

HPLC 法测定罗氟司特的有关物质

郝艳山^{1,2}, 戴俊东^{1*}, 产运霞²

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京万生药业有限责任公司, 北京 101113)

摘要 目的: 建立罗氟司特有关物质测定的 HPLC 方法。方法: 采用十八烷基硅烷键合硅胶为填料的色谱柱, 以 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调节 pH 至 3.5±0.1) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 检测波长为 215 nm, 对有关物质进行定性、定量分析。结果: 罗氟司特和相邻杂质以及各杂质之间的分离度均大于 1.5; 3- 环丙基甲氧基-4- 二氟甲氧基苯甲酸 (杂质 A)、4- 氨基-3, 5- 二氯吡啶 (杂质 B)、3- (环丙基甲氧基)-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基)-4- 羟基苯甲酰胺 (杂质 C)、3- 羟基-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基)-4- (二氟甲氧基) 苯甲酰胺 (杂质 D)、3, 4- 二羟基-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基) 苯甲酰胺 (杂质 E)、3- (环丙基甲氧基)-N- (吡啶-4- 基)-4- (二氟甲氧基) 苯甲酰胺 (杂质 F)、3- (环丙基甲氧基)-N- (3- 氯吡啶-4- 基)-4- (二氟甲氧基) 苯甲酰胺 (杂质 G)、3- (二氟甲氧基)-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基)-4- (环丙基甲氧基) 苯甲酰胺 (杂质 H)、3, 4- 二 (环丙基甲氧基)-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基) 苯甲酰胺 (杂质 I)、3, 4- 二 (二氟甲氧基)-N- (3, 5- 二氯吡啶-4- 基) 苯甲酰胺 (杂质 J) 和罗氟司特氮氧化物 (杂质 K) 在各自的线性范围内线性关系良好 ($r>0.999\ 0$, $n=5$), 相对校正因子分别为 1.14、1.00、1.17、0.96、0.70、1.76、1.08、1.37、1.14、1.65 和 1.22, 检测限分别为 0.1、0.03、0.1、0.1、0.1、0.03、0.1、0.1、0.1、0.1 和 0.1 ng; 定量限分别为 0.3、0.1、0.3、0.2、0.2、0.1、0.2、0.2、0.2、0.3 和 0.3 ng, 低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n=9$) 分别为 102.9%、100.0%、107.6%、107.5%、98.1%、99.9%、98.3%、97.6%、86.9%、100.0% 和 98.7%。5 批样品有关物质测定结果显示, 各已知杂质的含量均低于 0.1%, 其他最大单个杂质的含量均低于 0.1%, 杂质总量均低于 0.5%。结论: 本方法可用于罗氟司特的有关物质测定。

关键词: 罗氟司特; 有关物质; 杂质测定; 高效液相色谱法; 梯度洗脱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 06-1097-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.23

Determination of related substances in roflumilast by HPLC

HAO Yan-shan^{1,2}, DAI Jun-dong^{1*}, CHAN Yun-xia²

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Beijing Winsunny Pharmaceutical Co., Ltd, Beijing, 101113, China)

Abstract **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of related substances in roflumilast raw material. **Methods:** HPLC was adopted on a C₁₈ column with a gradient elution system of acetonitrile-

* 通信作者 Tel: (010) 84738616; E-mail: daijd@163.com

第一作者 Tel: (010) 61506986; E-mail: 674267707@qq.com

0.01 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (pH was adjusted to 3.5 ± 0.1 with phosphate acid) with a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹, and the column temperature was maintained at 25 °C, the detection wavelength was set at 215 nm. The related substances were qualified and quantified by the established method. **Results:** The resolutions between roflumilast and adjacent impurities, and between the known impurities were greater than 1.5. The calibration curves of 11 known impurities were linear in the concentration range ($r > 0.999\ 0$, $n = 5$). The relative correction factors were 1.14, 1.00, 1.17, 0.96, 0.70, 1.76, 1.08, 1.37, 1.14, 1.65 and 1.22 for 3-(cyclopropylmethoxy)-4-(difluoromethoxy) benzoic acid (impurity A), 3,5-dichloropyridin-4-amine (impurity B), 3-(cyclopropylmethoxy)-N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-4-hydroxybenzamide (impurity C), N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-4-(difluoromethoxy)-3-hydroxybenzamide (impurity D), N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-3,4-dihydroxybenzamide (impurity E), 3-(cyclopropylmethoxy)-4-(difluoromethoxy)-N-(pyridin-4-yl) benzamide (impurity F), N-(3-chloropyridin-4-yl)-3-(cyclopropylmethoxy)-4-(difluoromethoxy) benzamide (impurity G), 4-(cyclopropylmethoxy)-N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-3-(difluoromethoxy) benzamide (impurity H), 3,4-bis(cyclopropylmethoxy)-N-(3,5-dichloropyridin-4-yl) benzamide (impurity I), N-(3,5-dichloropyridin-4-yl)-3,4-bis(difluoromethoxy) benzamide (impurity J) and roflumilast oxynitride (impurity K), respectively; The detection limits were 0.1, 0.03, 0.1, 0.1, 0.1, 0.03, 0.1, 0.1, 0.1, 0.1 and 0.1 ng, and the quantitation limits were 0.3, 0.1, 0.3, 0.2, 0.2, 0.1, 0.2, 0.2, 0.2, 0.3 and 0.3 ng, respectively; And the average recovery rates ($n = 9$) were 102.9%, 100.0%, 107.6%, 107.5%, 98.1%, 99.9%, 98.3%, 97.6%, 86.9%, 100.0% and 98.7% at the concentration level of low, medium and high concentrations, respectively. The determination results of the five batches of samples showed that the known impurities were less than 0.1%, the maximum single unknown impurity was less than 0.1%, the total impurities were less than 0.5%.

