

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.22.013

高效液相色谱法测定原料药中溴芬酸钠及其杂质 A 含量

董莉, 鲁军, 窦佳

(辽宁省大连市药品检验所, 辽宁 大连 116021)

摘要:目的 建立测定原料药中溴芬酸钠及其杂质 A 含量的高效液相色谱法。方法 采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.4% 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 5.0)(55:45)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 266 nm, 柱温为 30 ℃; 外标法测定溴芬酸钠及其杂质 A 的含量。结果 溴芬酸钠及其杂质 A 质量浓度分别在 0.2~0.6 mg/mL 和 0.2~0.6 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 线性回归方程分别为 $Y=4.658 \times 10^5 X - 1.328 \times 10^5$, $r=0.9999$ ($n=7$) 和 $Y=2469 X + 2601$, $r=0.9999$ ($n=5$); 平均回收率分别为 99.99% 和 98.61%, RSD 分别为 0.39% ($n=7$) 和 1.10% ($n=5$)。结论 该方法快速、准确、专属性好, 可用于检测原料药中溴芬酸钠及其杂质 A 的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 溴芬酸钠; 杂质 A; 含量测定

中图分类号: R927.2; R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)22-0043-04

Content Determination of Bromfenac Sodium and Its Impurity A in Crude Drug by HPLC

Dong Li, Lu Jun, Dou Jia

(Dalian Institute for Drug Control, Dalian, Liaoning, China 116021)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the content determination of bromfenac sodium and its impurity A. **Methods** Hypersil BDS C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol - 0.4% triethylenediamine(adjust pH to 5.0 by phosphoric acid) (55:45), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 266 nm, the column temperature was 30 ℃. The bromfenac sodium and its impurity A were determined by external standard method. **Results** The bromfenac sodium and its impurity A were linear in the range of 0.2-0.6 mg/mL and 0.2-0.6 μg/mL, respectively. The linear regression equations were $Y=4.658 \times 10^5 X - 1.328 \times 10^5$, $r=0.9999$ ($n=7$) and $Y=2469 X + 2601$, $r=0.9999$ ($n=5$), respectively. The average recovery rates were 99.99% with RSD of 0.39% ($n=7$) and 98.61% with RSD of 1.10% ($n=5$), respectively. **Conclusion** The method is rapid, accurate and specific, which can be used for the content determination of sodium bromide and its impurity A in crude drug.

Key words: HPLC; bromfenac sodium; impurity A; content determination

溴芬酸钠的化学名称为 2-氨基-3-(4-溴苯甲酰基)苯乙酸钠, 是制备眼部炎症用药的原料。其结构与酮洛芬和双氯芬酸类似, 能抑制环氧合酶介导的前列腺素类炎性介质的合成, 具有强力消炎镇痛作用, 作用强度为其他非甾体抗炎药的 10 倍^[1-5]。其疗效和安全性均较好, 特别对于白内障术后眼部发炎、疼痛及畏光症状效果显著^[6-13]。本研究建立的高效液相色谱(HPLC)法可测定原料药中溴芬酸钠及其杂质 A 的含量, 且简便快速、专属性强、准确可靠, 可有效控制该药品的质量^[14-16]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪, 包括四元泵、自动进样器、柱温箱; Empower 工作站, Waters 2489 型紫外/可见光检测器, 配备 Waters 2998 型二极管阵列检测器(Waters 公司); PP-15E 型酸度计, MSA 225s-100-DA 型分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

溴芬酸钠对照品(批号为 WS/BRN/004-07)与

溴芬酸钠杂质 A 对照品(批号为 WS/BRW/003-07, 纯度为 96.8%), 均由厂方提供; 供试品为进口原料药(Indoco Remedies Ltd, 批号分别为 RK14BRN003, RK14BRN004, RK14BRN001); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

