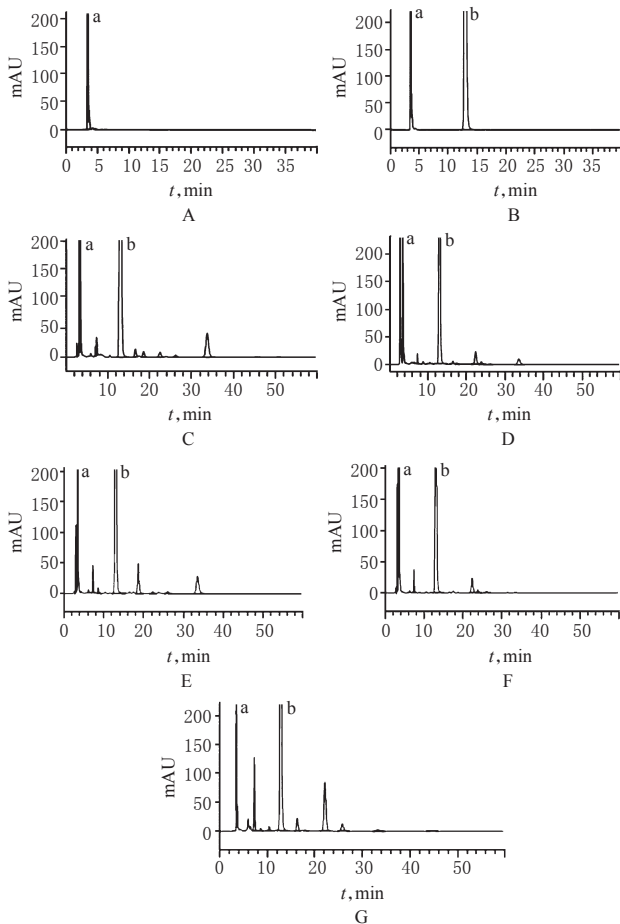


图1 高效液相色谱图

A.空白辅料;B.未破坏溶液;C.高温破坏溶液;D.氧化破坏溶液;E.酸破坏溶液;F.碱破坏溶液;G.光照破坏溶液;a.乙酸乙酯(溶剂);b.利克飞龙;其他峰为降解物质

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank excipients; B. solution not destroyed sample; C. solution destroyed by high temperature; D. solution destroyed by oxidation; E. solution destroyed by acid; F. solution destroyed by base; G. solution destroyed by high light; a. ethyl acetate (solvent); b. licofelone; the chromatographic peaks of other were degradation products

2.4.1 未破坏:取溶液1份,加流动相至刻度,摇匀,过滤,备用。

2.4.2 光照破坏:取溶液1份,加流动相至刻度,置于强度4 500 lx光照箱内照射0.5 h,摇匀,过滤,备用。

2.4.3 高温破坏:取溶液1份,加流动相15 ml,置于90 °C水浴加热70 min,取出放冷,加流动相至刻度,摇匀,过滤,备用。

2.4.4 碱破坏:取溶液1份,加1 mol/L氢氧化钠2 ml,再加流动相2 ml,常温放置3 d,用1 mol/L盐酸调pH为7.0,加流动相至刻度,摇匀,过滤,备用(由于碱破坏加热8 h后没有破坏出降解物质,所以常温放置3 d)。

2.4.5 氧化破坏:取溶液1份,加30%过氧化氢1 ml,再加流动相2 ml,置于70 °C水浴加热12 min,取出放冷,加流动相至刻度,摇匀,过滤,备用。

2.4.6 酸破坏:取溶液1份,加0.1 mol/L盐酸1 ml,再加流动相2 ml,置于70 °C水浴加热15 min,取出放冷,用0.1 mol/L氢氧化钠调pH为7.0,加流动相至刻度,摇匀,过滤,备用。

照“2.1”项下色谱条件,将上述处理溶液分别进样 10 μl 。结果从酸、碱、氧化、高温和光照破坏图可以看出,此液相条件能较好检测出降解产物,且降解产物与主峰达到很好的分离。用二极管阵列检测器对各个降解图谱的主峰进行峰纯度分析,其峰纯度均大于 0.999,均为单一-纯色谱峰,表明此液相条件适用于检查本品的有关物质,色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察

避光操作,取利克飞龙对照品适量溶解并稀释至下列质量浓度:8.1、16.2、40.5、81、162 $\mu\text{g/ml}$,分别精密量取 10 μl ,照上述色谱条件,注入液相色谱仪,以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,回归方程为: $y=9\ 456x-3\ 758$ ($r=0.999\ 9$),表明利克飞龙检测质量浓度线性范围为 8.1~162 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 精密度试验

精密量取“2.5”项下溶液(81 $\mu\text{g/ml}$)10 μl 连续进样 6 次,结果 RSD 为 0.21%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.7 检测限和定量限试验

