



## 高效液相色谱法测定注射用盐酸甲氯芬酯有关物质及质量评价研究<sup>\*</sup>

王琳, 吴兆伟, 王铁松, 赵巍, 吴斌, 安京烨, 郑洁, 张喆, 胡琴<sup>\*\*</sup>, 吴科春<sup>\*\*</sup>

(北京市药品检验所, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

**摘要** 目的: 建立注射用盐酸甲氯芬酯有关物质测定的高效液相色谱分析方法, 并对药品质量进行评价。方法: 采用资生堂 MGII C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠溶液 (磷酸调节 pH 至 2.5) - 乙腈 (65 : 35), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 25 °C, 检测波长为 225 nm, 进样量 10 μL, 分析时间为主成分峰保留时间的 4 倍。结果: 考察了有机相比和缓冲液 pH 对系统分离情况的影响, 根据破坏试验结果, 并兼顾分离度要求, 确定了有关物质色谱条件并进行方法学验证。盐酸甲氯芬酯检测下限为 1 ng, 水解杂质 (杂质 A)、醇解杂质 B 和 C 的检测下限分别为 0.2、0.7 和 1.4 ng, 新建方法在 14 批样品中检出现行标准中未能检出的醇解杂质 C。结论: 方法灵敏度高, 专属性强, 操作简便, 解决了现行标准中盐酸甲氯芬酯有关物质检查法色谱条件不完善等问题, 为该系列质量标准的修订提供数据参考, 并为药品的科学监管和注射剂的仿制药质量一致性评价提供有力的技术支持。

**关键词:** 高效液相色谱; 注射用盐酸甲氯芬酯; 有关物质; 醇解杂质; 质量控制; 仿制药一致性评价

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 11-2076-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.22

## Determination of related substances of meclofenoxate hydrochloride for injection by high performance liquid chromatography and study of quality evaluation<sup>\*</sup>

WANG Lin, WU Zhao-wei, WANG Tie-song, ZHAO Wei, WU Bin, AN Jing-ye, ZHENG Jie, ZHANG Zhe, HU Qin<sup>\*\*</sup>, WU Ke-chun<sup>\*\*</sup>

(Beijing Institute for Drug Control, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China)

**Abstract Objective:** To establish an high performance liquid chromatography method for the determination of related substances of meclofenoxate for injection and evaluate its quality. **Methods:** The separation was performed on SHISEIDO MGII C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with 0.05 mol · L<sup>-1</sup> sodium octane sulfonate solution (phosphoric acid adjusted to pH 2.5) - acetonitrile (65 : 35) as the mobile phase at flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The column temperature was 25 °C, the detection wavelength was 225 nm, the injection volume was 10 μL, and

<sup>\*</sup> “重大新药创制”国家科技重大专项资助项目 (2017ZX09101001)

<sup>\*\*</sup> 通信作者 胡 琴 Tel: (010) 52779623; E-mail: huqin@bdc.org.cn

吴科春 Tel: (010) 52779622; E-mail: wukechun@bdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 52779622; E-mail: lindawang2225@163.com



the analysis time was 4 times of the peak retention time of the main component. **Results:** The effects of organic phase and buffer pH on the separation of the system were investigated. According to the results of the failure tests and the resolution requirements, the chromatographic conditions of the substances were determined and the method validation was carried out. The detection limit of metoclopramide hydrochloride was 1 ng. The detection limits of the impurity A, impurity B and the impurity C were 0.2 ng, 0.7 ng and 1.4 ng, respectively. The new method can effectively detect alcohol-dissolved impurity C which could not be detected in the current standard in 14 batches of samples. **Conclusion:** The method has high sensitivity, specificity, and simple operation which solves the problems of imperfect chromatographic conditions of the relevant substances in the current standard, and provides data reference for the revision of the series of quality standards. It also provides strong technical support for the scientific supervision of drugs and the consistent evaluation of the quality of generic injections.

