

岛津 Nexera LC-40 结合 Co-injection 功能测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质

LC-192

摘要： 本文采用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪，建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质测定方法。对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中采用了自动进样器 Co-injection 功能，相较传统的直接进样（标准模式）可以获得更高的柱效及分离度；系统适用性试验，空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定干扰情况及分离度溶液测试结果均满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.051 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密度实验中，双氯芬酸钠的保留时间相对标准偏差为 0.040~0.071%；峰面积的相对标准偏差为 0.191~1.621%。供试品中单个杂质均小于 0.5%，并且总杂质小于 1.0%，结果符合药典要求。实验结果表明，该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

关键词： Nexera LC-40 高效液相色谱仪 双氯芬酸钠肠溶片 有关物质

双氯芬酸钠肠溶片为解热镇痛及非甾体抗炎镇痛药，用于缓解各种关节炎的关节肿痛症状，治疗非关节性的各种软组织风湿性疼痛，急性的轻、中度疼痛，对成人和儿童的发热有解热作用。其主要靠抑制环氧合酶减少前列腺素的合成，以及一定程度上抑制脂氧酶而减少白三烯、缓激肽等产物的生成而发挥解热镇痛及抗炎作用。

国内外对双氯芬酸钠制剂的 HPLC 方法报道较多，

但较少有使用 UHPLC 法对其有关物质进行检测的研究。和 HPLC 法相比，UHPLC 法能有效节省分析时间和有机溶剂的消耗。

参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下方法，本研究采用岛津新款液相色谱仪 LC-40，建立 UHPLC 法测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质，该方法准确、快速、灵敏度高，可用于制药药检相关行业对药品质量控制和分析的检验检测工作。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 NexeraLC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B XR 输送泵，SIL-40CXR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SPD-M40A 检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1. 岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D.×100mm L, 2.2 μm)

流动相：A相 -4% 冰醋酸溶液；B相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

检测波长：254 nm

进样体积：4 μL

洗脱方式：等度洗脱，A/B = 35/65 (v/v)

■ 样品前处理

供试品溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，取本品细粉适量（约相当于双氯芬酸钠 50 mg），精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使双氯芬酸钠溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，离心，取上清液作为供试品溶液。

对照溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项下，另取邻苯二甲酸二乙酯 5 mg，置 200 mL 量瓶中，精密加供试品溶液 1 mL，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

分离度溶液制备：参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠有关物质项下，取双氯芬酸钠对照品适量，用水制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液，取该溶液暴露于紫外光灯（254 nm）下照射 15 分钟，取 4 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，在与主峰相对保留时间约 0.8 处出现一杂质峰，两者的分离度应大于 6.0。

■ 结果与讨论

3.1 进样模式考察

岛津 Nexera LC-40 系统自动进样器 SIL-40CXR 具备多种预处理程序，可实现在线稀释样品溶液、在线柱前衍生、Co-injection、重叠进样等多项功能。Co-injection 模式相较传统直接进样（标准模式）可以去除溶剂效应，改善峰型，提高定量灵敏度。尤其当样品溶液含高比例有机溶剂时，可以直接进样分析而无需担心溶剂效应。本实验选择以水作为同时注入试剂，Co-injection 模式程序设定如图 2 所示。将 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比，如图 3 所示；对照溶液分别在两种模式下连续进样测定 6 次重复性色谱图如图 4 及图 5 所示，对比结果见表 1。



图 2. 自动进样器 SIL-40CXR 同时注入功能 (Co-injection) 程序设定

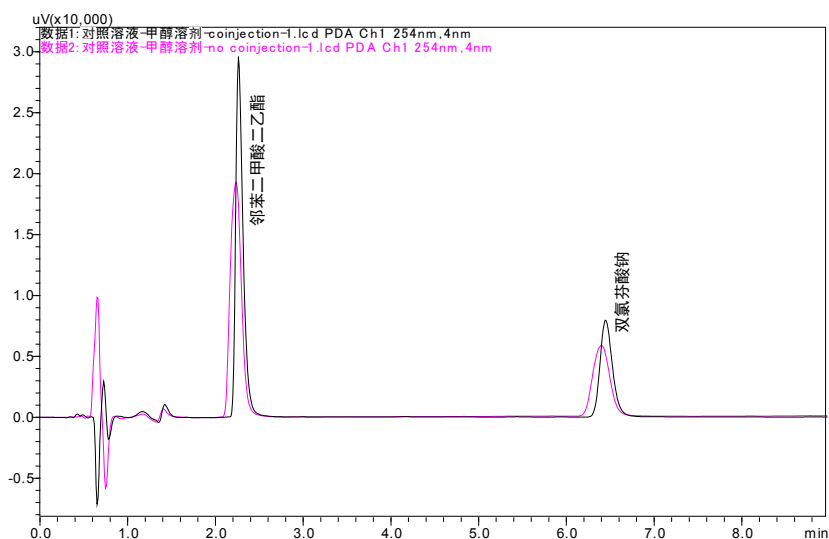


图 3. 对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: Co-injection 模式; 数据 2: 标准模式)

