

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01267

· 技术方法 ·

超快速液相色谱法测定尼美舒利 4 种制剂中的有关物质

张小妮¹, 郭欢迎², 耿庆光², 王嫦鹤², 刘海静^{1,2*}

1. 陕西中医学院药学院药理学系, 咸阳 712046

2. 陕西省食品药品检验所化学室, 西安 710065

[摘要] **目的** 建立采用超快速液相色谱(UFLC)法测定 4 种尼美舒利制剂中有关物质的方法。**方法** 采用岛津超高速液相色谱仪, 色谱柱: Synchronis C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm), 流动相: 甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液(氨水调 pH 至 6.5, 体积比 45:15:40), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 230 nm。分别采用《欧洲药典》和《中国药典》的系统适用性溶液、破坏性样品以及国内不同生产厂家、不同剂型的空白辅料对该方法的适用性进行了考察。**结果** 该方法分辨率高、专属性强, 能高效、快速地检测尼美舒利制剂中的有关物质, 破坏性试验产物对测定结果没有影响, 不同厂家、不同剂型的辅料对测定结果没有影响。**结论** 该方法高效、快速、适用面广, 可用于国内不同生产厂家、不同剂型的尼美舒利有关物质的测定。

[关键词] 超快速液相色谱法; 尼美舒利; 有关物质; 空白辅料

[中图分类号] R 917.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)11-1267-05

Determination of substances in 4 nimesulide preparations by ultra-fast liquid chromatography

ZHANG Xiao-ni¹, GUO Huan-ying², GENG Qing-guang², WANG Chang-he², LIU Hai-jing^{1,2*}

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, Shaanxi, China

2. Chemical Laboratory, Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To establish an ultra-fast liquid chromatography (UFLC) method for detecting the substances in different preparations of nimesulide. **Methods** Ultra-fast liquid chromatography instruments Shimadzu and Synchronis C₁₈ column (100 mm×2.1 mm×1.7 μm) were used. The mobile phase was a mixture solvent of methanol-acetonitrile-0.1% solution of orthophosphoric acid (adjusted to pH 6.5 with ammonia)(45:15:40). The flowing rate was 0.3 mL/min, and the detection wavelength was 230 nm. The system suitability solutions of European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia, the damaging samples and the accessories of different preparations of different manufacturers were used to investigate the method applicability. **Results** The method had high resolution, strong specificity and can efficiently and quickly detect the related substances in nimesulide preparations. Various degradation products of damaging tests and the accessories of different preparations from different manufacturers had no effect on the determination results. **Conclusion** The method is efficient, fast, widely applicable and can be used for detecting the substances in different preparations of nimesulide by different manufacturers.

[Key words] ultra-fast liquid Chromatography; nimesulide; related substances; blank excipients

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1267-1271]

尼美舒利化学名为 N-(4-硝基-2-苯氧基苯)甲磺酰胺, 是非类固醇抗炎药, 具有抗炎、镇痛、解热作用。于 1985 年由 Roche 公司首先在意大利上市, 目前已在 50 个国家使用^[1]。临床上用于慢性关节炎症如类风湿性关节炎和骨关节炎等手术和急性创伤后的疼痛和炎症, 鼻炎、喉炎、扁桃体炎及呼吸道感染引起的发热等症状的治疗^[2]。尼美舒利有关物质

的测定方法文献已有报道, 尼美舒利的保留时间约为 8 min, 有关物质样品的分析时间约为 60 min (7 倍保留时间)^[3]; 《中国药典》(2010 年版) 尼美舒利片有关物质测定方法也需要 60 min 的分析时间。本文建立了超快速液相色谱法对尼美舒利制剂中的有关物质进行检测, 并分别采用《欧洲药典》和《中国药典》的系统适用性溶液以及破坏性试验对该方法

[收稿日期] 2014-04-15 **[接受日期]** 2014-10-27

[基金项目] 陕西省哲学社会科学基金(13G020), Supported by Philosophy and Social Science Fund of Shaanxi Province(13G020).

