

• 实验研究 •

## HPLC法测定富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚原料药及其有关物质的含量

王旭光, 魏 君, 娄艳红, 何新华, 仲伯华, 谢剑炜  
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**[摘要]** 目的: 建立测定富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚原料药及其有关物质含量的高效液相色谱法。方法: 色谱柱为 Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: A为甲醇, B为 20mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液 (pH 5.0), 采用梯度洗脱 (以 A 相比例表示: 0<sup>→</sup> 10min 55% ~ 75%; 10<sup>→</sup> 50min 75%); 流速 1.00mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 206nm。结果: 富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚与其 9 个中间体达到较好的分离。结论: 该方法专属性好, 简便、快速, 能有效检出富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚原料药中的有关物质。

**[关键词]** 富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚; 高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R927.2 R971.92 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2011)08-0748-04

## HPLC determination of contents of *R, R'*-penheclidine fumarate substance and the related impurities

WANG Xu-guang WEI Jun LOU Yan-hong HE Xin-hua ZHONG Bo-hua XIE Jian-wei  
(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850 China)

**[Abstract]** **Objectives** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of contents of *R, R'*-penheclidine fumarate substance and the related impurities. **Methods** The Ultimate XB-C<sub>18</sub> column (250mm × 4.6mm, 5μm) was used. The mobile phase consisted of methanol (A) and 20mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 5.0, B), and gradient elution was performed (percentage of A: 0<sup>→</sup> 10 min 55% ~ 75%; 10<sup>→</sup> 50 min 75%). The flow rate was 1.00mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 206 nm. **Results** The *R, R'*-penheclidine fumarate substance and the 9 intermediates were separated. **Conclusion** We have established the method for determination of contents of *R, R'*-penheclidine fumarate substance and the related impurities with specificity, simplicity, rapidity and suitability.

**[Key words]** *R, R'*-penheclidine fumarate; high performance liquid chromatography (HPLC); content determination

戊乙奎醚是一种具有新结构类型的并有立体选择性作用的抗胆碱能新药, 它的分子中含有 2 个手性碳, 具有 4 个光学异构体, 试验证明戊乙奎醚的对映异构体之间药效差别较大, 最强的 *RR* 与最弱的 *SS* 之间, 药效相差 1 000 倍以上<sup>[1]</sup>。由于富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚的合成路线比较复杂, 涉及中间体

较多, 因此本实验建立了 RPHPLC 法分离富马酸(*R, R'*)-戊乙奎醚本品及其有关物质, 并对其含量进行了测定。

### 材 料

Agilent 1200 二元梯度泵高效液相色谱仪 (附二极管阵列检测器, Agilent Chem station 化学工作站, 美国 Agilent 公司); 酸度计 (Radiometer analytical PHM 240 法国); XP205 电子天平 (Mettler Toledo 瑞士); DL203 电子天平 (Mettler Toledo 瑞士); 8453 型紫外-可见分光光度计 (Hewlett Pack-

**[作者简介]** 王旭光, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。联系电话: (010) 66930630 E-mail xuguang\_wang521@sina.com

**[通讯作者]** 谢剑炜, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药物分析。联系电话: (010) 66931649 E-mail xiejw@imiac.cn

and, 美国)。

富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚对照品 (批号: 081106, 081108, 081109) 及中间体由军事医学科学院毒物药物研究所合成室提供。甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 其余试剂均为国产分析纯; 实验用水为纯化水。

## 方法与结果

### 1 检测波长的确定

配制一定浓度的富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚甲醇溶液, 采用紫外-可见分光光度计测定其紫外吸收光谱, 确定最大吸收波长为 206 nm; 同时本实验也采用高效液相色谱仪的二极管阵列紫外检测器进行全波长扫描, 所得结果与上述一致。

### 2 RP-HPLC 条件

富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚属于小分子化合物, 极性较弱, 因此选用反相分配体系, 采用  $C_{18}$  作为固定相。色谱柱: Ultimate XB- $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相 A 为  $CH_3OH$ , 流动相 B 为  $20 mmol \cdot L^{-1} KH_2PO_4$  (pH 5.0); 梯度洗脱 (以流动相 A 比例表示:  $0 \rightarrow 10 min$  55% ~ 75%;  $10 \rightarrow 50 min$  75%); 柱温: 25  $^{\circ}C$ ; 流速:  $1.00 mL \cdot min^{-1}$ ; 检测器: DAD 检测器; 检测波长: 206 nm; 进样体积: 20  $\mu$ L。分离色谱图见图 1。

