HPLC 法同时测定洛索洛芬钠片中的 5 个已知杂质

蒋蒨, 王平, 李荣, 李杰

(重庆科瑞制药(集团)有限公司, 重庆 400060)

摘要 目的:对洛索洛芬钠片的有关物质检测方法进行优化,提高杂质分离度和检出率。方法:采用 Intersil ODS-3(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相为 0.01 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾溶液(pH 4.5)-乙腈(85:15)(A)和 0.01 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾溶液(pH 4.5)-乙腈(15:85)(B),梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 220 nm;柱温 40 °C;进样体积 20 μ L。结果:洛索洛芬钠与相邻杂质以及 5 个已知杂质之间均达到的分离、洛索洛芬钠与5 个已知杂质的浓度与峰面积之间线性关系(r>0.999 9)、精密度、准确度和耐用性均良好;洛索洛芬钠片 3 批自制制剂与 3 批参比制剂的杂质谱基本一致,各批样品均符合制订质量标准的规定。结论:本法可用于洛索洛芬钠片有关物质的质量控制。

关键词:洛索洛芬钠片;方法优化;有关物质;校正因子;高效液相色谱法

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2023)02-0000-00

doi:10.19778/j.chp.2023.02.00?

Simultaneous determination of five known impurities in loxofen sodium tablets by HPLC

JIANG Qian, WANG Ping, LI Rong, LI Jie (Chongqing Kerui Pharmaceutical (Group) Co., Ltd., Chongqing 400060, China)

Abstract Objective: To improve the separation and detection rate of impurities by optimizing the detection method of related substances in loxofen sodium tablets. **Methods:** Intersil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) was adopted with 0.01 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (pH 4.5)-acetonitrile (85:15) (A) and 0.01 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (pH 4.5)-acetonitrile (15:85) (B) as mobile phase bygradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Detection wavelength was set at 220 nm. Column temperature was 40 °C. Injection volume was 20 μ L. **Results:** Loxofen sodium and adjacent impurities and five known impurities were separated and the linear relationship between the concentration and peak area (r > 0.999~9), the precision, accuracy and durability were met requirements. The impurity spectra of three batches of loxofen sodium tablets from self-made were basically the same as those of three batches of reference preparations. All batches of samples were in accordance with the provisions of quality standards. **Conclusion:** The method can be used for the quality control of related substances in loxoprofen sodium tablets.

Key words: loxoprofen sodium tablets; method optimization; related substances; correction factor; HPLC

洛索洛芬钠为苯丙酸类非甾体消炎药,口服 后在体内代谢成 trans-OH 型药物,抑制前列腺素 的生物合成[1],具有解热、消炎、镇痛的功效,且起 效快、作用强;因其为前体药从而不良反应显著减少,是具有较大市场潜力的药物^[2]。参考相关文献^[3,4],根据洛索洛芬钠合成工艺、化学结构以及

在国内外药典中,仅日本药典收载了洛索洛芬 钠及其片剂^[5,6],国内现行标准为企业注册标准或 新药转正标准及补充批件^[7]。

有关物质作为产品质量的重要指标,仅有日本药典收载了洛索洛芬钠原料的薄层色谱法。在国内

相关的标准和文献中^[8-11],其有关物质检查均为等度洗脱的 HPLC 法,且仅对未知单个杂质和杂质总量有限度要求。在实际研究工作中发现,采用现有的检测方法无法对这些已知杂质进行有效的研究。因此,本研究对洛索洛芬钠片的有关物质检测方法进行了优化,采用 HPLC 梯度洗脱程序,提高杂质分离度和检出率,对五个已知杂质进行了相对保留时间和校正因子研究。

表1 洛索洛钠片有关物质

Tab. 1 Related impurity in Loxoprofen Sodium Tablets

名称 (name)	化学命名 (chemical nomenclature)	杂质结构 (structural formula)
分解物 I (impurity I)	2-(4-乙酰苯基)-环戊酮(2-(4-acetophenyl)-cyclopentanone)	. Some
分解物Ⅱ(impurity Ⅱ)	2-(4-醛基苯基)丙酸(2-(4-aldophenyl) propionic acid)	HO
分解物Ⅲ(impurity Ⅲ)	4-(1-羧乙基)苯甲酸(4-(1-羧乙基)苯甲酸 4-(1-羧乙基)苯甲酸 4-(1-carboxyethyl) benzoic acid)	HO HO
分解物Ⅳ(impurity Ⅳ)	6-[4-(1-羧乙基)-苯基]-6-氧基己酸(6-[4-(1-carboxyethyl)-phenyl]-6-oxy- hexanoic acid)	HO 0 HO
分解物V(impurity V)	6-[4-(1-羧 Z 基) -苯 基] -5-氧 基 己 酸 (6-[4-(1-carboxyethyl) -phenyl] -5-oxy-hexanoic acid)	HO HO