[作者简介] 张小妮, 硕士生. E-mail: zhangxiaoni90@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-62288401, E-mail: liuhj272@163.com

适用性进行了考察,同时还对国内不同生产厂家、不同剂型的空白辅料进行了考察。本文所建立的超快速液相色谱法比常规的高效液相色谱法更加高效、快速、适用面广,可用于国内不同生产厂家、不同剂型的尼美舒利有关物质的测定。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 LC-30AD 超快速液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-30AD 泵、SIL-30AC 进样器、SPD-20A 紫外检测器;EMPOWRE 色谱工作站(美国 Waters 公司);LS-4000UV 光照试验仪(北京天星科仪科技有限公司);BSS224S 电子分析天平(德国塞利多斯公司);SCQ-200 超声波清洗器(上海声浦超声设备厂);高纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂 尼美舒利制剂;尼美舒利对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100555-201202);尼美舒利杂质 A[N-(2,4-二硝基-6-苯氧基苯基)甲磺酰胺]、B[N-(2-苯氧基苯基)甲磺酰胺]、E[N,N-(二甲磺酰基)-2-苯氧基苯胺]、F[N,N-(二甲磺酰基)-4-硝基-2-苯氧基苯胺]对照品(《欧洲药典》Y0001237);尼美舒利杂质 C(2-苯氧基苯胺)对照品(《欧洲药典》1140-039A3);尼美舒利杂质 D(4-硝基-2-苯氧基苯胺)对照品(《欧洲药典》1159-07);对氯苯胺(化学纯);甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Syncronis C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.7 μm,Thermo Scientific);流动相:甲醇-乙腈-0.1% 磷酸水溶液(氨水调 pH 至 6.5,体积比 45:15:40);流速:0.3 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:40℃;进样体积 1 μL。

2.2 溶液的配制 混合对照品溶液:精密称取尼美舒利杂质 A、B、E、F(杂质 A、B、E、F 为混合对照品,内含尼美舒利)4 mg 置 10 mL 量瓶中,加 4 mL 乙腈溶解,流动相定容至刻度,作为杂质 A、B、E、F 溶液;精密称取尼美舒利杂质 C 5 mg 置 25 mL 量瓶中,加 10 mL 乙腈溶解,水定容至刻度,精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶,流动相定容至刻度,作为杂质 C 溶液;精密称取尼美舒利杂质 D 5 mg 置 5 mL 量瓶中,乙腈溶解并定容至刻度,作为杂质 D 溶液。分别精密

量取杂质 A、B、E、F 溶液 2 mL、杂质 C 溶液 1 mL 与杂质 D 溶液 1 mL,混合摇匀,制成混合对照品溶液(含少量尼美舒利)。

系统适用性溶液:精密称取尼美舒利对照品 50 mg、对氯苯胺 20 mg 置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解定容后,精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中,流动相定容至刻度。

样品溶液:取尼美舒利分散片粉末约 0.5 g(相当于尼美舒利 25 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过。

对照溶液:精密量取 1 mL 样品溶液置 200 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀,滤过。

空白辅料溶液:根据不同厂家的生产工艺,分别按处方等比例的各辅料作空白样品,按照样品溶液的配制方法,制备空白辅料溶液。

2.3 系统适用性实验 分别精密量取混合对照品溶液、系统适用性溶液各 1 μL,注入超快速液相色谱仪,按照 2.1 项下的色谱条件进行分析,记录色谱图(图 1)。结果显示,混合对照品溶液色谱图中,各杂质间的分离度均大于 1.5,符合《欧洲药典》(8.0 版)的系统适用性要求^[4];系统适用性溶液色谱图中,尼美舒利峰的理论板数均大于 3 000,各杂质间的分离度均大于 1.5,符合《中国药典》(2010 年版)系统适用性要求^[5]。

