

反相 HPLC 法测定重酒石酸卡巴拉汀胶囊的含量及有关物质^{*}刘艳玲, 罗永煌^{**}, 田朋鑫, 聂延君, 乔彦茹

(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定重酒石酸卡巴拉汀胶囊的含量及有关物质。方法: 采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.05 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液(58:42, 用磷酸调节 pH 至 8.45) 为流动相; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 214 nm; 柱温: 40 °C。结果: 在所选色谱条件下, 主药与有关物质能较好分离, 重酒石酸卡巴拉汀在 23.6 ~ 447.1 μg · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好($r=0.9997$); 平均回收率为 99.3% (RSD = 0.35%, $n=9$); 检测限为 0.3 ng; 样品中有关物质检查符合质量要求。结论: 该方法简便灵敏, 专属性强, 精密度高, 可用于重酒石酸卡巴拉汀胶囊的质量控制。

关键词: 重酒石酸卡巴拉汀; 反相高效液相色谱法; 含量测定; 有关物质

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0721-04

RP-HPLC determination of rivastigmine capsules and its related substances^{*}LIU Yan-ling, LUO Yong-huang^{**}, TIAN Peng-xin, NIE Yan-jun, QIAO Yan-ru

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method for the determination of rivastigmine capsules and its related substances. **Methods:** The separation was performed on a Hypersil BDS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, with the mobile phase consisting of methanol-0.05 mol · L⁻¹ sodium hydrogen phosphate solution(58:42, adjusted to pH 8.45 with phosphate acid); The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength at 214 nm, the column temperature was 40 °C. **Results:** Rivastigmine and its related substances were completely separated by the method with a good linear range of 23.6-447.1 μg · mL⁻¹ ($r=0.9997$); the average recovery ($n=9$) was 99.3%; the limit of the detection was 0.3 ng. The related substances met the quality requirements in samples. **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate and specific. It can be used for quality control of rivastigmine capsules.

Key words: rivastigmine; RP-HPLC; determination; related substances

重酒石酸卡巴拉汀(rivastigmine, (S)-N-乙基-N-甲基-3-[1-二甲胺-乙基]氨基 甲酸苯酯-H-(2R,3R) 酒石酸盐)是一种脑组织高度选择性胆碱酯酶抑制剂^[1],同时对脑内丁酰胆碱酯酶也具有抑制作用,能有效改善老年性痴呆症患者的认知及行为障碍,已广泛用于轻度至中度阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)相关性痴呆的治疗,且耐受性较好^[2~4]。重酒石酸卡巴拉汀最早由瑞士诺华公司开发,于1997年12月在瑞士上市^[5]。2006年7月,FDA批准了重酒石酸卡巴拉汀的一个新适应症,即用于治疗与帕金森病(Parkinson disease)相

关的轻度至中度痴呆症(parkinson disease with dementia),成为首个获得FDA批准有此用途的药物^[6]。多项临床试验已证实,痴呆症患者的痴呆与中枢性多巴胺和乙酰胆碱的降低有关,补充多巴胺或者应用胆碱酯酶抑制剂能在一定程度上改善痴呆症状^[7,8]。目前,重酒石酸卡巴拉汀已经在美国、欧洲等60多个国家批准销售,上市的剂型主要包括胶囊剂、口服液、贴剂等^[3,9],而该药在我国正处于研发阶段。

重酒石酸卡巴拉汀及其制剂,在美国药典(USP 32版)、英国药典(BP 2009版)、欧洲药典(EP 5.5

* 重庆市科技创新能力建设(CSTC 2009CB1010)

** 通讯作者 Tel: 13883808688; E-mail: luoyonghuang@sohu.com

版)等国外药典以及中国药典均未收载,有关质量研究在国内外文献中报道甚少^[9,10],作者未见重酒石酸卡巴拉汀胶囊含量及有关物质测定的相关文献报道。国内仅一篇文献即王芳侠等^[10]报道了高效液相色谱离子对试剂法测定重酒石酸卡巴拉汀片的含量,且未对其有关物质进行控制。本文选定甲醇和磷酸氢二钠缓冲液为流动相测定重酒石酸卡巴拉汀胶囊的含量及有关物质,其简便、灵敏、经济,且专属性强、精密度高,可用于重酒石酸卡巴拉汀胶囊的质量控制。

1 仪器与试药

依利特 P200 II 高效液相色谱仪,SPD-6AV 紫外检测器,EC2000 色谱工作站。

重酒石酸卡巴拉汀对照品(自制);重酒石酸卡巴拉汀胶囊样品 3 批(山西仟源制药有限公司,批号 20091101,20091102,20091201,以重酒石酸卡巴拉汀计,规格为 $2.4 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$);甲醇:色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);其他试剂为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$);流动相: 甲醇- $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液(58:42,用磷酸调节 pH 至 8.45);流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 214 nm;柱温: 40°C ;进样量: $20 \mu\text{L}$ 。在此色谱条件下,理论塔板数按重酒石酸卡巴拉汀计算应不低于 1500。对照品及样品色谱图见图 1。

