

盐酸法舒地尔中杂质和二聚体的 HPLC 法测定

郝全文, 孙国祥*, 殷瑞娟, 豆小文

沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 采用高效液相色谱法建立盐酸法舒地尔中杂质检查和二聚体的测定。方法 用 Venusil XBP C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水 (50:50, 含 10 mmol/L 庚烷磺酸钠和 5 mmol/L 磷酸二氢钠, 用磷酸调 pH 3.0) 为流动相; 紫外检测波长为 275 nm; 进样量 10 μL; 体积流量 1.0 mL/min。采用自身对照法测定杂质, 标准曲线法测定二聚体。结果 盐酸法舒地尔中 4 个单一杂质质量的均值不大于 1.34%, 之和的均值不大于 1.38%。盐酸法舒地尔二聚体在 0.63~41.60 μg/mL 线性关系良好, $r=0.999\ 9$; 平均回收率为 99.5%, RSD 值为 1.3%。结论 本方法简便、准确、专属性强, 可作为盐酸法舒地尔中杂质检查及二聚体的测定方法。

关键词: 盐酸法舒地尔; 杂质; 二聚体; 高效液相色谱

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)004-0538-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.017

Determination of impurities and dimers in fasudil hydrochloride by HPLC

HAO Quan-wen, SUN Guo-xiang, YIN Rui-juan, DOU Xiao-wen

School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To develop an RP-HPLC method for determination of the impurities and dimers in fasudil hydrochloride. **Methods** Venusil XBP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was composed of methanol-H₂O (50:50, including 10 mmol/L sodium heptane-1-sulphonate and 5 mmol/L sodium dihydrogen phosphate, pH 3.0). The flow rate was 1.0 mL/min, and the determination wavelength was set at 275 nm with the injection volume of 10 μL. The total impurities were determined by the principal self contrast method, at the same time the dimer contents in the sample were determined by standard curve method. **Results** Each and total contents of four impurities in fasudil hydrochloride were below 1.34% and 1.38%. A linearity between peak areas and dimer content was achieved in the range of 0.63—41.60 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), and the average recovery was 99.5%, with an RSD value of 1.3%. **Conclusion** The method is simple, accurate, and sensitive, and could be used for the assay and quality control of impurities and dimers in fasudil hydrochloride.

Key words: fasudil hydrochloride; impurities; dimers; HPLC

盐酸法舒地尔是一种具有广泛药理作用的新型药物, 属于 5-异喹啉磺酰胺衍生物, 对 Rho 激酶有抑制作用, 通过增加肌球蛋白轻链磷酸酶的活性扩张血管, 降低内皮细胞张力, 改善脑组织微循环, 同时可拮抗炎性因子, 保护神经抗凋亡, 促进神经再生^[1-2]。临床应用盐酸法舒地尔有时会发生谷丙转氨酶 (GPT) 和谷草转氨酶 (GPT) 升高, 出现皮疹、排尿困难或多尿、嗝气、呕吐, 并可出现头痛、发热、意识水平下降和呼吸抑制等不良反应, 原因可能与其中的杂质有关。盐酸法舒地尔化学合成过

程中的各种中间体和终产物的类似物都有可能成为其杂质, 从而影响产品质量和药理活性。文献报道采用 RP-HPLC 法和紫外分光光度法建立了盐酸法舒地尔注射液中盐酸法舒地尔的分析^[3-6]。本实验采用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 技术鉴定盐酸法舒地尔中杂质, 并采用自身对照法测定其总量, 同时采用标准曲线法对盐酸法舒地尔二聚体定量, 以期对盐酸法舒地尔的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型液相色谱仪 (配有二极管阵列检

收稿日期: 2013-06-19

作者简介: 郝全文 (1985—), 男 (回族), 吉林省吉林市人, 硕士研究生。E-mail: haoquanwen0813@126.com

*通信作者 孙国祥 (1962—), 男, 辽宁凌源人, 教授, 博士生导师, 主要从事中药指纹学研究。Tel: (024) 23986286 E-mail: gxswyws@163.com

测器、四元低压梯度泵、在线脱气装置、自动进样器)、ChemStation 工作站(Agilent 科技有限公司); Sartorius BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司); ACQUITY 超高效液相色谱仪、Quattro micro API 三重四极杆串联质谱仪、MassLynxTM 4.1 质谱工作站软件(美国 Waters 公司)。