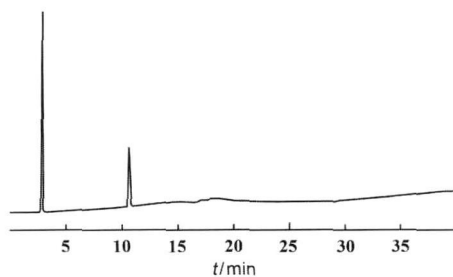
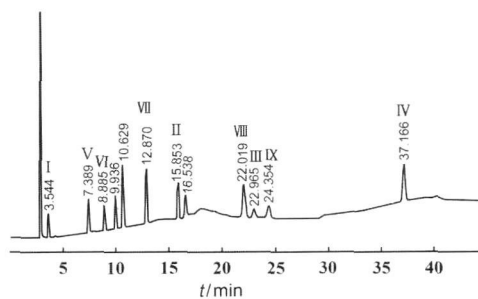


图 1 富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚的色谱图

### 3 方法学考察

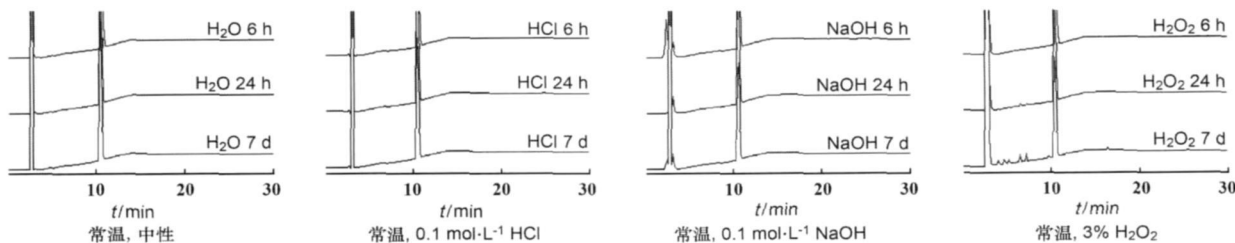
**3.1 方法专属性试验** 称取中间体 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, K, SR 型光学异构体及样品 (批号: 081106) 各 0.32, 1.02, 1.36, 2.11, 0.78, 0.75, 0.89, 2.05, 2.06, 2.31, 4.41 mg 将其置同一 5 mL 的量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 进样分析, 确定各成分的保留时间, 考察各成分色谱峰之间的分离度。结果表明, 在上述色谱条件下, 样品与中间体有较好的分离度, 结果见图 2。



富马酸 (2.91 min); SR 型光学异构体 (9.93 min); 样品 (10.62 min); 中间体 IX 的降解产物 (16.53 min)

图 2 富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚与中间体的分离色谱图

**3.2 破坏性试验** 用强酸 ( $0.1 mol \cdot L^{-1} HCl$  溶液)、强碱 ( $0.1 mol \cdot L^{-1} NaOH$  溶液)、和 3%  $H_2O_2$  溶液配置一定浓度的富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚溶液, 分装在安瓿瓶中, 分别放置在常温和高温  $80^{\circ}C$  条件下, 按不同时间段取样, 采用上述色谱条件进样分析, 结果表明, 富马酸 ( $R, R'$ )-戊乙奎醚在中性条件下较稳定, 在强酸、强碱、氧化条件下不稳定, 并且在上述条件下产生的降解产物与本药物能达到较好分离, 不干扰本品的测定, 表明所建方法专属性好, 结果见图 3。