Conclusion: The method is suitable for the quality control of roflumilast.

Keywords: roflumilast; related substances; impurity assay; HPLC; gradient elution

罗氟司特是一种新型的选择性磷酸二酯酶-4 (PDE-4) 抑制剂,适用于慢性阻塞性肺病(COPD)的治疗。奈科明公司(Nycomed)的罗氟司特片商品名为Daxas^[1-4],是批准用于慢性阻塞性肺疾病治疗的新型选择性磷酸二酯酶-4抑制剂,对肺部系统具有高效的抗炎活性。可抑制磷酸二酯酶-4,减少炎症介质的释放,进而抑制如慢性阻塞性肺病和哮喘等呼吸道疾病对肺组织造成的损伤^[5-7]。

目前国内对罗氟司特有关物质的测定方法报道^[8-13]较少,且国内报道方法对罗氟司特特定杂质的分析较少。国外文献^[14-15]使用粒径为1.8 μm色谱柱对罗氟司特的有关物质进行测定,但是由于色谱柱粒径较小,色谱柱使用寿命短,且难以分离所有杂质。本文采用普通C₁₈柱对罗氟司特杂质3-环丙基甲氧基-4-二氟甲氧基苯甲酸(杂质A)、4-氨基-3,5-二氯吡啶(杂质B)、3-(环丙基甲氧基)-N-

(3,5-二氯吡啶-4-基)-4-羟基苯甲酰胺(杂质C)、3-羟基-N-(3,5-二氯吡啶-4-基)-4-(二氟甲氧基)苯甲酰胺(杂质D)、3,4-二羟基-N-(3,5-二氯吡啶-4-基)苯甲酰胺(杂质E)、3-(环丙基甲氧基)-N-(吡啶-4-基)-4-(二氟甲氧基)苯甲酰胺(杂质F)、3-(环丙基甲氧基)-N-(3-氯吡啶-4-基)-4-(二氟甲氧基)苯甲酰胺(杂质G)、3-(二氟甲氧基)-N-(3,5-二氯吡啶-4-基)-4-(环丙基甲氧基)苯甲酰胺(杂质H)、3,4-二(环丙基甲氧基)-N-(3,5-二氯吡啶-4-基)苯甲酰胺(杂质I)、3,4-二(二氟甲氧基)-N-(3,5-二氯吡啶-4-基)苯甲酰胺(杂质J)和罗氟司特氮氧化物(杂质K)进行分离测定,克服了小粒径色谱柱使用的局限性,而且增加了对目前罗氟司特所有潜在杂质的分离度,进而有效地控制罗氟司特原料药的质量,同时也为制剂的质量控制提供参考。罗氟司特和杂质的结构见图1。

