

RP-HPLC法测定富马酸卢帕他定含量及有关物质

王海红¹, 葛萍², 赵卫³, 杭太俊^{4*}, 李天傲⁵

(1. 杭州市第一人民医院, 杭州 310006 2 徐州医学院药学院, 徐州 221004 3 江苏省药品检验所, 南京 210008

4 中国药科大学药物分析室, 南京 210009 5 浙江大学城市学院药学院, 杭州 310015)

摘要 目的: 建立富马酸卢帕他定的 HPLC 含量测定及有关物质检查方法。方法: 采用 XTerra- C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 以醋酸盐缓冲液 (pH 4.0) - 甲醇 (25:75) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 244 nm。并采用 LC-MS/MS 法鉴定主要有关物质。结果: 有关物质与富马酸卢帕他定分离良好, 富马酸卢帕他定浓度在 0.2~200 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好 ($r = 1.000$); 最低检测限为 0.1 μg·mL⁻¹; 富马酸卢帕他定中的主要有关物质分别为 3-二溴甲基-5-甲基吡啶、地氯雷他定、3,5-二(地氯雷他定代)甲基吡啶。结论: 本法专属准确, 可用于富马酸卢帕他定的含量和有关物质测定。

关键词: 富马酸卢帕他定; 含量测定; 有关物质; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0791-04

RP-HPLC determination of rupatadine fumarate and its related substances

WANG Hai-hong¹, GE Ping², ZHAO Wei³, HANG Tai-jun^{4*}, LI Tian-ao⁵

(1 The First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China 2 Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China

3 Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China 4 China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

5 Zhejiang University City College Medical College, Hangzhou 310015, China)

Abstract **Objective** To establish an RP-HPLC method for the determination of rupatadine fumarate and its related substances. **Method** The separation was performed on a XTerra- C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phase was composed of acetate buffer solution (pH 4.0) - methanol (25:75), and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with UV detection at 244 nm. LC-MS/MS method was employed for the identification of the major related substances. **Results** Rupatadine fumarate and its related substances can be completely separated by the method with a good linear range of 0.2~200 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$) and the LOD of 0.1 μg·mL⁻¹. The related substances were characterized as 3-dibromomethyl-5-methylpyridine, desloratadine and 3,5-di(desbratadine) methylpyridine. **Conclusion** This RP-HPLC method is selective, accurate and suitable for the determination of rupatadine fumarate and its related substances. **Key words** rupatadine fumarate; determination; related substances; RP-HPLC

富马酸卢帕他定 (rupatadine fumarate) 化学名为 (8-氯-6,11-二氢-11-[1-[(5-甲基-3-吡啶)甲基]-4-哌啶基]-5H-苯并[5,6]环庚烷并[1,2-b]吡啶富马酸盐), 是新一代三环类抗组胺类药物 (图 1-A), 具有抗组胺和拮抗血小板活化因子 (PAF) 双重作用。卢帕他定是目前唯一上市的既具有抗组胺作用又有拮抗 PAF 活性的强力、高效抗过敏药^[1-5]。该药口服治疗剂量能选择性阻滞 H₁ 受体, 对 5-羟色胺、乙酰胆碱、前列腺素 F_{2α}、白三烯 D₄

仅有很弱的阻滞作用, 尚能与血小板活化因子受体非竞争性结合, 可抑制致敏细胞脱颗粒, 其优点是没有心血管毒性和潜在的致心律不齐作用, 且无中枢镇静作用。已有文献报道富马酸卢帕他定的人体药代动力学研究^[6,7]和残留溶剂测定^[8], 其有关物质的研究测定尚未见文献报道。本文采用 HPLC 法对其含量和有关物质进行测定研究, 并对主要有关物质采用 LC-MS/MS 等方法鉴定确证。

* 通讯作者 Tel: (025) 83271090 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

1 仪器与试剂

日本岛津公司 LC10A-SPD10A 高效液相色谱系统; HS2000 色谱数据工作站; 美国 Waters 公司 Xterra-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱。

富马酸卢帕他定对照品 (HPLC 法测定含量为 99.7%,)、原料 (3 批批号为 070223 070305, 070317 的原料及 1 批原料粗品) 及其中间体氯雷他定、地氯雷他定均由中国药科大学医药化工研究所提供。

甲醇、醋酸铵、冰醋酸、三乙胺均为分析纯; 水为二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Xterra-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以醋酸盐缓冲液 (1 g 醋酸铵、1 mL 冰醋酸、0.1 mL 三乙胺溶于 1000 mL 水中, pH 4.0) - 甲醇 (25:75) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 244 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 专属性

