

高效液相色谱法测定双醋瑞因含量与有关物质

黄巧巧, 陈雪帆, 李会林

(浙江省药品检验所, 杭州 310004)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定双醋瑞因有关物质和含量。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-水(47:53,用醋酸调节pH值至2.7)为流动相,检测波长为254 nm。结果 双醋瑞因与有关物质分离良好,线性范围为12~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=1.0000$, $n=7$),最低检出量为0.5 ng。结论 该法简单快速,专属性强,结果准确,可用作双醋瑞因含量测定和有关物质检查的方法。

[关键词] 双醋瑞因;含量测定;有关物质;色谱法;高压液相

[中图分类号] R982 R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)09-1077-02

Determination on Content and Related Substances of Diacerein with HPLC

HUANG Qiao-qiao, CHEN Xue-fan, LI Hu+lin (Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT Objective To establish HPLC method for the determination on the content of diacerein and its related substances. **Methods** A C_{18} column was used, the mobile phase of acetonitrile-water (adjust pH to 2.7 with acetic acid) (47:53) and the detection wavelength was 254 nm. **Results** Diacerein and related substances could be well isolated. The calibration curves was linear in the range of 12~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with $r=1.0000$ ($n=7$). The detection limit was 0.5 ng. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination on the content of diacerein and its related substances.

KEY WORDS Diacerein; Content determination; Related substances; HPLC

双醋瑞因(4,5-二乙酰-9,10-二氧-2-萘羧酸, diacerein)为白细胞介素(L)-1的首要抑制剂,国内外研究显示,本品可显著改善骨关节炎及相关疾病引起的疼痛和关节功能障碍等症状。双醋瑞因从芦荟中提取,经多步反应合成,其中间体有芦荟素(中间体I),芦荟大黄素(中间体II),大黄酸(中间体III)等。双醋瑞因的相关报道较少^[1-3],笔者建立了测定双醋瑞因含量和有关物质的HPLC法,方法简单、准确可靠。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Waters 2695泵系统, Waters 2996二极管阵列检测器, Waters 色谱工作站。双醋瑞因自制对照品(含量99.4%,液相色谱面积归一化法)、双醋瑞因原料药(批号: 200510001, 200510002, 200510003)及其中间体I、II、III均由台州海辰医药化工有限公司提供。乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,二甲基乙酰胺、冰醋酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Ultimate XB-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(47:53,用醋酸调节pH值至2.7), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长

254 nm, 进样量 20 μL 。

2.2 双醋瑞因与中间体的分离度 根据生产工艺,在双醋瑞因合成过程中可能引入的杂质主要有中间体I、II和III。在上述实验条件下,取双醋瑞因粗品和中间体I、II、III各约12.5 mg分别置50 mL容量瓶中,加二甲基乙酰胺5 mL使溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,取上述溶液各20 μL 分别注入液相色谱仪。双醋瑞因保留时间为7.4 min,中间体I、II、III保留时间分别为3.2, 9.8, 11.0 min,粗品中各杂质及中间体均能与主成分完全分离。理论塔板数以双醋瑞因峰计算 > 5000。

2.3 专属性实验 取本品各约12.5 mg置50 mL容量瓶中,加二甲基乙酰胺5 mL溶解,分别经以下条件处理: ①在光照4500 LX条件下放置8 h; ②水浴加热3 h; ③加30%过氧化氢溶液2 mL,放置4 h; ④加3 mol · L⁻¹盐酸溶液3 mL,放置8 h用碱中和; ⑤加3 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液5 mL,放置8 h用酸中和。取上述溶液分别用流动相稀释至刻度,摇匀,进样。各降解条件下降解产生的杂质在选定的色谱条件下均可与主峰达到良好分离。空白溶剂在3.4 min前有出峰,对测定无干扰。

2.4 线性关系 取双醋瑞因对照品约12.5 mg置入50 mL容量瓶中,加二甲基乙酰胺5 mL使溶解,加流动相稀释至刻度,精密量取适量分别加流动相制

[收稿日期] 2006-11-01

[作者简介] 黄巧巧(1980-),女,浙江杭州人,药师,硕士,从事药品检验工作。电话: 0571-86459422, E-mail: hqiaoqiao1980@sina.com

