

HPLC法测定1,2-环己烷二甲醇中非对映异构体的含量

郭文敏^{1*}, 李清娟¹, 张琪¹, 陈素锐¹, 邢浩²[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)05-0455-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.05.24

摘要 目的:建立测定盐酸鲁拉西酮合成中的关键起始原料即1,2-环己烷二甲醇中杂质非对映异构体含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Rx C₈,流动相为0.01 mol/L 甲酸铵缓冲溶液(pH 3.0)-甲醇(70:30),流速为1.0 ml/min,检测器为示差折光检测器,检测器温度为35 ℃,柱温为35 ℃,以外标法测定。结果:1,2-环己烷二甲醇与其非对映异构体之间分离度大于2.0;二者检测质量浓度线性范围分别为0.01~10.0 mg/ml、10.0~200.0 μg/ml(*r*均为0.999 9);非对映异构体平均回收率为99.29% (RSD=0.66%, *n*=3),检测限为10 ng。结论:建立的方法准确、快速,可用于控制终产品盐酸鲁拉西酮中的光学异构体杂质含量。**关键词** 1,2-环己烷二甲醇;非对映异构体;高效液相色谱法;示差折光检测器;含量测定

Content Determination of Diastereoisomer of 1,2-cyclohexanedimethanol by HPLC

GUO Wen-min¹, LI Qing-juan¹, ZHANG Qi¹, CHEN Su-rui¹, XING Hao²[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 the content determination of diastereoisomer of 1,2-cyclohexanedimethanol which is the key starting material to synthesis lurasidone hydrochloride by HPLC. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Rx C₈ column with mobile phase consisted of 0.01 mol/L ammonium formate buffer solution (pH 3.0)-methanol (70:30) at the flow rate of 1.0 ml/min. Differential refractive index detector was adopted with the temperature of 35 ℃. The column temperature was set at 35 ℃, and external method was used. RESULTS: The resolution of cyclohexanedimethanol and diastereoisomer was greater than 2.0. The linear range of them were 0.01-10.0 mg/ml and 10.0-200.0 μg/ml (*r*=0.999 9); average recovery of diastereoisomer was greater than 99.29% (RSD=0.66%, *n*=3), and the detection limit was 10 ng. CONCLUSIONS: The method is proved to be simple, rapid and suitable for the content control of diastereoisomer in lurasidone hydrochloride.

KEYWORDS 1,2-cyclohexanedimethanol; Diastereoisomer; HPLC; Differential refractive index detector; Content determination

盐酸鲁拉西酮(Lurasidone hydrochloride, 商品名为Latuda)是第2代抗精神分裂症新药,于2010年10月28日被美国FDA批准上市,用于成人的精神分裂症。其作为一种具有双

重作用的抗精神分裂症治疗药物^[1-3],同时作用于多巴胺D₂受体、5-羟色胺(5-HT)₇受体、5-HT_{1a}受体、5-HT_{2a}受体、α_{2c}-肾上腺素受体,除可抑制注意缺陷多动障碍外,还可有效抑制

对顶空瓶平衡时间进行筛选,结果发现平衡时间在30 min后,峰面积基本不再改变。因此选择在100 ℃平衡温度条件下平衡30 min作为顶空进样条件。

3.3 色谱柱温度、加热时间的选择

乙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇的沸点范围较窄(39~83 ℃),笔者曾分别选择柱温35、45、55 ℃进行试验,结果在35 ℃时乙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇分离较好,45 ℃和55 ℃时出峰过快、分离度差。故选择35 ℃作为初温,保持5 min,待8种溶剂完全出峰后,再升高至200 ℃,使DMF出峰。

3.4 检测限度

药品中有机溶剂残留种类因生产工艺不同而异,本文中各种有机溶剂限度根据文献^[9]要求及2010年版《中国药典》^[2]的

规定,暂将阿莫曲坦原料药中乙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇与甲苯的限度定为0.5%、0.041%、0.06%、0.029%、0.5%、0.072%、0.5%和0.089%。

综上所述,本试验建立的方法线性、精密度、回收率、定量限、检测限结果等均较好,符合要求,能准确、迅速地检测出阿莫曲坦原料药中残留的乙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇与甲苯,从而控制药品质量、保证安全用药。

参考文献

- [1] 李晓东.抗偏头痛药阿莫曲坦:almotriptan[J].国外医药合成药、生化药、制剂分册,2002,23(1):55.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录61-63.
- [3] 周海钧.药品注册的国际技术要求:质量部分(ICH)[M].北京:人民卫生出版社,2000:82-89.