盐酸法舒地尔(自制,批号 20110101、20110102、20110103、20110104); 盐酸法舒地尔二聚体(自制,质量分数为 99.8%); 磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20110706); 甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司,批号 20111228031; 美国 Tedia 天地试剂公司,批号 20111123); 磷酸二氢钠(分析纯,广东汕头市西陇化工厂,批号 040130); 庚烷磺酸钠(色谱纯,山东省禹城市中美色谱产品厂,批号 20110223); 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

用 Venusil XBP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水(50:50, 含 10 mmol/L 庚烷磺酸钠和 5 mmol/L 磷酸二氢钠, 用磷酸调 pH 3.0) 为流动相; 紫外检测波长为 275 nm; 进样量 10 μL; 体积流量 1.0 mL/min。

2.2 UPLC-MS 检测条件

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UplcTM Beh C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 水-甲醇(74:26), 等度洗脱 20 min, 体积流量 0.20 mL/min; 柱温 40 °C; 样品室温度 4 °C; 进样量 20 μL。

2.2.2 质谱条件 离子源: ESI 源; 检测方式: 正负离子同时检测; 扫描方式: 全离子扫描(SCAN); 扫描范围: 100~1 000; 毛细管电压: 3.0 kV(正离子), 2.9 kV(负离子); 锥孔电压: 20 V; 源温度: 110 °C; 去溶剂气: N₂; 去溶剂气温度: 300 °C; 去溶剂气体积流量: 300 L/h; 锥孔气体积流量: 30 L/h。

2.3 溶液的制备

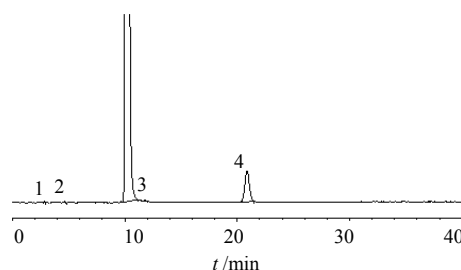
2.3.1 盐酸法舒地尔供试品溶液的制备 取盐酸法舒地尔约 6 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.6 mg/mL 供试品溶液。

2.3.2 盐酸法舒地尔二聚体对照品贮备溶液的制备 取盐酸法舒地尔二聚体对照品约 5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加适量乙腈溶解后, 加流动

相至刻度, 摇匀, 即得 0.104 mg/mL 溶液。

2.4 UPLC-MS 鉴定盐酸法舒地尔中可能的杂质

取盐酸法舒地尔供试品溶液进样 20 μL, 按以上色谱条件测定, 记录色谱图, 见图 1。可见盐酸法舒地尔有 4 个杂质。取盐酸法舒地尔 5.0 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 按以上色谱条件进样 10 μL 测定, 记录 UPLC 图和总离子流色谱图。按相对保留时间顺序, 在 0.088、0.189、1.760、1.978 处分别获得 *m/z* 243.0、171.8、222.9、482.1, 推测其可能的结构分别为 8-氯-异喹啉-5-磺酸、苯磺酸甲酯、5-异喹啉磺酸甲酯和 1,4-二(5-异喹啉磺酰基)-1,4-二氮环庚烷。



1-8-氯-异喹啉-5-磺酸 2-苯磺酸甲酯 3-5-异喹啉磺酸甲酯
4-1,4-二(5-异喹啉磺酰基)-1,4-二氮环庚烷
1-8-chloro-isoquinoline-5-sulfonic acid 2-methyl benzenesulfonate
3-5-isoquinoline sulfonic acid methyl ester 4-1,4-di(5-isoquinolin
sulphonyl)-1,4- diazepine

图1 盐酸法舒地尔及其杂质的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of fasudil hydrochloride and its impurities

2.5 盐酸法舒地尔中杂质检查

2.5.1 供试品溶液的制备 取盐酸法舒地尔样品约 6.0 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 流动相溶解并加至刻度, 摇匀。精密量取 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.5.2 检测限和定量限的测定 取盐酸法舒地尔供试品溶液, 稀释成不同质量浓度, 进样分析。当盐酸法舒地尔质量浓度为 0.36 μg/mL 时, 峰高约为噪音 3 倍(S/N=3), 确定盐酸法舒地尔的检测限(LOD)为 3.6 ng。当盐酸法舒地尔质量浓度为 1.2 μg/mL 时, 峰高约为噪音 10 倍(S/N=10), 确定盐酸法舒地尔的定量限(LOQ)为 12 ng。

