

HPLC法测定盐酸氯卡色林原料药中的有关物质

陶俊钰^{1*},刘为中^{2#},刘伟²,何广卫²,周洁²(1.合肥市食品药品检验中心,合肥 238000;2.合肥医工医药有限公司,合肥 230601)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5150-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.29

摘要 目的:建立测定盐酸氯卡色林原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Welch ultimate XB-ODS,流动相为磷酸二氢钠溶液(pH为6.5)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为35℃,进样量为20 μL。结果:杂质1、2、3检测质量浓度线性范围分别为0.075 60~7.560 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.081 40~8.140 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.099 24~9.924 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.075 60、0.081 40、0.099 25 μg/mL,检测限分别为0.022 68、0.024 42、0.029 77 μg/mL;精密度的RSD<2.0%,稳定性、重复性试验只检出杂质1,RSD<2.0%;回收率分别为98.53%~102.45%(RSD=1.06%, $n=9$)、98.26%~101.64%(RSD=1.03%, $n=9$)、100.08%~102.10%(RSD=0.70%, $n=9$)。结论:该方法灵敏、快速、准确、可靠,可用于盐酸氯卡色林原料药中有关物质的测定。

关键词 盐酸氯卡色林;高效液相色谱法;有关物质

Determination of Related Substances in Lorcaserin Hydrochloride by HPLC

TAO Junyu¹, LIU Weizhong², LIU Wei², HE Guangwei², ZHOU Jie² (1.Hefei Center for Food and Drug Inspection, Hefei 238000, China; 2.Hefei Industrial Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230601, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in lorcaserin hydrochloride. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Welch ultimate XB-ODS column with mobile phase consisted of Sodium dihydrogen phosphate (pH=6.5)-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 220 nm, and column temperature was 35 °C. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear ranges of impurity 1, 2, 3 were 0.075 60-7.560 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.081 40-8.140 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.099 24-9.924 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantification were 0.075 60, 0.081 40, 0.099 25 μg/mL. The limits of detection were 0.022 68, 0.024 42, 0.029 77 μg/mL. RSD of precision test was lower than 2.0%. Impurity 1 was found in stability test and reproducibility test, RSD<2.0%. The recoveries were 98.53%-102.45% (RSD=1.06%, $n=9$), 98.26%-101.64% (RSD=1.03%, $n=9$), 100.08%-102.10% (RSD=0.70%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is sensitive, rapid, accurate and reliable, which can be used to determine the related substances of lorcaserin hydrochloride.

KEYWORDS Lorcaserin hydrochloride; HPLC; Related substance

盐酸氯卡色林(Lorcaserin hydrochloride, Lorcaserin HCl),化学名为(*R*)-8-氯-1-甲基-2,3,4,5-四氢-1*H*-3-苯并氮杂卓盐酸盐半水合物^[1-2],是由Arena制药公司研究开发,作用于中枢神经系统的新型减肥药^[3-5]。FDA于2012年6月27日批准其上市。该药可有效避免传统减肥药激动5-HT_{2B}受体引起的心脏瓣膜病变及肺动脉高压,为临床治疗肥胖症提供了新的选择^[6-9]。

目前,已有文献对盐酸氯卡色林合成的工艺路线进行了报道^[10],而对其原料药的相关质量研究并未见报道。盐酸氯卡色林以*N*-(4-氯苯基乙基)-2-丙烯-1-胺盐酸盐为起始原料,在三氯化铝催化下进行分子内环合、拆分、成盐酸盐后进行水合物的制备而得。鉴于此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定盐酸氯卡色

林原料药中有关物质的方法,以期完善该原料药的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-15C型HPLC仪,包括SPD-M20A型紫外检测器、LC solution Lite色谱工作站(日本Shimadzu公司);XS105型十万分之一分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);FE20型pH计(瑞士Mettler-Toledo公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸氯卡色林原料药(合肥医工医药有限公司,批号:20140901、20140902、20140903);杂质1对照品(合肥伊博尼思化学技术有限公司,批号:20140810,纯度:97%);杂质2对照品(合肥医工医药有限公司,批号:20140819,纯度:98.9%);杂质3对照品(合肥医工医药有限公司,批号:20140829,纯度:98.7%);乙腈为色谱