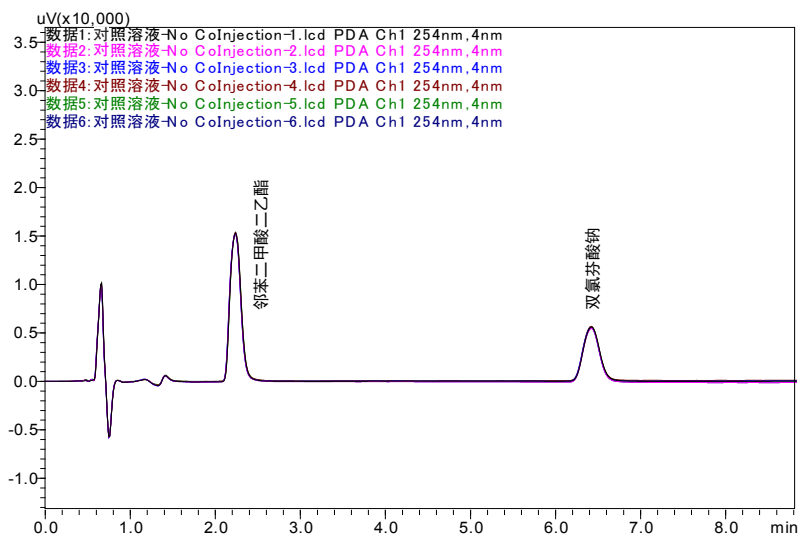


图 4. 对照溶液标准模式下重复性色谱图

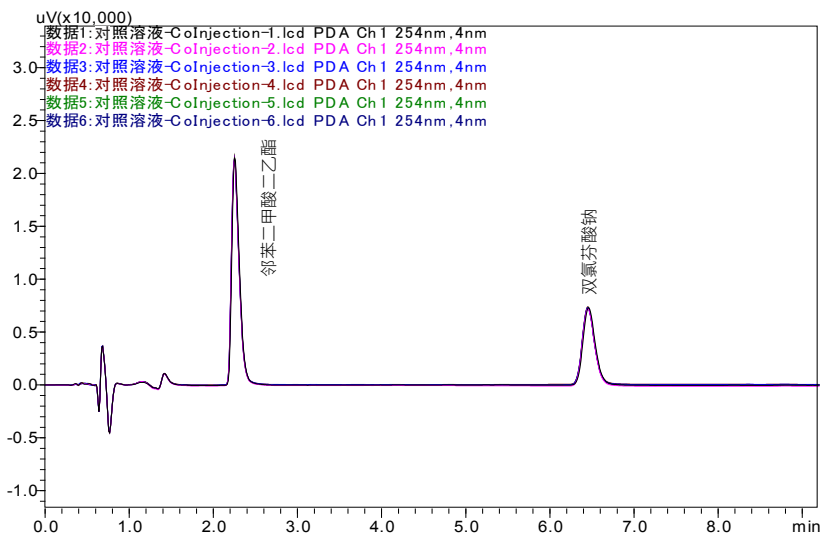


图 5. 对照溶液 Co-injection 模式下重复性色谱图

表 1. 标准模式和 Co-injection 模式下双氯芬酸钠色谱参数对比结果

No.	Co-injection 模式				标准模式			
	保留时间	峰面积	分离度 *	理论塔板数	保留时间	峰面积	分离度 *	理论塔板数
1	6.447	75,543	18.014	8,380	6.422	74,922	14.041	5,164
2	6.452	75,386	17.963	8,368	6.422	74,536	14.023	5,133
3	6.451	75,484	17.932	8,328	6.418	74,320	13.997	5,120
4	6.450	75,251	17.983	8,351	6.419	74,479	14.047	5,171
5	6.452	75,378	18.029	8,396	6.421	74,706	14.045	5,177
6	6.451	75,420	17.947	8,352	6.422	74,737	14.018	5,128
平均值	6.450	75,410	17.978	8,363	6.421	74,617	14.028	5,149
RSD(%)	0.027	0.133	0.212	0.287	0.028	0.287	0.137	0.481

