

## HPLC 法测定塞来昔布原料药中有关物质

余 娜<sup>1</sup>, 靳朝东<sup>2\*</sup>, 赵丽娜<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 天津药物研究院, 天津 300193

**摘要:** **目的** 建立测定塞来昔布原料药中有关物质的高效液相色谱 (HPLC) 法。**方法** 建立 HPLC 法, 采用 Century SIL C30 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B) - 甲醇 (C), 梯度洗脱; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 215 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。**结果** 塞来昔布与各杂质的分离度良好, 且在一定浓度范围内线性关系良好。塞来昔布和杂质 A、B、C、D、F 的定量限分别为 198.0、161.2、240.0、239.4、203.5、156.8 ng/mL, 检测限分别为 40.3、50.0、39.9、61.0、39.2、24.8 ng/mL。**结论** 本法操作简单, 准确度、灵敏度高, 可用于塞来昔布原料药中有关物质的分离检测。

**关键词:** 塞来昔布; 有关物质; 同分异构体; 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(2019)03-0596-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.03.004

## Determination of related substances in celecoxib active pharmaceutical ingredients by HPLC

YU Na<sup>1</sup>, JIN Chao-dong<sup>2</sup>, ZHAO Li-na<sup>2</sup>

1. 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 determination of the related substances in celecoxib active pharmaceutical ingredients. **Methods** HPLC method was established. The determination was carried out on Century SIL C30 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water - acetonitrile - methanol with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The detective wavelength was set at 215 nm, column temperature was 25 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** Celecoxib and its related impurities had good separation, and there were good linear relationship within a certain concentration ranges. The quantitative limits of cecoxib and impurity A, B, C, D, and F were 198.0, 161.2, 240.0, 239.4, 203.5, and 156.8 ng/mL, respectively. The detection limits were 40.3, 50.0, 39.9, 61.0, 39.2, and 24.8 ng/mL. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and suitable for the determination of related substances in celecoxib active pharmaceutical ingredients.

**Key words:** celecoxib; related substances; isomeride; HPLC

塞来昔布是 1,5-二芳基取代吡唑类化合物, 化学名为 4-[5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1 氢-1-吡唑-1-基]苯磺酰胺。塞来昔布是一种非甾体抗炎药, 能特异性抑制环氧化酶-2 (COX-2) 的产生, 被称为超级阿司匹林<sup>[1-2]</sup>。塞来昔布具有解热、镇痛、抗炎等作用<sup>[3]</sup>, 临床上多用于骨关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和肿瘤的治疗<sup>[4-6]</sup>。塞来昔布的合成路线有多种<sup>[7-8]</sup>, 通过对其 1 个合成工艺进行分析

发现, 在合成的最终产物中除可能含有起始原料和中间体 4,4,4-三氟-1-(4-甲基苯基)丁烷-1,3-二酮外, 还可能引入工艺杂质 4-[5-(3-甲基苯基)-3-(三氟甲基)吡唑-1-基]苯磺酰胺、4-[3-(4-甲基苯基)-5-(三氟甲基)吡唑-1-基]苯磺酰胺、4-[5-(2-甲基苯基)-3-(三氟甲基)吡唑-1-基]苯磺酰胺、4-[2-(1-对甲苯基亚乙基)胍基]苯磺酰胺、4-[2-(1-间甲苯基亚乙基)胍基]苯磺酰胺, 依次自行命名为杂质 A、B、C、D、F,

收稿日期: 2018-08-20

作者简介: 余 娜 (1992—), 女, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。E-mail: 1378104623@qq.com

\*通信作者 靳朝东, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (022)23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

