

HPLC法同时测定帕罗醇中的4种光学异构体含量

郭文敏^{1*}, 郑利刚¹, 邢浩², 白晓雪¹[1.石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035; 2.石家庄职业技术学院, 石家庄 050081]

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0071-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.25

摘要 目的:建立同时测定帕罗醇中4种光学异构体含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为CHIRALPAK[®] IC-3,以硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基)甲酸酯为填料;流动相为正己烷-异丙醇-二乙胺(65:35:0.1),流速为1.0 ml/min;检测波长为267 nm;柱温为25 ℃。结果:4种光学异构体间分离度均大于2.0,检测质量浓度线性范围均为5~120 μg/ml ($r=0.9999$),方法回收率 $\geq 99.42\%$, RSD $<1.20\%$ ($n=3$),检测限为10 ng。结论:建立的方法准确、快速,实现了对帕罗醇光学异构体杂质的有效控制。

关键词 帕罗醇;光学异构体;含量测定;高效液相色谱法

Content Determination of 4 Kinds of Enantiomers in Paroxol by HPLC

GUO Wen-min¹, ZHENG Li-gang¹, XING Hao², BAI Xiao-xue¹[1.CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China; 2.Shijiazhuang Vocational Technology Institute, Shijiazhuang 050081, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for determination of 4 kinds of enantiomers in paroxol. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was separated on CHIRALPAK[®] IC-3 column; silica gel covalent bonding cellulose-tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate) was used as filler. The mobile phase was consisted of hexane-isopropanol-diethylamine (65:35:0.1) at a flow rate of 1.0 ml/min and the column temperature at 25 ℃. The detection wavelength was 267 nm. RESULTS: The resolution of 4 kinds of enantiomers were greater than 2.0. The linear range of them were 5-120 μg/ml ($r=0.9999$, $n=7$) with an recovery rate $\geq 99.42\%$ (RSD $<1.20\%$, $n=3$). The detection limits were 10 ng. CONCLUSIONS: The method is accurate, rapid and suitable for quality control of enantiomers in paroxol.

KEYWORDS Paroxol; Enantiomers; Content determination; HPLC

帕罗醇有2个手性中心,共有4个光学异构体,反式左旋帕罗醇是帕罗西汀合成中的关键手性起始原料;而根据开发立体异构体新药的技术要求^[1],需要对手性起始原料的所有光学异构体进行严格控制,以确保终产品药物的安全性、有效性、质量可控性。文献^[2]中报道的方法只能检测顺式与反式2对非对映异构体,不能同时检测帕罗醇中可能存在的4个光学异构体(A反式左旋帕罗醇、B反式右旋帕罗醇、C顺式右旋帕罗醇、D顺式左旋帕罗醇),因而有必要首先建立一套适合的分析方法对A的3种光学异构体杂质进行有效控制。为此,本研究建立了同时测定帕罗醇中4种光学异构体的含量方法,报道如下。

1 材料

1.1 仪器

UV-2201 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);1200 高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

帕罗醇4种异构体对照品(包括A、B、C、D,批号分别为:111201、111202、111203、111204,纯度分别为:97.68%、97.19%、98.66%、96.39%)均为石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司拆分、精制、标定;A原料药[石药集团中奇制药技术(石

庄)有限公司自制,批号:120101、120102、120103,含量:99.56%、99.69%、99.91%];正己烷、异丙醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

对照品溶液:分别精密称取A、B、C、D 4种异构体对照品各10.0 mg,各置于100 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为100 μg/ml的对照品溶液;将4种异构体对照品溶液按1:1:1:1混合,即得4种异构体的混合对照溶液。

供试品溶液:分别精密称取3批A原料药各10.0 mg,分别置于100 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2 测定波长的选择

分别以流动相为溶剂将A、B、C、D 4种异构体对照品配制成一定质量浓度的溶液,在190~400 nm波长内进行扫描。结果表明,各异构体在267 nm波长处均有较强的吸收,故选择其作为检测波长。

2.3 色谱条件

色谱柱为CHIRALPAK[®] IC-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基)甲酸酯为填料;流动相为正己烷-异丙醇-二乙胺(65:35:0.1),流速为

*高级工程师。研究方向:新药研发。E-mail: gwenmin@mail.ccspc.com

1.0 ml/min;检测波长为267 nm;柱温为25 ℃;进样量为10 μl。

2.4 方法专属性考察

分别精密量取A、B、C、D 4种异构体的对照品溶液及其混合对照溶液各10 μl,进样测定,记录色谱图。结果,A、B、C、D的保留时间分别为6.856、7.635、14.103、28.319 min,理论板数分别为12 696、8 186、9 295、8 029,两两间分离度分别为2.1、3.6、5.1,拖尾因子均小于1.15,空白溶剂不干扰测定。色谱图见图1。

