

HPLC 法测定塞来昔布胶囊中有关物质

高洁¹, 曹光², 张晓东², 任晓文^{2*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要:目的 建立一种有效测定塞来昔布胶囊中有关物质的高效液相色谱法, 并进行质量方法学研究。方法 采用 Phenyl-2 Hypersil 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0) (45:55); 柱温为 40 ℃; 检测波长为 215 nm; 体积流量为 1.3 mL/min; 进样量为 80 μL。结果 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺的质量浓度在 1.0~3.0 μg/mL 具有良好的线性关系 ($r=0.9996$); 检测限 (S/N=3) 为 0.4 ng。结论 本方法简便准确、重现性好, 精密度高, 可有效地检测塞来昔布胶囊中有关物质, 并为塞来昔布的检查和方法学研究提供了依据。

关键词: 塞来昔布胶囊; 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)02-0182-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.019

Determination of related substances in Celecoxib Capsule by HPLC

GAO Jie¹, CAO Guang², ZHANG Xiao-dong², REN Xiao-wen²

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of related substances in Celecoxib Capsule and to study on quality by methodology. **Methods** The separation was performed on a Phenyl-2 Hypersil column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was methanol-0.02 mol/L monobasic potassium phosphate buffer (45:55, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) at a flow rate of 1.3 mL/min; The detection wavelength was 215 nm. The column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 80 μL. **Results** The linear range of 4-[5-(2-methyl phenyl)-3-(trifluorine methyl)-1H-pyrazole-1-based] benzene sulfonamide was 1.0—3.0 μg/mL ($r = 0.9996$). The detection limit (S/N = 3) was 0.4 ng. **Conclusion** This method is simple, accurate, reproducible, and suitable for the determination of related substances in Celecoxib Capsule, which provides a reliable method for the sample examination and methodological study on celecoxib.

Key words: Celecoxib Capsule; 4-[5-(2-methyl phenyl)-3-(trifluorine methyl)-1H-pyrazole-1-based] benzene sulfonamide; related substances; HPLC

塞来昔布化学名为 4-[5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺, 由法玛西亚公司和辉瑞制药有限公司共同研发, 1999 年获得美国 FDA 批准上市, 2001 年在中国上市。塞来昔布是环氧酶-2 (COX-2) 高选择性抑制剂, 是第一个新一代 COX-2 抑制剂, 能阻止炎症前列腺素类物质的产生, 达到抗炎镇痛及退热作用^[1]; 能有效治疗类风湿性关节炎和骨关节炎, 强效缓解关节炎的疼痛和炎症^[2]; 还可以预防多种恶性肿瘤, 如前列腺癌、肠道癌及

口腔恶性肿瘤等的发生^[3-5]。有研究表明与传统非甾体抗炎药相比, 治疗量的塞来昔布对 COX-1 几乎不抑制, 使由于抑制 COX 而引起的胃肠道不良反应的发生率显著下降^[6-8]。制剂中有关物质检查是控制成品质量的重要指标, 然而关于塞来昔布的报道多见于临床研究。本研究采用 HPLC 法测定塞来昔布胶囊中有关物质, 考察了可能存在的中间体杂质与主药的分离, 并建立了专属性强, 准确、可靠的有关物质检查方法, 可有效控制塞来昔布胶囊质量。

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09-401-009, 2011ZX09201-101-19, 2012ZX09105102); 天津市科技支撑项目 (09ZCKFSH01200)

作者简介: 高洁 (1986—), 女, 山东泰安人, 在读硕士研究生, 研究方向为药物新剂型及药物分析。Tel: 13682068331 E-mail: gjdeyouxiang@126.com

*通信作者 任晓文 (1966—), 女, 研究员, 主要从事药物新剂型及药物分析研究。Tel: (022)23006953 E-mail: renxw@tjpr.com

