

文章编号: 1006-2858(2010)08-0648-04

HPLC法测定非布司他的含量及有关物质

张 聪¹, 王绍杰², 麻荣丽¹, 孟 萍¹, 张天虹¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立测定非布司他原料药含量和有关物质的 HPLC 方法。方法 采用 Diamond ODS-C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-质量分数为 0.05% 的磷酸溶液 (体积比为 24:46:30), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, UV 检测波长为 315 nm, 柱温为 35 °C。结果 非布司他在 15.7~94.3 mg·L⁻¹ 内线性关系良好 ($r=0.9998$), 平均回收率为 100.5% (RSD=1.0%)。非布司他和其有关物质得到良好分离, 检测限为 0.5 ng。结论 HPLC 法可用于非布司他含量测定和有关物质检测。

关键词: 非布司他; 高效液相色谱法; 有关物质
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

非布司他 (febuxostat) 是一种新型的选择性黄嘌呤氧化酶抑制剂, 其化学名称为 2-(3-氰基-4-异丁氧基)苯基-4-甲基-5-噻唑甲酸^[1]。非布司他结构式见图 1。

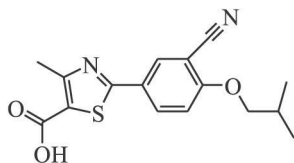


Fig 1 The structure of febuxostat

黄嘌呤氧化酶的作用是使次黄嘌呤转化成黄嘌呤, 再使黄嘌呤转化成尿酸。非布司他可以选择性抑制黄嘌呤氧化酶, 从而抑制尿酸的形成^[1-2]。在临床上用于治疗痛风病人的高尿酸血症^[3-4]。该成分的含量测定和有关物质检查方法在国内外均未见文献报道。本文作者采用 HPLC 法测定非布司他含量和有关物质检查, 为其质量控制提供了依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (L-2455 DAD 检测器, L-2130 输液泵, 日本 Hitachi 公司), D-2000 色谱工作站 (上海天美股份有限公司), 电子天平 ALC-110.4 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公

司), 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 磷酸 (分析纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂), 水 (纯化水, 市售)。

非布司他样品 (批号 20090401、20090402、20090403) 及非布司他对照品 (原料药精制品, 色谱峰面积归一化法含量测定质量分数为 99.9%) 均由某厂家提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamond ODS-C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-体积分数为 0.05% 的磷酸溶液 (体积比为 24:46:30), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 315 nm, 柱温为 35 °C。以非布司他峰计算, 理论塔板数不低于 6000, 分离度大于 1.5, 拖尾因子符合要求。

2.2 溶液的配制

对照品溶液的制备: 取非布司他对照品约 30 mg 精密称定, 加甲醇溶解制成 60 mg·L⁻¹ 的溶液, 即得。

供试品溶液的制备: 取非布司他样品约 30 mg 精密称定, 加甲醇溶解制成质量浓度约为 60 mg·L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.3 专属性考察

分别取“3.1”条的供试品溶液和对照品溶液

收稿日期: 2009-12-30

作者简介: 张聪 (1984-), 女 (汉族), 河北石家庄人, 硕士研究生, Tel 024-23984159, E-mail cong_zhang@yahoo.cn; 张天虹 (1966-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 主要从事药物分析及药物动力学研究, Tel 024-23984159, E-mail phamazhang@gmail.com。