2.2.1 富马酸卢帕他定与中间体的分离 根据合成工艺, 富马酸卢帕他定可能引入的杂质主要是中间体氯雷他定与地氯雷他定 (图 1)。取富马酸卢帕他定对照品和中间体适量, 加甲醇适量使溶解后再加流动相稀释制成浓度均为 100 μg · mL⁻¹ 的供试液, 在上述选定的色谱条件下进样测定。结果 (图 2) 表明在该色谱条件下富马酸卢帕他定与中间体能完全分离。

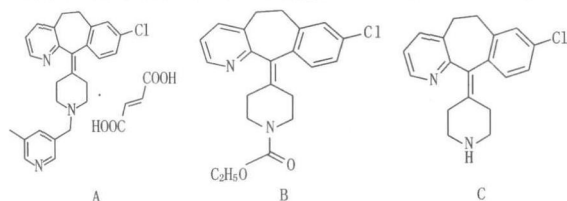


图 1 富马酸卢帕他定(A)、氯雷他定(B)和地氯雷他定(C)结构式
Fig 1 The structures of rupatadine fumarate (A), loratadine (B) and desloratadine (C)

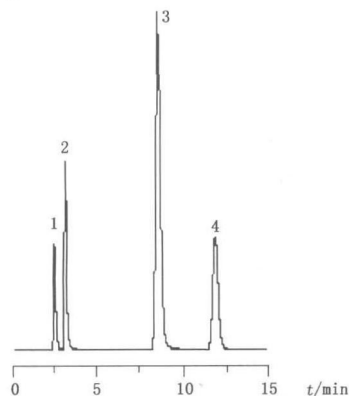


图 2 专属性试验图谱

Fig 2 HPLC test of specificity

1. 富马酸 (fumarate) 2. 地氯雷他定 (desloratadine) 3. 卢帕他定 (rupatadine) 4. 氯雷他定 (loratadine)

2.2.2 富马酸卢帕他定与分解产物的分离 取本品适量, 分别经强酸沸水浴 (1 mol · L⁻¹ 盐酸) 1 h、强碱沸水浴 (1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液) 1 h、过氧化氢沸水浴 5 min 破坏处理, 中和后, 分别用流动相稀释成约为 100 μg · mL⁻¹ 的供试液, 进行 HPLC 分析。试验结果表明, 本品对高温、酸和碱溶液比较稳定, 而在氧化破坏条件下, 极易降解。在上述选定的色谱条件下, 富马酸卢帕他定色谱峰与分解产物色谱峰的分离良好。

2.3 线性关系考察 精密称定富马酸卢帕他定对照品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加适量甲醇溶解后用流动相稀释制成每 1 mL 含富马酸卢帕他定分别为 0.2 0.5 1 2 5 10 20 50 80 100 120 150 200 μg 的对照品溶液。在本色谱条件下进行色谱分析, 记录峰面积。由溶液浓度 (C) 对峰面积 (A) 做线性回归, 回归曲线方程为:

$$A = 8.117 \times 10^3 C - 718 \quad r = 0.9998$$

最低检测限 (S/N = 3) 约为 0.1 μg · mL⁻¹。结果表明, 富马酸卢帕他定浓度在 0.2 ~ 200 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好。

2.4 溶液稳定性试验 取“2.3”项下的对照品溶液 (100 μg · mL⁻¹), 分别于 0 1 2 3 4 6 8 10 h 测定。结果表明溶液在 10 h 内测定结果稳定, RSD 为 5.3%。

2.5 回收率试验 照“2.3”项下方法制备浓度为 80 100 200 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Test results of recovery

加入量 (added) / μg · mL ⁻¹	测得量 (found) / μg · mL ⁻¹	回收率 (recovery) / % (n = 3)	平均回收率 (mean recovery) / % (n = 9)
80	80.70 ± 1.55	99.71	
100	100.2 ± 1.04	99.76	99.76
120	119.5 ± 1.11	99.80	

2.6 样品含量与有关物质测定

取本品适量, 精密称定, 加适量甲醇溶解后用流动相定量稀释制成每 1 mL 中含富马酸卢帕他定约为 100 μg 的供试液; 照上述色谱条件, 精密量取 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取富马酸卢帕他定对照品同法测定; 按外标法以峰面积计算含量。对批号为 070223 070305 070317 的 3 批样品进行含量测定, 结果样品的百分含量 (n = 3) 均为 99.7%。

取本品含量测定溶液为供试品溶液;精密量取 1 mL,加流动相稀释至 100 mL,作为对照溶液;照上述色谱条件,取对照溶液 10 μ L 注入液相色谱仪,调节谱图记录量程,使主成分峰高约为记录满量程的 10%,再量取上述 2 种溶液各 10 μ L 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 5 倍以上;检测供试品溶液中的杂质峰(溶剂峰、富马酸峰及峰面积小于对照溶液主峰面积 0.05 倍的峰忽略不计)。采用 1.0% 主成分自身对照法检查有关物质,对 3 批样品测得结果分别为 0.34%, 0.30%, 0.31%。