**Keywords:** high performance liquid chromatography; metoclopramide hydrochloride for injection; related substances; alcoholic impurity; quality control; evaluation of generic drug conformance

注射用盐酸甲氯芬酯为苯氧乙酸酯类中枢兴奋药,用于治疗外伤性昏迷、酒精中毒、儿童遗尿症等<sup>[1-4]</sup>。工业化生产盐酸甲氯芬酯主要以对氯苯氧乙酸为起始原料,与 *N,N*-二甲氨基乙醇反应生成甲氯芬酯,然后成盐、结晶制得<sup>[5-6]</sup>。盐酸甲氯芬酯在水和醇溶液中极易降解,产生大量杂质<sup>[7]</sup>,且同时等比例生成胆碱类物质,后者具有刺激性,注射时可能导致明显的血管刺激反应<sup>[8]</sup>,因此,有关物质为其关键质控点。虽然胆碱类杂质毒性较高,但该类杂质无紫外吸收,不适合用常规检测器进行测定,故可根据杂质降解机理,通过控制水解和醇解杂质的含量,来保障产品质量及临床用药的安全有效。

目前该品种的有关物质检查执行《中华人民共和国药典》2015 年版标准<sup>[9]</sup>,国外药典仅日本药局方收载其原料药标准<sup>[10]</sup>,且无有关物质项检查。现行标准采用 HPLC 等度洗脱法,流动相中有机相比例较低且分析时间较短,有强保留杂质未能检出的风险。国外药典均未收载该品种。已有报道的注射用盐酸甲氯芬酯有关物质测定方法多为高效液相色谱法<sup>[11-12]</sup>,但在流动相的选择上未考虑样品在醇中极易降解和在  $C_{18}$  柱中无保留的情况,且均未检出醇解杂质。

本文采用 HPLC 技术,建立了注射用盐酸甲氯芬酯有关物质检查新方法,检测出现行标准中未能检出的新杂质。应用该方法,对 66 批注射用盐酸甲氯芬酯仿制药进行考察,对产品质量进行评价,保障了临床用药安全,为科学监管提供了有力的支撑,对注射剂仿制药质量一致性评价起到积极引导和示范作用。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试药

岛津 20A 高效液相色谱仪 (Shimadzu 公司, 含 LC-20AB 泵, SIL-20ACHT 自动进样器, SFD-M20A 二极管阵列检测器, CTO-20AC 柱温箱, Shimadzu LC solution 工作站), Milli-Q 纯水机 (Merck millipore 公司), 十万分之一电子天平 (赛多利斯天平公司)。

盐酸甲氯芬酯对照品 (含量 99.7%) 购自中国食品药品检定研究院; 杂质对照品对氯苯氧乙酸 (含量 99.0%, 批号 05621LT-1) 购自北京百灵威科技有限公司。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

66 批注射用盐酸甲氯芬酯样品均来源于国家评价性抽验。辅料甘露醇由青岛明月海藻集团有限公司提供。

### 1.2 色谱条件

采用资生堂 MG-II  $C_{18}$  (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 流动相为 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠溶液 (磷酸调节 pH 至 2.5) - 乙腈 (65 : 35), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 25 °C, 检测波长为 225 nm, 进样量 10  $\mu$ L, 分析时间为主成分峰保留时间的 4 倍。

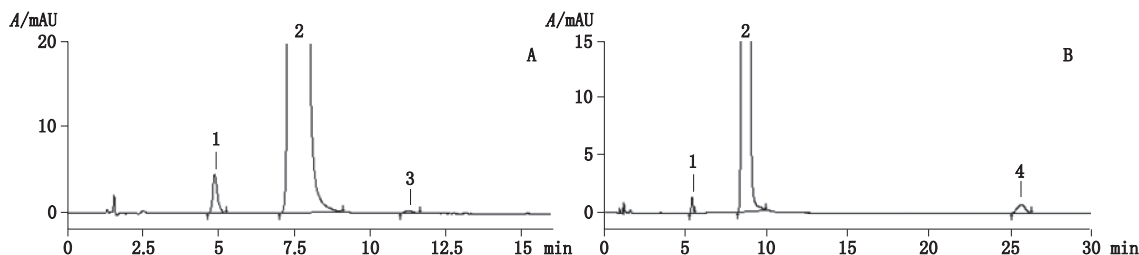
## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

本研究针对现行有关物质检查方法中, 等度洗脱条件下有机相比例低且分析时间短, 不利于强保留杂质检出的问题, 对色谱系统进行优化, 发现在规定的分析时间后有一较大色谱峰被洗脱 (杂质 C), 如图 1 所示。前期对盐酸甲氯芬酯杂质谱的研究结果表明: 杂质 A 为甲氯芬酯水解产物, 为高频出现的主要杂

