

盐酸托莫西汀中 S 异构体杂质含量的 柱前衍生高效液相色谱法测定

张小燕, 毕开顺, 苏丹, 刘中博, 蒋玲燕, 陈晓辉

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 以 2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC) 为柱前手性衍生化试剂, 建立了柱前衍生化反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法测定盐酸托莫西汀中 S 异构体杂质的方法。考察了碱化与衍生化试剂的浓度及反应时间对衍生化产率的影响, 以及流动相组成对柱效、分离度、保留时间的影响, 并讨论了结构因素对手性衍生和分离的影响。采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以乙腈-四氢呋喃-水 (体积比为 41:14:45) 为流动相, 流速 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C。在优化实验条件下, 盐酸托莫西汀与 S 异构体的分离度 $R > 1.5$; S 异构体的检出限为 0.15 mg/L, 在 0.5~8 mg/L 范围内线性良好; 精密度 RSD 为 1.8%; 按标准加入法计算, 加标回收率为 92%~99%; 按外标法计算, 加标回收率为 94%~102%。该方法简便、可靠, 可作为盐酸托莫西汀原料药中 S 异构体杂质限量的质控方法。

关键词: 盐酸托莫西汀; S 异构体; GITC; 柱前衍生; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.72; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2010)08-0817-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.08.012

Determination of S-isomer Impurity in Atomoxetine Hydrochloride by Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Xiao-yan, BI Kai-shun, SU Dan, LIU Zhong-bo, JIANG Ling-yan, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A pre-column derivatization high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of S-isomer impurity of atomoxetine hydrochloride was developed by using 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC) as derivative reagent. Effects of GITC concentration and reaction time on derivative reaction and influences of types and concentrations of organic modifier on chiral separation were investigated. The effects of structural factors on chiral derivatization and separation efficiency were discussed. The separation of two isomers was performed on a Zorbax SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) column using acetonitrile-tetrahydrofuran-water (41:14:45, by volume) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was maintained with 35 $^{\circ}$ C and the detection wavelength was set at 254 nm. Under the optimal conditions, the resolution of atomoxetine hydrochloride and its S-isomer was greater than 1.5. The linear range of S-isomer was 0.5 - 8 mg/L with a limit of detection (LOD) of 0.15 mg/L. The relative standard deviation (RSD) was 1.8%. The spiked recoveries of the S-isomer obtained from the general external standard method and the standard addition method were in the range of 94% - 102% and 92% - 99%, respectively. The results showed that the established HPLC method was reliable and simple, and could be used for the quality control of active pharmaceutical ingredient.

Key words: atomoxetine hydrochloride; S-isomer; GITC; pre-column derivatization; HPLC

盐酸托莫西汀 (Atomoxetine hydrochloride, R-) 是一种高度选择性去甲肾上腺素重摄取抑制剂, 临床用于治疗注意缺陷障碍伴多动症 (ADHD)^[1], 主要用于儿童及青少年多动症的治疗^[2-3]。临床批准使用的是盐酸托莫西汀的 R 构型, 由于手性药物在合成过程中可能引入 S 异构体杂质, 按照《手性药

收稿日期: 2010-01-18; 修回日期: 2010-05-01

第一作者: 张小燕 (1984-), 女, 山西忻州人, 硕士研究生

通讯作者: 陈晓辉, Tel: 024-23986259, E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn

物质质量控制研究技术指导原则》^[4], 手性药物的 *S* 异构体杂质需要限量检测, 故采用手性分离方法检测合成产品中 *S* 异构体含量^[5-6]。已有采用 Chiralcel OD-H 手性固定相检测盐酸托莫西汀中 *S* 异构体 (结构式见图 1) 的报道^[7-8], 但手性固定相制备成本高, 手性柱使用寿命短, 通用性差^[4]。柱前衍生化是对手性药物分离的间接方法^[9-15], 具有成本低、重复性好等优点。本文首次建立了柱前衍生 RP-HPLC 法分离盐酸托莫西汀的两个光学异构体并检测其中 *S* 异构体杂质含量的方法, 该方法分离效果好、简便、快速、重复性好, 样品溶液稳定。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

LC-10AT 型高效液相色谱仪, SPD-10A 型紫外可见光检测器, Class-VP 色谱工作站 (日本 Shimadzu 公司); Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司)。乙腈 (色谱纯, 山东禹王集团); 四氢呋喃 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 三乙胺 (TEA, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 盐酸托莫西汀 (*R*-, 纯度 99.4%) 及其 *S* 异构体 (纯度 99.8%), 均购自北京艾斯克医药技术开发有限公司; 2,3,4,6-四-*O*-乙酰基-β-*D*-葡萄糖异硫氰酸酯 (GITC, 美国 Sigma 公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈; 流动相: 乙腈 - 四氢呋喃 - 水 (体积比为 41 14 45); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温: 35 °C; 进样量 10 μL。