*: 双氯芬酸钠色谱峰与邻苯二甲酸二乙酯色谱峰的分离度

通过上述图表, 可见当样品溶液含高比例有机溶剂时, 采用 Co-injection 模式的色谱峰型明显优于标准模式下的色谱峰型; 对比可知, 仪器精密度考察结果表明峰面积及保留时间 RSD 与标准模式基本一致, 但是由于色谱峰型较标准模式得到改善, 进而提高了分离度及理论塔板数。

为了进一步说明 Co-injection 功能对峰型改善的能力, 将以水和 65% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经标准模式的谱图与以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式的谱图对比, 如图 6 所示。以 100% 甲醇为稀释溶剂的对照溶液经 Co-injection 模式所得色谱图, 其色谱峰型与以水或 65% 甲醇为稀释溶剂时在标准模式下的色谱峰型基本一致。结果表明, 当样品溶液含高比例有机溶剂时, 可以采用 Co-injection 模式分析而无需担心溶剂效应。

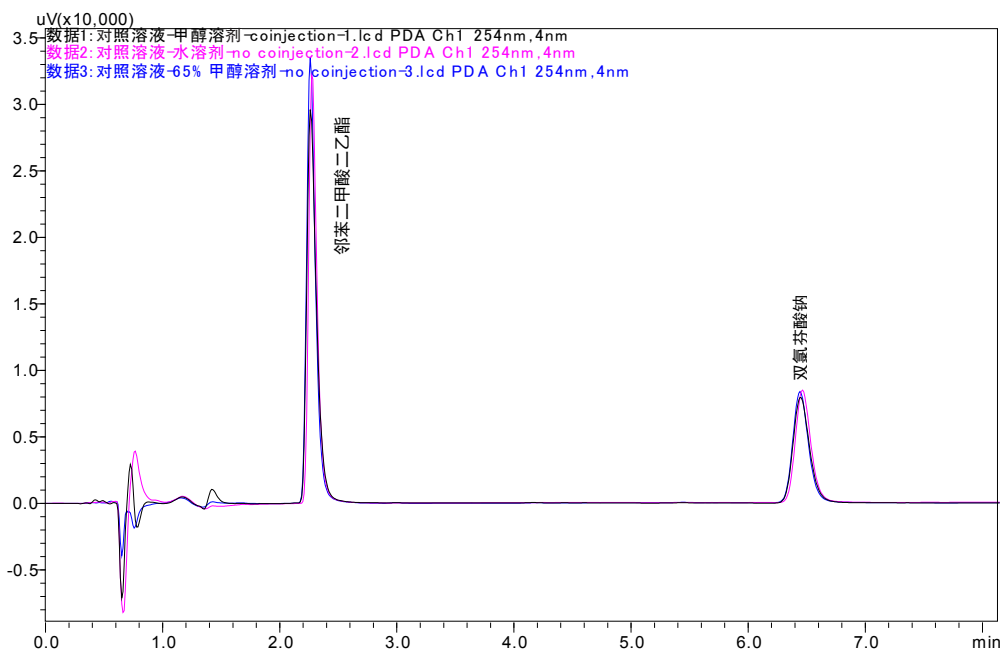


图 6. 不同稀释溶剂的对照溶液经标准模式与 Co-injection 模式的谱图对比 (数据 1: 甲醇, Co-injection 模式; 数据 2: 水, 标准模式; 数据 3: 65% 甲醇, 标准模式)

3.2 系统适用性试验

按照 1.2 中分析条件对空白溶剂、对照溶液、分离度溶液进行测定，色谱图如下所示。结果显示空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰；经光照破坏的分离度溶液中主峰与各杂质峰均能有效分离，分离度均大于 1.5；在与主峰相对保留时间约 0.8 处出现一杂质峰，两者的分离度为 6.45，满足药典要求。