质;杂质 B 为甲醇中降解产物,仅在 1 家企业样品中检出;杂质 C 为甲氯芬酯与乙醇反应产生的降解产

物,与盐酸甲氯芬酯的合成工艺相关<sup>[5]</sup>,且在现行药典标准规定的检测时间内无法有效检出。



1. 杂质 A (impurity A) 2. 甲氧芬酯 (meclofenoxate) 3. 杂质 B (impurity B) 4. 杂质 C (impurity C)

A. 现行药典方法 (current pharmacopoeia method) B. 新建方法 (new method)

图 1 供试品溶液典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatogram of the test solution

为进一步考察色谱系统对杂质的分离情况,进行了梯度洗脱,在 5%~95% 的有机相比比例下,未能检出除杂质 C 外的新杂质,考虑到梯度洗脱需要一定的平衡时间,且等度洗脱时间较短,因此确定使用等度洗脱条件。在等度洗脱条件下,分别考察了有机相比比例和缓冲液 pH 对系统分离情况的影响。

将流动相中有机相比比例由标准规定的 35% 升高至 40%,杂质 C 出峰时间略有提前,但主峰与水解产物(杂质 A)峰的分离度由 35% 比例的 9.8 降至 40% 比例的 3.1,在专属性研究中氧化破坏下的主峰与相邻杂质峰难以分离。因此,兼顾分离度要求,确定等度洗脱条件为有机相比比例 35%。

在确定有机相比比例的基础上,考察了不同 pH 缓冲液体系对分离能力的影响。甲氯芬酯的  $pK_a$  为 8.17,在 pH 约 6.7 以下都以离子形式存在,且在弱酸条件下稳定,水溶液 pH 大于 5.0 时水解迅速。因此,在 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠(磷酸调 pH 分别至 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0)-乙腈(65:35)等度洗脱条件下对降解溶液的分离情况进行考察。由分离结果可知,不同 pH 缓冲液对杂质峰个数无影响,主成分和

杂质 C 的保留时间在 pH 2.0~6.0 内变化较小(RSD 小于 1.0%),但是杂质 A 峰形及出峰时间受 pH 影响较大。缓冲液 pH 小于 4.0 时,杂质 A 出峰时间变化较小(相对保留时间为 0.4~0.6);当 pH 大于等于 4.0 时,杂质 A 出峰时间显著提前(相对保留时间为 0.1~0.2),且峰形分叉。综合考虑,选择缓冲液 pH 为 2.5。

根据考察结果,兼顾分离度、峰形和样品稳定性等因素,最终新建立的 HPLC 方法中,选择缓冲液 pH 为 2.5,有机相比比例 35% 的等度洗脱条件,并延长分析时间至主成分保留时间的 4 倍。

## 2.2 方法学验证

**2.2.1 耐用性考察** 取盐酸甲氯芬酯适量,用水-甲醇-无水乙醇(4:2:12)的混合溶液溶解并稀释成含盐酸甲氯芬酯 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,在 100 °C 水浴 10 min,作为降解溶液,用于方法耐用性的考察。考察了本方法在 SHISEIDO、Agilent、Phenomenex、GL Sciences、Thermo 5 个品牌 6 个不同规格的色谱柱中的耐用性。结果如表 1 所示,各主要杂质峰均能有效分离,其中杂质 C 相对保留时间在 2.6~3.6 之间,所用 6 根色谱柱的各项指标均符合系统适用性要求。