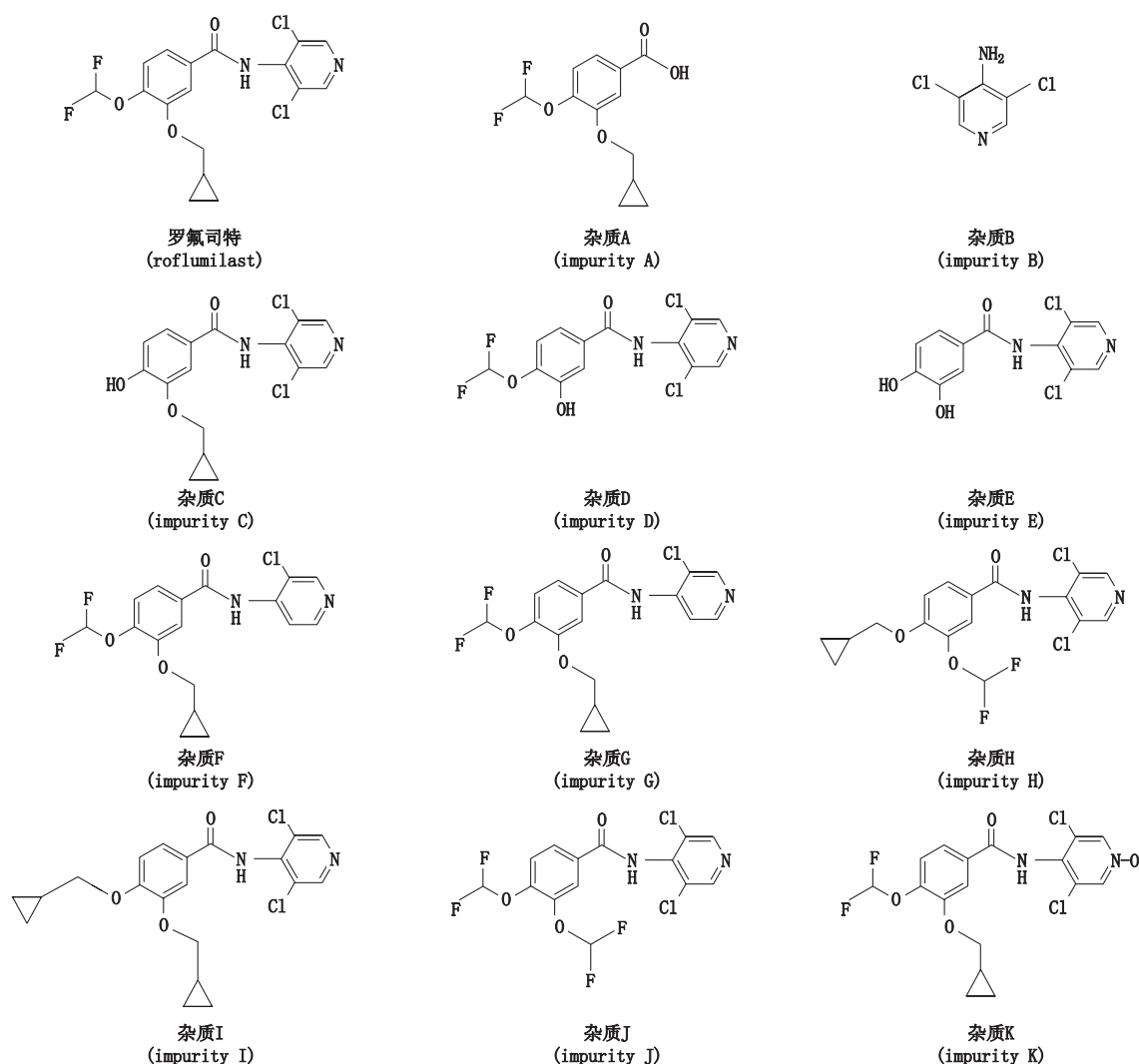


图1 罗氟司特及其各杂质成分的化学结构式

Fig. 1 Structures of roflumilast and its known impurities

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪 (2998 二极管阵列检测器, 四元泵; Waters 公司), Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶; Agilent 公司), BP211D 十万分之一天平 (Sartorius 公司)。

1.2 试剂

罗氟司特原料药 (北京万生药业有限责任公司, 批号 20120201、20120401、20120501、20120502、20120601)、罗氟司特对照品 (由原料药精制而得, 经紫外、红外、质谱和核磁共振分析确证, 批号 D20120201, 含量 99.74%) 以及各杂质对照品 (杂质 C: 批号 L002-20120401, 纯度 98.47%; 杂质 D: 批号

L003-20120402, 纯度 97.09%; 杂质 E: 批号 L004-20120405, 纯度 99.85; 杂质 F: 批号 L011-20120201, 纯度 97.63%; 杂质 G: 批号 L012-20120206, 纯度 98.71%; 杂质 H: 批号 L021-20120213, 纯度 96.55%; 杂质 I: 批号 L023-20120301, 纯度 96.20%; 杂质 J: 批号 L024-20120312, 纯度 99.91 和 杂质 K: 批号 L031-20120214, 纯度 99.81%) 均由北京万生药业有限责任公司制备; 杂质 A 由天津法莫西医药科技有限公司提供, 批号 20120114, 纯度 99.09%; 杂质 B 由南京康满林化工实业有限公司提供, 批号 20120113, 纯度 99.76%。乙腈为色谱纯; 其他均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm,

5 μm); 流动相: 以 0.01 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (磷酸调节 pH 至 3.5 \pm 0.1) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (表 1), 流速 0.5 mL \cdot min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 215 nm, 进样量 10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间 (time)/min	流动相 A (mobile phase A)/%	流动相 B (mobile phase B)/%
0	60	40
10	60	40
35	20	80
45	20	80
50	60	40
60	60	40

2.2 专属性试验与系统适用性

定位溶液: 取杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 的对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别作为以上各杂质的定位溶液。

供试品溶液: 取罗氟司特原料药约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

对照品溶液: 分别取杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J、杂质 K 和罗氟司特对照品各适量, 精密称定, 加乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含各 0.1 mg 的溶液, 作为

储备溶液, 精密量取储备溶液 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

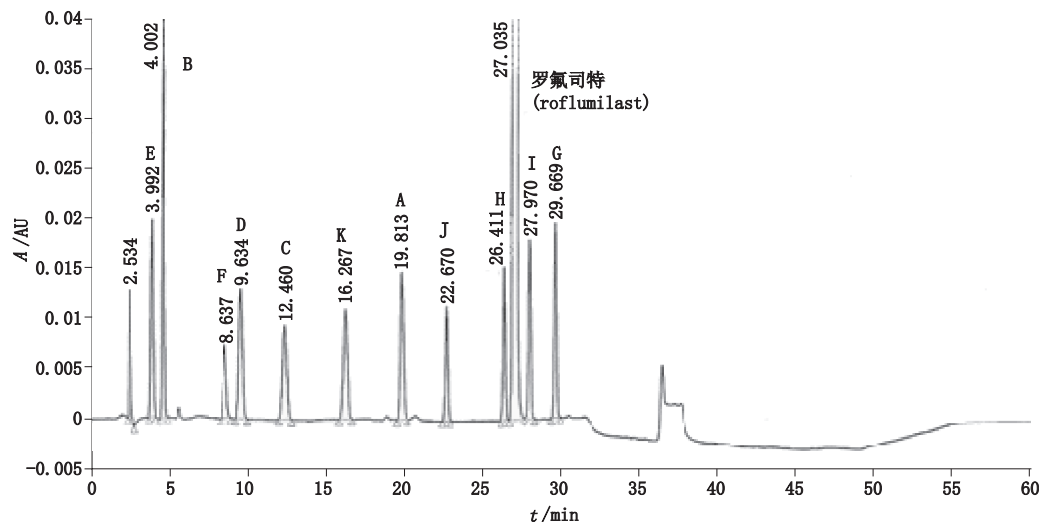
系统适用性溶液: 取罗氟司特对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 分别精密加入杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 的定位溶液各 1 mL, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。

