

HPLC法检查盐酸托莫西汀左旋异构体的有关物质

陈杰*,李展(河南省食品药品检验所,郑州 450003)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4299-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.24

摘要 目的:建立盐酸托莫西汀左旋异构体有关物质的检查方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为CHIRALPAK® OT(+),流动相为甲醇-异丙醇-三乙胺(960:40:0.5),检测器为蒸发光散射检测器,漂移管温度为90℃,气流速度为2.5 L/min。结果:各杂质峰与主成分峰分离度良好,已知杂质D-ATM、3-ATM、4-ATM与盐酸托莫西汀峰的相对保留时间分别约为0.65、1.26、1.50,前三者检测限分别为0.002 2、0.004 1、0.003 9 μg;3批样品中检出D-ATM,未检出3-ATM和4-ATM。结论:建立了盐酸托莫西汀中包括旋光异构体及同分异构体在内的有关物质的检查方法,且方法操作简便、专属性好。

关键词 盐酸托莫西汀;左旋异构体;HPLC;蒸发光散射检测器;有关物质;分离;检查

Determination of the Related Substances of Atomoxetine Hydrochloride Levamisole Isomer by HPLC CHEN Jie, LI Zhan (Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the detection of related substances in atomoxetine hydrochloride levamisole isomer. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on CHIRALPAK® OT(+) column with mobile phase consisted of methanol-isopropyl alcohol- triethylamine (960:40:0.5). ELSD detector was used, and the temperature of drift pipe was 90 °C; flow rate was 2.5 L/min. RESULTS: The impurity peak was well separated from main component peak; the relative retention time of known impurity D-ATM, 3-ATM, 4-ATM and atomoxetine hydrochloride were 0.65, 1.26 and 1.50, respectively. The detection limits were 0.002 2, 0.004 1 and 0.003 9 μg, respectively. D-ATM was found in 3 batches of sample, while 3-ATM and 4-ATM were not. CONCLUSIONS: The method has been established for the determination of the related substances as optical isomer and isomer in atomoxetine hydrochloride. The method is simple and specific.

KEYWORDS Atomoxetine hydrochloride; Levamisole isomer; HPLC; ELSD; Related substances; Separation; Detection

离子表面活性剂,季铵盐类化合物在碱性环境中杀菌作用较强,但硫酸镁溶液在碱性环境下容易生成碱式碳酸镁白色沉淀,而在酸性环境下则较稳定^[1]。笔者测定硫酸镁甘油溶液pH结果显示偏酸,而0.03%苯甲酸(pH 3.63)偏酸性,有利于提高硫酸镁甘油溶液的稳定性、发挥最佳的防腐效果。结合防腐剂筛选试验结果,优选0.03%苯甲酸为本品防腐剂。

有文献^[2]报道,以沉淀和显色反应鉴别甘油,操作简便、灵敏度高、便于观察。原理是由于甘油易被高碘酸氧化生成碘酸和甲酸,碘酸与硝酸银作用生成白色的碘酸银沉淀;甲酸与变色酸在硫酸中显红色。本品中含有硫酸镁,采用沉淀和显色反应鉴别甘油,硫酸镁会干扰结果判断,因此笔者根据2002年版《军队制剂规范》记载的甘油鉴别方法,即加硫酸氢钾0.5 g,加热,产生丙烯醛刺激性臭气。该方法操作简单,基层医院易于操作;且硫酸镁甘油溶液中甘油含量较高,丙烯醛刺激性臭气气味明显,易于辨识,能有效控制硫酸镁甘油溶液的质量。

本试验建立的提高硫酸镁甘油溶液质量及其标准的方法,可操作性强,能够有效控制本品的质量,使临床用药更加安全、有效。因此,建议在硫酸镁甘油溶液处方中增加0.03%苯甲酸为防腐剂,并增加甘油的鉴别项以提高其质量标准。

参考文献

- [1] 解放军总后勤部卫生部.中国人民解放军医疗机构制剂规范[M].2版.北京:人民军医出版社,2003:95-103.
- [2] 王志杰.1、2、3灌肠液在脑卒中便秘患者中的应用[J].中

日友好医院学报,2013,27(4):254.

- [3] 罗明生,高天惠.药用辅料大全[M].成都:四川科技出版社,1995:46-49.
- [4] 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,2010:437、1 223,附录107-116.
- [5] 梁小岩,曾伟强,雷桂华.常用液体制剂的防腐实验[J].齐鲁药事,2005,24(4):225.
- [6] 袁惠英.50%硫酸镁溶液的防腐剂筛选研究[J].中国药房,2011,22(9):812.
- [7] 李凡,刘晶星.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2010:41-42.
- [8] 邱凯.氯己定类消毒剂的研究进展[J].中国消毒学杂志,2010,27(4):460.
- [9] 张红,金琛,余洁.薄荷水防腐剂的筛选[J].中国药业,2013,22(20):56.
- [10] 李巧.10%氯化钾溶液防腐剂的筛选[J].医药导报,2005,24(3):223.
- [11] 莫玉芳,叶延武.5种防腐剂在50%硫酸镁溶液中的溶解及防腐效果[J].国际医药卫生导报,2006,12(12):109.
- [12] 管世煌.度灭芬在制剂中的应用[J].中国医院药学杂志,1983,3(4):29.
- [13] 任华君.开塞露鉴别方法的改进[J].华西药学杂志,1996,11(2):94.

