

用加校正因子的主成分自身对照法测定 苯扎贝特中杂质氯苯酪胺的含量

魏嘉陵¹, 林畅伟²

(1. 广东省药品检验所, 广州 510180; 2. 广东省揭阳市药品检验所, 揭阳 522000)

摘要 目的: 建立加校正因子的主成分自身对照法测定苯扎贝特中杂质氯苯酪胺的含量。方法: 通过方法学验证试验, 证明所采用的高效液相色谱法外标法测定苯扎贝特中杂质氯苯酪胺的含量方法可行; 再利用外标法, 分别测定主成分苯扎贝特和杂质氯苯酪胺的保留时间, 计算氯苯酪胺相对于苯扎贝特的相对保留时间, 分别测定主成分苯扎贝特和杂质氯苯酪胺的线性方程, 以斜率计算杂质氯苯酪胺相对于主成分苯扎贝特的校正因子; 最终利用相对保留时间确定杂质氯苯酪胺的位置, 用校正因子测定杂质氯苯酪胺的含量。结果: 测得杂质氯苯酪胺相对于主成分苯扎贝特的相对保留时间为 0.90, 校正因子为 1.2494。结论: 用加校正因子的主成分自身对照法测定苯扎贝特中杂质氯苯酪胺的含量, 方法可行。

关键词: 苯扎贝特; 氯苯酪胺; 校正因子

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2006)12-1848-03

Determine the content of impurity chlorobenzoyltyramine in bezafibrate with the correction factor for the substance and impurity being examined

WEI Jia - ling¹, LIN Chang - wei²

(1. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China; 2. Guangdong Jieyang Institute for Drug Control, Jieyang 522000, China)

Abstract Objective: To establish a method using the correction factor to determine the content of impurity chlorobenzoyltyramine in bezafibrate. **Method:** By validate the analytical method to ensure that the external standard method of HPLC method to determine the content of impurity chlorobenzoyltyramine in bezafibrate meets the requirements for the intended analytical applications. Then, use the external standard method of HPLC method to determine the relative retention time between chlorobenzoyltyramine and bezafibrate; use the slope of linear equation to determine the Correction factor between chlorobenzoyltyramine and bezafibrate. At last, use the relative retention time to sure the position of chlorobenzoyltyramine; use the the correction factor to determine the content of impurity chlorobenzoyltyramine in bezafibrate. **Results:** The relative retention time between chlorobenzoyltyramine and bezafibrate is 0.90; the correction factor between chlorobenzoyltyramine and bezafibrate is 1.2494. **Conclusion:** The method using the correction factor between substance being examined and impurity to determine the content of impurity chlorobenzoyltyramine in bezafibrate is available.

Key words: chlorobenzoyltyramine; bezafibrate; the correction factor

苯扎贝特是降血脂类药, 主要用于高血脂症的治疗。英国药典 2004 年版^[1]、我国《进口药品复核标准汇编 1999 年(上)》^[2]均予收载, 美国药典 27 版和日本药局方 14 版则均未见收载。英国药典 2004 年版、我国《进口药品复核标准汇编 1999 年(上)》均采用高效液相色谱法测定其杂质氯苯酪胺的含量。英国药典 2004 年版用色谱峰的保留时间

确定杂质氯苯酪胺峰位置, 采用不加校正因子的自身对照法测定其含量; 我国《进口药品复核标准汇编 1999 年(上)》用外标法, 采用氯苯酪胺杂质对照品测定氯苯酪胺含量。本文通过方法学验证试验验证本研究使用的高效液相色谱外标法测定氯苯酪胺杂质的准确性、可行性, 再利用外标法, 分别使用不同的仪器系统测定氯苯酪胺相对于苯扎贝特的相对

保留时间,分别利用主成分苯扎贝特和杂质氯苯酪胺的线性方程斜率测定杂质氯苯酪胺相对于主成分苯扎贝特的校正因子,最后用相对保留时间确定杂质氯苯酪胺的位置,用校正因子测定杂质氯苯酪胺的含量。研究证明加校正因子的主成分自身对照法测定苯扎贝特中杂质氯苯酪胺的含量,方法可行,日后的检验不使用对照品亦可测定氯苯酪胺杂质的含量。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:Shimadzu Class-VP 12SP1、Waters 2996;均使用二极管阵列检测器。色谱柱:NUCLEODUR C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)。