各 10 μL 进样, 记录色谱图。结果非布司他与其他杂质峰分离度符合要求, 色谱图见图 2。

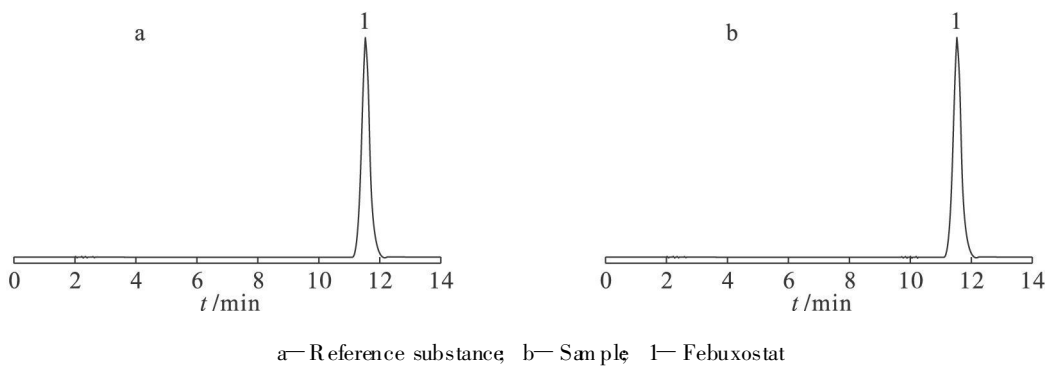


Fig 2 HPLC chromatograms of febuxostat

2.4 线性关系考察

取非布司他对照品约 20 mg 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度作为储备液。分别精密量取储备液适量, 用甲醇稀释制成非布司他质量浓度分别为 15.7、31.4、47.1、62.8、78.6、94.3 mg L⁻¹ 的溶液, 分别进样 10 μL, 记录色谱图。以质量浓度 ρ(mg L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 绘制标准曲线, 回归方程为: $A = 2.329 \times 10^4 \rho + 3.607 \times 10^3$ ($r = 0.9998$, $n = 6$)。表明非布司他在 15.7~94.3 mg L⁻¹ 内, 质量浓度与峰面积呈良好线性关系。

2.5 仪器精密度试验

取非布司他对照品溶液进样 10 μL, 重复进样 6 次, 以非布司他峰面积计算 RSD 为 0.68%。

2.6 重复性试验

取非布司他样品 (20090401), 精密称定, 按“3.1”条方法平行制备 6 份供试品溶液进行测定, 按外标法测定非布司他平均含量质量分数为 99.9%, RSD 为 0.50%。

2.7 回收率试验

取已知含量的非布司他样品, 精密称定, 配制成 48、60、72 mg L⁻¹ 3 个质量浓度, 每个质量浓度 3 份, 按外标法测定其含量, 计算平均回收率及 RSD。结果见表 1。

Table 1 The results of recovery test (n = 9)

$m_{\text{weighing}}/\text{mg}$	$m_{\text{determining}}/\text{mg}$	Recovery /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%
23.35	23.40	100.2	100.5	1.0
23.64	23.34	98.7		
23.54	23.39	99.4		
29.72	30.29	101.9		
29.43	29.77	101.2		
29.14	29.49	101.2		
35.32	35.56	100.7		
35.22	35.45	100.7		
35.22	35.35	100.4		

2.8 稳定性试验

取非布司他样品, 精密称定, 按“3.1”条方法制得供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、10 h 进样, 计算峰面积 RSD 为 0.62%。结果表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.9 含量测定结果

取非布司他样品 3 批, 每批取样 3 份, 按外标法测定含量, 结果见表 2。

Table 2 The results of content determination (n = 3)