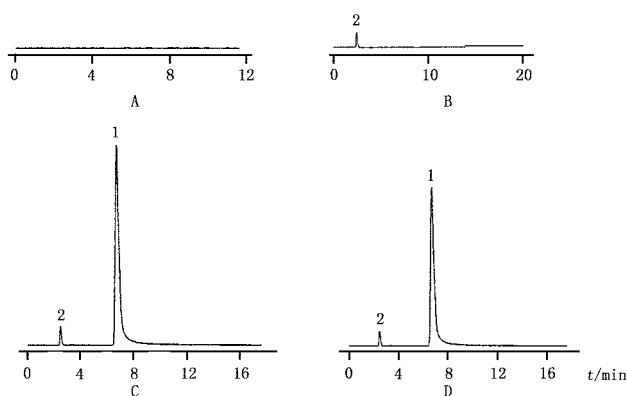


图 1 重酒石酸卡巴拉汀色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of rivastigmine

A. 空白辅料(blank) B. 酒石酸(tartaric acid) C. 对照品(reference substance) D. 样品(sample)

1. 卡巴拉汀(rivastigmine) 2. 酒石酸(tartaric acid)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取重酒石酸卡巴拉汀对照品约 16 mg,用流动相溶解并稀释至 50 mL,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取装量差异下的本品内容物,研细,精密称取适量(约相当于重酒石酸卡巴拉汀 15 mg),置 50 mL 烧杯中,加流动相适量,磁力搅拌 25 min ($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),转移至 50 mL 量瓶中,用流动相定容至刻度,离心 10 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清液作为供试品溶液。

2.2.3 酒石酸溶液 精密称取酒石酸 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,作为酒石酸溶液。

2.2.4 空白辅料溶液 按处方比例称取辅料制成空白胶囊,照“2.2.2”项下方法制备空白辅料溶液。

2.3 专属性试验 取供试品溶液 5 mL,分别经 105°C 5 h,4500 lx 光照 12 h,30% 过氧化氢溶液 2 mL(室温放置 1 h), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 2 mL(室温放置 2 h), $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL(室温放置 2 h)处理,作为高温破坏、光破坏、氧化破坏、碱破坏和酸破坏溶液。照“2.1”项下色谱条件测定其含量,记录色谱图。结果,重酒石酸卡巴拉汀在高温、强光、强酸条件下较稳定;在氧化、强碱条件下降解产物较明显,但主峰与杂质峰均能很好的分离。其色谱图见图 2。

2.4 线性关系考察

2.4.1 含量测定 精密称取重酒石酸卡巴拉汀对照品适量,用流动相溶解并分别制成每 1 mL 含 23.6,70.8,118.0,223.5,447.1 μg 的溶液。取上述溶液在选定的色谱条件下,分别进样 $20 \mu\text{L}$,以重酒石酸卡巴拉汀的峰面积 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,进行线性回归,得回归方程:

$$A = 16.11 C - 52.18 \quad r = 0.9997$$

重酒石酸卡巴拉汀在 $23.6 \sim 447.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.4.2 有关物质 精密称取重酒石酸卡巴拉汀对照品适量,用流动相溶解并分别制成 0.625,1.25,2.5,5.0,10.0,15.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。取上述溶液在选定的色谱条件下,分别进样 $20 \mu\text{L}$,以重酒石酸卡巴拉汀的峰面积 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,进行线性回归,得回归方程:

$$A = 12.45 C + 3.014 \quad r = 0.9995$$

重酒石酸卡巴拉汀在 $0.625 \sim 15.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好(对应杂质的限度范围为 0.11% ~ 2.88%)。

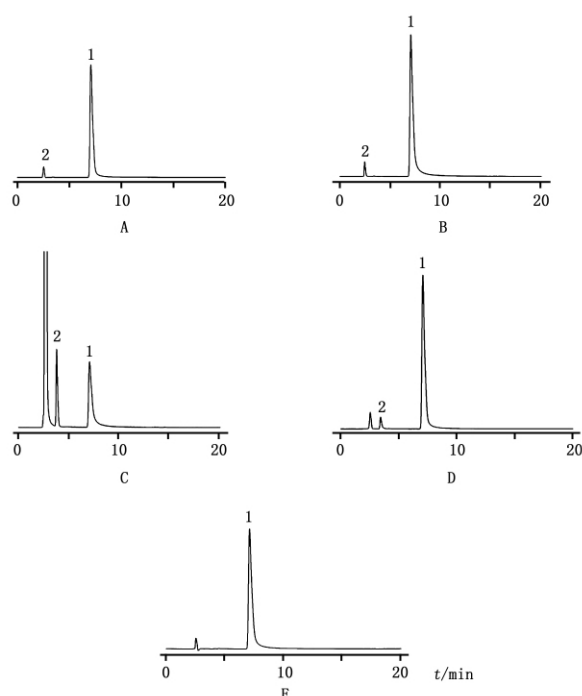


图2 专属性试验色谱图

Fig 2 The chromatograms of the special test

A. 加热破坏(destroyed by heat) B. 光破坏(destroyed by light) C. 氧化破坏(destroyed by oxidation) D. 碱破坏(destroyed by base) E. 酸破坏(destroyed by acid)

