

RP-HPLC法测定二氟泼尼酯原料药中有关物质含量[△]

冯光玲^{1,2*},冯爱国³,丁文娟³,孔祥雨^{1,2},刘宪华^{1,2}(1.山东省医药工业研究所,济南 250101;2.山东省化学药物重点实验室,济南 250101;3.山东临沂动植物园,山东临沂 276037)

中图分类号 R927.11;R988.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2363-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.21

摘要 目的:建立测定二氟泼尼酯原料药中有关物质含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Shimadzu VP-ODS,流动相为甲醇-水(50:50),流速为1.0 ml/min,检测波长为240 nm,进样量为15 μl。结果:二氟泼尼酯与相邻峰的分离度为2.50,二氟泼尼酯检测质量浓度线性范围为1.126~9.008 mg/ml($r=0.999\ 9$),精密度与稳定性试验的RSD分别为0.03%($n=6$)、0.11%($n=7$),检测限和定量限分别为56.3、281.5 ng。3批样品中有关物质含量分别为0.29%、0.23%、0.19%。结论:本方法简便、结果准确,可用于二氟泼尼酯原料药中有关物质的测定。

关键词 反相高效液相色谱法;二氟泼尼酯;原料药;有关物质;测定

Determination of Related Substances in Difluprednate Crude Drug by RP-HPLC

FENG Guang-ling^{1,2}, FENG Ai-guo³, DING Wen-juan³, KONG Xiang-yu^{1,2}, LIU Xian-hua^{1,2}(1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China; 3. Shandong Linyi Botanical Garden, Shandong Linyi 276037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of related substances in difluprednate crude drug. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Shimadzu VP-ODS column with mobile phase consisted of methanol-water (50:50) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 240 nm, and injection volume was 15 μl. RESULTS: The separation degree of difluprednate with adjacent peak was 2.50. The linear range of difluprednate was 1.126-9.008 mg/ml ($r=0.999\ 9$), and RSDs of precision and stability tests were 0.03% ($n=6$) and 0.11% ($n=7$). The limits of detection and quantification were 56.3 ng and 281.5 ng. The contents of related substance in 3 batches of samples were 0.29%, 0.23% and 0.19%. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and it can be used for the determination of related substances in difluprednate crude drug.

KEY WORDS RP-HPLC; Difluprednate; Crude drug; Related substances; Determination

二氟泼尼酯(Difluprednate),化学名为二氟孕甾丁酯、二氟泼尼松龙酯、醋酸丁酸二氟强的松龙,是一种泼尼松龙的二氟化衍生物,具有强效抗炎活性。2008年6月23日,美国FDA批准美国Sirion Therapeutics公司研制的0.05%二氟泼尼酯眼用乳液(Difluprednate, Durezol)上市,用于治疗眼科术后局部炎症和疼痛。国内目前对该品种正处于研制状态,由于原料药中有关物质是其质量控制的重要内容,也直接关系到成品制剂的安全有效,因此对原料药引入的杂质及可能的降解产物进行科学、合理、可行的评估非常重要。笔者采用二极管阵列检测器,建立了二氟泼尼酯原料药中有关物质测定的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。结果表明,采用该方法,主成分峰形及与有关物质的分离都较好,灵敏度高、简便,结果准确,适用于二氟泼尼酯原料药中有关物质的检测,且国内目前未见相关文献报道。

二氟泼尼酯化学结构式见图1。

1 材料

LC-20AT HPLC仪、SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

[△]基金项目:山东省科学技术发展计划项目资助(No.2011GSF12106)

*副主任药师。研究方向:新药研发。电话:0531-81213291。E-mail:jnfengguangling@163.com

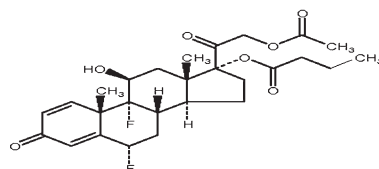


图1 二氟泼尼酯化学结构式

Fig 1 Chemical structure of difluprednate

二氟泼尼酯对照品(批号:20120809,纯度:99.82%)、二氟泼尼酯原料药(批号:20120802、20120804、20120806,纯度:99.71%、99.77%、99.81%)均由本所合成室提供;国外市售药0.05%二氟泼尼酯眼用乳液(商品名:Durezol,美国Sirion Therapeutics公司,批号:SIR9F001,规格:每瓶5 ml);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,试验用水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu VP-ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(50:50),流速:1.0 ml/min;检测波长:240 nm;进样量:15 μl。