表 1 色谱柱耐用性比较

Tab. 1 Column durability comparison

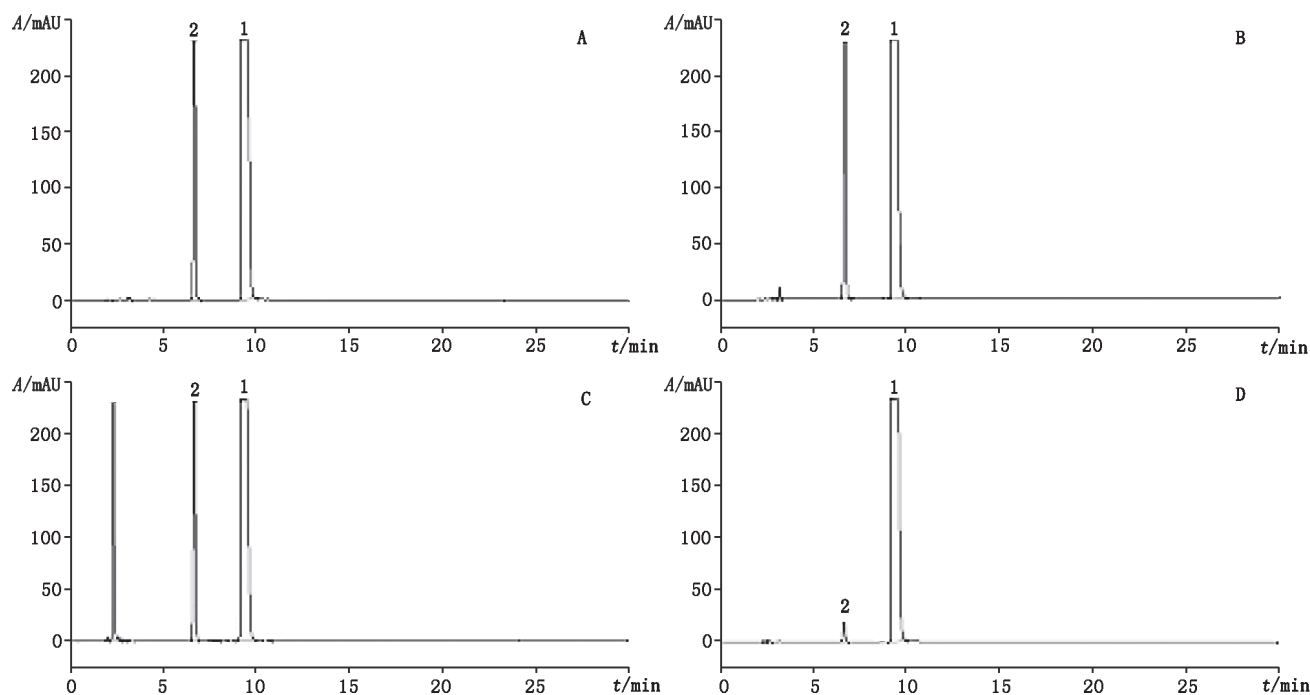
| 色谱柱<br>(column)                                               | 盐酸甲氯芬酯保留时间<br>(retention time of meclofenoxate<br>hydrochloride)/min | 杂质 A<br>(impurity A) |      | 杂质 B<br>(impurity B) |      | 杂质 C<br>(impurity C) |      |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
|                                                               |                                                                      | RRT                  | R    | RRT                  | R    | RRT                  | R    |
| SHISEIDO MG II C <sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)        | 11.28                                                                | 0.62                 | 10.3 | 1.68                 | 11.7 | 2.92                 | 12.8 |
| SHISEIDO UG120 C <sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)        | 7.91                                                                 | 0.66                 | 6.8  | 1.50                 | 7.6  | 2.55                 | 18.9 |
| Agilent ZORBAX Extend-C <sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) | 7.43                                                                 | 0.67                 | 7.2  | 1.96                 | 16.2 | 3.56                 | 16.1 |
| GL Sciences Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)            | 13.22                                                                | 0.63                 | 11.6 | 1.84                 | 15.5 | 3.26                 | 14.5 |
| phenomenex Gemini C <sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)     | 15.59                                                                | 0.68                 | 12.8 | 1.62                 | 16.0 | 2.68                 | 16.8 |
| Thermo BDS HYPERSIL C <sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)   | 15.42                                                                | 0.55                 | 13.6 | 1.36                 | 8.3  | 2.34                 | 18.0 |

注 (notes): RRT. 相对保留时间 (relative retention time); R.