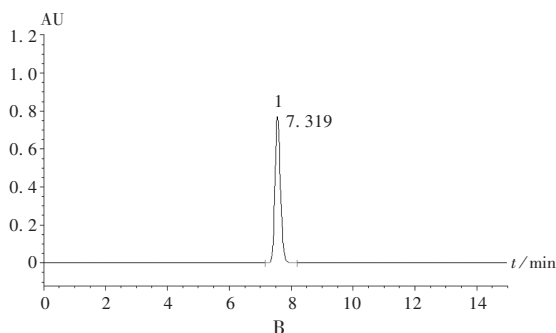
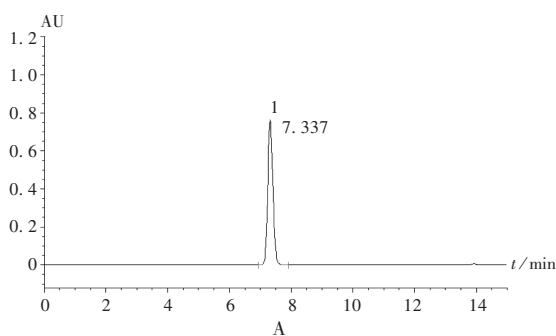
2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.4% 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 5.0)(55:45); 检测波长: 266 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。在此条件下的色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

取本品 20 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加稀释剂适量, 超声处理 5 min, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。另取溴芬酸钠对照品适量, 精密称定, 加稀释剂制成每 1 mL 含 0.4 mg 的溶液, 摇匀, 作为溴芬酸钠对照品溶液。取杂质 A 对照品 10 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加二氯甲烷 1 mL 使溶解, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液; 精密量取对照品贮备液



1. 杂质 A

A. 溴芬酸钠对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1 mL 和供试品溶液 0.5 mL, 置同一 50 mL 容量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为溴芬酸钠杂质 A 对照品溶液。避光操作。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 称取溴芬酸钠对照品 10, 15, 16, 18, 20, 24, 30 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 容量瓶中, 加稀释剂[甲醇-水(50:50)]适量, 超声使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为溴芬酸钠线性试验溶液。取溴芬酸钠杂质 A[7-(4-溴苯甲酰基)-1,3-二氢-2H-咪唑-2-酮]对照品 10 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加二氯甲烷 1 mL 使溶解, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置另一 50 mL 容量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液; 精密量取对照品贮备液 5, 7.5, 10, 15, 20 mL, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 作为溴芬酸钠杂质 A 线性试验溶液。按 2.1 项下色谱条件分别进样 2 次, 记录色谱图, 以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程, 溴芬酸钠为 $Y = 4.658 \times 10^5 X - 1.328 \times 10^5$, $r = 0.9999 (n = 7)$; 溴芬酸钠杂质 A 为 $Y = 2469X + 2601$, $r = 0.9999 (n = 5)$ 。结果表明, 溴芬酸钠及其杂质 A 质量浓度分别在 0.2~0.6 mg/mL 及 0.2~0.6 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验: 取室温避光放置 0, 4, 8, 12, 24 h 的供试品溶液, 分别进样测定。结果峰面积未见明显变化, RSD 为 1.10% ($n = 5$), 表明该溶液避光放置日内稳定

性良好, 能满足测定要求。

精密密度试验: 取批号为 RK14BRN003 的样品, 依法制备供试品溶液, 连续进样 5 次。结果溴芬酸钠的平均含量为 99.99%, RSD 为 0.67% ($n = 5$), 表明仪器精密密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 RK14BRN003)样品 5 份, 依法制备供试品溶液, 进样测定。结果溴芬酸钠平均含量为 99.94%, RSD 为 0.44% ($n = 5$), 表明方法重复性好。

回收率试验: 取线性关系考察项下的对照品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 每份样品各进样 2 次, 测定, 取平均值, 计算回收率。结果见表 1。

表1 回收率试验结果($n = 7$)

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
11.09	11.09	100.00		
15.06	15.09	100.20		
16.14	16.20	100.37		
18.95	18.93	99.89	99.99	0.39
20.88	20.71	99.19		
24.34	24.39	100.21		
30.91	30.94	100.10		

检出限和定量限确定: 按 2.1 项下色谱条件, 取线性关系考察项下溶液, 稀释成质量浓度为 4, 0.4, 0.04, 0.004 μ g/mL 的溶液, 分别取 10 μ L, 按拟订色谱条件进样分析。结果检测限按信噪比(S/N) = 3:1 确定为 1 ng/mL, 定量限按 $S/N = 10:1$ 确定为 4 ng/mL。