2.2 测定方法

取二氟泼尼酯原料药适量,精密称定,用流动相制成每1 ml约含二氟泼尼酯0.5 mg的供试品溶液与每1 ml中约含5 μg的对照溶液;精密量取供试品溶液和对照溶液各15 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2倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,单个杂质峰的面积不得大于对照溶液主峰面积的1/10,各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积。

2.3 检测波长的确定^[1]

采用二极管阵列检测器对供试品的色谱峰进行紫外扫描,结果最大吸收在240 nm波长附近;同时,由于各破坏产物的最大吸收也均在240 nm波长附近,故检测波长选用240 nm。

2.4 系统适用性试验

取二氟泼尼酯原料药适量,精密称定,用流动相制成每1 ml约含二氟泼尼酯0.5 mg的样品溶液a;取Durezol适量,精密量取,用流动相制成每1 ml约含二氟泼尼酯0.5 mg的样品溶液b;另取二氟泼尼酯对照品,同样品溶液a方法配制对照品溶液。各精密量取15 μl注入液相色谱仪,记录色谱图。以二氟泼尼酯峰计,理论板数为15 701,二氟泼尼酯与相邻峰的分度为2.50,杂质峰峰形良好,且能够互相分离。色谱见图2。

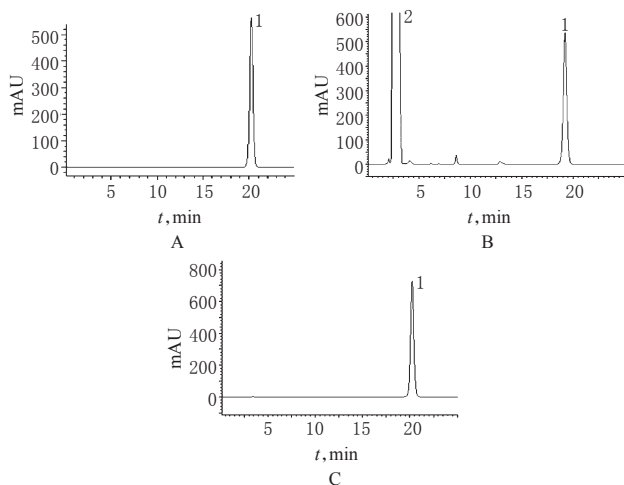


图2 系统适用性试验高效液相色谱图

A. 样品溶液a; B. 样品溶液b; C. 对照品溶液; 1. 二氟泼尼酯; 2. 辅料(山梨酸)

Fig 2 HPLC chromatogram of system test

A. test sample solution a; B. test sample solution b; C. solution control solution; 1. difluprednate; 2. excipients (sorbic acid)

2.5 专属性试验

2.5.1 酸破坏试验。称取二氟泼尼酯原料药50 mg,加0.1 mol/L盐酸1 ml,放置15 min,用0.1 mol/L氢氧化钠中和,用流动相稀释至100 ml,取样分析、测定。结果,主成分降解约2.10%,各峰之间均能较好地分离,详见图3A。

2.5.2 碱破坏试验。称取二氟泼尼酯原料药50 mg,加0.1 mol/L氢氧化钠1 ml,放置15 min,用0.1 mol/L盐酸中和,用流动相稀释至100 ml,取样测定。结果,主成分降解约2.34%,各峰之间均能较好地分离,详见图3B。

2.5.3 高温破坏试验。称取二氟泼尼酯原料药50 mg,加水3 ml,置于水浴中加热20 min,放冷,用流动相稀释至100 ml,取样测定。结果,主成分降解约1.31%,各峰之间均能较好地分离,详见图3C。

2.5.4 氧化破坏试验。称取二氟泼尼酯原料药50 mg,加30%过氧化氢3滴,加水3 ml,放置2 min,用流动相稀释至100 ml,取样测定。结果,主成分降解约2.52%,各峰之间均能较好地分离,详见图3D。