精密量取系统适用性溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。各杂质与主峰的分离度以及各杂质峰之间的分离度均大于 2.0, 系统适用性良好。见表 2 和图 2。

表 2 系统适用性试验结果

Tab. 2 Results of specificity and system applicability test

成分 (component)	t_R /(min)	相对保留时间 (RRT)	分离度 (resolution)
杂质 E (impurity E)	3.992	0.15	5.25
杂质 B (impurity B)	4.662	0.17	2.78
杂质 F (impurity F)	8.637	0.32	13.01
杂质 D (impurity D)	9.634	0.36	2.34
杂质 C (impurity C)	12.460	0.46	6.19
杂质 K (impurity K)	16.267	0.60	8.05
杂质 A (impurity A)	19.813	0.73	8.49
杂质 J (impurity J)	22.670	0.84	8.73
杂质 H (impurity H)	26.411	0.98	13.89
罗氟司特 (roflumilast)	27.035	1.00	2.46
杂质 I (impurity I)	27.970	1.03	3.66
杂质 G (impurity G)	29.669	1.10	6.50



A~K. 同表 2 (same as Tab. 2)

图 2 系统适用性色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability

2.3 破坏性试验

未破坏样品溶液: 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为未破坏样品溶液。

酸破坏样品溶液: 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 在 80°C 水浴中放置 24 h, 取出, 放冷, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 加乙腈溶定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为酸破坏样品溶液。

碱破坏样品溶液: 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 在 80°C 水浴中放置 24 h, 取出, 放冷, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 加乙腈定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为碱破坏样品溶液。

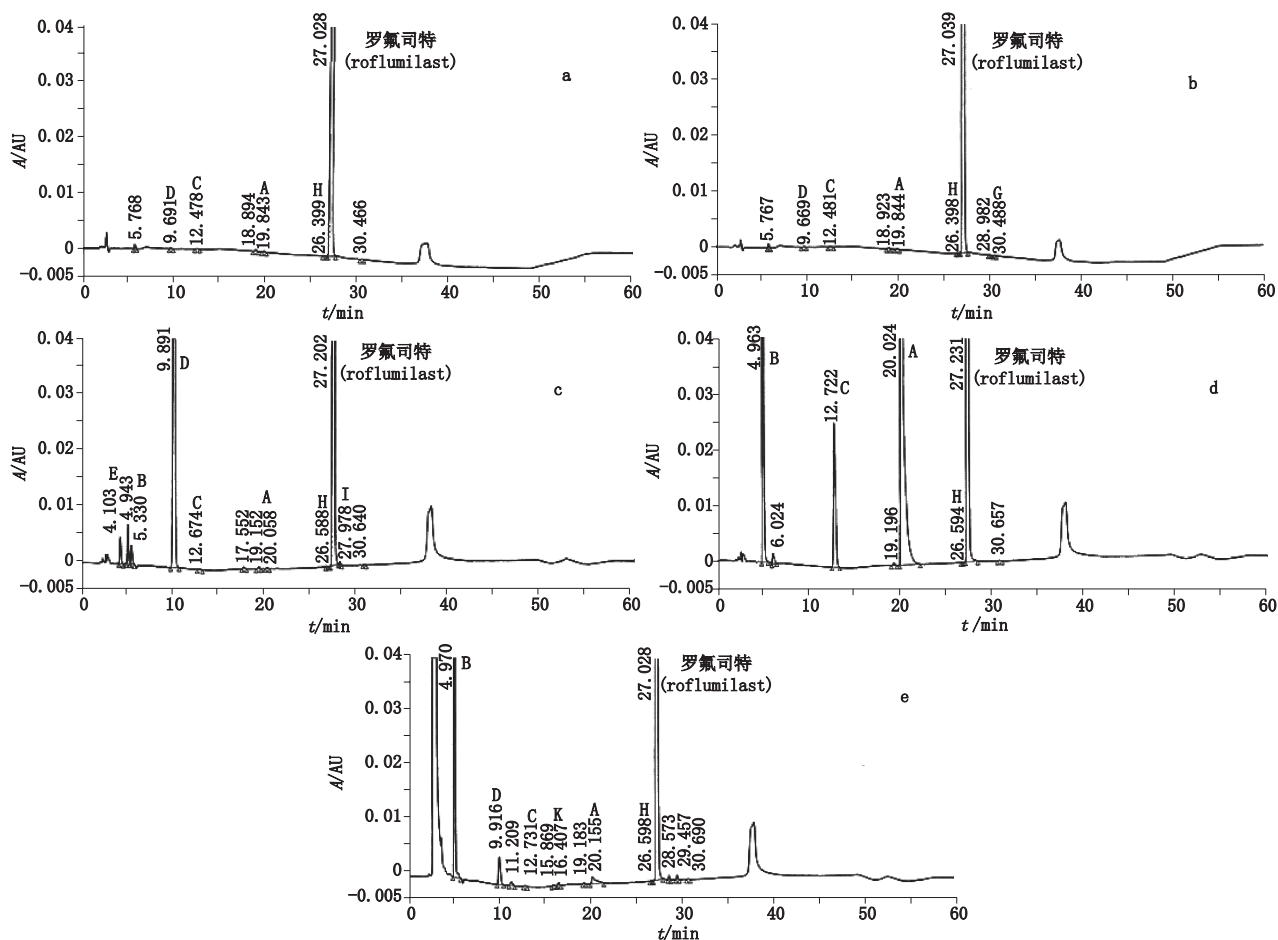
氧化破坏样品溶液: 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 5 mL, 于 80°C

