

# RP-HPLC法测定盐酸氟桂利嗪含量和有关物质\*

石杰<sup>1</sup>, 王兴辉<sup>1</sup>, 闻京伟<sup>2</sup>, 吴家锴<sup>1</sup>

(1. 郑州大学化学系, 郑州 450052 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

**摘要** 目的: 建立 HPLC 测定盐酸氟桂利嗪含量和有关物质的方法。方法: 色谱柱为 Diamonsial C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢铵 (0.1% 三乙胺, 磷酸调 pH 至 3.0) (66:34) 为流动相, 柱温 30℃, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm。结果: 此方法在 20~400 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好,  $r=0.9999$ , 最低检测量 10 ng。结论: 本方法快速、灵敏, 专属性强, 适用于盐酸氟桂利嗪含量及其有关物质的测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 盐酸氟桂利嗪; 含量; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)10-1685-04

## RP-HPLC determination of flunarizine hydrochloride and its related substance\*

SHI Jie<sup>1</sup>, WANG Xing-hui<sup>1</sup>, WEN Jing-wei<sup>2</sup>, WU Jia-kai<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry Zhengzhou University Zhengzhou 450052 China 2. Henan Institute for Drug Control Zhengzhou 450003 China)

**Abstract Objective** To establish an RP-HPLC method for determination of flunarizine hydrochloride and its related substance. **Method** Diamonsial<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted with the mobile phase of methanol-ammonium dihydrogen phosphate (0.02 mol·L<sup>-1</sup>, include 0.1% triethylamine adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) (66:34) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 254 nm. **Results** The calibration curve was linear in range of 20~400 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9999$ ). The limit of detection was 10 ng. **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive and can control the quality of the preparation effectively.

**Key words** HPLC; flunarizine hydrochloride; content; related substance

盐酸氟桂利嗪 (flunarizine hydrochloride) 为非竞争性二苯哌嗪类钙离子通道抑制剂, 可以抑制 Ca<sup>2+</sup> 内流, 从而使血管扩张, 尤其对脑血管有选择性作用, 临床上用于脑血管灌注不足的疾病<sup>[1]</sup>。2005 年版中国药典<sup>[2]</sup> 采用非水滴定法测定其含量, 由于其滴定过程中采用醋酸汞试液, 对环境 and 人体均不利。柳晓秦<sup>[3]</sup> 采用醇中碱中和滴定法避免醋酸汞试液的使用, 减少汞污染, 结果满意。至目前, 未曾见到国内外采用高效液相色谱法测定盐酸氟桂利嗪含量。本文拟采用高效液相色谱法测定其含量及有关物质, 测定方法快速、灵敏, 专属性强, 结果准确。

### 1 仪器与试剂

美国 Waters-Allice 2695 高效液相色谱系统;

Waters 2996 PDA 检测器; Empower 工作站。

盐酸氟桂利嗪对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 99.9%); 盐酸氟桂利嗪 3 批 (郑州瑞康制药有限公司, 批号为 070805, 070808, 070811); 甲醇为色谱纯 (Merck), 其余试剂为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱: Diamonsial C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢铵 (0.2% 三乙胺, 磷酸调 pH 至 3.0) (66:34); 柱温: 30℃, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm。进样量为 20 μL。色谱图见图 1-A。

在上述的色谱条件下, 盐酸氟桂利嗪的保留时

\* 河南省科技攻关项目 (0496430006)

第一作者 Tel: (0371) 66659218 E-mail: shijie@zzu.edu.cn

间为 8 min, 理论塔板数按盐酸氟桂利嗪峰计算大于 3000。

**2.2 储备液制备** 精密称取盐酸氟桂利嗪对照品 50 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 25 mL, 70 kHz 超声 5 min, 溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密称取盐酸氟桂利嗪原料 (99.5%) 50 mg 同法配制, 作为样品储备液。