1.3 溶液制备

1.3.1 盐酸托莫西汀供试溶液 精密称取盐酸托莫西汀 25 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 得到 500.0 mg/L 的储备液。再将该储备液用乙腈稀释成 100.0 mg/L 的供试溶液。

1.3.2 *S* 异构体对照溶液 精密称取 *S* 异构体 5 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 得到 100.0 mg/L 的 *S* 异构体储备液。再将该储备液用乙腈稀释成 10.0 mg/L 的对照液。

1.3.3 盐酸托莫西汀与 *S* 异构体混合溶液 取盐酸托莫西汀储备液及 *S* 异构体储备液适量, 加乙腈制成配比分别为 1:1 (质量浓度均为 30.0 mg/L) 及 100:1 (质量浓度分别为 100.0 mg/L 和 1.0 mg/L) 的盐酸托莫西汀和 *S* 异构体混合溶液。

1.3.4 衍生化溶液 精密称取 GITC 2 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 作为 GITC 衍生化试剂 (0.5 mmol/L)。

1.4 衍生化条件

精密吸取 100 μL 质量浓度均为 30 mg/L 的盐酸托莫西汀和 *S* 异构体混合溶液置于 1.5 mL 具塞反应瓶中, 加入 100 μL 0.5 mmol/L GITC 溶液, 并加入 100 μL 10 mmol/L 三乙胺的乙腈溶液, 盖紧瓶塞, 涡旋混合 1 min, 室温放置反应 15 min 后进样。

2 结果与讨论

2.1 衍生化条件的影响

2.1.1 三乙胺的浓度对衍生化反应的影响 盐酸托莫西汀及其 *S* 异构体均以盐酸盐形式存在, 与 GITC 的衍生化反应属于亲核反应, 化合物的盐酸盐与 GITC 无法直接进行反应, 故需在碱性条件下反应, 此时胺上的 N 孤对电子以游离形式存在, 有利于亲核反应的进行。实验采用三乙胺 (TEA) 为碱化试剂, 用以中和盐酸并为衍生化反应提供碱性环境, 考察 TEA 浓度在 1.0 ~ 50 mmol/L 范围时对衍生化反应的影响。结果表明, 随着 TEA 浓度的增大, 反应产物的峰面积逐渐增大, 当 TEA 的浓度大于 10 mmol/L 后反应产物几乎保持不变。继续增大 TEA 浓度, 出现杂质峰, 而衍生试剂 GITC 的峰面积逐渐变小。因此实验选择 TEA 的最佳浓度为 10 mmol/L。

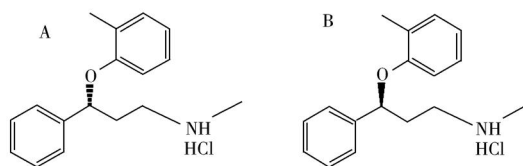


图 1 盐酸托莫西汀 (A) 及其 *S* 异构体 (B) 的分子结构式

Fig. 1 Molecular structures of atomoxetine hydrochloride (A) and its *S*-isomer (B)

2.1.2 G ITC 的浓度、反应时间对衍生化的影响 G ITC 是一种非常活泼的异硫氰酸酯类衍生化试剂，在室温下即可与反应化合物脂肪侧链上的 —NH— 进行 1:1 的化学反应，得到稳定的非对映异构的硫脲衍生物 (反应式见图 2)。实验考察了 G ITC 的浓度在 0.10~2.5 mmol/L 范围时对衍生化反应的影响。G ITC 浓度过低时，衍生化反应不完全，G ITC 的浓度为 0.5 mmol/L (反应比例 1:2.5) 时衍生化产物峰面积达到最大，继续增大 G ITC 浓度，衍生化产物的峰面积不再增加，故选定 G ITC 的最佳浓度为 0.5 mmol/L。

G ITC 与盐酸托莫西汀在室温下迅速反应，当反应时间达 15 min 时，衍生化产物的峰面积达到最大，继续延长反应时间，衍生化产物的峰面积不再增加。故选定反应时间为 15 min。