$^\circ\text{C}$ 水浴放置 24 h, 取出, 放冷, 加乙腈定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为氧化破坏样品溶液。

高温破坏样品溶液: 取本品细粉适量, 置称量瓶中, 在 105°C 烘箱中放置 24 h, 取出, 放冷, 取约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为高温破坏样品溶液。

光照破坏样品溶液: 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 于 4 500 lx 下放置 24 h, 取出, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为强光破坏样品溶液。

精密量取上述溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图见图 3。经强酸强制降解后, 降解杂质主要为 B、D、E; 经强碱强制降解后, 降解杂质主要为 A、B、C; 经氧化强制降解后, 降解杂质主要为 A、B、D、K; 在高温和光照条件下相对稳定。降解试验后各杂质与主成分的分离度均符合规定。



a. 高温降解 (high temperature degradation) b. 光照降解 (light degradation) c. 酸降解 (acid degradation) d. 碱降解 (base degradation) e. 氧化降解 (oxidation degradation)

图 3 降解试验色谱图

Fig. 3 Chromatograms of degradation tests

2.4 线性关系考察

分别取罗氟司特对照品及杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 的对照品约 10 mg, 精密称定, 置同一 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备溶液。取储备溶液适量, 用乙腈逐级稀释, 制得罗氟司特质量浓度依次为 0.04、0.08、0.20、0.80 和 1.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。分别取上述溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以质量浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 并按照斜率法计算各已知杂质的相对校正因子。罗氟司特和各杂质的线性方程以及各杂质的相对校正因子结果见表 3。结果表明: 在各自浓度范围内, 各组分与峰面积呈良好的线性关系, 除杂质 B、杂质 D 和杂质 G 外, 各已知杂质的相对校正因子均在 0.90~1.10 之间, 为了保证检验结果的准确性, 采用外标对照法计算各已知杂质的含量, 其他未知杂质采用不加校正因子的主成分对照法计算。

表 3 回归方程、线性范围及校正因子

Tab. 3 Regression equations, linear ranges and correction factors

成分 (component)	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程 (regression equation)	r	校正因子 (correction factor)
罗氟司特 (roflumilast)	0.044~1.328	$A=1.185 \times 10^5 C - 841.2$	0.999 8	1.00
杂质 A (impurity A)	0.044~1.320	$A=1.039 \times 10^5 C + 1.017 \times 10^3$	0.999 7	1.14
杂质 B (impurity B)	0.043~1.298	$A=1.188 \times 10^5 C - 4.458 \times 10^3$	0.999 4	1.00
杂质 C (impurity C)	0.042~1.248	$A=1.016 \times 10^5 C - 92.88$	1.000	1.17
杂质 D (impurity D)	0.039~1.174	$A=1.229 \times 10^5 C - 28.25$	1.000	0.96
杂质 E (impurity E)	0.044~1.332	$A=1.699 \times 10^5 C + 580.0$	0.999 8	0.70
杂质 F (impurity F)	0.043~1.296	$A=6.747 \times 10^4 C - 113.4$	1.000	1.76
杂质 G (impurity G)	0.044~1.315	$A=1.098 \times 10^5 C - 358.1$	1.000	1.08
杂质 H (impurity H)	0.044~1.332	$A=8.622 \times 10^4 C + 295.3$	1.000	1.37
杂质 I (impurity I)	0.042~1.244	$A=1.042 \times 10^5 C - 11.08$	0.999 0	1.14
杂质 J (impurity J)	0.042~1.242	$A=7.187 \times 10^4 C + 181.1$	1.000	1.65
杂质 K (impurity K)	0.045~1.341	$A=9.6764 \times 10^6 C - 113.7$	1.000	1.22

2.5 检出限和定量限试验

取“2.4”项下 0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液适量, 用乙腈逐步稀释成不同浓度, 在上述色谱条件下, 分别进样 10 μL 。按信噪比 $S/N=3$ 测定其检出限, 按信噪比 $S/N=10$ 测定其定量限。罗氟司特、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 的检出限分别为 0.03、0.1、0.03、0.1、0.1、0.1、0.03、0.1、0.1、0.1、0.1 和 0.1 ng, 定量限分别为 0.1、0.3、0.1、0.3、0.2、0.2、0.1、0.2、0.2、0.2、0.3 和 0.3 ng, 检出能力高, 能够满足测定要求。