* 副主任药师,硕士。研究方向:药品质量控制。电话:0371-63388289。E-mail:chenjiehn@163.com

(收稿日期:2014-01-23 修回日期:2014-04-03)

盐酸托莫西汀(Atomoxetine hydrochloride)是由美国Eli Lilly公司研制开发的新一代治疗注意力不集中与多动症(ADHD)的非精神性兴奋药物,是美国FDA许可用于治疗ADHD的第1个非中枢兴奋剂,其作用机制与以往获FDA批准的ADHD治疗药不同,是一个选择性去甲肾上腺素再摄取抑制剂,可用于兴奋剂治疗无效或其他原因不能使用兴奋剂的患者^[1]。目前认为本品的治疗作用与其选择性抑制突触前胺泵对去甲肾上腺素的再摄取效应有关,能增强去甲肾上腺素的翻转效应,从而改善ADHD的症状,间接促进认知的完成和注意力的集中。本品选择性作用非常强,耐受性良好,副作用极少^[2]。

盐酸托莫西汀临床批准使用的为左旋异构体,目前文献较少报道盐酸托莫西汀的有关物质的检查方法,已有文献建立的有关物质检查方法没有明确是否能够同时有效分离异构体^[3]。笔者采用新型的硅胶键合聚甲基丙烯酸酯手性柱CHIRLPAK® OT(+),该色谱柱具有传统硅胶正相柱的分离特点,但又不具有后者对水高度敏感的特性,且与后者比较另具有手性分离能力。在试验中,笔者将紫外二极管阵列检测器(DAD)串联蒸发光散射检测器(ELSD),利用ELSD能够检出无紫外吸收的杂质的特点,以期比较两种检测器检出杂质谱的差异,从而建立了盐酸托莫西汀中包括旋光异构体及同分异构体在内的有关物质的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-30A型高效液相色谱(HPLC)仪,包括SPD-20A型DAD(日本岛津公司);2000ES型ELSD(美国奥泰科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

(R)-(-)-托莫西汀盐酸盐原料药(以下简称盐酸托莫西汀,批号:120700020,纯度:99.1%;批号:120700030,纯度:99.3%;批号:120700040,纯度:99.4%)、已知杂质对照品N-甲基-3-(3-甲基苯氧基)-3-苯丙胺(简称3-ATM,批号:33452,纯度:98.2%)、N-甲基-3-(4-甲基苯氧基)-3-苯丙胺(简称4-ATM,批号:33553,纯度:98.0%)、N-甲基-3-苯氧基-3-苯丙胺(简称D-ATM,批号:33652,纯度:98.5%)均由河南天方药业股份有限公司提供;甲醇、异丙醇均为色谱纯,三乙胺为分析纯。

2 方法与结果^[4-5]

2.1 色谱条件

色谱柱为CHIRALPAK® OT(+)(150 mm×4.6 mm,10 μm);流动相为甲醇-异丙醇-三乙胺(960:40:0.5,pH 8.22),流速为1.0 ml/min;DAD,检测波长为230 nm,进样量为30 μl;ELSD,漂移管温度为90℃,气流速度为2.5 L/min。理论板数以盐酸托莫西汀峰计不低于3 000,D-ATM、3-ATM、4-ATM与盐酸托莫西汀峰的相对保留时间(RRT)分别约为0.65、1.26、1.50。

2.2 溶液制备

取本品加流动相制成约2.0 mg/ml作为贮备液;取各已知杂质对照品加流动相分别制成D-ATM(10.1 μg/ml)、3-ATM(10.3 μg/ml)、4-ATM(10.4 μg/ml)的溶液,作为各杂质对照品溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下贮备液10 ml,置于小量筒中用流动相定容至