赵丽娜, 女, 助理研究员, 研究方向为药物分析。E-mail: 13821855931@163.com

见图 1。其中杂质 A、B、C 为塞来昔布的同分异构体，杂质 D 与 F 互为同分异构体，在分离检测上具有一定难度。目前国内关于塞来昔布中有关物质检

出的方法较少或检出杂质不全<sup>[9]</sup>。因此，本研究建立 HPLC 法将塞来昔布与其同分异构体分离检测，以达到药品安全、有效、质量可控。

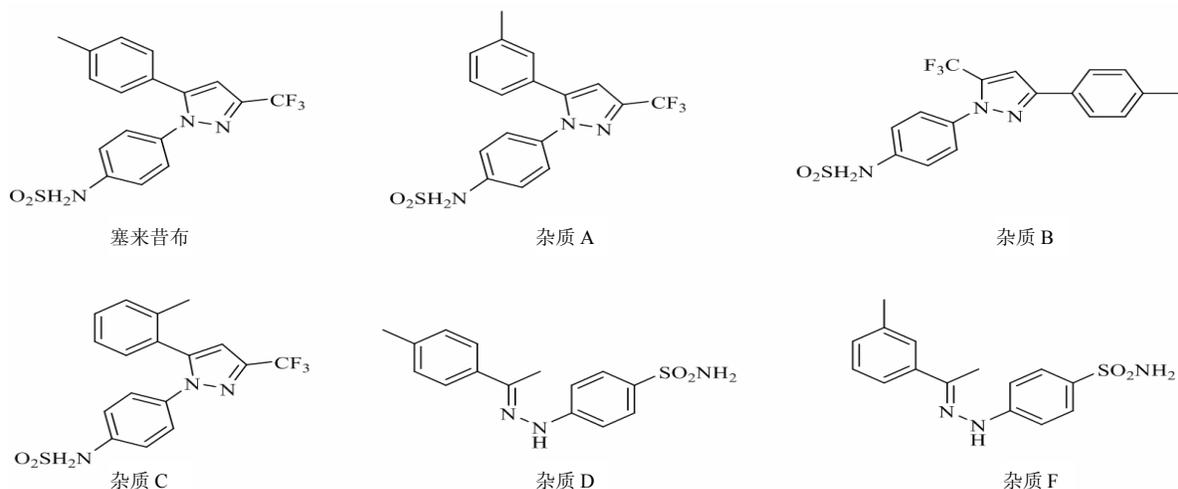


图 1 塞来昔布及其有关物质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of celecoxib and its related substances

## 1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪; Waters 2489 UV/VIS 检测器; Agilent 1260 高效液相色谱仪; DAD 检测器; Sartorius BP211D 型电子天平。

塞来昔布对照品 (自制, 批号 20110905-2); 塞来昔布原料药 (自制, 批号 130701、130702、130703); 杂质 A、B、C、D、F 均为自制, 批号分别为 ZA-170801、ZB-170801、ZC-170801、ZD-170802、ZF-170802; 甲醇、乙腈 (色谱级, 天津市康科德科技有限公司), 水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Century SIL C30 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B) - 甲醇 (C), 梯度洗脱, 见表 1; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 215 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 杂质储备液的制备** 分别精密称取杂质 A、B、C、D、F 约 4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取塞来昔布原料药样品 4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 精密称取塞来昔布对照

品 4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

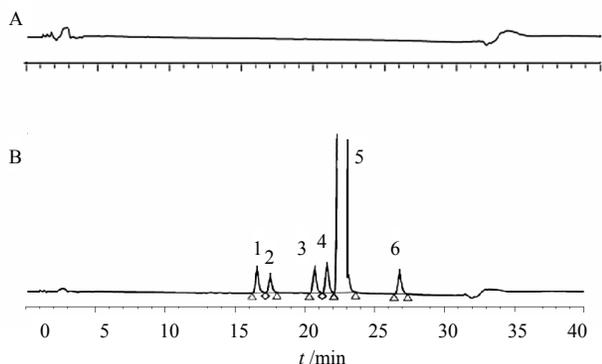
t/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	60	38	2
25	40	58	2
30	30	70	0
31	60	38	2
40	60	38	2

### 2.3 系统适用性试验

取塞来昔布对照品 4 mg 置 10 mL 量瓶中, 加各杂质储备液 0.1 mL, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得系统适用性溶液。重复进样 6 次。结果各组分的分离度均大于 1.5, 主成分和各杂质峰面积的 RSD 值均小于 2%, 理论塔板数均大于 25 000, 符合规定。见图 2。

### 2.4 专属性试验

**2.4.1 杂质定位试验** 精密称取塞来昔布原料药样品 4 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加杂质储备液各 0.1 mL, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得 1% 杂质混合溶液, 进样测定。主成分的拖尾因子和理论塔板数分别为 1.28、38 079, 各杂质之间的最小分离



1-杂质F 2-杂质D 3-杂质C 4-杂质A 5-塞来昔布 6-杂质B  
 1-impurity F 2-impurity D 3-impurity C 4-impurity A 5-celecoxib  
 6-impurity B

图 2 空白 (A) 和塞来昔布对照品 (B) 的 HPLC 图谱  
 Fig. 2 HPLC chromatograms of blank solution (A) and celecoxib reference substances (B)

度为 1.95 (与系统适用性结果一致)。取各杂质储备液 1 mL 分别置于不同的 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质定位溶液。