2.6 仪器精密度试验

取“2.4”项下 0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别精密

量取 10 μL , 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 罗氟司特、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 峰面积的 RSD 依次为 1.4%、1.8%、1.8%、1.6%、1.8%、1.5%、2.0%、1.6%、1.7%、1.2%、1.3% 和 2.0%。说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取罗氟司特原料药 6 份, 每份约 10 mg, 照“2.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密量取 10 μL , 注入液相色谱仪, 按外标法计算有关物质的含量, 杂质 C、杂质 D 和杂质 H 的平均含量分别为 0.008%、0.006% 和 0.006%, RSD 分别为 6.4%、7.8% 和 7.0%, 结果表明重复性良好, 见表 4。

表 4 重复性试验结果 (n=6)

Tab. 4 Results of repeatability

成分 (component)	有关物质 (related substances) /%						平均 (average)
	1	2	3	4	5	6	
杂质 A (impurity A)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 B (impurity B)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 C (impurity C)	0.008	0.007	0.008	0.007	0.007	0.008	0.008
杂质 D (impurity D)	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
杂质 E (impurity E)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 F (impurity F)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 G (impurity G)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 H (impurity H)	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006	0.006	0.006
杂质 I (impurity I)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 J (impurity J)	—	—	—	—	—	—	—
杂质 K (impurity K)	—	—	—	—	—	—	—

注 (note): “—” 未检出 (not detected)

2.8 溶液稳定性试验

2.8.1 杂质溶液的稳定性 取“2.4”项下 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,于室温条件下放置 24 h,分别在 0、2、4、8、12、24 h,精密量取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。罗氟司特、杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、杂质 G、杂质 H、杂质 I、杂质 J 和杂质 K 峰面积的 RSD 依次为 1.8%、1.8%、1.5%、1.3%、1.2%、1.4%、1.6%、2.1%、1.2%、1.4%、0.9% 和 1.3%。说明各组分在室温条件下放置 24 h 性质稳定。

2.8.2 供试品溶液的稳定性 取罗氟司特原料约 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液;于室温条件下放置,分别在 0、2、4、8、12、24 h,精密量取 $10 \mu\text{L}$ 注入

液相色谱仪,记录色谱图。罗氟司特峰面积的 RSD 为 0.15%,杂质 C、杂质 D、杂质 H 峰面积的 RSD 为分别为 2.0%、1.6% 和 0.73%,其他杂质均未检出,说明供试品溶液在室温条件下放置 24 h 性质稳定。

2.9 回收率试验

取罗氟司特 9 份,平均分为 3 组,每组 3 份,每份约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,分别加入杂质储备溶液 (质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 0.5、1.0 和 1.5 mL,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得回收率供试溶液;精密量取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算回收率,结果见表 5,表明各已知杂质在 3 个不同浓度水平 (0.05% 水平、0.1% 水平、0.15% 水平) 的回收率均在 80%~120% 之间,符合规定。

表 5 回收率试验结果 (n=9)

Tab. 5 Results of recovery

成分 (component)	回收率范围 (recovery range) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD/%
杂质 A (impurity A)	99.0~111.8	102.9	4.0
杂质 B (impurity B)	99.2~101.8	100.0	0.97
杂质 C (impurity C)	105.7~112.4	107.6	2.0
杂质 D (impurity D)	103.4~111.4	107.5	2.8
杂质 E (impurity E)	90.4~104.0	98.1	5.1
杂质 F (impurity F)	96.7~102.5	99.9	1.9
杂质 G (impurity G)	92.1~103.5	98.3	4.2
杂质 H (impurity H)	93.0~101.7	97.6	3.2
杂质 I (impurity I)	81.1~90.8	86.9	3.9
杂质 J (impurity J)	94.6~103.4	100.0	3.0
杂质 K (impurity K)	94.9~101.4	98.7	2.0

2.10 耐用性试验

取上述系统适用性溶液和供试品溶液,考察本色谱条件对流动相的 pH、柱温、流速和色谱柱粒径的

耐用性,结果表明,本方法对流速、色谱柱粒径耐用性较好,对流动相 pH 和柱温耐用性较差,需严格控制。耐用性试验结果见表 6。

表 6 耐用性试验结果

Tab. 6 Results of durability test

参数 (parameter)	具体变化 (specific change)	各峰分离度 (peak separation)										
		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}
色谱柱粒径 (column particle size) 5 μm	1.8 μm	3.2	16.6	2.0	8.2	10.3	9.7	10.0	14.8	2.5	3.9	6.6
柱温 (column temperature) 25 $^{\circ}\text{C}$	+5 $^{\circ}\text{C}$	3.9	14.1	0.8	7.5	8.6	9.1	10.3	14.8	2.5	4.1	5.8
	+2 $^{\circ}\text{C}$	2.0	10.1	2.8	4.3	7.1	7.7	6.9	11.5	2.5	2.0	1.9
	-5 $^{\circ}\text{C}$	2.8	14.9	3.6	7.6	9.3	10.9	9.4	14.4	2.5	3.5	7.5
流速 (flow rate) 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	+0.05 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	3.3	15.0	2.1	7.8	9.1	10.3	10.5	15.4	2.7	3.9	6.8
	-0.05 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	3.4	14.8	2.2	7.6	8.9	9.7	9.2	13.9	2.4	3.7	6.5
pH 3.5	+0.1	2.2	14.2	4.1	7.8	9.3	10.2	9.7	14.9	2.5	3.8	6.6
	-0.2	1.8	9.6	3.7	4.2	7.1	8.1	6.7	11.4	2.5	1.9	2.0
	-0.4	—	12.8	6.5	8.2	10.3	10.4	9.7	15.0	2.6	3.9	6.2