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260II 型高效液相色谱仪,配置四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器、自动进样器(Agilent 公司),BS124S 电子天平(万分之一,Sartorius),XS105(十万分之一,Metter Toledo)。

表 2 对照品和杂质信息

Tab. 2 Reference and impurity information

名称 (name)	批号 (lot No.)	含量 (assay)/%	来源 (origins)
洛索洛芬钠(loxoprofen sodium)	100638-201903	87. 4	中国食品药品检定研究院
分解物 I (impurity I)	BLF20170526	98. 18	山东博洛德生物科技有限公司
分解物Ⅱ(impurity Ⅱ)	BLF20171018	97. 69	山东博洛德生物科技有限公司
分解物Ⅲ(impurity Ⅲ)	BLF20170811	96. 38	山东博洛德生物科技有限公司
分解物IV(impurity IV)	2691-099A6	97.9	TLC
分解物 V (impurity V)	LSLF20180423	96. 67	山东博洛德生物科技有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Intersil ODS-3 (250 mm × 4.6 mm,

1.2 材料

洛索洛芬钠片自制品(重庆科瑞制药(集团)有限公司,批号:200601、200602、200603);洛索洛芬钠片参比制剂(第一三共株式会社,批号:THA6720、THA6757、THA6472);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水,杂质和对照品信息见表 2。

5 μ m);柱温为40 ℃,流动相为0.01 $mol \cdot L^{-1}$ 的磷酸 二氢钾溶液(pH4.5)-乙腈(85:15)(A)和0.01 $mol \cdot L^{-1}$ 的磷酸二氢钾溶液(pH4.5)-乙腈(15:85)(B),

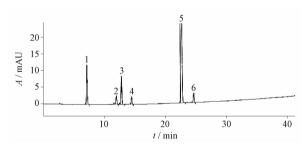
梯度洗脱(0~5 min,90% A;5~15 min,90% A→65% A;15~45 min,65% A→20% A),流速 1.0 mL,检测波长:220 nm,进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

- **2.2.1** 稀释剂 0.015 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 (磷酸调 pH 至 3.5)-乙腈(80:20)。
- 2.2.2 供试品溶液 取本品细粉适量(约相当于 洛索洛芬钠 12.5 mg),精密称定,置 50 mL量瓶中, 加适量稀释剂,振摇 10 min,加稀释剂稀释至刻度, 摇匀,滤过,即得。
- 2.2.3 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。
- 2. 2. 4 系统适用性溶液 取分解物Ⅲ、分解物Ⅱ、分解物Ⅱ、分解物Ⅳ、分解物Ⅰ和洛索洛芬钠的对照品适量,用稀释剂溶解并稀释制成每1 mL中分别含1. 25 μg 分解物Ⅲ、分解物Ⅱ、分解物Ⅴ、分解物Ⅳ、分解物Ⅰ和1 mg 洛索洛芬钠的溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性 精密量取系统适用性溶液 20μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,出峰顺序为分解物Ⅲ、分解物Ⅱ、分解物Ⅴ、分解物Ⅳ、洛索洛芬纳和分解物Ⅰ,重复进样6次,主成分峰与分解物Ⅰ峰之间分离度大于3.0、已知杂质与已知杂质之间的分离度均达到1.5;各峰的峰面积和保留时间精密度 RSD 值均小于2.0%;各已知杂质峰的理论塔板数均大于10000。典型色谱图见图1。



1. 分解物Ⅲ(impurity Ⅲ) 2. 分解物Ⅱ(impurity Ⅱ) 3. 分解物 V (impurity V) 4. 分解物Ⅳ(impurity IV) 5. 洛索洛芬钠(loxoprofen sodium) 6. 分解物 I (impurity I)

图1 系统适用性溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of system suitability

2.3.2 专属性试验 取洛索洛芬钠片进行强制降解试验,考察洛索洛芬钠对酸、碱、氧化、高温(溶液)、光照(溶液)的敏感程度,具体过程如下,结果见表3,空白辅料同法降解。