Batch number	w /%
20090401	100.1
20090402	99.7
20090403	100.2

2.10 有关物质检查

2.10.1 测定方法

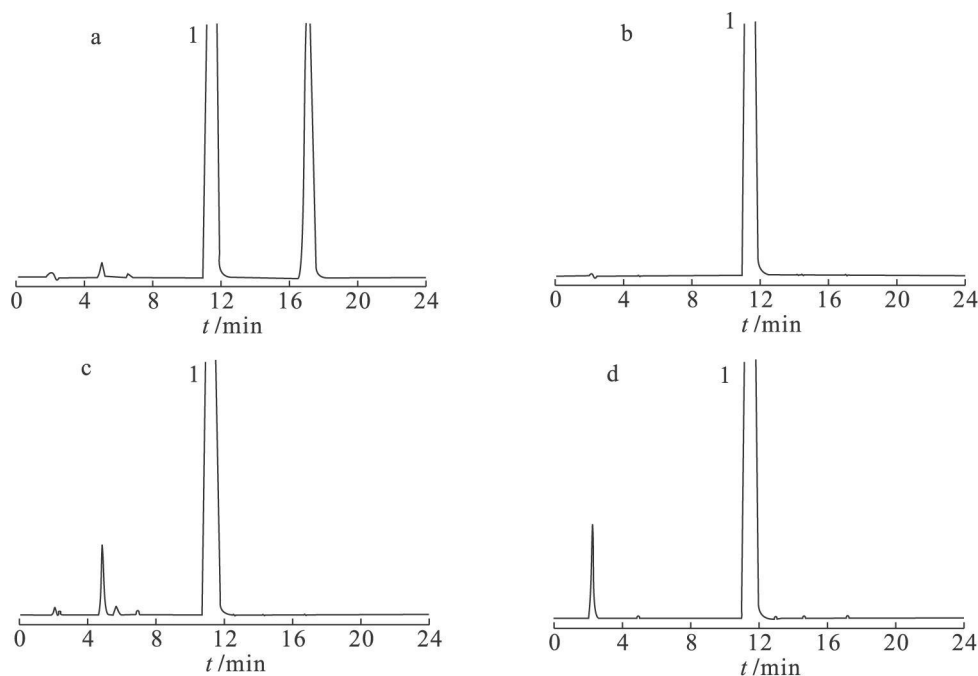
取非布司他样品约 20 mg 精密称定, 置于

25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为供试品溶液; 精密量取 1 mL 供试品溶液, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 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 10 μ L 注入液相色谱仪, 调节仪器灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 20%, 再精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分色谱峰保留时间的 2 倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰, 计算各杂质峰面积的和, 按不加校正因子主成分对照法^[5]计算有关物质含量。

2.10.2 专属性

破坏试验: 称取非布司他 4 份, 每份约 20 mg

分别经以下条件处理: a. 加入试管中, 直火加热至药物熔融变色; b. 加入 1 mol/L HCl 5 mL, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中加热 2 h, 冷却, 再将溶液用同浓度的 NaOH 中和至原 pH 值; c. 加入 1 mol/L NaOH 5 mL, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中加热 2 h, 冷却, 再将溶液用同浓度的 HCl 中和至原 pH 值; d. 加入质量分数为 3% 的过氧化氢 5 mL, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中加热 2 h, 冷却; 然后将 a、b、c、d 均转移至 25 mL 量瓶, 用甲醇进行稀释, 配制成每 1 mL 约含 800 μ g 的溶液。每一样品进样 10 μ L。非布司他的保留时间约为 11 min。非布司他在高温破坏、酸破坏、碱破坏和氧化破坏条件下所产生的降解产物在选定色谱条件下均可与主峰达到良好分离, 色谱图见图 3。



a—Destroyed by direct fire; b—Destroyed by acid; c—Destroyed by alkali; d—Destroyed by H_2O_2 ; 1—Febuxostat

Fig 3 HPLC chromatograms of degradation test

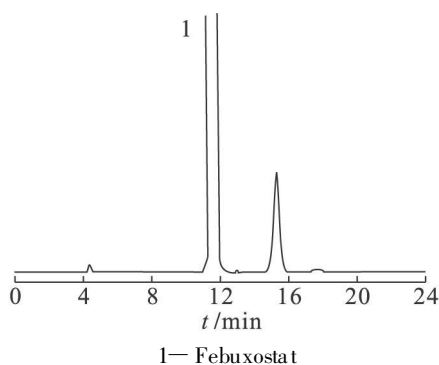
结晶母液: 取非布司他结晶母液制成的样品约 20 mg 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解定容。进样 10 μ L。非布司他的保留时间约为 11 min。结晶母液中各杂质在选定色谱条件下均可与主峰达到良好分离, 色谱图见图 4。

2.10.3 定量限和检测限

取非布司他的供试品溶液, 将溶液逐渐稀释, 进样 10 μ L, 记录色谱图, 按 10 倍信噪比计算, 测得非布司他的定量限为 1.8 ng。按 3 倍信噪比计算, 测得非布司他检测限为 0.5 ng。

2.10.4 有关物质检查结果

取非布司他样品 3 批, 每批取样 3 份, 按



1—Febuxostat

Fig 4 HPLC chromatograms of crystal mother liquor
“2.10.1”条方法进行有关物质检查, 结果有关物质的含量质量分数均小于 1.0%。色谱图见图 5。