1. 卡巴拉汀(rivastigmine) 2. 杂质(impurities)

2.5 最低检测限 该系统在浓度为 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测得最小检出量为 $0.3 \text{ ng} (S/N = 3)$ 。

2.6 进样精密度 取“2.2.1”项下重酒石酸卡巴拉汀对照品溶液,精密吸取 $20 \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,连续进样6针,按重酒石酸卡巴拉汀峰面积计算RSD为0.47%。取“2.11”项下重酒石酸卡巴拉汀1%自身对照液,精密吸取 $20 \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,连续进样6针,按重酒石酸卡巴拉汀峰面积计算RSD为0.34%。

2.7 溶液稳定性 取同一批号供试品溶液(照“2.2”项下方法制备),分别于0 2 4 6 8 h进样 $20 \mu\text{L}$ 测定峰面积,其RSD为0.22%,供试品溶液在8h内基本稳定。取“2.11”项下的对照品溶液和供试品溶液分别在0 2 4 6 8,12 h进样测定,考察对照品溶液的峰面积和杂质质量的稳定性,结果对照品溶液在12 h内基本稳定,重酒石酸卡巴拉汀峰面积的RSD为0.65%,供试品溶液在12 h内杂质个数没有增加,杂质总量基本稳定。

2.8 重复性试验

2.8.1 含量测定 取同一批号样品6份,研细,精

密称定,照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,重酒石酸卡巴拉汀含量的RSD为0.24%。

2.8.2 有关物质 取同一批号样品6份,研细,精密称定,照“2.11”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果杂质总量平均为0.20%,RSD为1.52%,具有良好的重复性。

2.9 回收率试验 称取处方量重酒石酸卡巴拉汀胶囊空白辅料3份,分别加入重酒石酸卡巴拉汀对照品12 mg、15 mg、18 mg,混合均匀并研细后,再分别精密称取细粉适量置50 mL烧杯中,加流动相适量,磁力搅拌25 min($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),转移至50 mL量瓶中,用流动相定容至刻度,使其浓度分别为 $0.24 \text{ } 0.30 \text{ } 0.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,离心10 min($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清液作为待测溶液。在上述色谱条件下,进样测定,测得重酒石酸卡巴拉汀低、中、高3种浓度的回收率($n = 3$)分别为99.2% (RSD = 0.41%)、99.2% (RSD = 0.28%)、99.4% (RSD = 0.37%),平均回收率($n = 9$)为99.3% (RSD = 0.35%)。

2.10 含量测定 取3批样品,每批3份,照“2.2”项下方法制备供试品溶液及对照品溶液,分别进样 $20 \mu\text{L}$,记录色谱图。按外标法以峰面积计算重酒石酸卡巴拉汀的含量,结果见表1。

2.11 有关物质检查 精密称取重酒石酸卡巴拉汀细粉适量(约相当于重酒石酸卡巴拉汀25 mg),照“2.2.2”项下方法制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液作为供试品溶液;将供试品溶液用流动相稀释100倍,作为1%的自身对照液。分别吸取上述2种溶液各 $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,调节检测器的灵敏度使对照液主峰高达到满量程的20%左右,量取除酒石酸峰以外的各杂质峰面积总和,并与对照液主成分峰面积比较,以不加校正因子的自身对照法计算杂质含量。结果,重酒石酸卡巴拉汀有关物质的含量均小于1%,详见表1。

表1 重酒石酸卡巴拉汀含量及
有关物质测定结果(% $n = 3$)

Tab 1 Results of content and related
substances of rivastigmine

批号 (Lot No.)	含量 (contents)	有关物质 (related substances)
091101	99.26	0.15
091102	99.63	0.21
091201	99.43	0.19