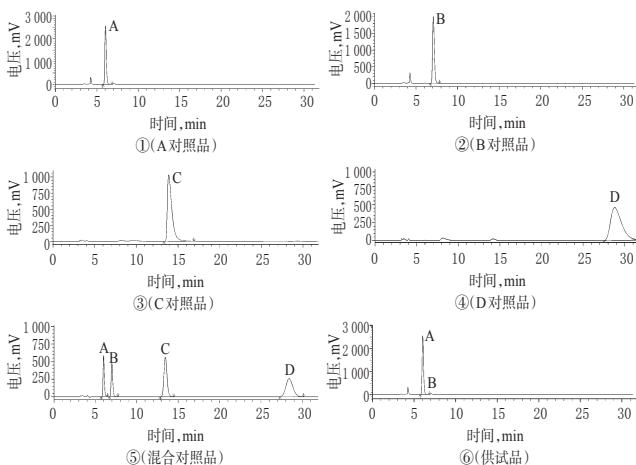


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.5 线性关系试验

分别精密称取4种异构体A、B、C、D对照品各适量,用流动相依次稀释制成含每个手性单体质量浓度约为5.0、10、20、50、80、100、120 μg/ml的溶液,进样测定,以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归,得4种异构体的线性方程,见表1,结果表明4种异构体检测质量浓度线性范围均为5~120 μg/ml。

表1 4种帕罗醇异构体的线性关系结果

Tab 1 Results of linear range of 4 kinds of paroxol enantiomers

异构体	线性方程	r	线性范围, μg/ml
A	$A=62.1c-3.96$	0.999 9	5~120
B	$A=59.4c+3.09$	0.999 9	5~120
C	$A=65.1c-3.28$	0.999 9	5~120
D	$A=57.4c+4.09$	0.999 9	5~120

2.6 检测限试验

取上述对照品溶液,逐级稀释至信噪比 ≥ 3 时,4种异构体的检测限均为10 ng。

2.7 回收率试验

按“2.1”项下方法称取已知4种异构体含量的供试品各9份,分别加入含4种异构体为高、中、低3个质量浓度的对照品溶液各3份,进样测定,计算各个异构体的回收率。4种异构体A、B、C、D的回收率试验结果见表2。

2.8 溶液稳定性试验

分别取各异构体对照品溶液于室温下放置,于0、2、4、6、8 h进样测定。结果各异构体的峰面积在8 h内RSD均小于0.4% ($n=5$),表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.9 重复性试验

称取批号为120101的样品6份,分别配制成供试品溶液,进样测定,结果表明本方法重复性良好,详见表3。

表2 回收率试验结果(% , $n=3$)

Tab 2 Results of recovery test(% , $n=3$)

异构体	回收率			平均回收率	RSD
	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度		
A	101.66	99.35	99.89	100.30	1.20
B	99.37	100.25	98.95	99.52	0.67
C	98.95	99.47	100.16	99.53	0.61
D	99.01	99.59	99.65	99.42	0.36

表3 重复性试验结果(% , $n=6$)

Tab 3 Results of repeatability test(% , $n=6$)

样品序号	各异构体含量			
	A	B	C	D
1	99.56	0.12	0.10	0.23
2	99.55	0.13	0.10	0.24
3	99.53	0.12	0.10	0.23
4	99.56	0.12	0.09	0.22
5	99.51	0.12	0.10	0.23
6	99.53	0.12	0.10	0.24
RSD, %	0.02	3.36	4.15	3.25

2.10 样品中异构体含量测定

分别称取3批样品配制成供试品溶液后进样测定,结果见表4,色谱见图1⑥(批号:120103)。

表4 3批样品中异构体含量测定结果(%)

Tab 4 Results of content determination of enantiomers in 3 batches of samples(%)

批号	异构体含量			
	A	B	C	D
120101	99.56	0.12	0.10	0.23
120102	99.69	0.10	0.09	0.10
120103	99.91	0.07	0.01	0.01

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本研究前期试验中分别以蛋白质型、多糖衍生物型、硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基)甲酸酯等为填料的手性色谱柱进行4种异构体检测方法的摸索。结果表明,以蛋白质型为填料的色谱柱的色谱峰形较差,无法有效分离4种手性异构体;以多糖衍生物型为填料的色谱柱虽然能够分离4种异构体,但要异构体A和B达到分离度大于1.5以上的理想分离,异构体D的保留时间将在90 min以上,且柱效较差,不适合含量测定使用。故本研究最终选择了以硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基)甲酸酯为填料的色谱柱,结果4种异构体均达到基线分离,分析时间为30 min,4种手性异构体色谱峰的理论板数均在8 000以上,适合于快速、准确测定4种异构体含量的要求。

3.2 流动相的选择

以硅胶表面共价键合有纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基)甲酸酯为填料的色谱柱,选用正己烷-异丙醇为流动相时,由于帕罗醇为含醇羟基的化合物,故在流动相中加入碱性改性剂二乙胺可以显著地改善色谱峰的保留行为、分离度及柱效。通过对正己烷-异丙醇-二乙胺比例分别为66:34:0.1、65:35:0.1、64:36:0.1的流动相进行筛选,最终选择以正己烷-异丙醇-二乙胺(65:35:0.1)为流动相。试验表明此流动相下4种异构体在较短的时间内达到基线分离。