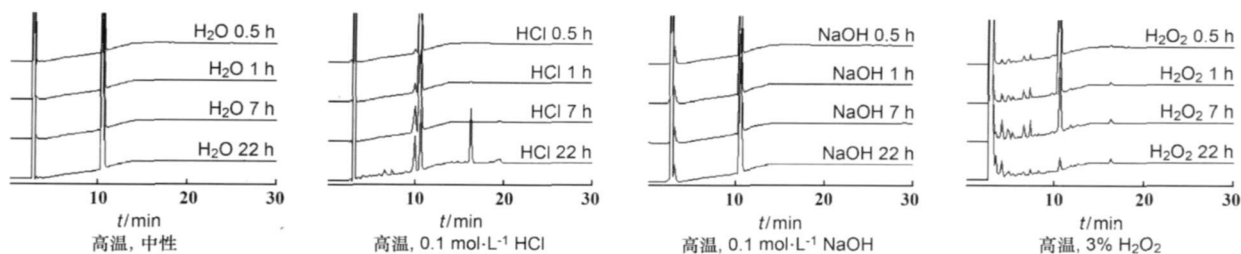


图 3 富马酸 (R,R')-戊乙奎醚破坏性试验色谱图

**3.3 线性关系** 精密称取本品对照品 25.17 mg 将其置 25 mL 量瓶中, 加入流动相超声溶解, 定容至刻度, 其浓度为  $1006.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 分别取该溶液 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10 mL, 将其置于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 其浓度分别为 10.07, 50.34, 100.1, 302.0, 503.4, 704.8,  $1007 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 进样分析, 记录色谱图, 以富马酸-(R,R')-戊乙奎醚的峰面积 (A) 对溶液浓度 (C,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行线性拟合, 得到回归方程:  $A = 21.22C + 34.09 (r = 0.99997)$ 。结果表明, 富马酸 (R,R')-戊乙奎醚在浓度 10.07 ~  $1007 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

**3.4 精密度试验** 取“3.3”项高、中、低 3 个浓度连续进样 5 次, 测定其峰面积并计算, 结果表明, 富

马酸 (R,R')-戊乙奎醚峰面积的 RSD 均 < 2%, 见表 1, 表明样品进样精密度良好。

表 1 富马酸 (R,R')-戊乙奎醚精密度

浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	
	日内	日间
302.0	0.02	0.35
503.4	0.02	0.47
704.8	0.03	0.37

**3.5 各中间体的检出限与定量限** 分别配制一定浓度的合成中间体溶液, 将其逐级稀释, 进样分析, 记录色谱图, 以基线噪音的 3 倍为检出限, 以基线的 10 倍为定量限, 结果见表 2。

表 2 富马酸 (R,R')-戊乙奎醚中间体的检出限与定量限

中间体	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
LOD / ng	17.6	5.50	5.70	10.2	7.90	9.50	8.60	8.60	2.60
LOQ / ng	35.5	11.0	11.4	20.4	15.8	19.0	17.2	10.2	13.0

**4 样品有关物质检查**

分别称取 3 批样品与对照品约 10 mg 分置不同的 10 mL 量瓶, 用流动相溶解并定容至刻度, 然后稀释 1 倍作为供试品溶液, 进样分析, 记录色谱图, 结果表明 3 批样品及对照品均未检出中间体, 只检出 SR 型光学异构体, 纯度均在 99.8% 以上。

**5 样品含量测定**

分别称取 3 批样品约 10 mg 置不同的 10 mL 量瓶, 用流动相溶解并定容至刻度, 然后稀释 1 倍作为供试品溶液; 另取对照品 10 mg 同法配制, 作为对照品溶液。分别取对照品溶液及供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 进样分析, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 即得 3 批样品的含量, 结果见表 3。

表 3 样品含量的测定结果

批号	RP-HPLC 法
精制品	100.0%
081106	99.5%
081108	100.5%
081109	100.9%

**讨 论**

由于本药物的最大紫外吸收波长为末端吸收 206 nm, 同时适合于各个相关杂质的测定, 因此不考虑杂质的最大吸收波长, 最后确定该 RP-HPLC 法的检测波长为 206 nm。

(下转第 760 页)

治疗前应用一段时间钙剂可能会明显减少治疗后早期不良反应。相对应, 如果患者治疗后立即补充钙和维生素 D, 理论上也可预防和减轻术后与血钙降低相关不良反应的发生率。本组病例在治疗前曾自行或在医生指导下在治疗前接受钙剂至少  $600 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \pm \text{VD} 400 \text{ IU}$  时间  $\geq 1$  个月。可能是导致头痛、肌肉痛、关节痛等不良反应发生率降低的原因。其每日服用钙剂剂量及服用时间只是临床医生根据自己经验制定。样本量偏小, 可以起到借鉴作用, 尚不能作为一般标准用于指导方案, 应进一步总结。