1 仪器与材料

LabAlliance 高效液相色谱仪系统, 包括 Series 1500 泵、Spectra 100 紫外检测器、分析之星色谱工作站; KQ—2200 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器厂); BP211D 电子天平 (德国赛多利斯公司); AB204—E 电子天平 (梅特勒-托利多公司); Elix 10 纯水系统 (美国 Millipore 公司); GM—0.33 隔膜真空泵 (天津市津腾实验设备有限公司)。

塞来昔布胶囊 (天津药物研究院提供, 规格 0.2 g/粒, 批号 20110801、20110802、20110803); 塞来昔布胶囊 (辉瑞制药有限公司进口分包装, 商品名西乐葆, 规格 0.2 g/粒, 批号 BK1100EE171、BK10CCEE256); 塞来昔布对照品 (天津药物研究院提供, 质量分数 99.6%, 批号 DZ-002); 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺对照品 (天津药物研究院提供, 质量分数 99.5%, 批号 LW-001); 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 超纯水 (实验室自制); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱为 Phenyl-2 Hypersil 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0) (45:55); 柱温为 40 °C; 检测波长为 215 nm; 体积流量为 1.3 mL/min; 进样量为 80 μL。在此条件下塞来昔布峰与相邻杂质峰达到基线分离, 理论塔板数以塞来昔布峰计应不低于 3 000。

2.2 杂质对照品溶液的制备

取杂质 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺对照品约 100 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇充分溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得杂质对照品储备液。精密移取杂质对照品储备液 0.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取塞来昔布胶囊 20 粒, 倾出内容物, 研细, 精密称取适量 (约相当于塞来昔布 100 mg), 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇充分溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按处方制备不含塞来昔布的空白辅料样品, 按“2.3”项下方法操作, 即得。

2.5 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液, 按上述方法进行试验, 记录色谱图, 见图 1, 可以看出空白辅料对试验结果无影响。

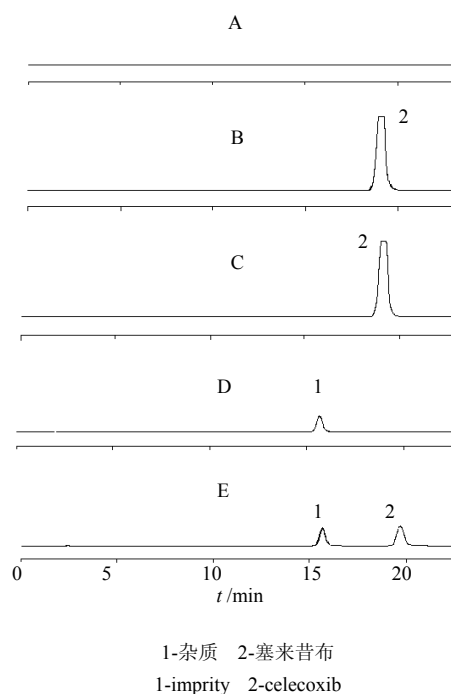


图1 空白辅料 (A)、对照品 (B)、样品 (C) 和杂质 (D) 以及杂质与塞来昔布混合样品 (E) 的 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC chromatograms of blank adjuvant (A), reference substance (B), sample (C), impurity (D) and mixed sample of impurity and celecoxib (E)

2.6 检测限的测定

取塞来昔布对照品溶液和杂质对照品溶液, 稀释若干倍, 分别进样 80 μL, 记录主峰峰高约为基线噪音 3 倍时的色谱图, 计算得塞来昔布的最低检测限为 400 ng, 杂质的检测限为 0.8 ng。

2.7 线性关系考察

精密吸取杂质对照品储备液适量, 加流动相稀释制成 1.0、1.6、2.0、2.4、3.0 μg/mL, 分别吸取 80 μL 进样, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为 $Y=8\ 380+2.34\times 10^5 X$, $r=0.999\ 6$ 。结果表明在 1.0~3.0 μg/mL 时, 杂质的质量浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.8 精密度试验

取 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺对照品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.24%。