(收稿日期:2013-04-09 修回日期:2013-05-10)

* 高级工程师, 硕士。研究方向: 新药研发。电话: 0311-67808931。E-mail: gwenmin@mail.ecspc.com

5-HT₂受体介导的行为,可剂量依赖性地显著抑制缓解条件性恐惧应急所致的僵滞行为。1,2-环己烷二甲醇(以下简称环己烷二甲醇)是盐酸鲁拉西酮合成中的关键起始原料,在合成反应中,环己烷二甲醇中的非对映异构体也参与反应,生成盐酸鲁拉西酮的异构体杂质,但在工艺中除去较为困难,因此严格控制环己烷二甲醇中非对映异构体的含量是合成中的一个关键控制点,但目前关于环己烷二甲醇中非对映异构体的检测方法尚未见文献报道。笔者建立了采用示差折光检测器^[4-7]测定环己烷二甲醇中非对映异构体杂质的高效液相色谱(HPLC)方法,结果表明建立的方法准确、快速,为有效控制终产品盐酸鲁拉西酮中的光学异构体杂质提供了方法,为该产品的质量控制提供了保障。

1 材料

1.1 仪器

e2695 HPLC 仪、2414 示差折光检测器(美国 Waters 公司)。

1.2 药品与试剂

环己烷二甲醇对照品(批号:20120901,纯度:99.85%)、环己烷二甲醇非对映异构体对照品(批号:20120902,纯度:99.69%)、环己烷二甲醇原料药(批号:20120301、2012302、2012303,纯度:99.76%、99.71%、99.79%)均由石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司提供;甲醇为色谱纯,甲酸铵为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与检测器条件

色谱柱:Agilent Rx C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L 甲酸铵缓冲溶液(pH 3.0)-甲醇(70:30),流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;柱温:35 °C;检测器内部温度:35 °C,外部温度:35 °C;采样速率:2.50 μl/s,过滤时间常数:1.0 s;极性:+;灵敏度:1 250.0 nRIU/mV。

2.2 供试品溶液制备

精密称取原料药约 100 mg,置于 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.3 对照品溶液制备

精密称取环己烷二甲醇与环己烷二甲醇非对映异构体对照品各适量,分别置于 10 ml 量瓶中,加流动相溶解制成含环己烷二甲醇约为 10 mg/ml、环己烷二甲醇非对映异构体 0.01 mg/ml 的溶液,摇匀,滤过,即得。

2.4 专属性考察

分别精密称取环己烷二甲醇与环己烷二甲醇非对映异构体对照品适量,加流动相溶解分别制成各自的对照品溶液及 2 种对照品的混合对照品溶液。依次精密吸取上述 3 种溶液及供试品溶液各 20 μl 注入色谱仪,记录色谱图。结果表明,环己烷二甲醇峰与其非对映异构体峰的保留时间分别约为 11、8 min,2 个色谱峰之间分离度大于 2.0,理论板数均高于 5 000,色谱图见图 1。

2.5 线性关系与响应因子考察

分别精密称取环己烷二甲醇对照品和环己烷二甲醇非对映异构体对照品适量,加流动相溶解并稀释制成含环己烷二甲醇分别为 0.01、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/ml 与非对映异构体

