

HPLC法测定非诺洛芬钙胶囊的含量和有关物质

吴颖, 刘茜, 陈桂良, 乐健

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 建立同时测定非诺洛芬钙胶囊含量及有关物质的 HPLC 方法。方法: 采用 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Kromasil C₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相为乙腈-水-磷酸 (50:49.6:0.4), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 272 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。结果: 非诺洛芬的进样浓度在 0.1524~152.4 μg·mL⁻¹ 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系, $r = 0.9999$, A、B 两厂家产品的平均回收率 ($n = 9$) 分别为 100.2% 和 101.0%; 热分解产物能从主峰中分离, 测得非诺洛芬的最小检出量为 0.91 ng。结论: 本方法准确、灵敏、可靠, 专属性强, 可用于非诺洛芬钙制剂的质量控制。

关键词: 非诺洛芬; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0066-04

HPLC determination of fenopropfen calcium capsules and its related substances

WU Ying, LIU Qian, CHEN Gui-liang, LE Jian

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the analysis of fenopropfen calcium capsules and its related substances. **Methods** The HPLC method was performed on an Agilent 1100 liquid chromatography. Kromasil C₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase of acetonitrile-water-phosphoric acid (50:49.6:0.4). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 272 nm. The column temperature was set at 30 °C and the injection volume was 20 μL. **Results** A linearity between peak area and fenopropfen concentration was achieved in the range of 0.1524-152.4 μg·mL⁻¹ with r of 0.9999. The average recoveries ($n = 9$) of products of A and B company were 100.2% and 101.0%, respectively. The heated degradation substances could be separated from main peak. The lowest detectable amount was 0.91 ng. **Conclusion** The method is accurate, specific, sensitive and can be used for quality control of fenopropfen calcium preparation.

Key words fenopropfen; assay; related substances; HPLC

非诺洛芬钙为非甾体消炎镇痛药, 由美国 Lilly 公司开发, 1976 年经美国 FDA 批准上市, 用于急、慢性风湿及类风湿性关节炎等。本品为钙盐, 具有比同类药口服好、胃肠道刺激性小的特点。中国药典 2005 年版二部收载该药的含量测定方法为非水滴定法, 存在专属性差且终点颜色不明显的缺点; 有关物质采用 TLC 法控制杂质的量, 灵敏度低, 且对杂质检测的专属性差。对于非诺洛芬钙的 HPLC 测定方法, 国内外已有文献报道^[1-3], 但未见同时测定含量及有关物质的研究, 且无系统适用性试验的要求。本文确立了系统适用性条件, 增加了测定方法

的稳定性和耐用性。该法能够同时测定非诺洛芬钙胶囊的含量及有关物质, 方法准确可靠, 专属性强, 可用于非诺洛芬钙制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪; G1316A 紫外检测器, ALS 自动进样器, 四元泵。非诺洛芬钙对照品 (由上海衡山药业有限公司提供, 批号: 020301, 含量: 99.87%, 水分: 5.77%), 吉非罗齐对照品 (购自中国药品生物制品检定所); 非诺洛芬钙胶囊 [A 厂家, 规格 0.02 g (以非诺洛芬计), 批号: 030901, 030902, 030903; B 厂家, 规格 0.02 g (以非诺洛芬

计), 批号: 030501, 030701, 030901]; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 采用 *Kromasil C₈* (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水-磷酸 (50: 49.6: 0.4), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 272 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL^[4]。取对照品非诺洛芬钙与吉非罗齐各约 10 mg 置同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (7: 3) 溶解并定量稀释至刻度, 摇匀, 即得系统适用性试验溶液。量取 20 μL 注入液相色谱仪, 理论板数按非诺洛芬峰计算应不低于 3000 非诺洛芬峰与吉非罗齐峰的分离度应不小于 8 (参考 USP 24 版“非诺洛芬钙片”含量测定项下, 选用吉非罗齐作为系统适用性试验分离度的考察对象, 且要求非诺洛芬峰与吉非罗齐峰的分离度达到 8 以上), 拖尾因子应不大于 2.0, 色谱图见图 1。