2.9 稳定性试验

取塞来昔布供试品溶液适量, 于室温放置, 分别于 0、1、4、8、12、24 h 进样测定, 记录色谱图, 计算得杂质 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺峰面积的 RSD 值为 0.23%, 结果表明杂质溶液在室温 24 h 内稳定性良好。

2.10 回收率试验

按处方量取空白全辅料约 80 mg、塞来昔布样品 200 mg, 共 9 份, 分别置 100 mL 量瓶中, 取 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺对照品 160、200、240 mg, 精密称定, 各 3 份, 分别置上述各量瓶中, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下, 分别进样测定, 记录色谱图, 计算得平均回收率为 99.74%, RSD 值为 0.91%。

2.11 样品测定

取各批次塞来昔布胶囊样品, 制备供试品溶液, 精密量取 1 mL 供试品溶液, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。另按“2.2”项下方法制备杂质对照品溶液。照以上色谱条件, 精密量取供试品溶液和杂质对照品溶液各 80 μ L, 分别进样, 记录色谱图至主成分保留时间的 3 倍, 供试品溶液中如有与杂质对照品溶液色谱图中相对应的峰, 按外标法以峰面积计算杂质的质量分数。另精密量取塞来昔布对照品溶液 80 μ L, 同法测定。结果见表 1。

表 1 塞来昔布胶囊有关物质测定结果

Table 1 Determination of related substances in Celecoxib Capsule

批 号	杂 质/%
110901	0.043
110902	0.048
110903	0.046
BK1100EE171	0.035
BK10CCEE256	0.032

3 讨论

3.1 色谱柱与流动相的选择

先试用 C_{18} 色谱柱, 甲醇-1%三乙胺磷酸盐缓冲液 (用磷酸或氢氧化钠试液调节 pH 3.0 ± 0.1) (62:38) 作为流动相, 主峰前的杂质峰与主成分峰重合, 不能达到有效分离; 采用 Phenyl-2 Hypersil

柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 3.0) (45:55) 为流动相, 杂质峰与主成分峰达到有效分离。

3.2 样品溶液滤过方式考察

考察了 0.45 μ m 滤膜对取塞来昔布胶囊供试品溶液滤过时吸附的情况, 配制同一瓶样品溶液, 分别考察未滤过、滤过后, 样品峰面积的变化, 结果 0.45 μ m 滤膜滤过样品与未滤过样品峰面积基本相当。

3.3 已知杂质相对于塞来昔布的校正因子考察

进行了已知杂质 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺相对于塞来昔布的校正因子试验, 结果 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺相对于塞来昔布的校正因子为 0.97。故样品中已知杂质 4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1*H*-吡唑-1-基]苯磺酰胺计算, 亦可采用 1% 自身对照方法进行计算。

参考文献

- [1] Derry S, Moore R A. Single dose oral celecoxib for acute postoperative pain in adults [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 3: CD004233.
- [2] 谭利民. 塞来昔布治疗类风湿性关节炎疗效观察 [J]. *中国医学创新*, 2012, 9(1): 37-38.
- [3] Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, *et al.* MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(8): 1439-1447.
- [4] Vivaldi A, Ciampi R, Tacito A, *et al.* Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, potentiates the chemotherapeutic effect of vinorelbine in the medullary thyroid cancer TT cell line [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 355(1): 41-48.
- [5] Murphy K T, Lynch G S. Editorial update on emerging drugs for cancer cachexia [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2012, 17(1): 5-9.
- [6] Simon L S, Weaver A L, Graham D Y, *et al.* Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 1999, 282(20): 1921-1928.
- [7] Okie S. Missing data on Celebrex. Full study altered picture of drug [N]. *Washington Post*, 2001-08-05(A11).
- [8] Wright J M, Perry T L, Bassett K L, *et al.* Reporting of 6-month vs 12-month data in a clinical trial of celecoxib [J]. *JAMA*, 2001, 286(19): 2398-2400.