未降解:照"2.2.2 供试品溶液"项下制备。

酸降解:取本品细粉适量(约相当于洛索洛芬钠 12.5 mg),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 4 mol·L⁻¹盐酸溶液 5 mL,98 $^{\circ}$ C水浴加热 0.5 h,加 4 mol·L⁻¹氢氧化钠中和,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀。

碱降解:取本品细粉适量(约相当于洛索洛芬钠 12.5 mg),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 4 mol·L⁻¹氢氧化钠 5 mL,98 $^{\circ}$ 水浴加热 1 h,加 4 mol·L⁻¹盐酸溶液中和,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀。

氧化降解:取本品细粉适量(约相当于洛索洛芬钠 12.5 mg),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 3%过氧化氢 5 mL,98 ℃水浴加热 0.5 h,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀。

高温降解:取供试品适量,在60℃条件下,平铺放置30 d,照"2.2.2 供试品溶液"项下制备。

高湿降解:取供试品适量,在 25 ℃,RH90%条件下,平铺放置 30 d,照"2.2.2 供试品溶液"项下制备。

光照降解:取供试品适量,在(4500±500) lx 光 照条件下,平铺放置 30 d,照"2.2.2 供试品溶液"项下制备。

由试验结果可得,空白溶剂及各辅料对有关物质测定不会造成干扰;主成分与已知杂质、已知杂质与已知杂质之间能完全分离;样品在酸、碱、氧化、光照、高温、高湿等条件下破坏得到的杂质峰均与洛索洛芬钠峰的分离度符合要求,降解产物峰之间也具有良好的分离度,各破坏条件下主峰纯度因子均大于990。通过比较试验前后总峰面积的变化,物料平衡(A破坏后各色谱峰校正后的峰面积和×100%)在95%~100%;本品在各强制降解条件下均易降解产生分解物V,特别是在碱性条件下增加尤其明显。该方法专属性良好,能有效检测样品中的降解产物,结果详见表3。

- 2.3.3 定量限与检测限 精密称取洛索洛芬钠对照品及各杂质对照品适量,分别精密量取适量,置量瓶中,逐级稀释后进样 20 μL,以信噪比为 3:1 时计算检测限,以信噪比为 10:1 时计算定量限,结果见表 4。
- 2.3.4 线性、范围和校正因子 精密称取洛索洛芬 钠对照品及各杂质对照品适量,精密称定,分别加稀 释液溶解并稀释配制成系列的线性溶液,上述色谱 条件进行测定,记录色谱图,以浓度 C(μg·mL⁻¹)

对峰面积 A 进行线性拟合,并以斜率计算校正因 子,结果见表 4。

表3 洛索洛芬钠片强制降解试验结果(%)

Tab. 3 Results of forced degradation test of loxoprofen sodium tablets

项目 (item)	未降解 (not destroy)	酸降解 (destroyed by acid)	碱降解 (destroyed by base)	氧化降解 (destroyed by oxidation)	高温降解 (destroyed by high temperature)	高湿降解 (destroyed by hig temperature)	光照降解 h (destroyed by light)
分解物Ⅲ	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	0.04	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
分解物Ⅱ	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)(未检出 not detected	未检出)(not detected)	0.05 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)
分解物V	0.12	0. 14	1.84	0. 18	0.09	0.44	0.12
分解物Ⅳ	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)(未检出 not detected	未检出)(not detected)	未检出 (not detected)	0. 24	未检出 (not detected)
分解物I	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)(未检出 not detected	未检出)(not detected)	0.43	0. 19	未检出 (not detected)
最大未知单杂(maximum unknown single impurity)	0.05	0.51	0.62	0. 21	0.07	0.06	0.05
洛索洛芬钠(loxoprofen sodium)	99. 58	98. 39	92.08	95. 25	98. 47	98.56	99. 10
峰纯度(peak purity)*	999	997	998	998	996	998	996
物料平衡(material balance)	-	98	100	96	98	98	99

注: * 峰纯度因子,工作站依据光谱匹配度来衡量峰纯度

表 4 检测限、定量限、线性范围、回归方程和校正因子

Tab. 4 Results of detection limit, quantitation limit, linear range, regressive equation and correction factor