2.5.5 光照破坏试验。取本品于照度为(4 500 ± 500) lx的条

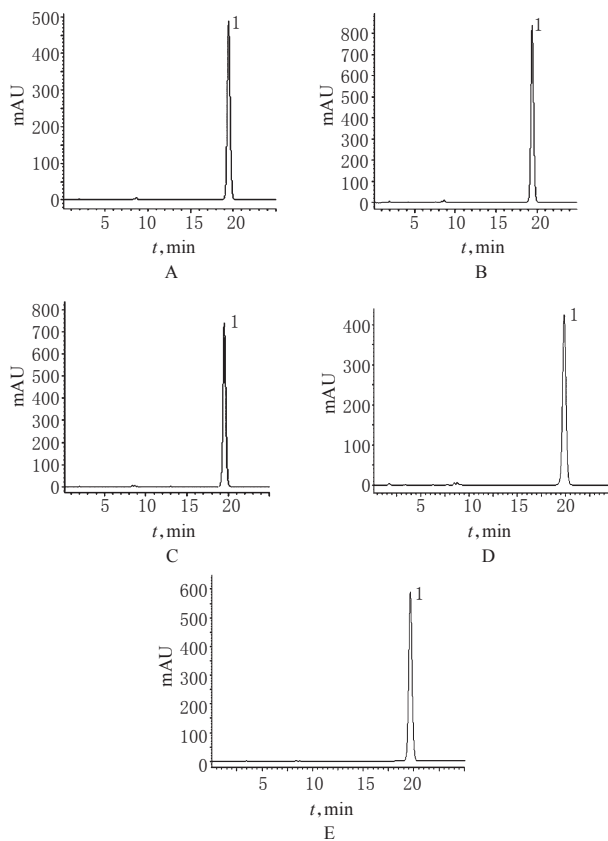


图3 专属性试验高效液相色谱图

A. 酸破坏后溶液; B. 碱破坏后溶液; C. 高温破坏后溶液; D. 氧化破坏后溶液; E. 光照破坏后溶液; 1. 二氟泼尼酯

Fig 3 HPLC chromatogram of specification test

A. solution destroyed by acid; B. solution destroyed by base; C. solution destroyed by high temperature; D. solution destroyed by oxidation; E. solution destroyed by high light; 1. difluprednate

件下放置10 d,称取光照后的样品50 mg,用流动相溶解并稀释至100 ml,取样测定。结果,主成分降解约1.70%,各峰之间均能较好地分离,见图3E。

2.6 检测限和定量限试验

精密称取二氟泼尼酯原料药适量,用流动相配制每1 ml含0.5 mg的溶液,再分别用流动相稀释成不同质量浓度的溶液,分别进样测定,记录色谱图,并对色谱系统进行基线检测。结果,二氟泼尼酯信噪比为3时检测限为56.3 ng,信噪比为10时定量限为281.5 ng。

2.7 线性关系考察

精密称取二氟泼尼酯对照品适量,加流动相溶解并稀释成每1 ml含50 μg的溶液,摇匀;用流动相稀释制成每1 ml中含1.126、2.252、3.378、4.504、5.630、6.756、7.882、9.008 μg的溶液,分别量取15 μl注入液相色谱仪。以质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,回归方程为: $A = 24\ 392c - 1\ 832$ ($r = 0.999\ 9$)。表明二氟泼尼酯检测质量浓度线性范围为1.126~9.008 μg/ml。

2.8 精密度试验

取质量浓度为5.630 mg/ml的溶液,连续进样测定6次,记录二氟泼尼酯的峰面积并计算,结果RSD为0.03%。

2.9 溶液稳定性试验

取同一份配制好的二氟泼尼酯供试品溶液,分别于0、7.5、12.5、18、22.5、28 h时测定1次,共测定7次,以二氟泼尼酯的峰面

凯氏定氮法测定土鳖虫多肽片的总氮量^Δ

罗美兰*,丁志军,廖银根,甘慧群(江西省皮肤病专科医院药剂科,南昌 330001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2365-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.22