2.5.3 精密度试验 精密量取盐酸法舒地尔供试品溶液(批号 20110101) 10 μL, 连续进样 5 次。结果盐酸法舒地尔的峰面积的 RSD 值为 0.7%。

2.5.4 稳定性试验 取盐酸法舒地尔供试品溶液，在制备溶液后的 0、42、84、126、210 min 分别进样 10 μL ，进样分析，结果供试品溶液色谱图中杂质总面积随时间增加变化不大，4 个杂质峰面积总和 RSD 值为 2.2%，表明杂质在供试品溶液中很稳定。

2.5.5 重复性试验 将盐酸法舒地尔供试品溶液（批号 20110101）稀释成 6.0 $\mu\text{g/mL}$ ，进样 10 μL 分析，记录供试液色谱图。重复试验 4 次。4 个杂质总量的 RSD 值均不大于 1.6%，主峰含量均值为 98.19%，RSD 值为 0.03%。

2.5.6 测定 取批号分别为 20110101、20110102、20110103、20110104 盐酸法舒地尔样品约 6.0 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，配制成 600 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液。精密吸取供试品溶液 1.0 mL，置 100 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，即得 6 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。精密吸取各供试品溶液和对照品溶液 10 μL 注入色谱仪分析，记录色谱图。按自身对照法分别计算各杂质的含量和总杂质的含量，结果见表 1，结果盐酸法舒地尔中 4 个单一杂质含量的均值不大于 1.34%，4 个杂质含量之和均值不大于 1.38%。

表 1 盐酸法舒地尔中杂质的测定结果

Table 1 Determination of impurities in fasudil hydrochloride

批 号	8-氯-异喹啉苯磺酸5-异喹啉磺酰基)-1,4-二氮环庚烷/%	5-磺酸/%	甲酯/%	酸甲酯/%	基)-1,4-二氮环庚烷/%
20110101	0.015	0.0061	0.032		1.34
20110102	0.016	0.0031	0.026		1.35
20110103	0.012	0.0031	0.016		1.32
20110104	0.015	0.0075	0.025		1.36

2.6 盐酸法舒地尔中二聚体的测定

2.6.1 系统适用性试验 取盐酸法舒地尔二聚体对照品储备液适量，稀释，精密吸取 10 μL 进样分析，记录色谱图，同时进样供试品溶液和空白溶剂，见图 2，可见二聚体保留时间为 20.6 min，理论塔板数不低于 14 000。

盐酸法舒地尔中杂质和盐酸法舒地尔二聚体对照品在线紫外光谱完全一致，证明该杂质是盐酸法舒地尔二聚体，见图 3。UPLC-MS 也证明其为二聚体。

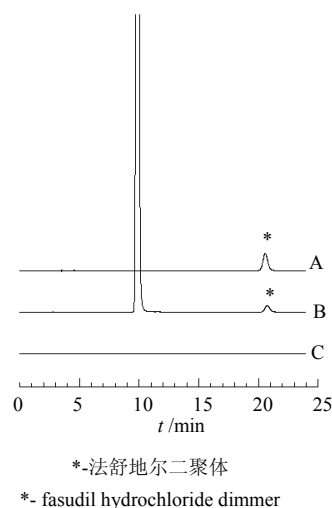


图 2 法舒地尔二聚体对照品 (A)、样品 (B) 和空白溶剂 (C) 的色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of fasudil hydrochloride dimer reference substance (A), sample (B), and blank solvent (C)

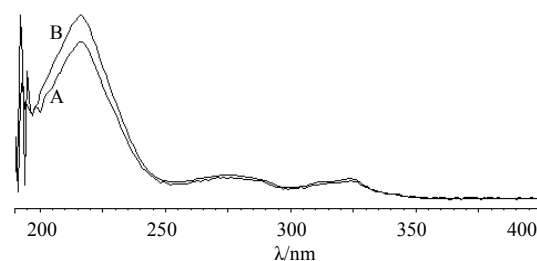


图 3 盐酸法舒地尔中杂质 (A) 和二聚体对照品 (B) 的在线紫外光谱

Fig. 3 UV absorption spectra of impurity (A) and dimer reference substance (B) in fasudil hydrochloride