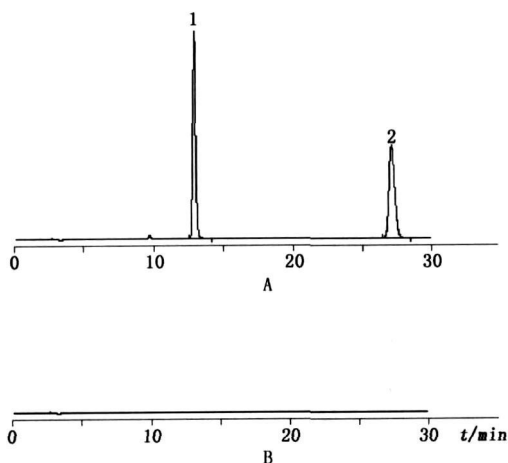


图 1 系统适用性试验溶液 (A) 及空白溶剂 (B) 的色谱图
Fig 1 Chromatograms of system suitability test solution (A) and blank solvent (B)

1 非诺洛芬 (fenopfen) 2 吉非罗齐 (gen fibrozil)

2.2 测定方法

2.2.1 含量测定 取装量差异项下的内容物, 研细, 精密称取适量 (约相当于非诺洛芬 35 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇-水 (7: 3) 适量, 超声 (130 W, 50~60 kHz) 15 min 使非诺洛芬钙溶解, 放冷, 用甲醇-水 (7: 3) 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取非诺洛芬钙对照品适量 (以无水物计), 精密称定, 加甲醇-水 (7: 3) 溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含非诺洛芬 0.7 mg 的对照品溶液, 同法测定。按外标法以峰面积计算, 并将结果乘以 0.9272, 即得, 色

谱图见图 2。

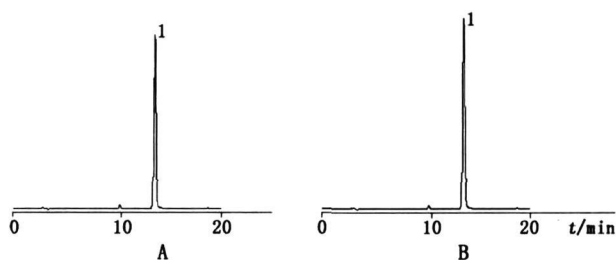


图 2 非诺洛芬钙对照品 (A) 及样品 (B) 色谱图
Fig 2 Chromatograms of fenopfen calcium reference substance (A) and sample (B)
1. 非诺洛芬 (fenopfen)

2.2.2 有关物质测定 取本品的内容物适量 (约相当于非诺洛芬 200 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇-水 (7: 3) 适量, 超声 (130 W, 50~60 kHz) 15 min 放冷, 加甲醇-水 (7: 3) 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇-水 (7: 3) 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。照含量测定项下的色谱条件, 取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分峰的峰高约为满量程的 20%; 再精密量取上述 2 种溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍; 供试品溶液的色谱图中如显杂质峰 (溶剂峰除外), 量取各杂质峰峰面积的和, 不得大于对照溶液主成分峰峰面积的 3 倍 (3.0%)。

2.3 专属性试验 取非诺洛芬钙对照品、辅料 (包括滑石粉、微粉硅胶、低取代羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠、乳糖、硬脂酸镁与乙醇) 各 8 mg 及本品内容物的细粉适量 (约相当于非诺洛芬 20 mg), 于 120 °C 放置 36 h 进行高温破坏试验。将破坏后的对照品、样品与辅料, 分别加入甲醇-水 (7: 3) 10 mL, 超声 (130 W, 50~60 kHz) 10 min 滤过, 取滤液照上述色谱条件进行降解产物的检出试验, 结果经破坏后的辅料色谱图中均无明显杂质峰检出, 对照品与样品均有不同程度的降解产物峰被分离检出, 色谱图见图 3。说明本法能分离非诺洛芬的热分解产物, 而辅料不干扰样品的测定。

2.4 线性试验 精密称取非诺洛芬钙对照品适量, 加甲醇-水 (7: 3) 溶解并稀释制成含非诺洛芬 0.15~150 μg · mL⁻¹ 的 9 个浓度的溶液 (约相当于含量测定用供试品溶液浓度的 0.2%~200%), 照“2.1”项下的色谱条件, 进样测定, 记录色谱图, 以峰面积 *Y* 对浓度 *X* (μg · mL⁻¹) 进行线性回归。结