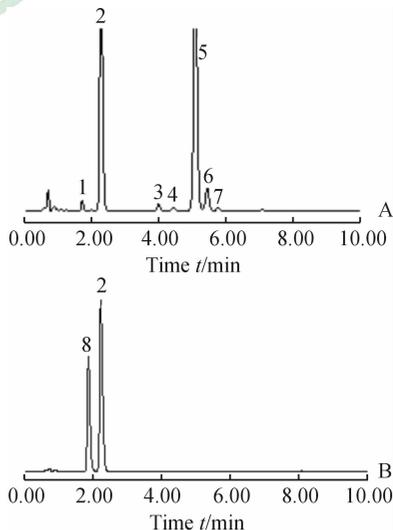


图 1 混合对照品(A)和系统适用性溶液(B)色谱图
Fig 1 Chromatograms of the mixed reference substance solution(A) and system suitability(B)

1: Impurity A; 2: Nimesulide; 3: Impurity B; 4: Impurity C; 5: Impurity D; 6: Impurity E; 7: Impurity F; 8: 4-Chloroaniline

2.4 空白辅料的考察 分别精密量取 A~F 6 个厂家的空白辅料溶液和其制剂溶液各 1 μL , 注入超快

速液相色谱仪, 按照 2.1 项下的色谱条件进行分析, 记录色谱图(图 2)。

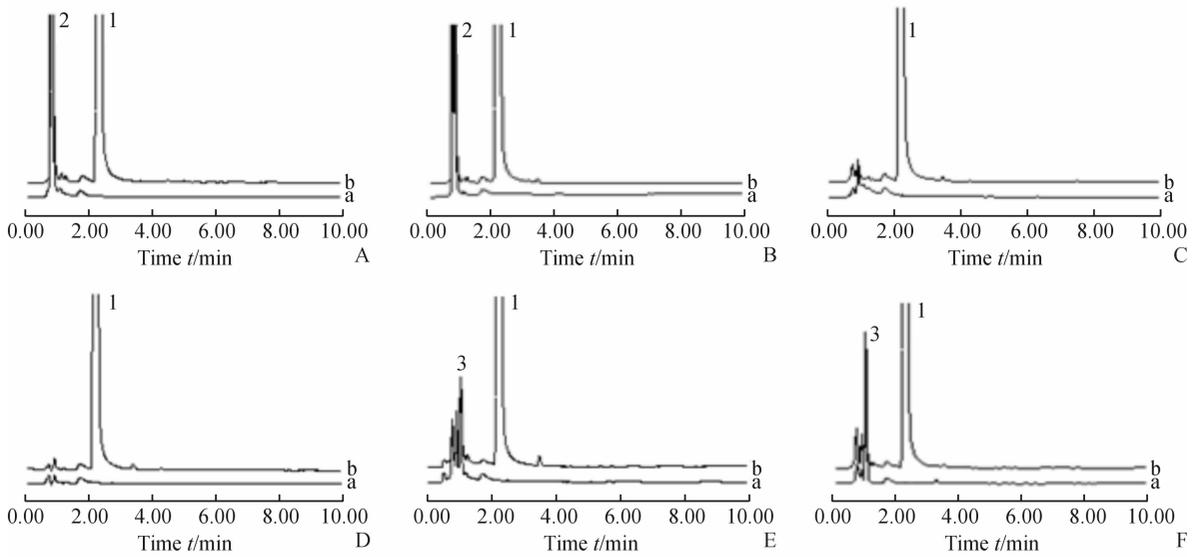


图 2 空白辅料图谱

Fig 2 Chromatograms of blank excipients

A-F; Pharmaceutical factories. A, B; Dispersible tablets; C; Tablets; D; Capsules; E, F; Granules. a; Blank excipients; b; Preparations. 1; Nimesulide; 2; Saccharin sodium; 3; Aspartame

由图 2 结果可见: A 制药厂和 B 制药厂的分散片色谱图中有糖精钠色谱峰, E 制药厂和 F 制药厂的颗粒剂色谱图中有阿斯巴甜的色谱峰, 但是这些辅料均不干扰测定, 所有厂家提供的空白辅料与尼美舒利色谱峰完全分离, 对尼美舒利有关物质的检测无干扰。

2.5 破坏性实验

2.5.1 原样品 取尼美舒利颗粒粉末, 各约 0.5 g (相当于尼美舒利 25 mg), 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释到刻度, 摇匀, 滤过。精密量取 1 μL , 注入超快速液相色谱仪, 按照 2.1 项下的色谱条件进行分析, 记录色谱图(图 3A)。