2.4 样品含量测定

精密量取供试品溶液和溴芬酸钠对照品溶液各 10 μ L, 按拟订色谱条件操作, 用外标法计算含量。精密量取供试品溶液和溴芬酸钠杂质 A 对照品溶液各 10 μ L, 按拟订色谱条件操作, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍, 供试品溶液的色谱图中, 如有与杂质 A 保留时间一致的峰, 则按外标法以峰面积计算, 不得超过 0.10。详见表 2 及图 2。

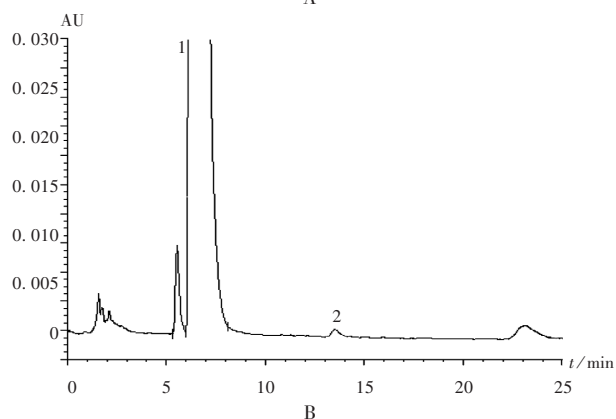
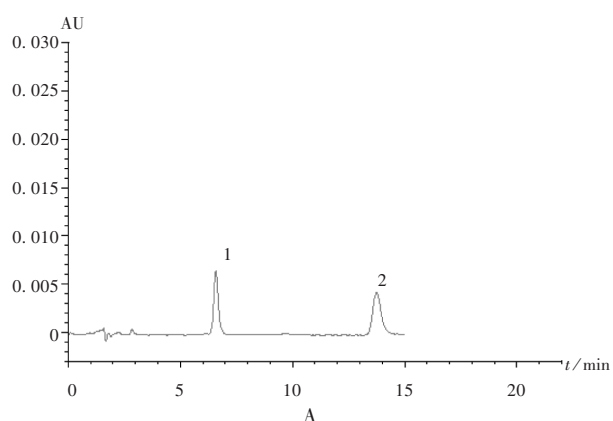
表2 样品含量测定结果(%)

批号	含量/ RSD ($n = 3$)	杂质 A	杂质 1	杂质 2	杂质* 总量
RK14BRN003	99.20/0.20	0.01	0.08	0.07	0.15
RK14BRN004	101.60/0.23	0.01	0.08	0.06	0.14
RK14BRN001	99.60/0.31	0.01	0.08	0.07	0.15

注: *表示除杂质 A 外的其他杂质。

2.5 强制降解试验

精密量取供试品溶液 10 mL, 分别精密加入 30% 过氧化氢溶液、稀盐酸、氢氧化钠溶液各 1 mL, 供试品溶液于 60 $^{\circ}$ C 加热 1 h 后、相对湿度 80% 放置 2 h, 供试



1. 溴芬酸钠 2. 杂质 A

A. 溴芬酸钠杂质 A 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 2 含量测定高效液相色谱图

品溶液于日光照射 2 h 后,依法制备,即得破坏性试验 a, b, c, d, e, f 溶液,分别按拟订色谱条件测定。结果表明,该色谱条件可以将溴芬酸钠与各种条件下降解的有关物质分离。除 80% 相对湿度破坏影响不大外,其他温度、光照有些影响(降解产物质量约增加 0.1%),氧化破坏和碱破坏影响较大,而酸破坏时溴芬酸钠几乎全部

被破坏。详见图 3。

3 讨论

3.1 色谱柱耐受性考察

分别使用 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Unitary C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)以及 Kromasil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)等色谱柱分析供试品溶液溴芬酸钠的杂质 A 与含量,其峰形及分离度均满意,故认为本方法对色谱柱的耐受性良好。