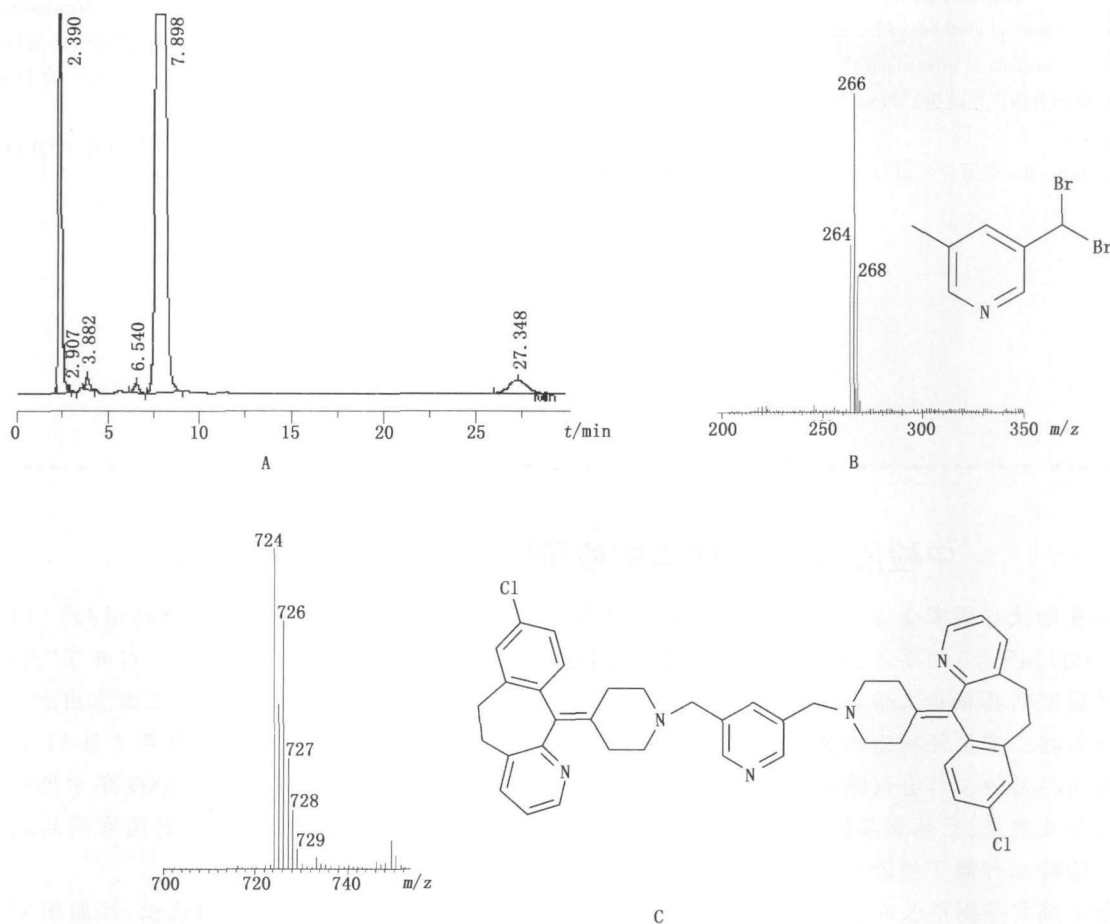


图 3 富马酸卢帕他定有关物质分析鉴定图谱

Fig 3 Test of related substances for rupaidine fumarate

A. 供试粗品 HPLC 图 (HPLC chromatogram of raw sample) B. 保留时间 6.54 min 成分峰的 ESI⁺-MS 数据和对应分子结构 (ESI⁺-MS spectrum and the corresponding structure of the related substance with retention time of 6.54 min) C. 保留时间 27.35 min 成分峰的 ESI⁺-MS 数据和对应分子结构 (ESI⁺-MS spectrum and the corresponding structure of the related substance with retention time of 27.35 min)

3 讨论

对富马酸卢帕他定在流动相中进行紫外吸收曲线测定,结果表明,富马酸卢帕他定紫外吸收谱中在 205 nm 的 UV 末端处有最大吸收,在 244 nm 附近有较强芳香杂环吸收肩峰,且峰形平缓。为减少干扰并保证测定灵敏度,选定 244 nm 为测定波长。