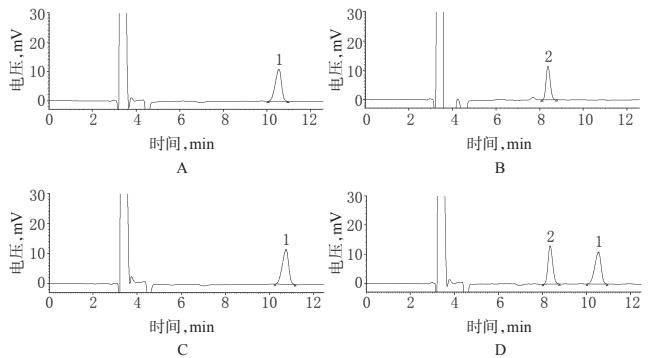


图1 高效液相色谱图

A. 环己烷二甲醇对照品; B. 环己烷二甲醇非对映异构体对照品; C. 供试品; D. 混合对照品; 1. 环己烷二甲醇; 2. 环己烷二甲醇非对映异构体

Fig 1 HPLC chromatograms

A. cyclohexanedimethanol control; B. cyclohexanedimethanol diastereoisomer control; C. test sample; D. mixed control; 1. cyclohexanedimethanol; 2. cyclohexanedimethanol diastereoisomer

分别为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μg/ml 的对照品溶液;分别精密吸取 20 μl,注入色谱仪,记录峰面积,以质量浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标,进行线性回归,得环己烷二甲醇及其非对映异构体的线性方程分别为: $A=2\ 985.5c+12.9$ ($r=0.999\ 9, n=6$)、 $A=2\ 981.1c+9.5$ ($r=0.999\ 9, n=5$)。结果表明,环己烷二甲醇及其非对映异构体检测质量浓度线性范围分别为 0.01~10.0 mg/ml、10.0~200.0 μg/ml;且以环己烷二甲醇响应因子为 1 计,环己烷二甲醇非对映异构体的相对响应因子为 0.996。

2.6 精密度试验

分别精密吸取环己烷二甲醇(10.0 mg/ml)及其非对映异构体(100.0 μg/ml)的对照品溶液 20 μl,重复进样 5 次,测得二者峰面积的 RSD 分别为 0.42%、0.44% ($n=5$),表明方法精密度良好。

2.7 检测限与定量限试验

采用逐级稀释的方法制备系列质量浓度的环己烷二甲醇非对映异构体对照品溶液,进样测定。当信噪比≥10 时,环己烷二甲醇非对映异构体的定量限为 31 ng;当信噪比≥3 时,环己烷二甲醇非对映异构体的检测限为 10 ng。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20120301)共 5 份,分别制备成供试品溶液,进样测定,结果样品中环己烷二甲醇和非对映异构体杂质的含量分别为 99.76%、0.24%,RSD 分别为 1.39%、1.96% ($n=5$)。

2.9 回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20120301,环己烷二甲醇及其非对映异构体的含量分别为 99.76%、0.24%)约 100 mg 各 9 份;于 9 份样品中依次精密加入环己烷二甲醇非对映异构体对照品溶液(0.304 0 mg/ml)0.4、0.8、1.2 ml 各 3 份,并制备成供试品溶液。分别精密吸取 20 μl,注入色谱仪,记录色谱图,计算回收率,结果见表 1。

2.10 溶液稳定性考察

取“2.8”项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 时精密吸取 20 μl,注入色谱仪,记录色谱图,测定其峰面积。结果环

表1 回收率试验结果($n=3$)Tab 1 Results of recovery test($n=3$)

样品称量,mg	样品中非对映异构体的已知量,mg	非对映异构体的加入量,mg	非对映异构体的测得量,mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
100.56	0.241 3	0.121 6	0.362 1	99.29		
100.66	0.241 6	0.121 6	0.360 9	98.09		
100.89	0.242 1	0.121 6	0.363 7	99.97		
100.28	0.240 7	0.243 2	0.481 2	98.92		
100.69	0.241 7	0.243 2	0.482 9	99.20	99.29	0.66
100.95	0.242 3	0.243 2	0.483 6	99.23		
100.78	0.241 9	0.364 8	0.608 4	100.46		
100.36	0.240 9	0.364 8	0.602 7	99.19		
100.49	0.241 2	0.364 8	0.603 2	99.23		

己烷二甲醇及其非对映异构体峰面积的RSD分别为0.65%、0.69%($n=6$)。结果表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.1.1 耐用性考察