原料药供试品溶液的 HPLC 色谱图中塞来昔布与其杂质的色谱峰均分离良好, 且与对照品保留时间一致 (杂质 A、B、C、D、F 对照品的保留时间分别为 21.603、26.803、20.712、17.530、16.587 min, 塞来昔布的保留时间为 22.542 min 且峰纯度良好)。

**2.4.2 强制降解试验** 将塞来昔布原料药供试品溶液在加热、酸、碱、氧化和光照条件下进行破坏, 破坏后的样品溶液分别进样 20 μL, 记录色谱图。结果降解产物与塞来昔布主峰和各杂质分离良好。

**2.5 线性关系考察**

分别精密量取塞来昔布对照品储备液和各杂质储备液 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 即得 2% 线性储备液; 将 2% 线性储备液分别取 0.25、0.40、0.50、0.75、1.00、1.25 mL 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 分别得到 0.05%、0.08%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25% 的线性溶液, 进样测定, 见表 2。结果表明, 各杂质在一定浓度范围内线性关系良好。

表 2 线性关系结果

Table 2 Results of linear relationship investigation

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
杂质 A	Y=73 918 X-207.54	0.999 3	0.161 2~1.007 5
杂质 B	Y=63 200 X-1 799.90	0.999 9	0.240 0~1.000 0
杂质 C	Y=63 283 X+1 158.20	0.999 9	0.239 4~0.997 5
杂质 D	Y=45 028 X-694.83	0.999 2	0.203 5~1.017 5
杂质 F	Y=64 630 X+78.24	0.999 3	0.156 8~0.980 0
塞来昔布	Y=65 225 X+4 750.00	0.999 4	0.099 0~0.990 0

**2.6 定量限试验**

**2.6.1 定量限溶液的配制** 分别取各杂质储备液 0.1 mL 置不同的 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 即得 1% 塞来昔布对照品和各杂质储备液; 取 0.25 mL 1% 塞来昔布储备液、0.4 mL 1% 杂质 A、F 储备液、0.5 mL 1% 杂质 D 储备液和 0.6 mL 1% 杂质 B、C 储备液置同一 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 即得定量限溶液。

**2.6.2 定量限的确定** 分别取各杂质储备液适量, 加 80% 甲醇稀释至信噪比 ≥ 10 : 1, 计算各杂质的定量限。结果塞来昔布和杂质 A、B、C、D、F 的定量限分别为 198.0、161.2、240.0、239.4、203.5、156.8 ng/mL。

**2.6.3 定量限精密度的** 平行配制 6 份定量限溶液, 进样测定, 计算各成分峰面积的 RSD 值, 结果均小

于 5%。

**2.6.4 定量限回收率** 分别配制 80%、100%、120% 的定量限浓度溶液各 3 份, 共 9 份, 进样测定, 结果表明各杂质定量限的回收率在 93%~105%, RSD 值均小于 5%。

**2.7 检测限试验**

分别取各杂质储备液适量, 加溶剂逐步稀释至信噪比为 3 : 1, 计算各杂质的检测限, 结果表明杂质 A、B、C、D、F 和塞来昔布的检测限分别为 40.3、50.0、39.9、61.0、39.2、24.8 ng/mL。

**2.8 准确度试验**

分别精密量取各杂质储备液 0.1 mL 置同一个 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀即得 1% 对照品溶液; 再取 1% 杂质对照品溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀即得 0.1%

杂质对照品溶液。精密称取塞来昔布原料药样品约 4 mg, 置 10 mL 量瓶, 分别加入 1% 杂质对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 各平行 3 份, 即得 80%、100%、120% 的加样回收率溶液共 9 份。进样测定, 计算, 结果表明各杂质回收率在 90%~108%, RSD 值均小于 5%。

### 2.9 精密度试验

**2.9.1 重复性试验** 精密称取塞来昔布原料药样品约 4 mg, 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即得, 平行配制 6 份, 作为溶液 A; 取 0.1 mL 溶液 A 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为溶液 B。进样测定。结果表明, 塞来昔布原料药样品中只检测出杂质 A、B, RSD 值分别为 3.14%、2.47%。

**2.9.2 中间精密度试验** 精密称取塞来昔布原料药样品约 4 mg, 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 由另一人员在另外一台仪器上完成测定, 结果两台仪器的 RSD 值分别为 4.55%、6.31%。