2.7 有关物质的鉴定 对本品粗品照有关物质测定法进行分析,测得其含有 3 个主要有关物质成分,如图 3-A 中保留时间分别为 3.88 6.54 27.35 min 的峰。根据工艺路线、已知中间体对照和 ESI 正离子化 LC-MS 法 (TSQ Quantum Ultra 三重四极质谱)测得的 $[M + H]^+$ 离子的质量 (图 3),分离制备有关物质单体后 NMR (Bruker AV 500 CDC₃溶剂)测定。确证它们分别为地氯雷他定; 3- (二溴甲基) - 5- 甲基吡啶 (图 3-b); 3,5-二 (地氯雷他定取代)甲基吡啶 (图 3-C)。

富马酸卢帕他定的中间体氯雷他定的色谱行为受 pH 影响较大^[2],为使样品和中间体完全分离,我们采用了醋酸盐缓冲液,并加入三乙胺调节 pH 至 4.0 三乙胺同时还起到扫尾剂的作用。在该色谱条件下,样品色谱峰保留时间适中,峰形对称,且与中间体、降解产物能有效分离。本试验建立的方法

准确, 专属性好, 适用于富马酸卢帕他定的含量测定和有关物质检查。

参考文献

- 1 Izquierdo I Merlos M, García-Rafanell J Rupatadine a new selective histamine H_1 receptor and platelet-activating factor(PAF) antagonist A review of pharmacological profile and clinical management of allergic rhinitis *Drugs Today (Barc)*, 2003, 39(6): 451
- 2 CUI Jing(崔京), HUANG Jian(黄健), HUO Li-nu(霍立茹), *et al* Determination of loratadine tablets and its related substances by HPLC(氯雷他定片含量及有关物质的 HPLC测定). *Chin J Chromatogr*(中国医药工业杂志), 2002, 33(6): 294
- 3 WANG Zhen-yu(王震宇), ZHU Xiong(朱雄), WANG Er-hua(王尔华). Improved synthesis of 5-methylpyridine-3-carboxylic acid the intermediate of rupatadine(卢帕他定中间体 5-甲基吡啶-3-羧酸的合成工艺改进). *Prog Pharm Sci*(药学进展), 2005, 29(1): 31
- 4 ZHANG Wan-jin(张万金), LUO Yan(罗艳), ZHANG Yan-mei(张燕梅). Synthesis of rupatadine(卢帕他定的合成). *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2006, 37(7): 433
- 5 CHEN Jian-hua(陈建华), LI Jin(李劲), SU Wei-ke(苏为科). Synthesis of rupatadine fumarate(富马酸卢帕他定的合成). *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2007, 38(10): 686
- 6 WEN Yu-guan(温预关), YU Ling-han(喻凌寒), LIN Nan(林楠), *et al* Pharmacokinetics of rupatadine fumarate tablets in healthy volunteers(富马酸卢帕他定片在健康人体的药动学研究). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2008, 43(10): 779
- 7 Solans A, Izquierdo I, Donado E, *et al* Pharmacokinetic and safety profile of rupatadine when coadministered with azithromycin at steady-state levels a randomized open-label two-way crossover Phase I study. *Clin Ther*, 2008, 30(9): 1639
- 8 ZHU Mei(朱梅), LIU Jin-ai(刘津爱). GC determination of residual solvents in fumarate rupatadine(气相色谱法测定富马酸卢帕他定原料中的残留溶剂). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(4): 572

(本文于 2008 年 12 月 11 日收到)

中检所召开 2009 年中检所国家药品抽验工作会议

为贯彻执行国家食品药品监督管理局《关于印发 2009 年全国药品抽验工作计划的通知》(国食药监稽[2009]45 号)的要求,全面落实推进国家药品抽验工作,2009 年 4 月 3 日,中检所召开了“2009 年中检所国家药品抽验工作会议”,党委书记、所长李云龙及常务副所长金少鸿、副所长王军志出席。

所长办公室主任杨昭鹏主持会议。药品检验处处长马双成传达了国家局于 2009 年 3 月 11 日召开的全国药品抽验工作会议精神;药品市场监督办公室抽验管理处处长姜典财布置了 2009 年中检所抽验工作任务及要求;生物制品检验处处长李凤祥和抗生素室主任胡昌勤分别就如何做好国家药品抽验的管理和检验工作做了经验介绍。

金少鸿常务副所长和王军志副所长分别就提高对国家药品抽验工作重要性的认识、按照国家局的有关指示精神,科学地、高水平地完成 2009 年国家药品、生物制品抽验工作等提出了具体要求。

李云龙所长指出,2009 年国家药品抽验任务是中检所的重要任务之一,希望通过这项工作,使中检所 2009 年业务建设和业务管理工作再上新台阶,并对抽验工作提了三点要求。药品市场监督办公室、所长办公室、党委办公室、药品检验处、生物制品检验处、医疗器械检验处、信息处、标准物质管理处的负责人,以及承担 2009 年中检所国家药品抽验检验任务的 12 个科室负责人及技术人员代表 38 人参加了会议。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>