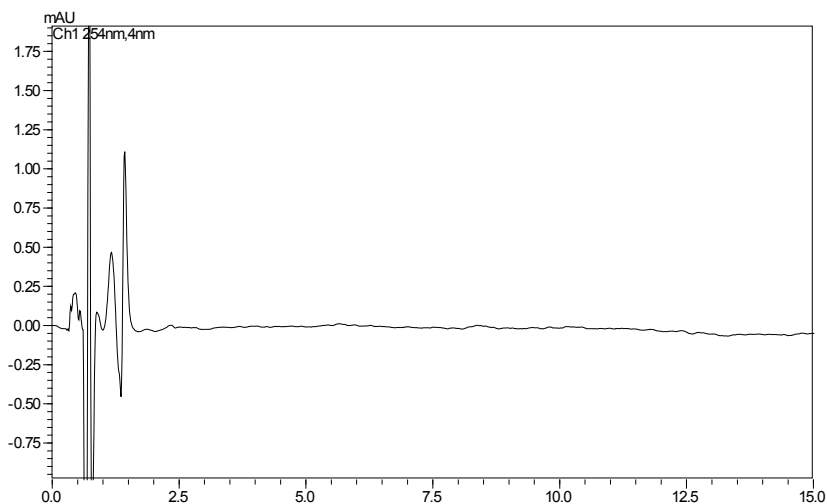


图 7. 空白溶剂（甲醇）色谱图

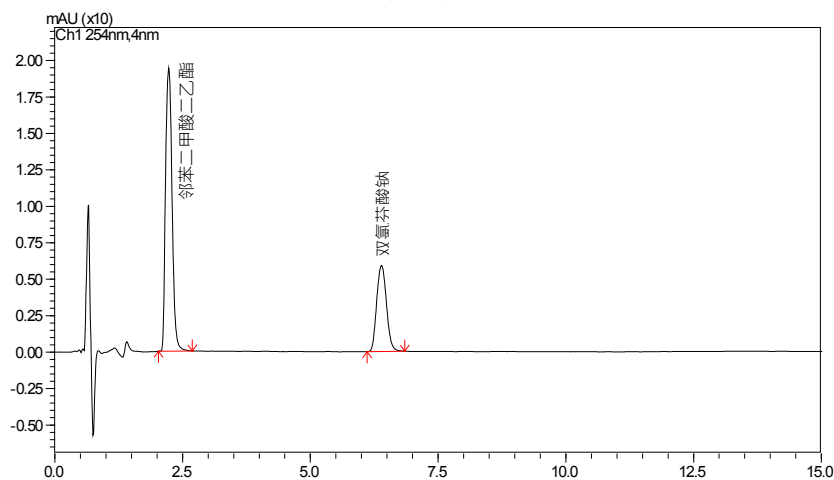


图 8. 对照溶液色谱图

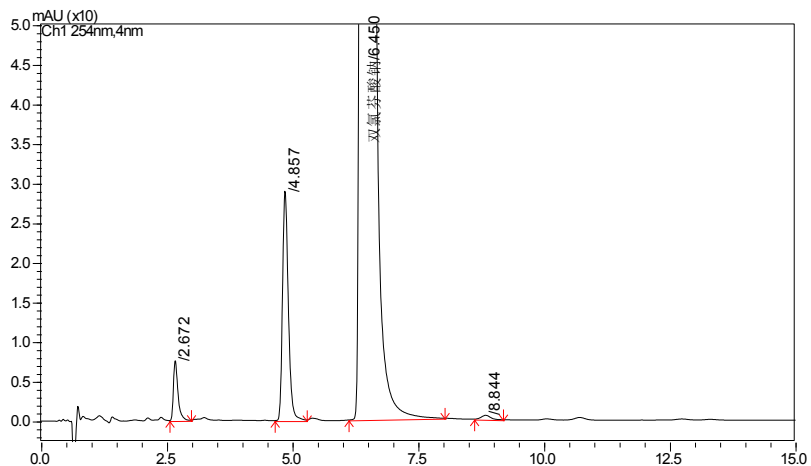


图 9. 分离度溶液色谱图

3.3 标准曲线

对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的线性及范围。按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 3 所示，双氯芬酸钠在 0.1-10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9996，具体结果见表 2。

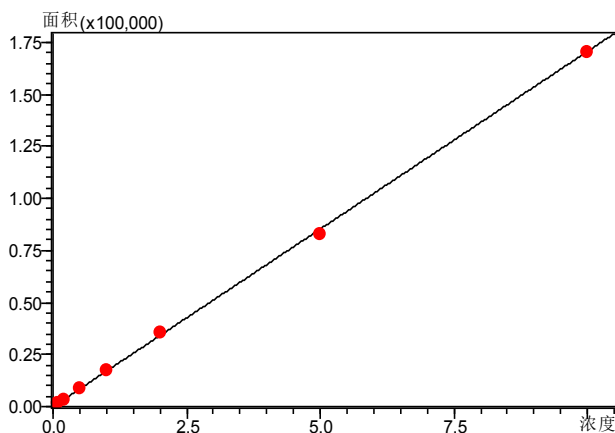


图 10. 双氯芬酸钠标准曲线

表 2. 标准曲线参数

名称	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	线性方程	相关系数 r	准确度 %
双氯芬酸钠	0.1-10.0	$Y = (17064.5)X + (-13.8032)$	0.9996	96.9-103.5