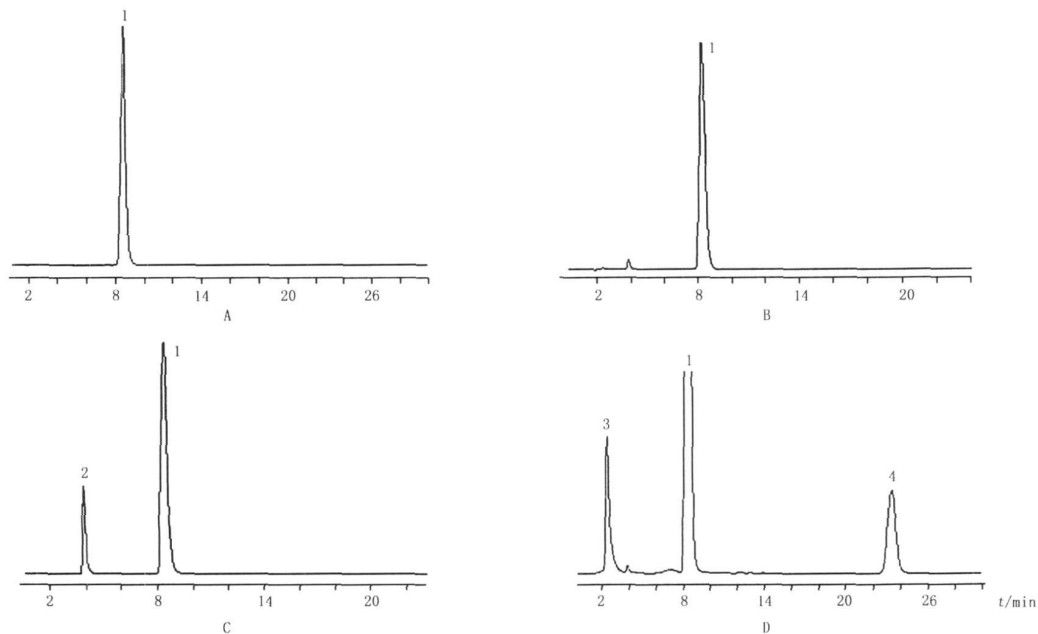


图 1 盐酸氟桂利嗪有关物质分离色谱图

Fig 1 Chromatograms of flunarizine hydrochloride related substances

A. 盐酸氟桂利嗪 (flunarizine hydrochloride) B. 盐酸氟桂利嗪粗品 (raw material) C. 母液回收品 (residual solution) D. 合成原料与样品 (reactants and flunarizine)

1. 盐酸氟桂利嗪 (flunarizine hydrochloride) 2. 母液回收杂质 (degradation of residual solution) 3. 肉桂基哌嗪 (cinnamylpiperazine) 4. 二氟苯基氯甲烷 (difluorobenzyl chloride)

**3.2 降解产物的分离** 分别量取 5 份盐酸氟桂利嗪储备液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 其中 3 份分别加入  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 5 mL,  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 5 mL, 3% 双氧水 5 mL, 破坏 15 h 后中和, 加流动相稀释至刻度。另外 2 份, 分别置 3000 k 光线下放置 48 h, 100 °C 水浴中破坏 4 h 后流动相稀释至刻度。按“有关物质检查”项下方法检测, 结果见图 2。用色谱仪二极管阵列检测器检测色谱峰纯度符合要求; 试验表明各种条件下降解产物与盐酸氟桂利嗪分离良好, 该色谱条件适宜进行有关物质的测定。

#### 4 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢铵 (磷酸调 pH 至 3.0) 溶液稀释至刻度, 摇匀, 分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 以峰面积  $A$  为纵坐标, 以浓度  $C$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程:

### 3 专属性

**3.1 有关物质的分离** 分别取盐酸氟桂利嗪、盐酸氟桂利嗪粗品、盐酸氟桂利嗪母液回收品、原料肉桂基哌嗪、二氟苯基氯甲烷和样品混合的甲醇溶液, 在上述色谱条件下进样, 色谱图见图 1, 各有关物质分离良好。

$A = 565.8C - 30.82 \quad r = 0.9999$

结果表明在  $20 \sim 400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内, 盐酸氟桂利嗪峰面积与浓度呈良好线性关系。