摘要 目的:建立土鳖虫多肽片的总氮量的测定方法并制订该制剂含氮量的限度。方法:采用凯氏定氮法。将供试品消化(420℃,60 min)、蒸馏后,用硫酸滴定液滴定,测定土鳖虫多肽片的总氮量。结果:平均回收率为98.89%(RSD=0.78%),重复性试验RSD为0.88%;3批样品总氮量均值为5.09%。结论:建立的方法结果可靠、重复性好,可作为该制剂的质量控制方法;拟定该制剂每片含总氮量不得少于17.12 mg。

关键词 土鳖虫多肽片;凯氏定氮法;总氮量

Determination of Total Nitrogen Content in Woodlouse Polypeptide Tablets by Kjeldahl Method

LUO Mei-lan, DING Zhi-jun, LIAO Yin-gen, GAN Hui-qun (Dept. of Pharmacy, Jiangxi Provincial Skin Specialty Hospital, Nanchang 330001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for determination of total nitrogen content in Woodlouse polypeptide tablets and to develop the limit of nitrogen content in the preparation. METHODS: After digesting the samples (420℃, 60 min) and distilling, Kjeldahl method was used to determine total nitrogen content in Woodlouse polypeptide tablets. RESULTS: The mean recovery was 98.89% (RSD=0.78%), and RSD of repeatability test was 0.88%; average total nitrogen content of 3 batches of samples was 5.09%. CONCLUSIONS: The method is reliable and reproducible, and can be used for the quality control of Woodlouse polypeptide tablets. Total nitrogen content per tablet is no less than 17.12 mg.

KEY WORDS Woodlouse polypeptide tablets; Kjeldahl method; Total nitrogen content

积计算,结果主成分和有关物质的RSD分别为0.11%、0.01%。

2.10 回收率试验

精密称取二氟泼尼酯原料药适量,用流动相配制浓度为每1 ml含5 mg的溶液,作为供试品贮备液;取对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成5 mg/ml的溶液,作为对照品贮备液;精密量取供试品贮备液0.8、1.0、1.2 ml各3份,分别置于9个10 ml量瓶中,精密量取对照品贮备液1.0 ml,分别置于上述量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为回收率供试溶液;精密量取对照品贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。分别精密量取供试溶液和对照品溶液各15 μl注入色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算回收率,详见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

水平	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
低	4.09	4.13	100.98	100.2	0.56
	4.09	4.10	100.24		
	4.09	4.11	100.49		
中	5.11	5.10	99.80		
	5.11	5.16	100.98		
	5.11	5.11	100.00		
高	6.13	6.10	99.51		
	6.13	6.10	99.51		
	6.13	6.13	100.00		

Δ 基金项目:江西省科技计划资助项目(No.20111BBG70005-5)

* 副主任药师。研究方向:医院制剂及新制剂研发。电话:0791-85210774。E-mail:1433658399@qq.com

2.11 样品中有关物质的检测

取3批样品,按“2.1”项下条件和“2.2”项下方法测定,结果3批样品中有关物质含量分别为0.29%、0.23%、0.19%。

3 讨论

3.1 流动相选择

国内外均未见二氟泼尼酯有关物质检测的文献报道。笔者前期试验时曾采用不同的流动相[甲醇-水(70:30)、甲醇-水(30:70)、甲醇-水(40:60)、甲醇-水(60:40)]考察二氟泼尼酯与各破坏产物的分离情况。结果发现甲醇的比例对二氟泼尼酯与破坏产物的分离度有较大的影响,只有当甲醇-水比例为50:50时峰形较佳,分离度好,并且保留时间合适。

3.2 相关质量标准研讨

本品为化学药3.1类新药,国内外药典及相关其他质量标准均未收录,因此笔者将仿制二氟泼尼酯原料药与国外市售药在相同液相色谱条件下进行比对。结果除国外市售药的色谱图中发现有辅料峰(山梨酸)外,其余二者基本一致,说明本法能很好地控制其质量。因此笔者认为本法建立的液相色谱条件可作为该产品的有关物质检测条件。

参考文献

- [1] Yasueda S, Kimura M, Ohtori A, *et al.* Analysis of an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, in aqueous humor by combination of semi-micro HPLC and column switching method[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2003, 30(6):1 735.

(收稿日期:2012-08-29 修回日期:2013-01-06)