3.4 检测限和定量限

对于未知杂质，用双氯芬酸钠替代考察未知杂质的检测限及定量限。根据 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双氯芬酸钠标准溶液数据，计算检出限 ($S/N=3$, LOD 表示)、定量限 ($S/N=10$, LOQ 表示)，色谱图如图 11 所示，结果如表 3 所示。

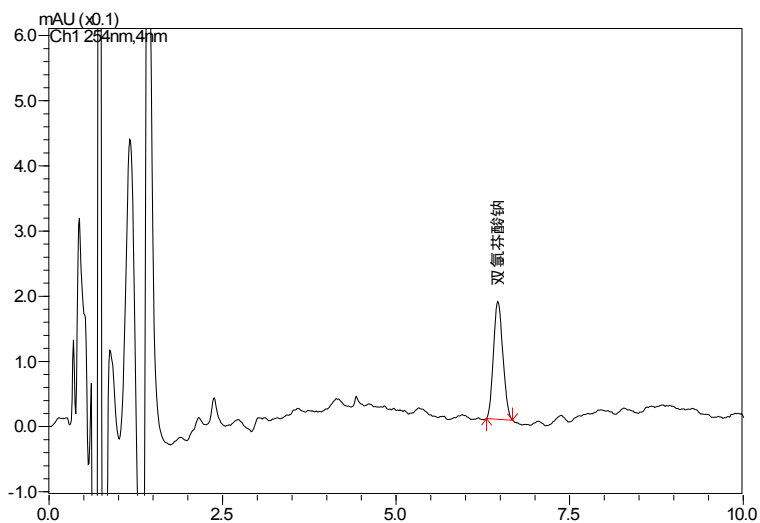


图 11. 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液色谱图

表 3. 检测限和定量限测定结果

化合物	浓度 (µg/mL)	信噪比	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
双氯芬酸钠	0.103	20.16	0.015	0.051

3.5 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定, 选择浓度为 0.1、0.5 和 5.0 µg/mL 的双氯芬酸钠对照品溶液分别连续进样测定 6 次, 结果见表 4。双氯芬酸钠的保留时间 RSD 为 0.040~0.071%; 峰面积 RSD 为 0.191~1.621%。结果表明 Nexera LC-40 液相色谱仪具有良好的稳定性。

表 4. 双氯芬酸钠对照品溶液精密度的结果 (n=6)

No.	0.1 µg/mL		0.5 µg/mL		5.0 µg/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	6.466	1,829	6.476	8,102	6.48	82,799
2	6.465	1,749	6.481	8,110	6.476	82,492
3	6.467	1,759	6.484	8,272	6.473	82,580
4	6.471	1,775	6.482	8,244	6.472	82,435
5	6.475	1,799	6.481	8,115	6.474	82,517
6	6.476	1,772	6.483	8,388	6.474	82,335
平均值	6.47	1,781	6.481	8,205	6.475	82,526
RSD(%)	0.071	1.621	0.040	1.413	0.044	0.191

3.6 样品测定

按照 1.2 分析条件测定, 精密量取供试品溶液与对照溶液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 除邻苯二甲酸二乙酯峰和其之前的色谱峰外, 在相对保留时间 1.2~1.3 处的杂质峰 (杂质 III), 其峰面积乘以 0.5 后不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积 (0.5%), 其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液中双氯芬酸峰面积 (0.5%), 各杂质峰面积的和 (杂质 III 按校正后的峰面积计) 不得大于对照溶液双氯芬酸峰面积的 2 倍 (1.0%)。