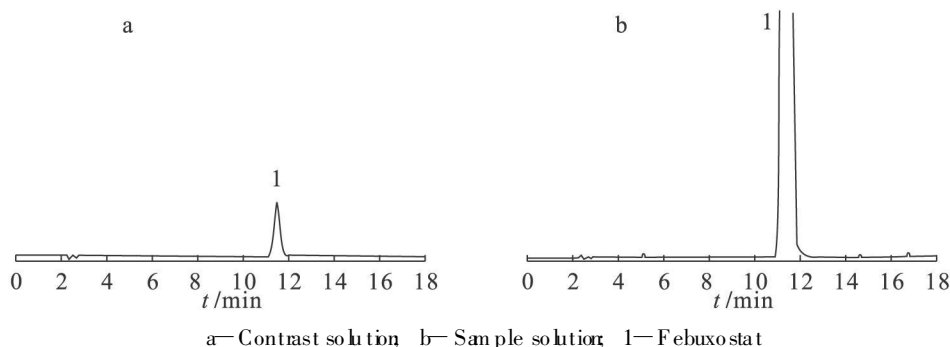


Fig 5 HPLC chromatograms of related substance

3 讨论

a. 波长的选择: 本实验中作者应用 DAD 检测器, 由非布司他紫外光谱扫描图得知, 非布司他在 216 nm 和 315 nm 有吸收峰, 观察不同波长下吸收图谱可知非布司他与其主要杂质在 315 nm 处都有较好的吸收, 而且在该波长处溶剂等对测定干扰小, 便于有关物质的检出, 所以选用 315 nm 作为测定波长。

b. 在试验中作者考察了流动相体系。以甲醇-水作为流动相时, 洗脱能力差, 保留时间长, 且峰形不好; 改为乙腈-水, 保留时间缩短, 峰呈正态分布, 但是在有关物质检查时, 有一杂质峰与主峰没有分开; 最后将流动相改为甲醇-乙腈-体积分数为 0.05% 的磷酸溶液后, 各杂质都能与主峰得到良好分离, 且有较好峰形和较短的保留时间。

c. 破坏试验结果表明, 非布司他在强酸、强碱和过氧化氢氧化化的条件下均较稳定, 仅在高温破坏试验中发生降解。在本文作者建立的方法下, 破坏产生的杂质均能与非布司他的主峰达到完全分离, 本方法专属性好, 灵敏度高, 可以应用

于测定非布司他含量和有关物质检查。

参考文献:

- [1] OKAMOTO K, EGER B T, NISHINO T. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition[J]. J Biol Chem, 2003, 278(3): 1848- 1855.
- [2] KOMORIYA K, OSADA Y, HASEGAWA M, et al Hypouricemic effect of allopurinol and the novel xanthine oxidase inhibitor TE F6720 in chimpanzees[J]. European Journal of Pharmacology, 1993, 250: 455- 460
- [3] BECKER M A, SCHUMACHER H R, WORTMANN R L, et al Febuxostat: a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase[J]. Arthritis & Rheumatism, 2005, 52(3): 916- 923.
- [4] BECKER M A, SCHUMACHER H R, WORTMANN R L. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout[J]. N Engl J Med, 2005, 353(23): 2450- 2461
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 30.

Determination of content of febuxostat and its related substances by HPLC

(下转至第 674 页)

CHEN Dong DING Ping-tian DENG Y r-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To summarize the methods and mechanisms involved in researches about oral polymeric micelles **Methods** According to the polymeric micelles with regard to carrier of oral uptake, the oral absorption of polymeric micelles were classified and reviewed on the basis of published literatures **Results** Caco-2 cells, reverted rat intestine, and animal model can be used as common models to investigate the absorption mechanism for oral polymeric micelles With these models, four mechanisms had been introduced to explain the phenomenon related to micelles absorption, i.e. inhibition on P-gp pinocytosis, simple passive diffusion and the oral uptake with the influence of the bile **Conclusions** The methods and mechanisms involved in researches about oral polymeric micelles are reviewed, and this article will provide references for the studies of polymeric micelles for oral administration

Key words polymeric micelles; oral administration; bioavailability; absorption mechanism

(上接第 651 页)

ZHANG Cong¹, WANG Shao-jie², MA Rong-li¹, MENG Ping¹, ZHANG Tian-hong¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determining the content of febuxostat and its related substances **Methods** The determination of febuxostat and the separation of its related substances was performed on a C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-acetonitrile-0.05% (v/v/v) phosphoric acid (V:V:V = 24:46:30). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Ultraviolet absorption detector was set at 315 nm and column temperature was 35 °C. **Results** The linear range of febuxostat was between 15.7 and 94.3 mg·L⁻¹ (r = 0.999 8). The average recovery was 100.5% with RSD of 1.0%. The related substances of febuxostat could be completely separated from febuxostat. The limit of detection (LOD) was 0.5 ng. **Conclusions** The method is simple and accurate for quality control of the febuxostat

Key words febuxostat; HPLC; related substance