注 (note): R_1 . 杂质 E 与杂质 B 峰之间分离度 (resolution between peaks of impurity E and impurity B); R_2 . 杂质 B 与杂质 F 之间分离度 (resolution between peaks of impurity B and impurity F); R_3 . 杂质 F 与杂质 D 之间分离度 (resolution between peaks of impurity F and impurity D); R_4 . 杂质 D 与杂质 C 之间分离度 (resolution between peaks of impurity D and impurity C); R_5 . 杂质 C 与杂质 K 之间分离度 (resolution between peaks of impurity C and impurity K); R_6 . 杂质 K 与杂质 A 之间分离度 (resolution between peaks of impurity K and impurity A); R_7 . 杂质 A 与杂质 J 之间分离度 (resolution between peaks of impurity A and impurity J); R_8 . 杂质 J 与杂质 H 之间分离度 (resolution between peaks of impurity J and impurity H); R_9 . 杂质 H 与罗氟司特之间分离度 (resolution between peaks of impurity H and roflumilast); R_{10} . 罗氟司特与杂质 I 之间分离度 (resolution between peaks of roflumilast and impurity I); R_{11} . 杂质 I 与杂质 G 之间分离度 (resolution between peaks of impurity I and impurity G); “—” 峰重合 (overlap)

2.11 样品检测

分别取 5 批原料药,按照“2.2”项下方法,分别制备供试品溶液和对照品溶液,进样测定,各已知杂

质按外标法计算,未知杂质按照主成分外标法计算有关物质的含量,结果见表 7。

表 7 样品检验结果

Tab. 7 Results of sample tests

成分 (component)	有关物质含量 (content of related substance) /%				
	20120201	20120401	20120501	20120502	20120601
杂质 A (impurity A)	—	—	—	—	—
杂质 B (impurity B)	—	—	—	—	—
杂质 C (impurity C)	0.008	0.006	0.007	0.006	0.015
杂质 D (impurity D)	0.007	0.006	0.004	0.005	0.006
杂质 E (impurity E)	—	—	—	—	—
杂质 F (impurity F)	—	—	—	—	—
杂质 G (impurity G)	—	—	—	—	—
杂质 H (impurity H)	0.005	0.006	0.006	0.006	0.012
杂质 I (impurity I)	—	—	—	—	—
杂质 J (impurity J)	—	—	—	—	—
杂质 K (impurity K)	—	—	—	—	—
其他单个最大杂质 (other maximum single impurity)	0.022	0.020	0.022	0.024	0.034
杂质总量 (total impurities)	0.074	0.057	0.062	0.063	0.091

注 (note): “—” 未检出 (not detected)

3 讨论

3.1 流动相的选择

国外文献^[14-15]采用 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶液 (pH 3.5)–乙腈体系测定罗氟司特的有关物质,经试验发现,该条件下梯度漂移较大,以至于在漂移的基线上杂质很难检测出来。将甲酸铵换成 $0.010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液,并对梯度洗脱程序进行调

整,结果表明,采用 $0.010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液可明显降低基线漂移,且各杂质均能有效分离。

3.2 pH 耐用性试验

随着磷酸盐缓冲液 pH 的增加,杂质 F 的保留时间增加,当 pH 为 3.7 时,杂质 F 的保留时间大于杂质 D 的保留时间,因此,须严格控制缓冲盐的 pH 范围为 3.3~3.6。