**2.2.2 专属性考察** 注射用盐酸甲氯芬酯的制剂工艺分为原料药直接分装和冷冻干燥2种,后者含有辅料甘露醇。本研究按照含辅料比例最高的处方,取甘露醇适量,加水溶解作为空白辅料溶液。空白辅料溶液的色谱图与溶剂色谱图基本一致,未显

示明显的辅料峰,对主成分测定没有干扰。在强制破坏试验中,经酸、碱、氧化、光照破坏后(图2),各破坏条件下相邻杂质与主峰分离度均符合要求,主峰纯度因子均大于999,说明系统具有良好的专属性。



1. 甲氯芬酯 (meclofenoxate) 2. 水解杂质, 杂质 A (hydrolyzed impurities, impurity A)

图2 强酸(A)、强碱(B)、氧化(C)和光照(D)条件下的色谱图

Fig. 2 Chromatograms under strong acid (A), alkali (B), oxidation (C) and light conditions (D)

**2.2.3 稳定性考察** 经考察,主成分在8 h内稳定(主成分峰面积的RSD为0.26%,小于20%),但杂质含量仍呈明显上升趋势。以杂质变化的绝对值小于0.05%计算,应在4 h内完成测定,故供试品溶液应临用新制。

**2.2.4 检测下限** 在主峰与噪音强度比大于3时,盐酸甲氯芬酯检测下限为1 ng,杂质A和杂质C检测下限分别为0.2 ng和1.4 ng。

### 2.3 样品测定及质量评价

采用新建的HPLC方法对9家企业66批次样品进行有关物质检查,单个最大杂质均为水解杂质A,且在所有批次样品中均有检出,含量为0~1.1%;在1家企业的14批样品中发现并检测出杂质C,含量为0.1%~0.2%;样品中所有杂质总量为0~1.1%。

考察发现,有关物质不合格样品均为冷冻干燥工艺生产的制剂,且冻干工艺生产的样品中杂质A含量(均值0.34%)显著高于无菌分装工艺生产的样品

(均值0.05%),说明样品中杂质A主要由冻干工艺中水解产生。此次考察的9家企业中,有4家采用冷冻干燥工艺,有关物质检测不合格样品涉及其中2家企业生产的3批样品,提示少数企业的冷冻干燥工艺水平仍有较大差距,需要进一步改进。

前期研究结果表明,杂质C为原料药合成工艺中引入,是酸性条件下甲氯芬酯与无水乙醇的酯交换产物<sup>[13]</sup>。为了进一步证实杂质C与乙醇的相关性,本研究采用气质联用法测定样品中的乙醇量<sup>[14]</sup>,并从检出杂质C的企业中选取7批样品对杂质C的含量和乙醇量(表2)进行相关性分析(表3),结果表明杂质C的含量与乙醇量显著正相关( $P<0.05$ ),进一步说明杂质C源于主成分与溶剂无水乙醇发生的酯交换反应,建议在原料药精制纯化过程中应避免使用低级醇类试剂,且使用无水乙醇做溶剂时,应合理控制生产工艺以减少杂质C的生成。

表 2 杂质 C 和乙醇的含量(%)

Tab. 2 Contents of impurity C and ethanol

| 批号 (batch No.) | 杂质 C (impurity C) | 乙醇 (ethanol) |
|----------------|-------------------|--------------|
| 15041701       | 0.100             | 0.11         |
| 15011401       | 0.103             | 0.16         |
| 15041502       | 0.087             | 0.10         |
| 15011301       | 0.114             | 0.23         |
| 15042001       | 0.075             | 0.10         |
| 15041801       | 0.093             | 0.13         |

表 3 杂质 C 含量和乙醇含量的相关性分析

Tab. 3 Pearson correlations between the content of impurity C and ethanol

| 变量<br>(variable)     | 相关性参数<br>(correlation parameter)      | 杂质 C<br>(impurity C) | 乙醇<br>(ethanol) |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------|
| 杂质 C<br>(impurity C) | Pearson 相关性<br>(Pearson relationship) | 1                    | 0.839(*)        |
|                      | 显著性(双侧)<br>(significance/two-tailed)  | 0.000                | 0.037           |
|                      | N                                     | 6                    | 6               |
| 乙醇<br>(ethanol)      | Pearson 相关性<br>(Pearson relationship) | 0.839(*)             | 1               |
|                      | 显著性(双侧)<br>(significance/two-tailed)  | 0.037                | 0.000           |
|                      | N                                     | 6                    | 6               |

注 (note): \*. 在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关 (significant correlation at 0.05 level (bilateral))