#### 5 精密性及稳定性

取“线性关系考察”项下浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液连续进样 6 次, 其结果的 RSD 为 0.13%。将此溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 20, 24 h 测定, 其结果的 RSD 为 0.95%, 表明溶液在 24 h 内稳定。

#### 6 检测限及定量限

当信噪比  $SN = 10$  时, 盐酸氟桂利嗪的定量限质量浓度为  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 按信噪比  $SN = 3$  计算, 最低检测限质量浓度为  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最低检出量为 10 ng。

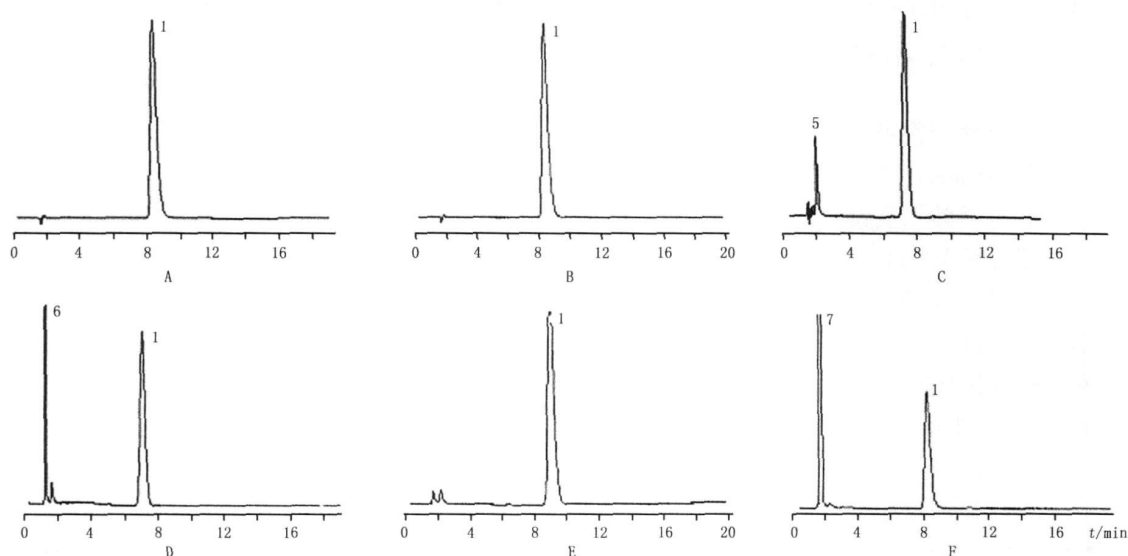


图 2 盐酸氟桂利嗪降解产物分离图

Fig 2 Chromatograms of degradation products of flunarizine hydrochloride under light heat acid base and oxidative condition

A. 盐酸氟桂利嗪 ( flunarizine hydrochloride ) B. 光照破坏 ( destroyed by strong light ) C. 高温破坏 ( destroyed by heating ) D. 酸破坏 ( destroyed by acid ) E. 碱破坏 ( destroyed by alkali ) F. 氧化破坏 ( destroyed by oxidation )

1 盐酸氟桂利嗪 ( flunarizine hydrochloride ) 5. 高温降解物 ( products under heat ) 6 酸降解物 ( products in acid medium ) 7 氧化溶剂峰 ( oxidation medium peak )

## 7 回收率试验

取含量为 99.5% 的样品适量, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分别精密加入盐酸氟桂利嗪对照品 16 20 24 mg 按“含量测定”项下供试品溶液制备方法制备成相当于测试浓度的 80%, 100%, 120% 的溶液, 按上述色谱条件测定。根据测得盐酸氟桂利嗪量计算, 3 个浓度的平均回收率 (  $n = 3$  ) 分别为 99.5%, 99.8%, 99.6%; RSD 分别为 0.56%, 0.73%, 0.87%。

## 8 含量测定

精密量取对照品储备液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢铵 (磷酸调 pH 至 3.0) 溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液; 精密量取样品储备液 5 mL, 同法配制, 作为供试品溶液。取对照品溶液和供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 分别注入高效液相色谱仪, 以外标法计算盐酸氟桂利嗪含量, 3 批原料及母液回收品的检测结果见表 1。