3.2 稳定性考察

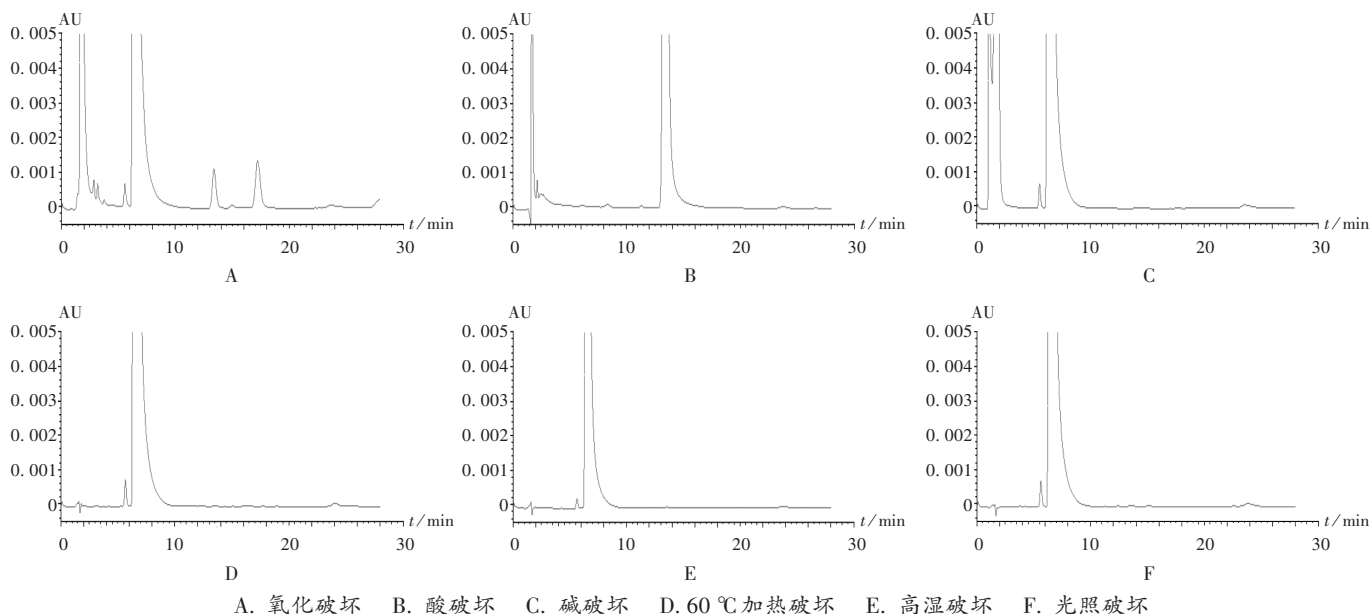
经试验,该原料药不稳定,避光放置 3 ~ 30 d,含量平均下降 1% ~ 2%;对光比较敏感,光照 3 ~ 30 d,有关物质总含量由 0.2% 增加到 3.5% ~ 5.0%。供试品溶液颜色由黄色变为橘黄色。这其中溴芬酸钠杂质 A 的变化不大,而在相对保留时间 0.9 处及 3.5 处增加很多,故对其有关物质进行质量控制非常必要。

3.3 检测波长选择

以甲醇为溶剂,分别取溴芬酸钠对照品、溴芬酸钠杂质 A 对照品制成每 1 mL 含溴芬酸钠及溴芬酸钠杂质 A 10 μg 的溶液,在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描,结果溴芬酸钠及溴芬酸钠杂质 A 分别在 266 nm 及 270 nm 波长处有最大吸收峰。本研究中选择在 266 nm 波长处测定溴芬酸钠及杂质 A 的含量,效果满意。

3.4 杂质 A 考察

用本方法所测得的溴芬酸钠及溴芬酸钠杂质 A 的含量与梯度试验方法^[3]比较,其结果完全一致。且有关物质多检出 1 个杂质,消除了梯度带来的基线波动造成的干扰,由样品测定和回收率测定结果可知,该方法准确性好,精密度高,重复性好,适用于测定溴芬酸钠原料



A. 氧化破坏 B. 酸破坏 C. 碱破坏 D. 60 °C 加热破坏 E. 高温破坏 F. 光照破坏

图 3 强制降解试验高效液相色谱图