* 副主任药师。研究方向:药品检验、药品标准起草。电话:0551-62809203。E-mail:942884082@qq.com

通信作者:副研究员。研究方向:新药研发。E-mail:lwzhipi@163.com

纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch ultimate XB-ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸二氢钠溶液(取磷酸二氢钠二水合物 5.6 g, 加水 1 000 mL 使溶解, 再加三乙胺调 pH 为 6.5, A)-乙腈(B)(梯度洗脱程序见表 1)^[11-13]; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0~35	75→30	25→70
35~60	30	70
60~61	30→75	70→25
61~70	75	25

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取杂质 1 对照品 18.90 mg、杂质 2 对照品 20.35 mg、杂质 3 对照品 24.81 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得单一对照品贮备液。取上述单一对照品贮备液各 1 mL, 置于同一 50 mL 量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 即得杂质 1 质量浓度为 15.12 μg/mL、杂质 2 质量浓度为 16.28 μg/mL、杂质 3 质量浓度为 19.85 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品 50.12 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 摇匀, 即得。

2.2.3 空白对照溶液 取流动相作为空白对照溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取样品 50.34 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 精密加入“2.2.1”项下单一对照品贮备液各 2 mL, 加流动相溶解并定容, 摇匀, 即得。

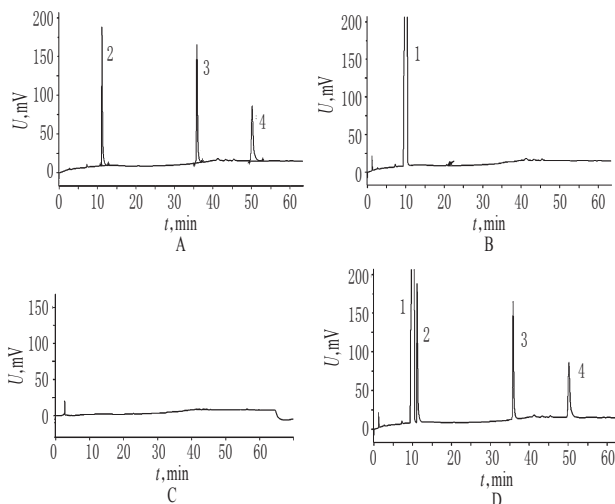
2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液和系统适用性溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 各杂质峰之间、主成分峰与杂质峰之间均能达到基线分离, 分离度均 > 1.5; 且保留时间适宜; 其他成分对测定无干扰。

2.4 破坏性试验

2.4.1 光照破坏样品溶液 取样品 10 mg, 置于 20 mL 量瓶中加流动相溶解并稀释至刻度, 置于 4 500 lx 紫外灯下照射 24 h, 即得。

2.4.2 高温破坏样品溶液 取置于 150 °C 烘箱中放置 8



A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白对照溶液; D. 系统适用性溶液; 1. 盐酸氯卡色林; 2. 杂质 1; 3. 杂质 2; 4. 杂质 3
A. mixed control solution; B. test sample; C. blank control solution; D. system suitability solution; 1. lorcaseerin hydrochloride; 2. impurity 1; 3. impurity 2; 4. impurity 3

图 1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of system suitability test

h 后的样品 10 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 即得。

2.4.3 酸破坏样品溶液 取样品 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 取上述溶液 5 mL, 加 1 mol/L 盐酸溶液 2.0 mL, 于 80 °C 水浴放置 6 h, 加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL 中和, 再加流动相定容至 10 mL, 即得。