15 ml,作为供试品溶液依法测定。另取贮备液5份,每份10 ml:(1)加醇制稀盐酸溶液(0.1 mol/ml)1 ml,强力振摇,1 h后加入醇制氢氧化钠溶液(0.1 mol/ml)1 ml,调pH为中性作为酸破坏溶液;(2)加醇制氢氧化钠溶液(0.1 mol/ml)1 ml,强力振摇,1 h后加入醇制稀盐酸溶液(0.1 mol/ml)1 ml,调pH为中性作为碱破坏溶液;(3)加5%双氧水1 ml,强力振摇,作为氧化破坏溶液;(4)在70℃放置5 h,作为热破坏溶液;(5)在3 000 lx光照下放置24 h,作为光破坏溶液。取上述各破坏液分别加入“2.2”项下D-ATM、3-ATM、4-ATM对照品溶液各1 ml,置于小量筒中用流动相定容至15 ml,依法测定,结果各检测成分均能有效分离。经DAD检测,在230 nm波长处杂质峰最多,故设定检测波长为230 nm;另以碱破坏溶液检出杂质数量最多。与DAD相比,ELSD检出的杂质峰响应值虽较小,但数量更多,因此拟定标准采用ELSD,见图1(部分图略)。

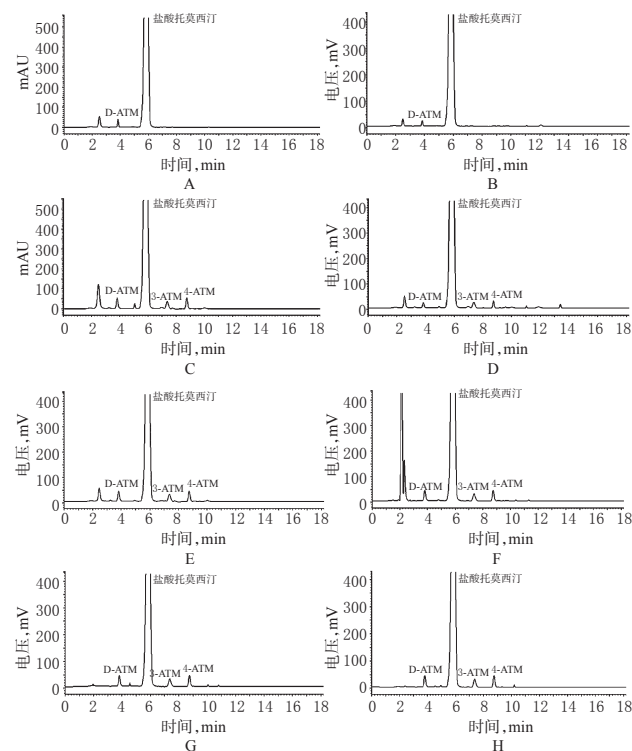


图1 高效液相色谱图

A.未破坏供试品(DAD);B.未破坏供试品(ELSD);C.碱破坏后溶液(DAD);D.碱破坏后溶液(ELSD);E.酸破坏后溶液(ELSD);F.氧化破坏后溶液(ELSD);G.热破坏后溶液(ELSD);H.光破坏后溶液(ELSD)

Fig 1 HPLC chromatograms

A. undestroyed sample (DAD); B. undestroyed sample (ELSD); C. solution destroyed by alkali (DAD); D. solution destroyed by alkali (ELSD); E. solution destroyed by acid (ELSD); F. solution destroyed by oxidation (ELSD); G. solution destroyed by thermal (ELSD); H. solution destroyed by light (ELSD)

2.4 线性范围考察

分别取D-ATM、3-ATM、4-ATM杂质对照品溶液各1.5、1.0、0.8、0.4、0.2 ml,用流动相稀释至10 ml,依法测定,计算峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,回归得线性关系试验结果见表1。

表1 线性关系试验结果

Tab 1 Results of linear range

杂质	回归方程	线性范围, $\mu\text{g/ml}$	r
D-ATM	$y=12\ 173x+68.32$	0.202~1.515	0.999 8
3-ATM	$y=11\ 771x+289.69$	0.206~1.545	0.999 7
4-ATM	$y=11\ 829x+76.513$	0.208~1.560	0.999 9

2.5 精密度及稳定性试验

取“2.3”项下碱破坏溶液,依法测定,重复进样6次,测定D-ATM、3-ATM、4-ATM峰面积及保留时间,计算平均RRT分别为D-ATM 0.65(RSD=0.23%)、3-ATM 1.26(RSD=0.21%)、4-ATM 1.50(RSD=0.24%),峰面积RSD分别为0.8%、0.9%、0.5%($n=6$)。

分别在0、2、4、8 h测定该溶液稳定性,结果D-ATM、3-ATM、4-ATM峰面积的RSD分别为0.9%、0.7%、0.6%($n=4$)。

2.6 检测限试验

取杂质对照品溶液(D-ATM、3-ATM、4-ATM均约为10.0 $\mu\text{g/ml}$),分别用流动相10倍梯度稀释,依法测定,记录ELSD的色谱图,计算得D-ATM、3-ATM、4-ATM在ELSD上的检测限分别为0.002 2、0.004 1、0.003 9 μg 。