本研究由 Shimadzu Class-VP 12SP1 高效液相色谱仪与 NUCLEODUR C₁₈ 色谱柱组成仪器系统 1;由 Waters 2996 高效液相色谱仪与 Kromasil C₁₈ 色谱柱组成仪器系统 2。

苯扎贝特为德国 Heumann Pharma GmbH 产品(批号为 98-03428,98-04254,98-04255);氯苯酪胺为德国 Heumann Pharma GmbH 产品;乙腈为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水,电阻 > 18.2 MΩ。

2 色谱条件与系统适应性试验

流动相 A:1% 磷酸溶液;流动相 B:乙腈-1% 磷酸溶液(90:10);梯度洗脱,流动相 A:B 0 min 时为 89:11,以线性梯度,至 35 min 时为 0:100,至 37 min 恢复为 89:11,并保持此比例至 45 min;柱温:25℃;检测波长:230 nm,进样量:20 μL。

分别取氯苯酪胺、苯扎贝特对照品各约 10 mg,加乙腈定容至 50 mL,量取 5 mL,加乙腈至 50 mL,再量取 1 mL,加乙腈至 20 mL,作为分离度试验用溶液,分别注入仪器系统 1、系统 2,结果见图 1。

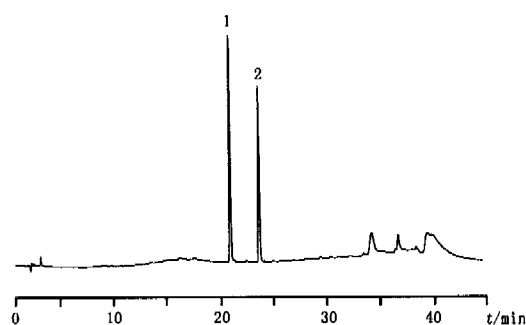


图 1 仪器系统 1 分离度试验色谱图

Fig1 The chromatogram of resolution test obtained from system 1

1. 氯苯酪胺(chlorobenzoyltyramine) 2. 苯扎贝特(bezafibrate)

测得氯苯酪胺峰与苯扎贝特峰的分度度,仪器

系统 1 为 12.3、仪器系统 2 为 12.5。理论塔板数氯苯酪胺峰仪器系统 1 为 776063、仪器系统 2 为 143378;苯扎贝特峰仪器系统 1 为 624250,仪器系统 2 为 165548。

3 专属性试验

取氯苯酪胺,加乙腈制成约 1 μg·mL⁻¹ 的溶液,分别注入仪器系统 1、系统 2,采用二极管阵列检测器测定,结果峰纯度均为 100%。

4 线性关系、相对保留时间、校正因子试验

分别精密称取氯苯酪胺、苯扎贝特对照品各约 10 mg,加乙腈至 50 mL,精密量取该溶液 5 mL,加乙腈至 50 mL,作为线性原液(20 μg·mL⁻¹),精密量取线性原液,加乙腈,制成浓度分别为 0.00,0.20,0.50,0.70,1.00,2.00,3.00,4.00 μg·mL⁻¹ 的溶液。精密量取上述溶液注入液相色谱仪,测定保留时间和峰面积。以各浓度点色谱峰的平均保留时间(t_R)计算氯苯酪胺相对于苯扎贝特的相对保留时间 t , $t = t_{R\text{氯苯酪胺}}/t_{R\text{苯扎贝特}}$;以溶液浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,分别测定氯苯酪胺、苯扎贝特的线性方程及回归系数 R^2 ,以氯苯酪胺、苯扎贝特线性方程的斜率计算氯苯酪胺相对于苯扎贝特的校正因子 f , $f = (A_{\text{氯苯酪胺}}/C_{\text{氯苯酪胺}})/(A_{\text{苯扎贝特}}/C_{\text{苯扎贝特}})$ 。结果见表 1、表 2。

表 1 相对保留时间测定结果

Tab 1 Determination results of the relative retention time

仪器系统 (system)	氯苯酪胺 (chlorobenzoyltyramine)	苯扎贝特 (bezafibrate)	T	T 平均值 (average)
1	21.10	23.43	0.90	0.90
2	16.87	19.02	0.89	

表 2 校正因子测定结果

Tab 2 Determination results of the correction factor

仪器系统 (system)	氯苯酪胺 (chlorobenzoyltyramine)		苯扎贝特 (bezafibrate)		f	f 平均值 (average)
	线性方程	R ²	线性方程	R ²		
1	A = 76137C + 1628	0.9999	A = 60725C - 8290	0.9995	1.2537	1.2494
2	A = 79322C - 71	0.9999	A = 63710C + 2879	0.9995	1.2450	