成分	$LOD/$ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	LOQ	线性范围 (linear range)	回归方程 (regressive equation)	r	校正因子 (correction factor)
洛索洛芬钠(loxoprofen sodium)	0. 028 9	0. 083 6	0. 079 ~ 2. 366	A = 37.58C + 0.072	0. 999 9	1
分解物 I (impurity I)	0.028 8	0.086 5	0. 092 ~ 2. 768	A = 10.82C - 0.0051	0. 999 9	3. 47
分解物Ⅱ(impurity Ⅱ)	0.017 4	0.0697	0. 084 ~ 2. 510	A = 11.74C - 0.11	0. 999 9	3. 20
分解物Ⅲ(impurity Ⅲ)	0.007 3	0.024 3	0.078 ~ 2.334	A = 43.39C + 0.039	0. 999 9	0. 87
分解物Ⅳ(impurity N)	0.024 1	0.096 5	0.077 ~ 2.237	A = 9.04C + 0.0097	0. 999 9	4. 16
分解物V(impurity V)	0. 018 1	0.054 3	0. 087 ~ 2. 605	$A = 31.\ 03C + 0.\ 12$	0. 999 9	1. 21

- 2.3.5 溶液稳定性试验 供试品溶液、各杂质对照溶液在常温条件下放置 0、4、8、12、18、24、36 和 48h 后按上述色谱条件测定。结果表明,在室温条件下放置 48 小时各色谱峰的峰面积均没有明显变化,各杂质的 RSD 均小于 2% (n=6)。
- 2.3.6 回收率试验与重复性 采用加样回收率的测定方法,以各杂质限度作为 100% 浓度,分别制备相当于限度浓度 50%、100% 及 150% 三个浓度的样品,各平行制备三份。按上述色谱条件测定,计算回收率与并考察方法的重复性,结果各已知杂质平均回收率在 94% ~ 106%,回收率及重复性的 RSD 均在 5% 以内,符合要求,说明该方法具有良好的准确度及重复性。
- 2.3.7 中间精密度 照"重复性"项下方法配制溶

- 液,由另一名分析人员使用不同的仪器、不同时间进行测试,结果各杂质含量 RSD 均小于 5% 表明本法的中间精密度良好。
- **2.3.8** 耐用性试验 取供试品溶液和对照溶液,改变拟定色谱条件,包括流动相初始比例(83:17~87:13),流速(0.8~1.2 mL·min⁻¹),柱温(35~45℃),检测波长(220~224 nm),磷酸盐缓冲液 pH 值(3.3~3.7)以及不同品牌色谱柱(中谱红 RD-C₁₈、Agilent ZORBAX SB-C₁₈),主成分、已知杂质与与相邻杂质峰均能达到良好的分离,符合系统适用性的要求,该方法的耐用性良好。
- 2.3.9 有关物质的测定 采用上述经过验证的有 关物质检查方法对洛索洛芬钠片 3 批自制制剂 3 批 参比制剂进行检测,典型色谱图见图 2。采用校正

因子计算,结果显示,在参比制剂和自制制剂中均能 检出分解物 V,含量相当,均小于 0.1%;参比制剂 和自制制剂检出的杂质和杂质含量相当,两者的杂质谱一致(表5)。

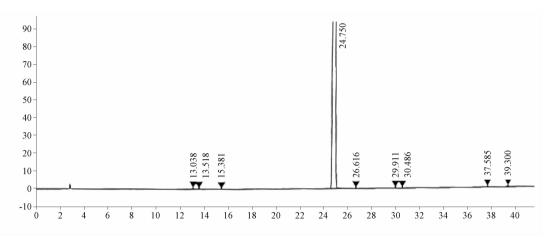


图 2 供试品溶液色谱图

Fig. 2 Chromatogram of Self-made preparation

表5 洛索洛芬钠片有关物质检测结果

Tab. 5 The results of related substances in losoprofen sodium tablets

杂质	参比制剂	(reference prepar	ations)/%	自制制剂(self-made preparations)/%			
(Related impurity)	THA6720	THA6757	THA6472	200601	200602	200603	
分解物Ⅲ(impurity Ⅲ)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	
分解物Ⅱ(impurity Ⅱ)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	
分解物V(impurity V)	0.08	0.03	0. 10	未检出 (not detected)	0.06	0. 05	
分解物IV(impurityIV)	0. 10	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	
分解物I(impurity I)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)	
最大未知单杂(maximum unknown single impurity)	0.07	0.05	0.06	0.06	0.03	0.05	
总杂(total impurities)	0.30	0. 19	0. 19	0. 13	0. 23	0. 22	