2.7 回收率试验

取D-ATM、3-ATM、4-ATM杂质对照品溶液,各分别取0.8、1.0、1.2 ml各3份,3份对照品溶液混合后,分别用贮备液稀释至10 ml,作为供试品溶液。另取上述杂质对照品溶液,用流动相稀释10倍,作为对照品溶液,依法测定,计算回收率。结果平均回收率D-ATM、3-ATM、4-ATM分别为99.8%(RSD=0.32%, $n=3$)、99.6%(RSD=0.46%, $n=3$)、99.3%(RSD=0.44%, $n=3$)。

2.8 相对响应因子的测定

精密称取盐酸托莫西汀适量,用流动相溶解并稀释成质量浓度为10.5 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,另取杂质对照品溶液,依法测定,计算相对响应因子,结果见表2。

表2 相对响应因子测定结果

Tab 2 Results of relative response factor

成分	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	峰面积	相对响应因子
盐酸托莫西汀	10.5	124 123	
D-ATM	10.1	123 521	0.97
3-ATM	10.3	121 455	1.00
4-ATM	10.4	119 852	1.03

2.9 样品溶液的测定

取企业提供的3批样品,用流动相溶解并制成2.0 mg/ml的溶液,作为供试品溶液。取供试品溶液1 ml,用流动相稀释200倍,作为自身对照溶液,依法测定,采集ELSD的检测图谱。记录色谱图至主成分峰保留时间的2倍,采用RRT定位D-ATM、3-ATM、4-ATM,采用自身对照法计算D-ATM、3-ATM、4-ATM、最大单一杂质及总杂质的量,结果见表3。

表3 3批样品的杂质含量测定结果(%)

Tab 3 Content determination results of the impurity in 3 batches of samples (%)

批号	D-ATM	3-ATM	4-ATM	最大单一杂质	总杂质
120700020	0.06	未检出	未检出	0.11	0.28
120700030	0.07	未检出	未检出	0.15	0.24
120700040	0.06	未检出	未检出	0.12	0.31

3 讨论

经方法学验证,笔者首次采用的可用于分离含芳香基团的手性化合物或极性物质的新型硅胶键合聚甲基丙烯酸酯手性柱及上述色谱系统,能够有效分离盐酸托莫西汀异构体及有关物质,可以作为考察有关物质杂质谱的有效方法;并且与DAD比较,ELSD检出杂质数更多,更适合本品有关物质的分析。

由于杂质对照品成本高昂,为便于工业化生产中质量控制,拟采用RRT定位D-ATM、3-ATM、4-ATM。由于3个已知杂质的相对响应因子介于0.9~1.1之间,因此可采用自身对照法测定各杂质的量。由于碱破坏溶液中3个已知杂质均为另外加入且浓度已知,采用其峰面积作为测定精密度及稳定性的考核指标更有代表性;另外由于碱破坏溶液中含有更多杂质,直接选用该溶液考察RRT还能够考虑到干扰物质对RRT影响这一考察因素,既简化了试验又更具合理性。

有关物质的定义是在生产过程中带入的起始原料、中间体、聚合体、副反应产物,以及贮藏过程中的降解产物,这些杂质的结构和化学性质都与主成分有着一定的关系。本研究采用手性柱,采用对照品定位的方法明确了盐酸托莫西汀的3种异构体杂质,并依据破坏试验建立了有关物质的检查方法。经比对ELSD和DAD的杂质谱差异,发现采用ELSD检出杂质更多,这表明有部分有关物质可能没有紫外吸收。本色谱系统中甲醇极性较强,无机离子保留应较弱,从色谱图中可见酸、碱破坏溶液在约2.3 min处有出峰,判断可能是破坏产物或无机离子出峰;原料药的ELSD图谱上在约2.3 min处有出峰,判断可能是原料药中氯离子出峰。由于技术的进步,现代的ELSD直接采用压缩空气作为载气,彻底改变了过去采用高压氮气为气源时成本高、换气频繁、使用不便的问题,使得ELSD作为一种常规易用、低成本的检测器成为了可能,因此,本品的杂质分析可选用ELSD为检测器。

综上,本文建立了盐酸托莫西汀中包括旋光异构体及同分异构体在内的有关物质的检查方法,且方法操作简便、专属性好。

参考文献

- [1] 魏宏伟.治疗注意缺陷障碍的新药:托莫西汀[J].国外医学儿科学分册,2004,31(6):329.
- [2] Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, *et al.* Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2002, 27(5): 699.
- [3] 张小燕,李伟,毕开顺,等.RP-HPLC法测定盐酸托莫西汀的含量及有关物质[J].现代生物医学进展,2010,18(10):3 541.
- [4] 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.
- [5] Sellers JA, Olsen BA, Owens PK. Determination of the enantiomer and positional isomer impurities in atomoxetine hydrochloride with liquid chromatography using polysaccharide chiral stationary phases[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(4): 1 088.

(收稿日期:2014-01-24 修回日期:2014-05-04)