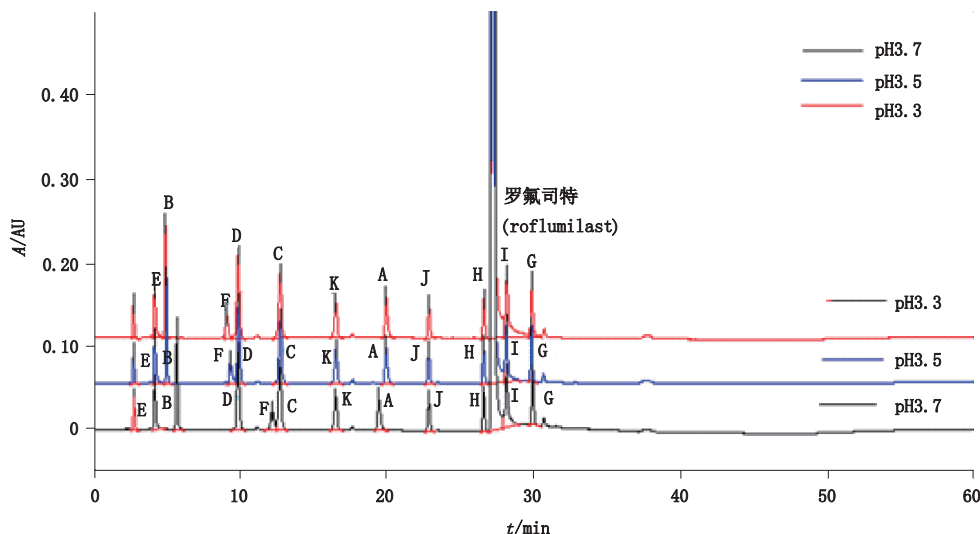


图 8 pH 耐用性色谱图谱

Fig. 8 Chromatograms of pH durability test

3.3 检测波长的选择

取“2.2”项下供试品溶液、以及各已知杂质的溶液,采用 PDA 检测器进行检测,罗氟司特在 215 nm 和 250 nm 波长附近有特征最大吸收,各杂质在 215 nm 均有较大吸收,而个别杂质在 250 nm 吸收较弱,因此,选用 215 nm 作为检测波长。

参考文献

- [1] BOLAND S, ALEN J, BOURIN A, *et al.* Novel roflumilast analogs as soft PDE4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(18): 4594
- [2] 闫文娜, 陈艳明, 倪成亮, 等. 罗氟司特中有关物质的鉴定和含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(10): 1726
YAN WN, CHEN YM, NI CL, *et al.* Identification and quantitative analysis of related substances in roflumilast [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(10): 1726
- [3] MILARA J, MORELL A, BALLESTER B, *et al.* Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist [J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 12
- [4] 马培奇. 慢性阻塞性肺病治疗新药罗氟司特 [J]. *上海医药*, 2011, 32(4): 201
- [5] MA PQ. Roflumilast: a novel approach to treating COPD [J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2011, 32(4): 201
- [6] 封宇飞. 磷酸二酯酶-4 抑制剂罗氟司特的药理与临床研究新进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(14): 1257
FENG YF. Progress in pharmacological and clinical studies of the phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast [J]. *Chin J New Drugs*, 2011, 20(14): 1257
- [7] 祝巍, 陈萍. 磷酸二酯酶抑制药—罗氟司特在慢性阻塞性肺疾病治疗中的应用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2011, 30(11): 819
ZHU W, CHEN P. Application of phosphodiesterase inhibitor—roflumilast in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2011, 30(11): 819
- [8] 韩伟, 周新. 慢性阻塞性肺疾病的治疗新选择—罗氟司特 [J]. *世界临床药物*, 2011, 32(7): 396
HAN W, ZHOU X. Roflumilast, a highly selective PDE-4 inhibitor in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *World Clin Drugs*, 2011, 32(7): 396
- [9] 王江玲, 梁建华. HPLC 法测定罗氟司特有关物质 [J]. *河南大学学报 (医学版)*, 2014, 33(4): 253
WANG JL, LIANG JH. Determination of related substances in roflumilast by HPLC [J]. *J Henan Univ (Med Sci)*, 2014, 33(4): 253

- [9] 郑曦孜. HPLC 法测定罗氟司特的有关物质[J]. 光谱实验室, 2013, 30(6): 3122
ZHENG XM. Determination of related substances in roflumilast by HPLC[J]. Chin J Spectrosc Lab, 2013, 30(6): 3122
- [10] 张莉, 黎其荣, 杨伟涵, 等. HPLC 法测定罗氟司特有关物质方法研究[J]. 今日药学, 2014, 24(2): 114
ZHANG L, LI QR, YANG WH, *et al.* HPLC determination of roflumilast related substances[J]. Pharm Today, 2014, 24(2): 114
- [11] 赵永娟, 付建, 赵海桥. HPLC 法测定罗氟司特片有关物质[J]. 中国化工贸易, 2013, 12(12): 321
ZHAO YJ, FU J, ZHAO HQ. Determination of related substances in roflumilast tablets by HPLC[J]. China Chem Trade, 2013, 12(12): 321
- [12] 杨丽霞, 闫建军, 冯彩婷. 高效液相色谱法测定罗氟司特药品中罗氟司特和 4 种杂质[J]. 理化检测(化学分册), 2015, 51(5): 594
YANG LX, YAN JJ, FENG CT. HPLC determination of roflumilast and 4 impurities in roflumilast drug[J]. Phys Test Chem Anal Part B(Chem Anal), 2015, 51(5): 594
- [13] 何凤琴, 周磊, 秦妮, 等. 罗氟司特主药和有关物质的 HPLC 法测定[J]. 医学美容美容, 2013(3): 155
HE FQ, ZHOU L, QIN N, *et al.* Determination of roflumilast and related substances by HPLC[J]. Med Aesthet Cosmetol, 2013(3): 155
- [14] BARHATE VD, DEOSTHALEE PC. Validation of rapid liquid chromatographic method for the determination of roflumilast[J]. J Chem Pharm Res, 2011, 3(2): 770
- [15] BARHATE VD, DEOSTHALEE P. Rapid liquid chromatographic method for the determination of roflumilast in the presence of degradation products[J]. Indian J Pharm Sci, 2010, 72(3): 401

(本文于 2016 年 7 月 4 日收到)