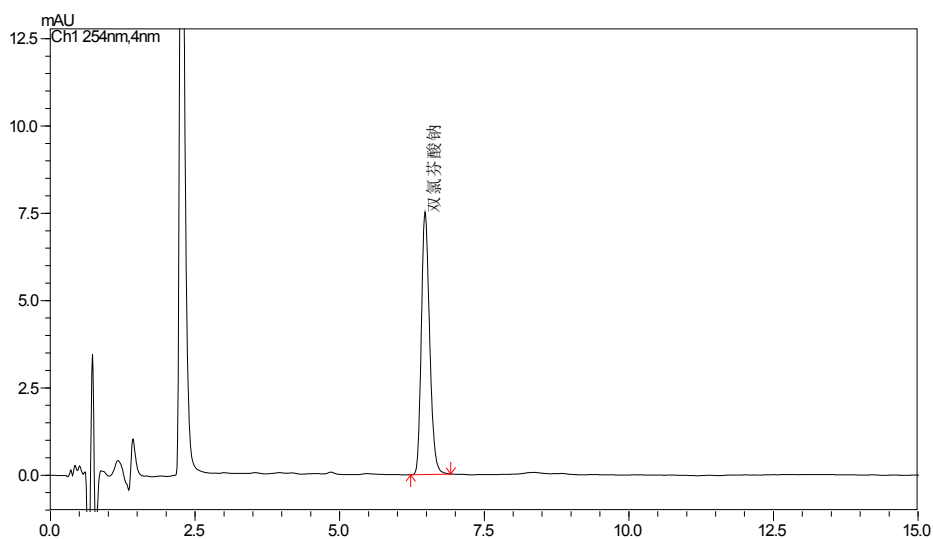


图 12. 对照溶液色谱图

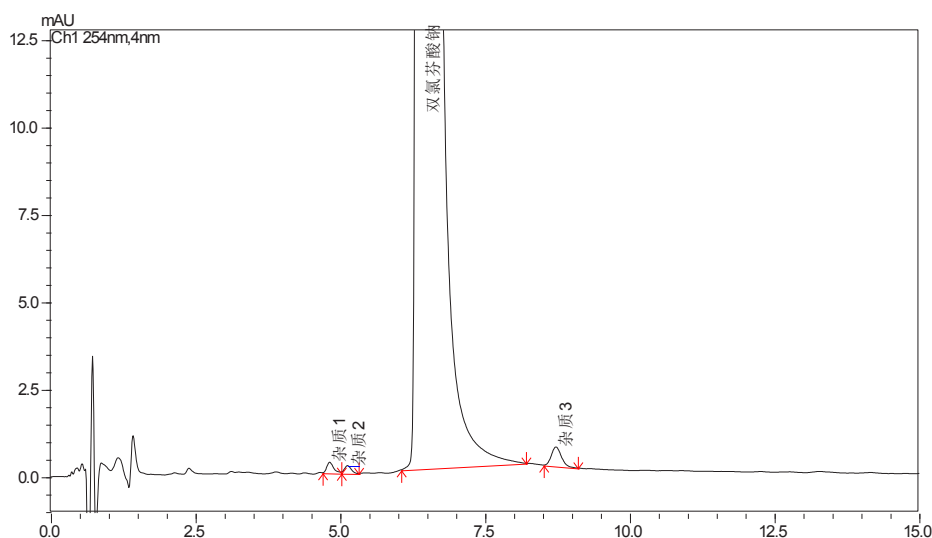


图 13. 供试品溶液色谱图

表 5. 样品杂质测定结果

	保留时间	峰面积	杂质含量 (%)
对照溶液主峰	6.473	75260	-
杂质 1	4.824	2497	0.017
杂质 2	5.131	1694	0.011
杂质 3	8.732	6455	0.021
总杂质	-	-	0.049

结论

本实验使用岛津 Nexera LC-40 高效液相色谱仪, 参照 2015 版《中国药典》双氯芬酸钠肠溶片有关物质项, 建立了双氯芬酸钠肠溶片有关物质的测定方法。对于未知杂质, 用双氯芬酸钠替代考察未知杂质。该方法中, 采用 Co-injection 功能, 相较标准进样模式可以获得更高的柱效及分离度; 系统适用性试验, 空白溶剂对双氯芬酸钠杂质测定无干扰, 分离度溶液测试结果满足药典要求。双氯芬酸钠在 0.10~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好, 相关系数为 0.9996。双氯芬酸钠的检测限及定量限分别为 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.051 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密度实验中, 双氯芬酸钠的保留时间 RSD% 为 0.040~0.071%; 峰面积 RSD% 为 0.191~1.621%, 仪器精密度良好。采用主成分自身对照法对杂质进行定量, 供试品中单个杂质均小于 0.5%, 并且总杂质小于 1.0%, 结果符合药典要求。实验结果表明, 该方法能快速准确地测定双氯芬酸钠肠溶片有关物质。

岛津应用云