氟哌啶醇片溶出度测定方法的改进

余倩*,段永生,杜凯,刘珊珊,车宝泉(北京市药品检验所,北京 100035)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0073-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.26

摘要 目的:建立氟哌啶醇片新的溶出度测定方法。方法:溶出度法由《中国药典》的小杯法改为篮法,以盐酸溶液 900 ml 代替 200 ml 为溶出介质,转速为 100 r/min;检测方法由原来的紫外分光光度法改为高效液相色谱法,色谱柱为 Intersil C₁₈,流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(60:40,pH 4.0),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 248 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 50 μl。同时比较两种方法测定 6 批样品的溶出度结果。结果:氟哌啶醇检测质量浓度线性范围为 0.531~4.248 μg/ml($r=0.9999$),平均回收率为 99.58%(RSD=0.46%, $n=3$);样品的溶出时间由原来的 45 min 缩短至 30 min,限度由原来的 70% 提高到 80%。新方法与原方法相比溶出量更高,RSD 更小,样品溶出均一性更好。结论:新方法提高了溶出度检测的专属性和准确性,较好地体现了片剂间的差异。

关键词 氟哌啶醇片;溶出度测定;方法改进;高效液相色谱法

Improvement of Determination Method of the Dissolution of Haloperidol Tablets

YU Qian, DUAN Yong-sheng, DU Kai, LIU Shan-shan, CHE Bao-quan (Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of dissolution of Haloperidol tablets. METHODS: The dissolution experiment adopted rotating basket method in *Chinese Pharmacopeia* instead of small vessel method, using hydrochloric acid solution 900 ml instead of 200 ml as solvent and rotating speed of 100 r/min. The determination method changed from UV to HPLC. The analytical column was Intersil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (60:40, pH adjusted to 4.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 248 nm, and column temperature was 30 ℃. The injection volume was 50 μl. The detection methods for the dissolution of 6 batches of samples were compared. RESULTS: The linear range of haloperidol were 0.531-4.248 μg/ml ($r=0.9999$) with an average recovery of 99.58% (RSD=0.46%, $n=3$). The dissolution time for the sample decreased to 30 min from the previous 45 min, and the limitation rate increased from 70% to 80%. Compared with previous method, new method showed higher dissolution, lower RSD and better homogeneity. CONCLUSIONS: The method improves the accuracy and specificity for dissolution detection. The improved dissolution method is more discriminating among different tablets than before.

KEYWORDS Haloperidol tablets; Dissolution determination; Method improvement; HPLC

氟哌啶醇是一种丁酰苯类抗精神分裂药^[1],用于治疗急、慢性各种精神分裂症、躁狂症、反应性精神病及其他具有兴奋、躁动幻觉、妄想等症的重症精神病^[2]。氟哌啶醇难溶于水^[3],所以氟哌啶醇的溶出行为成为其吸收利用的限速步骤,直接决定其利用效率,因此氟哌啶醇的溶出度试验是十分重要和必要的^[4]。2010年版《中国药典》二部的方法^[5]为:采用小

杯法,用盐酸溶液(9→1 000)200 ml 为溶出介质,转速为 75 r/min^[5]。此条件转速过高,条件过于剧烈,不能有效评价该制剂的溶出情况,而小杯法是在检测灵敏度达不到要求时的无奈选择^[5],因此建立更为有效的溶出度方法以保证药品的有效性十分必要^[6-8]。笔者参照《美国药典》(USP)32-NF27 的方法^[9],通过试验研究将溶出度试验方法改为篮法,溶剂为盐酸溶液

本研究另对流速及柱温进行了考察,结果发现流速的改变对异构体的分离影响不大,为减少分析运行时间,选择流速为 1.0 ml/min;柱温由 15 ℃升高到 40 ℃,虽然保留时间由 60 min 减少到 35 min,但异构体 A 和 B 的分离度由 2.9 降低到 1.45,综合比较,选择柱温为 25 ℃。

综上,本研究经采用不同手性色谱柱、不同流动相体系、不同流动相调节剂(二乙胺、三氟乙酸、甲酸等)对 4 种异构体进行色谱条件与系统适用性试验,优化确定了同时测定 4 种异构体含量的准确、快速的 HPLC 法条件。本研究成功地实现了

对反式左旋帕罗醇光学异构体(A)杂质的有效控制,对提高用其作为原料合成的药品帕罗西汀的安全性、有效性、质量可控性具有促进作用。

参考文献

- [1] 黄晓龙.美国 FDA 关于开发立体异构体新药的政策简介[J].中国新药杂志,2000,9(9):650.
- [2] 郭文敏,白晓雪,梁亚丽,等.HPLC 法同时测定帕罗醇中反式帕罗醇和顺式帕罗醇的含量[J].中国药师,2011,14(11):1 570.

* 主管药师。研究方向:药品质量标准、药物分析及药品检验。电话:010-83229443。E-mail:yuqian666111@126.com

(收稿日期:2013-04-01 修回日期:2013-04-26)