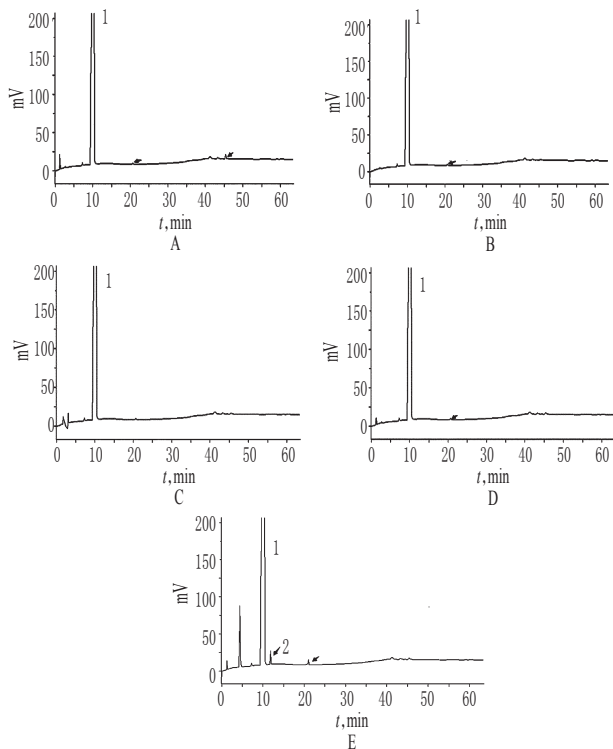
2.4.4 碱破坏样品溶液 取样品 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 取上述溶液 5 mL, 加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL, 于 80 °C 水浴放置 6 h, 加 1 mol/L 盐酸溶液 2.0 mL 中和, 再加流动相定容至 10 mL, 即得。

2.4.5 氧化破坏样品溶液 取样品 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 取上述溶液 5 mL, 加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 摇匀, 于 50 °C 水浴放置 10 min, 再加流动相定容至 10 mL, 即得。

取上述各样品溶液 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 2。由图 2 可知, 样品在酸、碱、光照以及高温条件下均较为稳定, 基本无降解产物产生, 在氧化破坏条件下可产生两个较为明显的降解产物; 但降解产物与主峰以及杂质峰间均能达到基线分离。

2.5 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、1、1、1 mL, 分别



A. 光照破坏样品; B. 高温破坏样品; C. 酸破坏样品; D. 碱破坏样品; E. 氧化破坏样品; 1. 盐酸氯卡色林; 2. 杂质 1
A. destroyed by light; B. destroyed by high temperature; C. destroyed by acid; D. destroyed by alkali; E. destroyed by oxidation; 1. lorcaseirin hydrochloride; 2. impurity 1

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of destructive test

置于 100、50、25、20、10 mL 量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以杂质 1、2、3 质量浓度 ($x, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归,得杂质 1 回归方程为 $y = 3.342 \times 10^4 x - 1269 (r = 0.9999)$ 、杂质 2 回归方程为 $y = 3.122 \times 10^4 x - 322.4 (r = 0.9999)$ 、杂质 3 回归方程为 $y = 3.267 \times 10^4 x - 706.3 (r = 0.9999)$ 。结果表明,杂质 1、2、3 检测质量浓度线性范围分别为 0.075 60~7.560、0.081 40~8.140、0.099 24~9.924 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得 LOQ;当信噪比为 3:1 时,得 LOD。结果,杂质 1、2、3 的 LOQ 分别为 0.075 60、0.081 40、0.099 25 $\mu\text{g/mL}$, LOD 分别为 0.022 68、0.024 42、0.029 77 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色

谱条件进样测定,记录峰面积。结果,杂质 1、2、3 峰面积的 RSD 分别为 0.98%、1.02%、0.76% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20140901)适量,分别于室温下放置 0、2、4、6、8、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,只检出杂质 1,其峰面积的 RSD=1.03% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:20140901)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算有关物质含量。结果,只检出杂质 1,其含量的平均值为 0.012%, RSD=1.52% ($n=6$),表明本试验重复性良好。

2.10 回收率试验

取低、中、高质量的杂质 1、2、3 对照品,分别置于 100 mL 量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表 2。

2.11 样品有关物质测定

取各批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算有关物质含量,结果见表 3(表中“-”为未检出)。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者根据盐酸氯卡色林的 pKa 值 ($\text{pKa}=9.53$),选用经典的缓冲盐体系(磷酸二氢钠溶液)与有机相探索合理的配比,最终确定本试验的流动相为磷酸二氢钠溶液(取磷酸二氢钠二水合物 5.6 g,加水 1 000 mL 使溶解,再加三乙胺调 pH 为 6.5)-乙腈。

3.2 检测波长的选择

在预试验中笔者进行紫外扫描,发现盐酸氯卡色林原料药的主成分在 220 nm 波长处有较大吸收,起始原料、各中间体、终产品在 220 nm 波长处摩尔吸收系数比接近 1:1,且其他波长处均未检测到较大杂质。随后笔者取“2.2.1”项下的单一对照品贮备液进行验证,发现杂质 1、2、3 在 220 nm 波长处均有较大吸收。因此,本试验最终确定检测波长为 220 nm。