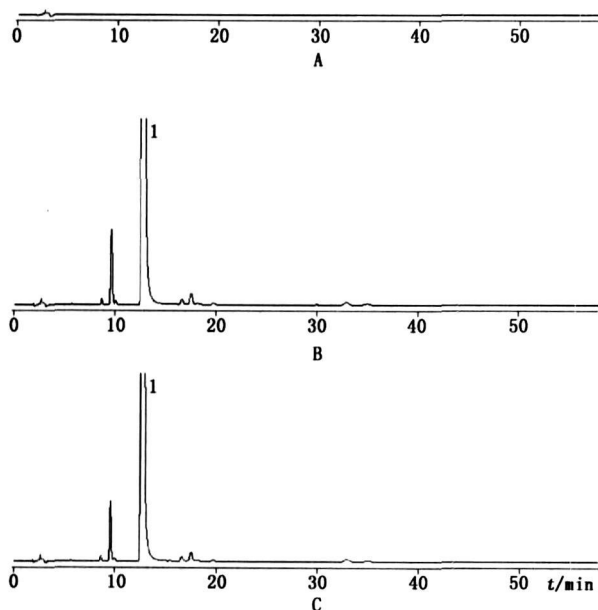


图3 非诺洛芬钙经高温破坏的色谱图

Fig 3 Chromatograms of fenoprofen calcium destroyed by heating at about 120 °C

A 辅料 (excipient) B 对照品 (reference substance) C 样品 (sample)

1 非诺洛芬 (fenoprofen)

果表明, 进样浓度在 $0.1524 \sim 152.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与测得的峰面积呈良好的线性关系:

$$Y = 7.751X - 2.982 \quad r = 0.9999$$

2.5 定量限、检出限及峰纯度检查 取供试品溶液适量, 加甲醇-水 (7:3) 稀释制成含非诺洛芬一定浓度的溶液, 照“2.1”项下的色谱条件进样, 记录色谱图。结果 $S/N = 10.5$ 定量限为 3.05 ng $S/N = 4.0$ 检出限为 0.91 ng

2.6 进样精密性、重复性及溶液的稳定性试验

2.6.1 进样精密性 精密量取“2.2.1”项下的对照品溶液 $20 \mu\text{L}$, 分别连续进样 6 次, 记录色谱图, 以峰面积计算 RSD 值 ($n = 6$) 为 0.18% 。

2.6.2 重复性 取 A 厂批号为 030901 及 B 厂批号为 030501 的样品, 照“2.2.1”项下的方法各配制 6 份供试品溶液, 按外标法以峰面积计算含量, 结果 A 厂的样品含量平均值 ($n = 6$) 为 105.6% , RSD 为 0.21% ; B 厂的样品含量平均值 ($n = 6$) 为 103.2% , RSD 为 0.61% 。

2.6.3 溶液的稳定性 按“2.2.1”项下的方法配制供试品溶液与对照品溶液, 室温下放置, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15, 24 h 测定, 以非诺洛芬峰的峰面积计算 RSD 值。结果对照品溶液为 0.04% , A 厂的供试品溶液为 0.15% , B 厂的供试品溶液为 0.09% 。

表明在 24 h 内溶液稳定。

2.7 回收率试验 取非诺洛芬钙对照品约 33, 42, 50 mg 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 分别按 A、B 厂家的处方比例加入一定的辅料, 分别配制低、中、高 3 个浓度的溶液各 3 份, 加甲醇-水 (7:3) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液分别照“2.2.1”项下的方法测定, 计算回收率, 测得 A 厂家低、中、高 3 个浓度回收率 ($n = 3$) 分别为 100.0% (RSD = 0.4%)、 100.4% (RSD = 0.8%)、 100.1% (RSD = 0.7%), 平均值 ($n = 9$) 100.2% ; B 厂家低、中、高 3 个浓度回收率 ($n = 3$) 分别为 100.8% (RSD = 0.4%)、 101.2% (RSD = 0.2%)、 101.0% (RSD = 0.05%), 平均值 ($n = 9$) 为 101.0% 。

2.8 系统耐用性试验 取“2.1”项下系统适用性试验溶液, 在保持其他色谱条件不变的情况下, 分别改变流速 ($1.0 \sim 1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、柱温 ($30 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$) 以及更换同类型色谱柱 [Kromasil C_8 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)] 以考察测定条件有微小变动时, 测定结果不受影响的程度。结果表明, 在改变上述色谱条件的情况下, 非诺洛芬峰的理论板数均大于 10000, 非诺洛芬峰与吉非罗齐峰的分离度均大于 20, 说明方法具有良好的系统耐用性。

2.9 样品测定

2.9.1 含量测定 照“2.2.1”项下的方法配制供试品溶液及对照品溶液, 照“2.1”项下的色谱条件进样测定, 按外标法以峰面积计算, 测得 A 厂家 3 批样品及 B 厂家 3 批样品的含量, 见表 1。