2.5.2 强酸破坏 取 3 份尼美舒利颗粒粉末, 各约 0.5 g (相当于尼美舒利 25 mg), 分别置 100 mL 量瓶中, 各加入 1 mol/L 盐酸溶液 10 mL, 依次常温放置 2 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 2 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 4 h。放冷, 各加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 使呈中性, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过^[6]。精密量取 1 μL , 注入超快速液相色谱仪, 按照 2.1 项下的色谱条件进行分析, 记录色谱图(图 3B)。由图谱可见, 经强酸破坏后产生的杂质与尼美舒利主峰能够完全分离。强酸条件下, 尼美舒利易降解产生较多的杂

质, 且随着时间的增加, 杂质峰面积有所增加, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 4 h、2 h 后比常温放置 2 h 产生杂质的峰面积更大。因此建议在尼美舒利的生产和检测过程中应避免强酸环境。

2.5.3 强碱破坏 取 3 份尼美舒利颗粒粉末, 各约 0.5 g (相当于尼美舒利 25 mg), 分别置 100 mL 量瓶中, 各加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL, 依次常温放置 2 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 2 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 4 h。放冷, 各加入 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 使呈中性, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过。精密量取 1 μL , 注入超快速液相色谱仪, 按照 2.1 项下的色谱条件进行分析, 记录色谱图(图 3C)。由图谱可见, 经强碱破坏后产生的杂质与尼美舒利主峰能够完全分离。强碱水浴条件下, 尼美舒利更易降解产生较多杂质, 相对于常温放置 2 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 4 h、2 h 后杂质的数量有所增多。因此建议在尼美舒利的生产和检测过程中应避免强碱环境。

2.5.4 双氧水破坏 取 2 份尼美舒利颗粒粉末, 各约 0.5 g (相当于尼美舒利 25 mg), 分别置 100 mL 量瓶中, 各加入 30% 双氧水 10 mL, 依次常温放置 4 h、80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 2 h。放冷, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过。精密量取 1 μL , 注入超快速液相色谱

谱仪,按照 2.1 项下的色谱条件进行分析,记录色谱图(图 3D)。由图谱可见,经双氧水破坏后产生的杂质与尼美舒利主峰能够完全分离。强氧化条件下,尼美舒利主峰基本被氧化,在 80℃ 常温放置 4 h 与 80℃ 水浴放置 2 h 下产生的杂质基本相当。因此,建议在尼美舒利的生产和检测过程中应避免强氧化环境。

2.5.5 高温破坏 取 2 份尼美舒利颗粒粉末,各约 0.5 g(相当于尼美舒利 25 mg),分别置于 100 mL 量瓶中,放于 105℃ 下加热 8 h,放冷,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过。精密量取 1 μL,注入超快速液相色谱仪,按照 2.1 项下的色谱条件进行分析,记录色谱图(图 3E)。由图谱可知,经高温破坏后产生的

杂质与尼美舒利主峰能够完全分离。高温条件下,尼美舒利易降解产生杂质。因此,建议在尼美舒利的生产和检测过程中应避免高温的影响。

2.5.6 光照破坏 取尼美舒利颗粒粉末,约 0.5 g(相当于尼美舒利 25 mg),置于 100 mL 量瓶中,置 4500 Lx 光照箱中放置 10 d,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过。精密量取 1 μL,注入超快速液相色谱仪,按照 2.1 项下的色谱条件进行分析,记录色谱图(图 3F)。由图谱可知,光照后在辅料峰和主峰之间产生少量杂质,所以光照条件对尼美舒利也有影响。因此,建议在尼美舒利的生产和检测过程中应避免光照。