3.3 色谱系统耐用性考察

本试验分别考察了在柱温变化 ($\pm 5^\circ\text{C}$)、流速变化

表2 回收率试验结果($n=9$)Tab 2 Results of recovery tests($n=9$)

待测有关物质	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收 率, %	RSD, %
杂质1	10.22	10.47	102.45	100.21	1.06
	10.22	10.07	98.53		
	10.22	10.31	100.88		
	51.10	51.22	100.23		
	51.10	51.01	99.82		
	51.10	51.15	100.10		
	511.00	508.20	99.45		
	511.00	511.80	100.16		
	511.00	512.50	100.29		
杂质2	10.36	10.53	101.64	99.60	1.03
	10.36	10.21	98.55		
	10.36	10.18	98.26		
	51.80	51.70	99.81		
	51.80	51.28	99.00		
	51.80	51.34	99.11		
	518.00	519.70	100.32		
	518.00	516.80	99.77		
	518.00	517.50	99.90		
杂质3	10.01	10.11	101.00	100.68	0.70
	10.01	10.22	102.10		
	10.01	10.16	101.50		
	50.05	50.13	100.16		
	50.05	50.19	100.28		
	50.05	50.25	100.40		
	500.50	502.20	100.34		
	500.50	501.80	100.26		
	500.50	500.90	100.08		

表3 样品有关物质测定结果($n=3, \%$)Tab 3 Results of related substance determination in samples($n=3, \%$)

样品批号	杂质1	杂质2	杂质3	总杂质
20140901	0.011	-	-	0.011
20140902	0.002	-	-	0.002
20140903	0.007	-	-	0.007

(± 0.1 mL/min)、盐浓度变化(± 0.005 mol/L)、pH变化(± 0.1)、有机相加入比例变化($\pm 5\%$)以及不同批号色谱柱和不同仪器条件下样品分离度及杂质检出个数,以对分析方法的耐用性进行验证。结果表明,在色谱条件发生微小变动的条件下,杂质种类、含量及分离度基本

无变化,表明本方法耐用性良好。

综上所述,本方法灵敏、快速、准确、可靠,可用于盐酸氯卡色林原料药中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 吴之波,张玉娟,范文进,等.盐酸氯卡色林的合成工艺研究[J].精细化工中间体,2016,46(4):27-31.
- [2] 贺新,王均伟,朱启华,等.盐酸氯卡色林的合成研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(23):2676-2682.
- [3] 曾碧涛,朱涛,王天霞.微波辅助合成盐酸氯卡色林[J].化学试剂,2016,38(9):917-920.
- [4] Joo JK, Lee KS. Pharmacotherapy for obesity[J]. *J Menopausal Med*, 2014, 204(3):90-96.
- [5] 石卫峰,王均伟,朱启华,等.治疗肥胖的新药氯卡色林[J].中国新药杂志,2014,23(2):127-129.
- [6] 魏春燕,苏娜,徐珽.药物治疗超重和肥胖患者的国内外研究进展[J].中国药房,2014,25(42):4003-4006.
- [7] 朱占永,余晶,严玲玲,等.外科手术治疗病态性肥胖症的研究进展[J].华中科技大学学报,2011,40(1):119-124.
- [8] 王昊苏,朱亦龙,吴飞,等.盐酸氯卡色林消旋体的合成工艺改进[J].药学与临床研究,2014,22(3):237-238.
- [9] 韩航,王超群,季安成,等.盐酸氯卡色林的合成[J].药学与临床研究,2015,23(1):45-46.
- [10] 江迅,李新涓子,李勇刚,等.氯卡色林盐酸盐的制备方法:中国,103333111[P]. 2013-10-02.
- [11] 周志勇,黄鹤飞,张焯.缙沙坦氨氯地平片有关物质研究[J].安徽医药,2016,20(4):651-655.
- [12] 陈晓亮,汪旭.高效液相色谱法测定复方间苯二酚搽剂中间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量[J].安徽医药,2017,21(1):53-56.
- [13] 张颖,李嘉,何春欢,等.高效液相色谱法测定异叶爬山虎中异槲皮苷的含量[J].安徽医药,2017,21(1):46-48.

(收稿日期:2017-04-19 修回日期:2017-07-15)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