依据2010年版《中国药典》(二部)附录XIX A关于药品质量标准分析方法验证指导原则^[8],以主峰理论板数、主峰与相邻杂质峰的分度为评价指标,分别选用以辛烷基硅烷键合硅胶为固定相、不同品牌的色谱柱(柱1:Agilent;柱2:Waters;柱3:Phenomenex),不同pH(2.9、3.0、3.1)的0.01 mol/L甲酸铵缓冲溶液,不同流动相比,不同流速,不同柱温进行方法优化,最终确定了本试验的最佳分离分析条件即“2.1.1”项下条件。具体试验结果见表2。

表2 方法耐用性考察结果

Tab 2 Results of robustness test

色谱条件	主峰理论板数	主峰与相邻杂质峰分离度
柱1 缓冲溶液pH	2.9	3 439
	3.0	3 931
	3.1	3 416
流动相比	甲醇-缓冲溶液(72:28)	3 989
	甲醇-缓冲溶液(70:30)	3 961
	甲醇-缓冲溶液(68:32)	3 015
流速	0.9 ml/min	3 163
	1.0 ml/min	3 209
	1.1 ml/min	3 219
色谱柱温度	30 ℃	3 389
	35 ℃	3 986
	40 ℃	3 989
检测器温度	30 ℃	3 315
	35 ℃	3 970
	40 ℃	3 975
柱2	文中确定的色谱条件	3 586
柱3	文中确定的色谱条件	3 931

2.1.2 样品含量测定

取3批样品制备成供试品溶液后进样测定,计算样品中环己烷二甲醇非对映异构体杂质的含量,结果分别为0.19%、0.27%、0.21%。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

由于环己烷二甲醇与其非对映异构体为极性较为相似的化合物,前期试验中分别采用以辛烷基硅烷键合硅胶、十八烷基硅烷键合硅胶、氨基键合硅胶为填料的色谱柱进行分析。结果表明,采用辛烷基硅烷键合硅胶为填料的色谱柱,环己烷二甲醇与其非对映异构体的色谱峰峰形良好、柱效最佳;经考察不同品牌的辛烷基硅烷键合硅胶色谱柱,结果表明均符合要求,本文拟定方法良好。

3.2 流动相组成的优化

由于示差折光检测器属于光学检测器,流动相中存在的微小气泡会使基线不稳,甚至影响检测,因此流动相在临用前应将缓冲溶液与有机相按比例混为一相、进行脱气后方可使用。因此本测定方法中的流动相组成是首先借助蒸发光散射检测器进行优化确定后,再采用示差折光检测器进行方法学验证研究。在选用流动相体系时,使用甲酸铵缓冲溶液,调pH为3.0,可使二者的分离度与峰形达到最佳;在有机相的选择过程中,经试验筛选使用甲醇更优,且可调空间较大。

3.3 其他应用

本方法除可用于测定环己烷二甲醇中的非对映异构体杂质外,亦可用于环己烷二甲醇及其非对映异构体的含量测定。

参考文献

- [1] 封宇飞.抗精神病新药鲁拉西酮的药理与临床研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(10):853.
- [2] Citrome L. Lurasidone for schizophrenia: a brief review of a new second-generation antipsychotic[J]. *Clin Schizophr Relat Psychoses*, 2011, 4(4):251.
- [3] Citrome L. Lurasidone for schizophrenia: a review of the efficacy and safety profile for this newly approved second-generation antipsychotic[J]. *Int J Clin Pract*, 2011, 65(2):189.
- [4] 徐焯,李丽君,王乃芝,等.高效液相色谱法测定饮料中防腐剂 and 甜味剂[J].食品科学,2008,29(6):339.
- [5] 戴传波,李建桥,胡清.采用带示差折光检测器的高效液相色谱法检测肌醇[J].化学工业与工程技术,2006,27(4):57.
- [6] 龚时琼.高效液相色谱仪常用检测器的使用与维护[J].现代仪器,2009,16(1):55.
- [7] 顾云,李海生.高效液相色谱法用于蜂蜜的分析及其品质评价[J].天津药学,2001,13(2):49.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录194-195.

(收稿日期:2013-04-25 修回日期:2013-08-02)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