## 9 有关物质测定

精密量取“2.2”项下样品储备液作为供试品溶液, 精密量取此供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液; 取对照溶液和供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 分别注入高效液相色谱仪, 记录色谱图至主成分保留时间的 3 倍。测定结果见表 1。

表 1 含量及有关物质测定结果 (%,  $n = 3$ )

Tab 1 Results of content and the related substances in samples

| 批号<br>(Lot<br>No.)           | 含量 (content) |                     | 有关物质 (related substance) |                     |
|------------------------------|--------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
|                              | (Ch. P) [2]  | 本法<br>(this method) | (Ch. P) [2]              | 本法<br>(this method) |
| 070805                       | 99.5 (0.2)   | 99.4 (0.1)          | 0.05                     | 0.08                |
| 070808                       | 99.5 (0.1)   | 99.5 (0.1)          | 0.04                     | 0.04                |
| 070811                       | 99.4 (0.1)   | 99.6 (0.2)          | 0.11                     | 0.09                |
| 母液回收品<br>(residual solution) | 98.3 (0.1)   | 90.0 (0.2)          | 9.72                     | 9.66                |

注 (note): 括号内为 RSD (RSD in the parentheses %)

## 10 讨论

**10.1** 2005 年版中国药典<sup>[2]</sup>采用非水滴定法测定盐酸氟桂利嗪含量, 当原料中同时存在含有碱性哌嗪基团的杂质时, 测定结果将不能真实反映盐酸氟桂利嗪的含量。本试验将母液回收品同时采用 2 种方法测定含量, 经比较, 结果相差 8.34%。高效液相色谱法因能有效分离样品, 测定专属性强, 样品用量少, 结果准确, 更适合于盐酸氟桂利嗪原料含量的测定。

**10.2** 在该反相高效液相色谱系统中影响色谱保留值和分离选择性的因素为: 流动相 pH 及有机相比例。为提高分离组分的  $k$  值, 确保样品完全离子化, 同时为防止碱性样品在分离过程中产生拖尾, 以

磷酸二氢铵为缓冲剂, 调节 pH 为 3.0 该 pH 在此缓冲剂的有效缓冲范围内, 流动相 pH 波动小, 易于调节。

**10.3** 该样品降解产物极性较大, 容易与溶剂同时出峰。为排除溶剂峰干扰, 保证有关物质检测准确, 最终调节甲醇与磷酸二氢铵缓冲液比例为 66:34 使主成分保留时间为 8 min, 肉桂基哌嗪在 2 min 左右出峰, 确保不受溶剂峰干扰。

**10.4** 盐酸氟桂利嗪在高温和酸性条件下不稳定, 将继续对其降解物及母液回收品中的杂质进行结构确证, 为有关物质准确定量提供参照物。

## 参考文献

- 1 CHEN Ya-feng(陈亚峰), XIN Chun-lan(辛春兰), WEN Zhuo-hui(温茁会). Advances in clinical applications of flunarizine hydrochloride clinical use(盐酸氟桂利嗪的临床应用进展). *Evaluation of Drug Use in China* (中国医院用药评价与分析), 2001, 1(1): 55
- 2 ChP (中国药典). 2005 Vol II (二部): 547
- 3 LIU Xiao-qin(柳晓秦). The determination of flunarizine hydrochloride content by alkaline titration in ethanol(醇中碱滴定测定盐酸氟桂利嗪含量). *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2005, 20(4): 150

(本文于 2008 年 10 月 8 日收到)

## 曾明主任等二人赴日本参加第 15 届 CHRO2009 国际会议

2009 年 9 月 2 日至 2009 年 9 月 5 日, 中国药品生物制品检定所细菌二室主任曾明研究员和课题组成员喻钢应邀参加了在日本新潟举办的第 15 届空肠弯曲菌和幽门螺杆菌相关致病菌 (CHRO2009) 国际会议。会议共邀请了来自美国、澳大利亚、英国、加拿大、韩国、中国、波兰、西班牙以及日本等 40 个国家、地区和国际组织约 500 余人参加。