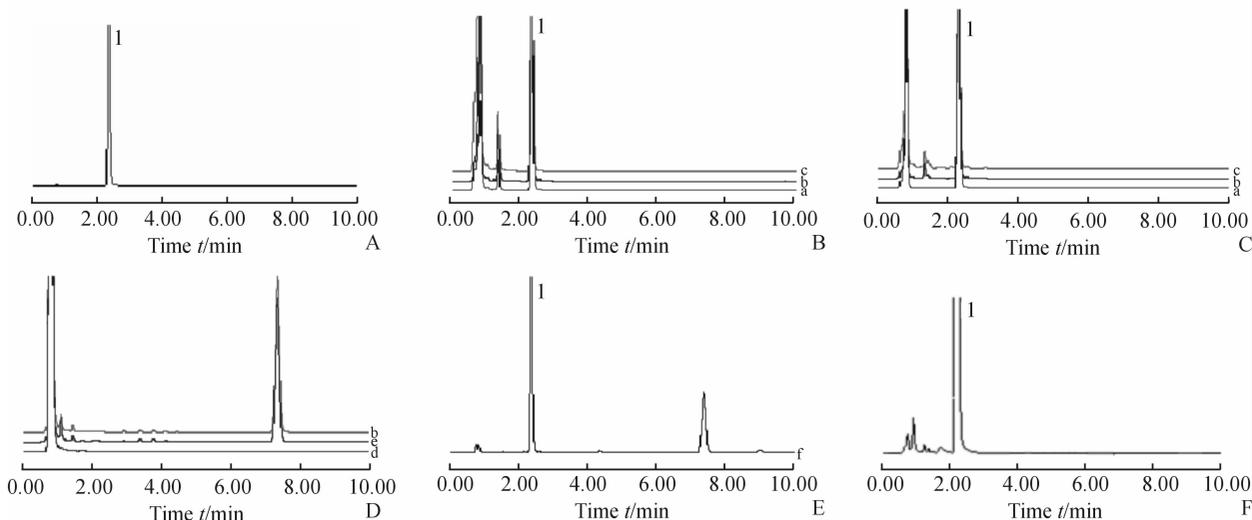


图 3 破坏性实验图谱

Fig 3 Chromatograms of destructive experiments

A: Original sample; B: Acid damage samples; C: Alkali damage samples; D: Oxidation damage samples; E: High temperature damage samples; F: Light damage samples. a: Room temperature for 2 h; b: 80℃ water bath for 2 h; c: 80℃ water bath for 4 h; d: Blank of hydrogen peroxide; e: Room temperature for 4 h; f: 105℃ for 8 h. 1: Nimesulide

2.6 有关物质测定 精密称取尼美舒利制剂适量(相当于尼美舒利 50 mg)于 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。取上述溶液 1 mL 置 200 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,作为对照溶液。取对照溶液和供试品溶液各 1 μL 注入液相色谱仪,按照 2.1 项下的色谱条件进行分析,记录色谱图。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,单个杂质峰面积不得大于对照溶液中主峰面积,各杂质峰面积之和不得大于对照溶液中主峰面积的 5 倍。结果(表 1)显示:16 批尼美舒利制剂的有关

物质单个杂质峰面积含量为 0.004 6% ~ 0.052 5%,总杂质含量为 0.022 8% ~ 0.084 3%。

3 讨论

3.1 UPLC 与 HPLC 测定有关物质的比较 使用超快速液相色谱法测定,尼美舒利的出峰时间在 2.2 min,而采用 HPLC 测定尼美舒利的出峰时间在 8.5 min^[3],由于尼美舒利有关物质检测需要保留主峰时间的 7 倍,所以 UPLC 法大大节约了检测时间,同时也减少了进样量。