2.6.2 线性关系试验 取盐酸法舒地尔二聚体对照品储备液适量，分别稀释成 0.63、2.08、4.16、10.40、20.80、41.60 $\mu\text{g/mL}$ 溶液。精密吸取上述溶液 10 μL 注入色谱仪分析，测定两次，记录色谱图，用平均峰面积对质量浓度回归，得方程 $A = 14.319 C - 2.292$ ， $r = 0.9999$ ，线性范围：0.63~41.60 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6.3 检测限和定量限试验 以 $S/N = 10$ 确定定量限为 6.24 ng，以 $S/N = 3$ 确定检测限为 2.52 ng。

2.6.4 精密度试验 精密吸取盐酸法舒地尔二聚体对照品贮备溶液 10 μL 注入色谱仪，连续进样分析 5 次，记录色谱图，结果二聚体峰面积的 RSD 值为 1.2%。

2.6.5 稳定性试验 分别在配制盐酸法舒地尔供试品溶液后的 0、52、104、150、285 min 进样分析，

记录色谱图,结果二聚体峰面积的 RSD 值为 1.4%,结果表明二聚体溶液在 285 min 内稳定。

2.6.6 重复性试验 精密吸取 10 μ L 盐酸法舒地尔供试品溶液(批号 20110101)进样分析,平行两次,再重复试验 4 次,记录色谱图,以平均峰面积计算供试品中二聚体平均质量分数为 1.30%,RSD 值为 1.7%。

2.6.7 加样回收试验 精密吸取 10 μ L 盐酸法舒地尔供试品溶液(批号 20110101)进样分析,平行两次,记录色谱图,按标准曲线法测得其二聚体含量的基础值。依次精密称取盐酸法舒地尔约 6 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,共 9 份供试品溶液,分别精密加入 0.4、0.8、1.2 mL 盐酸法舒地尔二聚体对照品贮备溶液至量瓶中,每个质量浓度 3 个样本,用流动相稀释并加至刻度,摇匀,即得。分别吸取上述溶液 10 μ L 注入色谱仪分析,平行两次,记录色谱图,以平均峰面积按标准曲线法计算二聚体回收率,结果平均回收率为 99.5%,RSD 值为 1.3%。

2.6.8 测定 取批号分别为 20110101、20110102、20110103、20110104 盐酸法舒地尔约 6 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用流动相溶解并加至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。精密吸取 10 μ L 注入色谱仪进样分析,记录色谱图,按标准曲线法以平均峰面积计算样品中二聚体的质量分数,结果见表 2。根据对 4 批样品测定的二聚结果,规定盐酸法舒地尔中二聚体不得超过 1.5%。

3 讨论

若按照文献及现有国家标准中关于盐酸法舒地尔有关物质检查的色谱条件,所得色谱图分析时间较长,主峰的出峰时间晚,并且拖尾严重,因此进

表 2 盐酸法舒地尔中二聚体的测定结果

Table 2 Determination of dimers in fasudil hydrochloride

批号	二聚体/%
20110101	1.3
20110102	1.4
20110103	1.4
20110104	1.3

行了调整。本实验通过加入离子对试剂庚烷磺酸钠及缓冲盐磷酸二氢钠来改善主峰的峰形及出峰时间,使杂质与盐酸法舒地尔主峰能够得到充分分离。

本实验建立的检测盐酸法舒地尔中有关物质的色谱条件具有很好的分离能力和检测能力。因此本法专属性好,可用于盐酸法舒地尔中杂质检查和二聚体的定量分析。

参考文献

- [1] 郝春华,王维亭,赵专友,等.法舒地尔对心脑血管疾病的药理作用及临床应用[J].现代药物与临床,2010,25(6):411-416.
- [2] 牙韩华,覃保华.盐酸法舒地尔治疗缺血性脑卒中临床疗效分析[J].药物评价研究,2012,35(5):372-373.
- [3] 葛欣,孟祥军,李娜然.HPLC法测定盐酸法舒地尔的有关物质[J].光谱实验室,2011,28(4):1908-1910.
- [4] 乐健,石宽,闻俊,等.用HPLC法测定盐酸法舒地尔注射液中盐酸法舒地尔的含量[J].药学服务与研究,2012,12(1):14.
- [5] 李金涛,干伟,邓媛媛,等.HPLC法测定盐酸法舒地尔的含量[J].中国药师,2010,13(11):1609-1611.
- [6] 吕洁,孟祥军,邹春阳.紫外-可见分光光度法测定盐酸法舒地尔注射液中盐酸法舒地尔的含量[J].中国医药指南,2011,9(5):26-28.