表 1 HPLC 法与 UV 法的结果比较 (%)

Tab 1 Comparison of the HPLC method and UV method

厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	HPLC	UV ^[5]
A	030901	105.5	106.5
	030902	106.6	106.6
	030903	105.0	105.1
B	030501	103.6	103.6
	030701	104.0	104.5
	030901	104.3	104.4

2.9.2 有关物质测定 照“2.2.2”项下的方法配制供试品溶液及对照溶液, 照“2.1”项下的色谱条件进样测定, 按主成分自身对照法以峰面积计算各杂质的量。测得 A 厂家 3 批样品 (批号为 030901, 030902, 030903) 的有关物质的平均量 ($n = 2$) 分别为 2.6% , 2.6% , 2.6% ; B 厂家 3 批样品 (批号为 030501, 030701, 030901) 的有关物质的平均量 ($n = 2$) 分别为 2.6% , 2.5% , 2.7% 。

3 讨论

3.1 取“2.1”项下的系统适用性试验溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 根据文献报道^[2,3]及非诺洛芬在流动相中的最大吸收波长, 在 200~400 nm 的波长处测定。当选用 272 nm 作为检测波长时, 非诺洛芬及杂质均有较好的响应, 并达到良好分离, 故选用 272 nm 作为本法的测定波长。

3.2 中国药典 2005 年版二部^[5]与 USP 24 版^[4]非诺洛芬钙均采用 TLC 法控制非诺洛芬钙有关物质的限度, 由于 TLC 法的灵敏度较低, 或对杂质检测专属性不够, 采用该法时, 在各批样品测定与稳定性考察中均未检出有关物质。而采用本实验确立的色谱条件进行试验后发现, A、B 两厂家共 6 批样品均检出有关物质。由于已知杂质难以得到, 故以主成分自身对照法计算有关物质的量。经查阅文献, 未见有检测非诺洛芬钙有关物质的报道, 因此本实验确立的色谱条件可为相关质量研究提供参考。

3.3 中国药典采用紫外分光光度法(吸收系数法)进行非诺洛芬钙胶囊的含量测定, 将本法与药典法

进行比较, 结果见表 1。结果显示, 两法的测定结果基本一致, 考虑到吸收系数法受仪器、试剂、环境等的影响因素较多, 故认为本文的 HPLC 法更适合用于非诺洛芬钙胶囊含量测定。

参考文献

- 1 Miceli JN, Ryan DM, Done AK. High-performance liquid column chromatography of fenopofen in serum. *J Chrom atogr B*, 1980, 183 (2): 250
- 2 ZHAO Chun-shun (赵春顺), CUI Sheng-miao (崔升淼), ZHANG Hong-wu (张宏武), et al. Preliminary studies on the preparation and pharmacokinetics of the fenopofen calcium sustained-release tablets (非诺洛芬钙缓释片的制备及其人体药动学初步研究). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2006, 41(17): 1338
- 3 JN Ou (金瓯), NI W ei-fang (倪维芳). HPLC determination of fenopofen calcium bulk materia (HPLC 法测定非诺洛芬钙原料的含量). *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 1999, 15(4): 284
- 4 USP 24- NF 19 1999, 709
- 5 ChP (中国药典), 2005. Vol II (二部): 332-333

(本文于 2008 年 1 月 24 日收到)

《人类疾病动物模型技术规范研究与应用》出版

由贺争鸣研究员和王钜教授主编的《人类疾病动物模型技术规范研究与应用》一书已由辽宁大学出版社于 2008 年 1 月出版。该书的出版旨在抛开每一种动物模型的特殊性, 提炼共性, 建立人类疾病动物模型共同描述规范, 为科研工作者在创建新的动物模型或选择与使用动物模型过程中提供可行性路线和操作方案。

本书共分九章, 23 万字, 从常用的实验动物种类选择、动物模型的制作方法和比较医学的意义入手, 总结分析了目前我国人类疾病动物模型的建立和使用现状及与国外发达国家的差距, 提出了符合我国实际情况的人类疾病动物模型的选择和技术操作规范。从理论上较深入地研究了常用动物模型的选择原则、制作方法、技术规范及比较医学上的意义, 提出研究报告, 为国家行政管理部门、课题成果鉴定等提供决策参考, 也从实践上为动物模型的使用者提供技术指导。

(来自 www.nicbp.org.cn)