### 2.10 耐用性试验

试验表明, 温度、检测波长、体积流量发生微

小变化时, 对样品测定无明显影响, 主峰与杂质之间均能达到基线分离, 各条件下的质量分数的 RSD 值均小于 3.0%。

### 2.11 稳定性试验

精密称取塞来昔布原料药样品 4 mg, 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇溶解, 稀释至刻度, 分别考察 0、40、80 min 以及 2、4、8、12、24 h 塞来昔布原料药样品溶液的稳定性, 结果塞来昔布质量分数的 RSD 值为 0.004%, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.12 有关物质的测定

分别精密称取各批塞来昔布原料药样品 4 mg, 置 10 mL 量瓶, 加 80% 甲醇溶解, 稀释至刻度, 得 0.40 mg/mL 的供试品溶液; 精密量取供试品溶液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。照上述色谱条件进样测定。以 1% 主成分自身对照法计算杂质的质量分数, 结果 3 批样品中已知杂质 (杂质 A) 质量分数和最大单一杂质均小于 0.1% (其他杂质均未检出), 总杂质质量小于 0.2%, 符合要求, 结果见表 3。

表 3 塞来昔布原料药中有关物质测定结果

Table 3 Determination of related substances in celecoxib active pharmaceutical ingredient

批号	质量分数/%		
	杂质 A	最大单一杂质	总杂质
130701	0.03	0.03	0.09
130702	—	0.03	0.05
130703	0.03	0.03	0.06

## 3 讨论

实验考察了 Sepax GP-phenyl 柱、Welch Xtimate C<sub>18</sub> 柱、Welch Ultimate PFP 柱、XBridge shield RP18 柱、Kromasil NH<sub>2</sub> 柱以及 Century SIL C30 柱 6 种不同填料色谱柱, Century SIL C30 色谱柱能将各杂质和主峰分离, 且分离度均大于 1.5, 其余色谱柱的分离效果均较差。随后又考察了 3 个不同厂家的 C30 色谱柱, 分别为 GL Sciences Inertsil C30 柱、Welch Ultimate XB-C30 柱和 Thermo Acclaim C30 柱, 通过调节流动相比比例均能将杂质与塞来昔布分离, 但分离效果要差于 Century SIL C30 色谱柱, 故将色谱柱定为 Century SIL C30 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。

水相考察了钾盐、铵盐以及各种环糊精, 发现

纯水与盐的分离效果并无明显差别。有机相考察了甲醇、乙腈, 使用甲醇时杂质与主峰之间的分离效果较好, 杂质之间的分离效果较差, 且基线上漂; 使用乙腈时杂质与主峰之间的分离效果较甲醇差, 杂质之间的分离效果较好, 且基线较平, 峰形较好。故综合考虑, 水相为纯水, 有机相以乙腈为主, 再稍加一些甲醇以提高杂质与主峰之间的分离度。

实验过程中发现杂质 D、F 不稳定, 易降解, 故杂质 D、F 需现配现用。

本实验建立了高效液相色谱-紫外检测法分离检测塞来昔布原料药与其同分异构体杂质, 并对其进行了方法学验证, 结果表明, 该方法操作简便, 灵敏度高, 准确度、精密度和重复性好, 适合于塞来昔布与其同分异构体及其他杂质的分离检测。

## 参考文献

- [1] 姚世宁, 徐 畅, 张青青, 等. 塞来昔布的合成、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(28): 51-55.
- [2] 梅之南, 施 震, 汪细和, 等. COX-2 抑制剂 Celecoxib 的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(10): 433-434.
- [3] 董亚琳, 罗秦英, 姚鸿萍, 等. 塞来昔布的药理作用、药代动力学及临床评价 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2002, 2(5): 274-276.
- [4] 吕双丛, 曹瑞丽. 塞来昔布治疗风湿性关节炎和骨关节炎的疗效观察 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2015, 15(10): 1296-1299.
- [5] Lu Y, Liu X F, Liu T R, *et al.* Celecoxib exerts antitumor effects in HL-60 acute leukemia cells and inhibits autophagy by affecting lysosome function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016(84): 1551-1557.
- [6] 杨 佳, 岳金波, 孙菊杰, 等. 塞来昔布对 FaDu 人咽喉癌裸鼠移植瘤放疗过程中肿瘤再增殖抑制效应 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(19): 1349-1356.
- [7] 崔志艳. 塞来昔布合成方法与杂质研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2013.
- [8] 吕苗苗, 陈华宝, 李海泉等. 塞来昔布的合成 [J]. 北京化工大学学报, 2005, 32(6): 97-98.
- [9] 蒋振东, 杨 琳, 卢 巍. 塞来昔布有关物质的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(9): 1295-1299.