精密称取利克飞龙对照品溶液逐级稀释后进样,当信噪比为 3:1 时,测得检测限为 0.25 ng;当信噪比为 10:1 时,测得定量限为 0.89 ng。

2.8 稳定性试验

精密量取本品(批号:20120501)制备的供试品溶液 10 μl ,分别在 0、1、2、3、4 h 内注入液相色谱仪,记录利克飞龙峰面积及最大杂质的变化情况。计算得主峰峰面积 RSD 为 1.6%($n=5$),最大杂质的含量逐渐增加,0~3 h 的最大杂质分别为 0.06%、0.07%、0.08%、0.09%,于第 4 h 时出现了大于 0.1% 的杂质,表明供试品溶液在 3 h 内稳定。

2.9 有关物质检查

采用主成分自身对照法计算总杂质质量。分别精密量取由批号 20120501、20120502、20120503 样品制备的供试品溶液以及自身对照溶液各 10 μl ,注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍。供试品溶液中最大单个杂质峰面积不得大于对照溶液的主峰面积的 0.1%;杂质峰面积之和(除溶剂峰外)不得大于对照溶液主峰面积 1.0%。有关物质检查结果见表 1。

表 1 3 批样品有关物质检查结果

Tab 1 Results of related substances in 3 batches of samples

批号	最大杂质质量, %	总杂质质量, %
20120501	0.06	0.20
20120502	0.09	0.31
20120503	0.07	0.21

3 讨论

3.1 流动相的选择

前期试验中选择不同配比的乙腈和水为流动相,发现主峰峰形不好。因该化合物中含有羧酸,如果调整流动相使其在酸性条件,能增加该化合物在色谱柱里面的保留,并且峰形较好,所以选择加入磷酸。采用乙腈与 0.05% 磷酸水溶液(50:50、60:40、70:30, V/V) 配比为流动相,流速为 1.0 ml/min、流动相配比为 50:50 时,主峰保留时间约为 20 min,样品运行时间

需要 60 min,时间过长;流动相配比为 70:30 时,主峰保留时间约为 6 min,与相邻的杂质峰分离度不够;因此选择乙腈-0.05% 磷酸水溶液(60:40, V/V) 为流动相,结果主峰保留时间约为 13 min,与相邻的杂质色谱峰有很好的分离。

3.2 耐用性试验

选用两个品牌(安捷伦和菲罗门)的 C_{18} 反相色谱柱,使用乙腈-0.05% 磷酸水溶液(60:40)为流动相,分别测定同一样品,结果两种色谱柱分离结果无明显差异,理论板数分别为 15 892、9 248,出峰时间分别为 13.486、13.807 min,各峰间分离度分别为 3.9、3.7 以及 6.8、5.9,表明本方法对色谱柱无特殊要求,一般的 C_{18} 反相色谱柱均可满足测定需求。

3.3 柱温的影响

柱温对该样品溶液影响较大,如果柱温大于 30 $^{\circ}\text{C}$,该样品溶液稳定性时间会缩短 0.5 h,可能是因为柱温升高促进样品降解所致,故最终柱温选择 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.4 波长的确定

取利克飞龙对照品溶解稀释制成溶液,照紫外-可见分光光度法在 200~400 nm 波长处扫描,结果在 248 nm 波长处有最大吸收。在破坏性试验中,大多数降解产物在 222 nm 波长处均有很好的吸收,主峰在 222 nm 波长处也有吸收,为更好地检查出本品的有关物质,故将其波长定为 222 nm。

3.5 操作注意

由破坏性试验可知,本品在光照、加热、氧化、酸性条件下都不稳定,尤其对光照最敏感。因此,有关物质检查溶液配制时需避光操作,样品也应避光、低温、密闭保存。

稳定性试验中共考察了 4 h,结果利克飞龙峰面积的 RSD $\leq 2.0\%$ ($n=6$),但是第 4 h 时出现了大于 0.1% 的杂质,表明单一考察峰面积的 RSD 不足以说明样品溶液稳定,还需要考察最大杂质的变化情况。随着时间的增加,供试品溶液中杂质的含量也逐渐增加,因此样品溶液配制后应立即进样。

参考文献

- [1] 姚中强,于孟学,韩淑玲.非甾体抗炎药[J].北京医学,2005,27(5):295.
- [2] 刘智兰,李灵芝.非甾体抗炎药的不良反应及预防[J].中国药物与临床,2007,7(11):864.
- [3] Albrecht W, Unger A, Nussler A K, et al. In vitro metabolism of 2-[6-(4-chlorophenyl)-2,2-dimethyl-7-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrrrolizin-5-yl] acetic acid (licofelone, ML3000), an inhibitor of cyclooxygenase-1 and -2 and 5-lipoxygenase[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(5):894.
- [4] Kulkarni SK, Singh VP. Licofelone: the answer to unmet needs in osteoarthritis therapy[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10(1):43.
- [5] Reginster J, Bias P, Buchner A. First clinical results of licofelone (ML3000), an inhibitor of COX-1, COX-2, and 5-LOX, for the treatment of osteoarthritis[C]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(Suppl 2):116.

(收稿日期:2013-12-02 修回日期:2014-01-15)