3 讨论

3.1 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器对本品进行多波长检测,观察其紫外吸收光谱。重酒石酸卡巴拉汀的吸收度在 235 ~ 199 nm 间呈由小至大的上升趋势,其中波长 199 nm 为末端吸收,溶剂和辅料干扰大;当选择 214 nm 作为检测波长时,重酒石酸卡巴拉汀及杂质均有较好的响应,并达到良好分离,故选用 214 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择 国内王芳侠等^[10]报道过重酒石酸卡巴拉汀片的含量测定方法,其流动相为磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 1.56 g 和辛烷磺酸钠 2.16 g,加水 1000 mL 溶解,用磷酸调节 pH 至 4.0) - 乙腈(70:30)。笔者考虑到其中所用的离子对试剂辛烷磺酸钠和乙腈价格昂贵,而且用此方法测定重酒石酸卡巴拉汀胶囊含量时主峰与杂质峰分离不够理想,主峰还有拖尾现象。因此,本实验在王芳侠等报道方法的基础上对其色谱条件进行了筛选和优化,最终选定甲醇 - 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液(58:42,用磷酸调节 pH 至 8.45)作为流动相,结果主峰与杂质峰分离良好。采用该色谱条件,不仅减少了离子对试剂对柱子的损伤,且大大节约了成本。

3.3 流动相 pH 的选择 重酒石酸卡巴拉汀结构中含胺基,其保留时间和峰形受流动相 pH 的影响较大,随着 pH 的增大,能显著提高主峰与杂质的分离效果及柱效,经筛选最终确定 pH 为 8.45。

3.4 色谱柱的选择 试验中选择了 3 种不同的色谱柱,结果表明 Waters XTerra RP C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm),Hypersil BDS C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm),Agilent ZORBAX Extend C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm),均可用于本品的含量测定。本试验所用的流动相 pH 为 8.45,以上 3 种色谱柱均为耐酸耐碱色谱柱,但 Waters XTerra RP C₁₈ 和 Agilent ZORBAX Extend C₁₈ 色谱柱的 pH 耐受范围较 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱更宽些,如果长时间使用更推荐选用 Waters XTerra RP C₁₈ 和 Agilent ZOR - BAX Extend C₁₈ 色谱柱。

4 结论

本文建立的反相 HPLC 方法,简便灵敏,专属性强,精密度高,可用于重酒石酸卡巴拉汀胶囊的质量

控制。

参考文献

- XU Zhe(许哲),ZHOU Ning(周宁),XU Xu(许旭) *et al.* Enantioseparation of rivastigmine by high performance liquid chromatograph using vancomycin chiral stationary phase(使用大环糖肽抗生素建固定相高效液相色谱法直接拆分卡巴拉汀). *Chin J Anal Chem*(分析化学研究简报) 2007 35(7):1043
- WANG Yin - hua(王荫华),CHEN Qing - tang(陈清棠),ZHANG Zhen - xin(张振馨) *et al.* The treatment by using rivastigmine for patients with Alzheimer disease: results of a multi-center randomized open - labeled controlled clinical trial(卡巴拉汀治疗阿尔茨海默病患者的临床研究). *Chin J Neurol*(中华神经科杂志) 2001 34(4):210
- MAO Jie - ping(毛洁萍),YANG - Xin - ling(杨新玲),JIANG Yu - ping(蒋雨平). Transdermal patch of cholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease(胆碱酯酶抑制剂的贴皮制剂治疗阿尔茨海默病). *Chin J Clin Neurosci*(中国临床神经科学) 2009 17(1):86
- HE Pei - hong(和培红),GUO Dai - hong(郭代红). Assessment of clinical efficacy and safety of rivastigmine(利斯的明的临床研究与安全评价). *ADRJ*(药物不良反应杂志) 2004 1(3):170
- LONG Xiang - jun(龙湘俊),LI Meng - ran(李梦然). Progress in the synthesis of Rivastigmine(酒石酸卡巴拉汀的合成研究进展). *Central South Pharm*(中南药学) 2006 4(5):369
- LIU Jie(刘洁). Novartis Exelon approved as first - line treatment of Parkinson disease with dementia(诺华 Exelon 获批作为一线治疗帕金森病后痴呆). *Med Econ News*(医药经济报) 2006 - 7 - 8
- TAN Yu - yan(谭玉燕),CHEN Sheng - di(陈生弟). The clinical features of Parkinson's dementia and progress in the treatment(帕金森痴呆的临床特征及治疗进展). *Chin J Neurol*(中华神经科杂志) 2006 39(6):413
- Emre M ,Aarsland D ,Albanese A *et al.* Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2004 351:2509
- HUANG Tao - min(黄滔敏),CHEN Nian - zu(陈念祖),DUAN Geng - li(段更利). Determination of dissolution of rivastigmine by reverse - phase high performance liquid chromatograph(反相高效液相色谱法测定利斯的明胶囊的溶出度). *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志) 2007 26(2):123
- WANG Fang - xia(王芳侠),CHEN Zan - min(陈赞民). Determination of rivastigmine hydrogen tartrate in the tablets by HPLC method(HPLC 法测定重酒石酸卡巴拉汀片含量). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志) 2008 17(19):1700

(本文于 2010 年 8 月 23 日收到)