CHRO 首次会议于 1981 年在英国雷 举办, 之后每两年举办一次。CHRO2009 会议藉新潟大学成立 60 周年庆典之际定于 2009 年 9 月 2-5 日在日本新潟举办。会议旨在促进对弯曲杆菌和幽门螺杆菌及其相关疾病的研究。空肠弯曲菌和幽门螺杆菌都归属于螺旋杆菌属。前者潜伏于鸡肉中而引起食物中毒, 最近的研究表明其分离的频率显著增加。幽门螺杆菌是导致胃炎和十二指肠溃疡的主要病因, 是导致胃癌发生的潜在细菌性致病因子。1982 年, 澳大利亚学者 Barry Marshal 和 Robin Warren 发现了幽门螺杆菌, 并证明该细菌感染胃部会导致胃炎、胃溃疡和十二指肠溃疡。这一成果打破了当时流行的医学教条(即胃炎是由于精神承受过大压力所致), 并最终于 20 多年后帮助两位科学家赢得了 2005 年诺贝尔生理医学奖。Marshal 和 Warren 先驱性的发现, 使胃溃疡从原先人们眼中的慢性病变成了一种“采用短疗程的抗生素和酸分泌抑制剂就可治愈的疾病”。人是这种病菌的唯一自然宿主, 大量研究表明, 超过 90% 的十二指肠溃疡和 80% 左右的胃溃疡都是由幽门螺杆菌感染所导致的。

本次大会内容分为空肠弯曲菌和幽门螺杆菌两大类, 其中包括流行病学 (Epidemiology)、毒力与遗传学 (Virulence and Genetics)、分类学 (Taxonomy)、药物抗性 (Drug Resistance)、疾病预防与控制 (Prevention and Control) 以及动物模型与治疗 (Animal Models and Therapy) 六大方面的内容。会议在日本国家肿瘤研究中心的 Ushijima 教授一项题为“幽门螺杆菌感染所诱导的异常 DNA 甲基化作为致癌的主要途径”的报告中拉开序幕。

此次会议有幸邀请到 2005 年诺贝尔生理医学奖的获得者 Barry Marshal 进行题为“幽门螺杆菌与胃癌的关系”的专题讲座。专题中他还详细阐述了人类感染幽门螺杆菌后该菌如何在胃内定植并随后引发慢性胃炎、十二指肠溃疡以及导致胃癌的全过程, 介绍了胃癌与年龄的关系以及运用质量生活年限 (Quality Adjusted Life Year, QALY) 的概念阐述治疗幽门螺杆菌感染的价值。报告最后, Marshal 阐述了目前治疗幽门螺杆菌的传统三联或四联疗法 (抗生素、铋剂、抑酸药物) 存在副作用大、价格昂贵、易产生耐药性等缺点, 并指出目前采用益生菌以及天然食用植物治疗幽门螺杆菌感染的应用前景, 这正好契合我所细菌二室目前正在进行的研究课题。

通过此次会议交流, 充分了解目前幽门螺杆菌相关的前沿动态和研究设计方案。曾明研究员与有关专家展开交流与合作, 并达成共识, 实现资源共享。会议中还与诺贝尔生理医学奖获得者 Marshal 就其目前从事的研究内容以及其它与幽门螺杆菌相关的问题展开交流, 获得有益的启发。

益生菌防治幽门螺杆菌尚处于起步阶段, 日本东海医科大学 Koga 教授及其课题组在益生菌预防和治疗幽门螺杆菌方面的研究走在世界前列。其率先研究并证实益生菌菌株 LG21 对成人具有减轻胃部炎症的作用, 降低患胃癌的风险。除此之外还证实该菌株有预防儿童感染幽门螺杆菌的作用。因此, 该研究成果为本课题后续研究提振了信心, 动物实验方案设计对本课题后续动物实验中动物的分组、剂量、对照等方面提供了较大的参考价值。

摘自中国药品生物制品检定所网站: <http://www.nicbbp.org.cn>