表 1 尼美舒利制剂中有关物质的测定结果

Tab 1 Determination results of substances in nimesulide preparations

Dosage form	Factory	Lot number	Relative retention time <i>t</i> /min						Total impurity
									content
			0.3	1.9	2.5	3.0	5.9	9.1	
Tablet	A	130505	0.009 2	0.023 7	-	0.032 8	-	-	0.065 7
Tablet	B	130507	0.007 9	0.008 4	-	-	0.025 3	0.042 7	0.084 3
Tablet	C	130202	0.005 9	-	0.017 4	0.006 2	-	0.037 9	0.067 4
Tablet	C	130502	0.007 2	0.052 5	-	0.012 9	-	-	0.072 6
Dispersible tablet	D	130704	0.014 3	0.020 1	0.011 2	-	0.030 8	-	0.076 4
Dispersible tablet	E	130701	0.028 7	-	0.011 3	-	-	-	0.04
Dispersible tablet	F	130314	0.005 4	0.010 8	0.013 9	-	-	-	0.03
Dispersible tablet	G	130707	0.006 7	0.017 2	-	0.009 7	-	-	0.033 6
Capsule	E	130324	0.004 6	0.039 5	-	-	-	-	0.044
Capsule	H	130709	0.008 3	-	0.008 8	0.0057	-	-	0.022 8
Capsule	F	130705	-	0.015 3	0.010 9	-	-	-	0.026 3
Capsule	A	130201	-	0.006 3	-	-	0.026 1	-	0.032 4
Granule	I	120303	0.008 8	0.007 5	-	-	0.037 4	0.029 2	0.082 9
Granule	D	130706	0.008 9	-	0.009 2	0.006 6	-	-	0.024 6
Granule	J	120843	0.010 7	0.029 8	-	0.007 7	-	0.0238	0.072
Granule	J	120364	0.009 8	0.033 6	-	0.039 3	-	-	0.082 7

A-J: Different pharmaceutical factories

3.2 流动相的选择 本实验对乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-乙腈-0.1%磷酸盐缓冲溶液 3 种流动相条件下的系统适用性进行了对比。发现乙腈-0.1%磷酸水溶液条件下,系统适用性下杂质 C 和杂质 D 分离度 < 1.5。采用甲醇-乙腈-0.1%磷酸盐缓冲溶液作为流动相时,各杂质能很好地分离,但是尼美舒利保留时间较长(5~6 min),使得检测时间太长。采用甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相时,各杂质既能很好分离,且尼美舒利保留时间较短,主峰 7 倍保留时间后检测时间在 20 min 之内。故选择了甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液作流动相。

3.3 pH 的选择 流动相的 pH 对尼美舒利主峰保留时间影响较大,随着流动相 pH 增大,尼美舒利的保留时间缩短。本研究选择甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液(氨水调 pH 至 6.5,体积比 45:15:40)为流动相,在此条件下,所有杂质峰均能完全分离(分离度 > 1.5),且峰形对称,基线平稳,尼美舒利各种剂型中的有关物质均能够被较好地分离检测。

3.4 样品的配制 本次实验过程中发现,所制备的尼美舒利样品(浓度约为 1 mg/mL)在较低的温度下(15℃左右)放置约 24 h 后,容易析出针状晶体,导致测定结果差异较大。因此,尼美舒利有关物质的供试品溶液应现用现配,常温避光放置,不宜在低温下放置。

3.5 样品稳定性 尼美舒利样品在强酸、强碱、强氧化、高温和强光的条件下均容易降解产生杂质。因此,建议在尼美舒利的生产和分析检测过程中应避免强酸、强碱、强氧化、高温和强光环境的影响。

综上所述,本研究所建立的方法比常规的高效液相色谱法更加高效、快速,适用面更广,不仅能够保证主成分与各有关物质的色谱峰均完全分离,大大缩短了检测时间,还可适用于国内不同生产厂家、不同剂型的尼美舒利有关物质的测定。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 谢 斌,方建国,任 霞,王文清. HPLC 法测定尼美舒利胶囊有关物质[J]. 今日药学,2011,21:33-36.
- [2] 李燕航,高咏梅. HPLC 法测定尼美舒利胶囊有关物质[J]. 广东药学院学报,2006,22:518-520.
- [3] 占明清,刘冬梅. HPLC 法检测尼美舒利干混悬剂的有关物质[J]. 中国药品标准,2008,9:301-303.
- [4] 欧洲药品质量委员会. 欧洲药典 8.0 版[S]. 欧洲药品质量管理局,2014:2577-2578.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 二部. 北京:中国医药科技出版社,2010:225-226.
- [6] 黄 敏. RP- HPLC 法测定自制尼美舒利分散片含量及有关物质[J]. 中国医药导报,2007,4:30-32.

[本文编辑] 尹 茶