5 精密度试验

精密量取线性关系试验项下浓度为 1.0 μg·mL⁻¹ 的溶液,注入仪器系统 1,重复进样 6 次,测定氯苯酪胺峰面积,结果 RSD% = 0.5% (n = 6)。

6 回收率试验

取含量测定项下的供试品溶液,加入线性关系试验项下浓度为 1.0 μg·mL⁻¹ 的溶液,制成含氯苯酪胺约为 1.0 μg·mL⁻¹ 的溶液,作为供试品溶液;

取线性关系试验项下浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液, 注入仪器系统 1, 测得氯苯酰胺平均回收率为 101.5% ($n=3$)。

7 耐用性试验

取含量测定项下的供试品溶液, 在 0, 1, 10, 20 h 注入仪器系统 1 测定氯苯酰胺、苯扎贝特的峰面积, 氯苯酰胺峰面积的 RSD 为 1.4% ($n=4$), 苯扎贝特峰面积的 RSD 为 0.6% ($n=4$)。

8 检测限试验

取线性原液 ($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加乙腈, 制成不同浓度的溶液, 注入仪器系统 1, 氯苯酰胺溶液浓度为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $S/N \approx 3$, 检测限为 0.4 ng。

9 样品测定

取本品, 加乙腈, 制成含苯扎贝特 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为供试品溶液; 取线性关系试验项下浓度为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液, 注入仪器系统 1, 测定峰面积, 分别以外标法、加校正因子 ($f=1.2494$) 的主成分自身对照法计算氯苯酰胺含量, 结果见表 3。

表 3 样品测定结果 (%)
Tab 3 Results of sample analysis

批号 (Lot No.)	外标法 (the external standard method)	加校正因子主成分自身对照法 (the method using correction factor)
98-03428	0.0620	0.0672
98-04254	0.0131	0.0140
98-04255	0.0386	0.0408

10 讨论

10.1 以上研究结果显示, 本高效液相色谱法适用于氯苯酰胺杂质的测定。在本色谱条件下, 不同的仪器系统, 氯苯酰胺与苯扎贝特均能有效分离, 氯苯酰胺峰峰纯度均为 100%, 均不受其他成分色谱峰干扰, 显示本色谱系统有较好的适用性。

10.2 相对保留时间、校正因子试验结果显示: 测得

的相对保留时间 $t_{\text{氯苯酰胺/苯扎贝特}}$ 、校正因子 $f_{\text{氯苯酰胺/苯扎贝特}}$ 在不同的仪器系统 (仪器系统 1 与仪器系统 2) 有较好的重现性, 因此可作为测定氯苯酰胺的常数。

10.3 目前我国药品质量标准检查有关物质最常用的是 2005 年版^[3] 中国药典附录 VD 第 (4) 法, 即不加校正因子的主成分自身对照法, 该法用主成分作对照, 杂质峰面积不经校正, 由于不同物质检测的响应值不一样, 杂质峰面积不经校正则难以定量测定, 因此只能对杂质作限度检查。另一种较为常见的方法是 2005 年版中国药典附录 VD 第 (2) 法, 即外标法, 外标法使用杂质对照品能准确测定杂质含量, 通常该法在建立质量标准时可以专门制备杂质对照品, 但一旦方法确定并上升为国家标准以后, 在日后的检测中却很难从国家法定机构获取, 使执行质量标准时陷入无法获取杂质对照品的窘境。本研究参考 2005 年版中国药典附录 VD 第 (3) 法, 即加校正因子的主成分自身对照法, 探讨在建立方法时测定被测杂质氯苯酰胺相对于主成分苯扎贝特的相对保留时间以确定氯苯酰胺在色谱图中的位置, 测定被测杂质氯苯酰胺相对于主成分苯扎贝特的校正因子以计算杂质氯苯酰胺的含量, 从而在日后实际应用中, 比较准确地测定被测杂质氯苯酰胺的含量, 同时又避免了使用杂质对照品。从本研究的样品测定结果看, 加校正因子的主成分自身对照法测定结果与外标法基本相同。

参考文献

- 1 BP (英国药典). 2004. Vol I
- 2 A Collection of Specifications for Import Drug (进口药品复核标准汇编). 1999. Vol I (上)
- 3 ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部): Appendix (附录) VD
(本文于 2006 年 2 月 10 日收到)