根据患者治疗前是否行抗骨吸收药物治疗进行比较, 发现治疗前曾行抗骨吸收药物治疗患者, 在治疗后头痛、肌肉痛、关节痛症状明显低于未服用抗骨吸收药物组, 发热、流感样症状比较, 两组无明显差异。唑来膦酸其药理作用与其他抗骨吸收药物相似, 抑制破骨细胞的活性, 降低骨转换, 其不良反应与其他双膦酸盐药物类似, 治疗前患者如果已经应用过此类药物, 其不良反应也会相应减少。说明, 在治疗前应用一段时间钙剂或应用抗骨吸收药物可能会明显减少治疗后早期不良反应。

本组病例中应用的骨吸收抑制剂药物包括口服双膦酸盐药物、SERM (盐酸雷洛昔芬)、鲑鱼降钙素类药物时间  $\geq 1$  个月。可能是导致不良方法发生率降低的原因。但本研究样本量小, 没有比较不同骨吸收抑制剂药物之间在不良反应发生率是否具有差异。本结论尚需进一步总结及明确。

综上所述, 唑来膦酸治疗后 30 d 内未见严重不良反应, 发热、流感样症状、肌肉痛、关节痛、头痛等不良反应发生常见, 多为一过性, 可能与骨密度及是

否合并骨折无关, 治疗前应用钙剂及骨吸收抑制可能会显著降低肌肉痛、关节痛、头痛等不良反应发生率, 可能还有其他因素导致不良反应发生率较高, 本研究样本量较少, 尚需进一步收集药物不良反应病例, 总结规律。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 孙瑞台. 骨质疏松的运动疗法应用及研究进展 [ J ]. 国外医学·物理学与康复学分册, 1994 14 (4): 149-151
- [ 2 ] DENNISON E, COOPER C. Epidemiology of osteoporotic fractures [ J ]. *Hum Res* 2000 54 (Suppl) 1: 58-63
- [ 3 ] COMPTON JE, SEEMAN E. Compliance with osteoporosis therapy is the weakest link [ J ]. *Lancet* 2006, 368 (9540): 973-974.
- [ 4 ] SIRIS ES, HARRIS ST, ROSEN CJ, et al. Adherence to bisphosphonate therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases [ J ]. *Mayo Clin Proc*, 2006, 81 (8): 1013-1022
- [ 5 ] BLACK DM, DELMAS PD, EASTELL R, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis [ J ]. *N Engl J Med*, 2007, 356 (18): 1809-1822
- [ 6 ] LYLES KW, COLÓN-EMER IC, MAGAZNER JS, et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture [ J ]. *N Engl J Med*, 2007, 357 (18): 1799-1809
- [ 7 ] DUNFORD JE, THOMPSON K, COXON FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase *in vitro* and inhibition of bone resorption *in vivo* by nitrogen-containing bisphosphonates [ J ]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296 (2): 235-242
- [ 8 ] GREEN R, MÜLLER K, JÄGGIKA, et al. Preclinical pharmacology of CGP 42446 a new, potent heterocyclic bisphosphonate compound [ J ]. *J Bone Miner Res*, 1994 9 (5): 745-751.

编辑: 况扶华 接受日期: 2011-03-14

(上接第 750 页)

在 RP-HPLC 方法考察实验中, 分别考察了不同 pH 值, 不同梯度洗脱条件等对测定结果的影响, 结果表明在其他条件下中间体 VIII 与 IX 不能达到完全分离, 在本实验所建立的色谱条件下所有中间体可达到很好的分离。

建立的 RP-HPLC 法在  $10 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好, 并且高、中、低 3 种浓度的日内与日间精密度均符合要求, 重现性好。

原料药在中性条件下稳定, 在强酸、强碱和氧化条件下均不稳定, 并且在上述条件下所产生的降解

产物与本药物能达到较好的分离, 从而进一步证明了该 RP-HPLC 法专属性较好。

该方法结果可靠, 重现性好, 可用于该化合物的定性及定量分析。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 薛明, 阮金秀, 张振清, 等. HPLC 法检测盐酸乙二奎醚 R 型异构体经小鼠尿排泄的方法学研究 [ J ]. 中国临床药理学与治疗学, 2003 8 (4): 425-427.

编辑: 周卓 接受日期: 2010-10-20