成 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 100.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别精密量取上述溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以进样浓度 (C) 为横坐标, 双醋瑞因的峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 回归方程为: $A = 123.4966C - 6.19912$, $r = 1.0000$ ($n = 7$), 结果显示双醋瑞因的线性范围为 12~100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 最低检出限 取线性范围测定项下的对照品溶液, 稀释至峰高约为基线噪音的 3 倍, 得双醋瑞因检测限为 0.5 ng。

2.6 精密度和重复性实验 取同一批样品 (批号 200510001), 于同一天内和不同天内分别各测定 6 份含量, 考察日内和日间精密度的。结果日内精密度 RSD 为 0.41%, 日间精密度 RSD 为 0.53%, 表明本法精密度良好。

2.7 溶液的稳定性 取双醋瑞因约 12.5 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 加二甲基乙酰胺 5 mL 使溶解, 加流动相稀释至刻度, 分别在 20 $^{\circ}\text{C}$ 室温放置 0, 1, 2, 4, 8, 12 和 24 h 后进样 20 μL , 结果表明双醋瑞因的峰面积和有关物质总峰面积百分数在 24 h 内稳定, RSD 分别为 0.02% 和 3.24% ($n = 7$), 表明样品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

2.8 有关物质检查 取本品约 12.5 mg 置 50 mL 容量瓶中, 加二甲基乙酰胺 5 mL 使溶解, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 精密量取 1 mL, 加流动相稀释至 100 mL, 作为对照溶液。分别量取供试品溶液和对照溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图至双醋瑞因主成分峰保留时间的 3 倍。扣除溶剂峰, 按主成分自身对照法计算有关物质。结果见表 1。

2.9 样品含量的测定 取本品约 12.5 mg 置 50 mL 容量瓶中, 加二甲基乙酰胺 5 mL 使溶解, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL 置 25 mL 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取双醋瑞因对照品, 同法测定, 按外标法以峰面积计算含量。结果见表 1。

表 1 双醋瑞因有关物质和含量测定结果 %

批号	含量	有关物质	最大单个杂质
200510001	99.7	0.64	0.21
200510002	99.6	0.51	0.19
200510003	99.3	0.60	0.26

3 讨论

双醋瑞因在乙腈和水中溶解较差, 但溶解于二甲基乙酰胺, 故在样品溶液制备时, 先加二甲基乙酰胺适量使溶解, 再加流动相稀释至所需浓度。经验证方法可行, 溶剂对有关物质检查和含量测定无干扰, 样品在酸性流动相中稳定。

双醋瑞因的结构中存在羧基团, 显弱酸性, pH 值的改变影响其电离情况, pH 值越大, 电离越大, 保留时间越小。在 pH 为 2.7 时双醋瑞因的保留较强, 经选择流动相比例, 乙腈-水 (47:53 用醋酸调节 pH 值至 2.7) 时, 双醋瑞因保留时间合适, 峰形对称, 中间体与双醋瑞因分离良好。

双醋瑞因结构中含有苯环, 具有共轭体系, 在 254 nm 有最大吸收峰。综合分析 DAD 等高图、三维谱图和平面光谱图, 发现双醋瑞因粗品中各杂质和中间体均在 254 nm 附近有最大吸收, 氧化破坏、热破坏和光破坏产生的主要降解杂质在 254 nm 附近有最大吸收, 而酸碱破坏产生的杂质在 254 nm 附近吸收较小, 考虑到原料药主要控制中间体杂质, 且粗品和氧化、热、光破坏产生的主要降解产物也在 254 nm 附近有最大吸收, 故选择 254 nm 波长为有关物质检查和含量测定的波长。

[参考文献]

[1] 董顺玲, 张丽容. RP-HPLC 法测定双醋瑞因胶囊的含量和有关物质 [J]. 中医研究, 2006, 19(3): 30-32

[2] 马宁, 罗艳, 黄海萍, 等. 牛黄解毒片中 5 种成分的 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(4): 230-231.

[3] 庚梅, 杜海燕, 孙家跃, 等. 四工作曲线法同时测定芦荟苷和芦荟大黄素 [J]. 分析试验室, 2005, 24(1): 66-69.

欢迎订阅 2006 年《医药导报》精装合订本

2006 年《医药导报》合订本烫金封面精装, 美观, 实用, 便于收藏。每本定价 98.00 元, 数量有限, 本部将依汇款先后顺序寄刊, 售完为止。凡购买者请直接汇款到本刊编辑部, 并在汇款单上注明“购 2006 年合订本”字样。联系电话: 027-83643083, 83666619。