3 结论

本研究对注射用盐酸甲氯芬酯现行标准中的有关物质测定方法进行了考察及优化,在此基础上建立的新方法灵敏度高,专属性强,操作简便,可有效检出现行标准未能检出的醇解杂质,为《中华人民共和国药典》2015 年版中注射用盐酸甲氯芬酯质量标准的修订提供了参考。通过研究,还确认了注射用盐酸甲氯芬酯高风险杂质及质量控制关键步骤,指导企业优化相应的生产工艺,提升了产品质量,为科学监管提供技术保障和执法依据,促进了国产仿制药质量的不断提高,为一致性评价工作提供了有力的技术支撑。

参考文献

[1] 吕卫红. 盐酸甲氯芬酯的药理作用和临床应用[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(1): 47  
LÜ WH. The pharmacologic action and clinical application of meclufenoxate hydrochloride[J]. Northwest Pharm J, 2004, 19(1): 47  
[2] 周桂花, 汪萌芽. 药物治疗酒精中毒的研究进展[J]. 中国当代医药, 2013, 20(16): 22  
ZHOU GH, WANG MY. Research advances in drug therapy of alcohol poisoning[J]. China Mod Med, 2013, 20(16): 22

[3] 蒲友华, 刘定远. 注射用盐酸甲氯芬酯治疗新生儿缺氧缺血性脑病临床研究[J]. 儿科药学杂志, 2008, 14(4): 47  
PU YH, LIU DY. The clinical research of meclufenoxate in the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. J Pediatr Pharm, 2008, 14(4): 47  
[4] 张天锡. 注射用盐酸甲氯芬酯的临床应用[J]. 药学服务与研究, 2005, 5(4): 388  
ZHANG TX. Clinical application of meclufenoxate hydrochloride injection[J]. Pharm Care Res, 2005, 5(4): 388  
[5] 赵普. 盐酸甲氯芬酯的合成[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(12): 690  
ZHAO P. Synthesis of meclufenoxate hydrochloride[J]. Qilu Pharm Aff, 2012, 31(12): 690  
[6] 张忠敏, 张利敏, 修荣, 等. 氯醒酯的合成工艺改进[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 2(14): 112  
ZHANG ZM, ZHANG LM, XIU R, et al. Improved synthesis of meclufenoxatum[J]. Chin J Med Chem, 2004, 2(14): 112  
[7] 王琳, 吴兆伟, 王铁松, 等. 注射用盐酸甲氯芬酯杂质谱与其生产工艺的相关性研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1307  
WANG L, WU ZW, WANG TS, et al. Correlation study between production process and impurity profile of meclufenoxate hydrochloride for injection[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(7): 1307  
[8] 赵巍, 吴兆伟, 张喆, 等. 注射用盐酸甲氯芬酯及有关物质的毒性研究[J]. 中国医药生物技术, 2018, 5(13): 437  
ZHAO W, WU ZW, ZHANG Z, et al. Study on toxicity of meclufenac hydrochloride for injection and related substances[J]. Chin Med Biotechnol, 2018, 5(13): 437  
[9] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 904  
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 904  
[10] JP17[S]. 2011: 1065  
[11] 孟婷, 赵敏, 李茂林, 等. 高效液相色谱法测定注射用盐酸甲氯芬酯中的有关物质[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(20): 1919  
MENG T, ZHAO M, LI ML, et al. Determination of related substances in meclufenac hydrochloride for injection by high performance liquid chromatography[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2006, 27(20): 1919  
[12] 陈刚, 黄铁花. 注射用甲氯芬酯含量及有关物质测定[J]. 医学导报, 2009, 2(28): 243  
CHEN G, HUANG TH. Determination of content and related substances of meclufenac for injection[J]. Herald Med, 2009, 2(28): 243  
[13] 杨振强, 谢文磊, 李海涛. 酸催化油脂酯交换反应研究进展[J]. 粮食与油脂, 2006(3): 13  
YANG ZQ, XIE WL, LI HT. Research in transesterification of oils and fats via acid catalysts[J]. Cereals Oils, 2006(3): 13  
[14] 吴兆伟, 陈安东, 王铁松, 等. 气相色谱-质谱法同时分析固体药物制剂中 50 种残留溶剂[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(9): 764  
WU ZW, CHEN AD, WANG TS, et al. Simultaneous determination of 50 residual solvents in solid drug preparations by GC-MS[J]. Chin Pharm J, 2014, 49(9): 764

(本文于 2019 年 10 月 10 日修改回)