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

在现有的国家药品标准中对洛索洛芬钠有关物质检测均采用的是等度洗脱,甲醇-水-冰醋酸-三乙胺=580:420:1:1(v/v/v/v)为流动相,在该条件下,有部分杂质未被完全分离,且由于检测波长222 nm,接近于流动相的截止波长,造成部分杂质未能被检出。本文将其有关物质色谱系统修改为梯度洗脱法,加强了色谱系统的洗脱、分离能力,并将流动相确定为乙腈-磷酸二氢钾,降低了背景影响,增加了系统灵敏度。该方法能有效的分离各破坏条件下产生的降解产物,且适当调节柱温、流动相组分比例、及采用不同品牌的同类型色谱柱均能满足分离

要求,专属性及耐用性良好。

3.2 已知杂质及其控制限度的确定

根据相关文献资料以及稳定性结果,确定了5个已知杂质(分解物 I、II、III、III、III、III 、IV和 V),其中分解物 V在强制降解试验和加速、长期稳定性试验中均有不同程度的增加,为洛索洛芬钠水解后开环、氧化产生降解杂质(见图 3),提示其为洛索洛芬钠片的主要降解产物。因此,根据洛索洛芬钠片的的最大日剂量为 180 mg,按照 ICH 的 Q3B(R2)中"新药制剂中降解产物的限度",其质控限为0.2%,本研究将洛索洛芬钠片中5个已知杂质的限度设定为 0.2%,并作为特定杂质纳入质量标准予以控制。

图3 分解物 V 的降解路线图

Fig. 3 Degradation Roadmap of impurity V

3.3 小结

试验采用该法对洛索洛芬钠片自制制剂和参比制剂各3批进行了有关物质检查,结果表明,自制制剂和参比制剂中杂质谱基本一致,自制品中各已知杂质、单个未知杂质和总杂质均低于质量标准规定的限度。综上所述,本方法专属性强,能有效分离和检测样品中可能的工艺杂质和降解杂质,采用相对保留时间和校正因子来定量相关杂质,可用于洛索洛芬钠片中有关物质的质量控制。

参考文献

- [1] 周淑琴. 新型非甾体抗炎药洛索洛芬钠的研究进展[J]. 上海医药, 2008, 29(10):468

 ZHOU SQ. The research advances of a novel non-steroidal antiinflammatory agent loxoprofen sodium [J]. Shanghai Med Pharm
 J, 2008, 29(10):468
- [2] 黄李焘. 洛索洛芬钠的研究进展[J]. 社区医学杂志, 2015, 13(18):73

 HUANG LT. Research progress of loxoprofen sodium[J]. J Commun Med, 2015, 13(18):73
- [3] 洛索洛芬钠片. 日本病院薬剤師会 IF 文件, 2018 年 3 月修订(第 10 版)

 Loxoprofen Sodium Tablets. If document of Japanese Hospital Pharmacists Association, revised in March 2018 (10th Ed)
- [4] 石蓓佳,纪宇,黄朝瑜. 洛索洛芬钠杂质 2-[(4-乙酰基苯基)

甲基]环戊酮研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12):2199 SHI BJ, JI Y, HUANG CY. Study on the impurity 2-[(4-acetylphenyl) methyl]cyclopentanone of loxoprofen sodium[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(12):2199
[5] JP XWIS]. 2021:1279

- [6] JP XVIII [S]. 2021:1280
- [7] 曹琳,陈仲益,章燕,等. 洛索洛芬钠片的质量分析[J]. 中国现代应用药学,2019,36(5):563

 CAO L, CHEN ZY, ZHANG Y, et al. Quality analysis of loxoprofen sodium tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2019, 36 (5):563
- [8] YBH04482010 国家药品标准[S]. 2010 YBH04482010 National Drug Standard[S]. 2010
- [9] YBH33602005Z 国家药品标准[S]. 2005 YBH33602005Z National Drug Standard[S]. 2005
- [10] 袁浩宇,王鹏,易红,等. RP-HPLC 法测定洛索洛芬钠片的含量及有关物质[J]. 中国药房, 2017, 28(15):2127
 YUAN HY, WANG P, YI H, et al. Determination of contents and related substances in loxoprofen sodium tablets by RP-HPLC
 [J]. China Pharm, 2017, 28(15);2127
- [11] 陆步实, 张根元, 杨大龙, 等. 反相高效液相色谱法测定洛索 洛芬钠的含量及其有关物质[J]. 中国新药杂志, 2004, 13 (12):1137 LU BS, ZHAN GY, YANG DL, et al. RP-HPLC determination of loxoprofen sodium and its related substances [J]. Chin J New

Drugs, 2004, 13(12):1137

(收稿日期:2022-06-28)