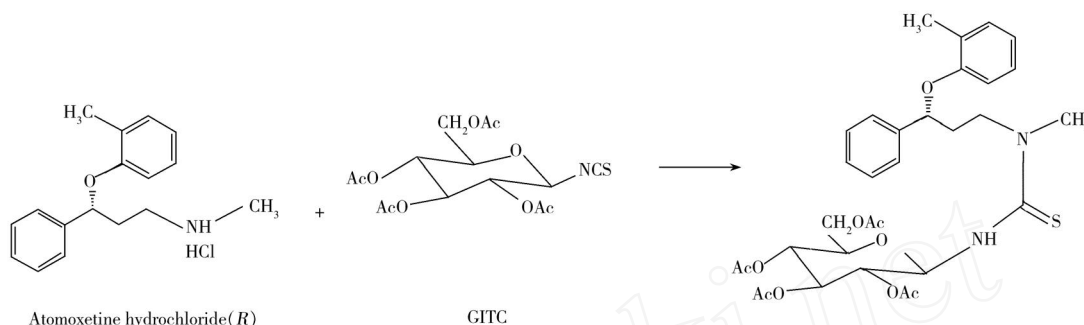


图 2 盐酸托莫西汀与 G ITC 的衍生化反应

Fig. 2 Derivatization reaction of atomoxetine hydrochloride and G ITC

2.2 G ITC 结构对衍生化反应的影响

G ITC 结构中反应基团异硫氰基与空间位阻较大的全乙酰化 β -D 葡萄糖基直接相连，与底物的空间位阻作用对衍生化反应有显著影响。盐酸托莫西汀结构中氨基与苯环之间隔 3 个碳原子，与 G ITC 的空间位阻作用小，可以顺利发生衍生化反应，得到非对映异构体衍生物。G ITC 结构中的全乙酰化 β -D 葡萄糖基具有刚性及亲脂性强的特点，在选定的色谱条件下，G ITC 的大分子结构在色谱分离中起主要作用。

2.3 色谱条件的优化

分别考察了乙腈和四氢呋喃作调节剂对分离效果的影响。流动相系统为乙腈-水时，分析 50 min，两光学异构体仍未达到基线分离。当加入三乙胺和三氟乙酸，或用磷酸二氢钾和磷酸二氢铵等缓冲盐调节 pH 时，分离度改善不明显。当加入四氢呋喃，并调整比例为乙腈-四氢呋喃-水 (体积比 41:14:45) 时，分离度达 1.7，两光学异构体得到理想分离。主要是因为四氢呋喃的洗脱能力极强，能显著减少两化合物的保留时间，随着四氢呋喃的比例增加，流动相洗脱能力增加，扩散作用降低，色谱峰变窄，分离度增加。

2.4 方法学验证

2.4.1 系统适用性实验 取盐酸托莫西汀、S 异构体对照溶液及“1.3.3”制备的 1:1 (R, S) 和 100:1 (R, S) 的混合溶液，分别按“1.4”条件衍生化后，按“1.2”色谱条件分析。两光学异构体的分离度为 1.7，拖尾因子为 1.02，色谱柱理论塔板数按 S 异构体计不低于 10 000，盐酸托莫西汀与 S 异构体的保留时间分别为 20.78、22.06 min，色谱图见图 3。

2.4.2 线性关系考察 外标法：精密吸取 10 mg/L 的 S 异构体对照液 0.5、1、2、4、8 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，用乙腈定容，制成 0.5、1、2、4、8 mg/L 的标准系列溶液，按“1.4”条件衍生化后，以“1.2”色谱条件分析。标准加入法：精密吸取 S 异构体对照液 0.5、1、2、4、8 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，每份加入盐酸托莫西汀储备液 2 mL，加乙腈定容，制成盐酸托莫西汀为 100.0 mg/L，S 异构体分别为 0.5、1、2、4、8 mg/L 的标准系列溶液，按“1.4”条件衍生化后，以“1.2”色谱条件分析。

以质量浓度 (X, mg/L) 对峰面积 (Y) 作线性回归，S 异构体在 0.5~8 mg/L 范围内呈良好线性关

系。外标法回归方程为 $Y = 3\,685.6X + 564.91$, $r = 0.999\,9$; 标准加入法回归方程为 $Y = 3\,642.4X + 4\,344.9$, $r = 0.999\,8$ 。由曲线的斜率可知, 两条标准曲线近似平行, 说明盐酸托莫西汀的存在对微量 *S* 异构体的测定影响不大。

2.4.3 检出限 取质量浓度均为 30 mg/L 的盐酸托莫西汀及 *S* 异构体混合溶液的衍生产物, 用乙腈逐步稀释, 衍生化后, 按“1.2”色谱条件分析, 测得盐酸托莫西汀及 *S* 异构体的检出限 ($S/N = 3$) 均为 0.15 mg/L。

2.4.4 精密度实验 取 100.0 mg/L 盐酸托莫西汀和 1.0 mg/L *S* 异构体混合液, 衍生化后, 按“1.2”色谱条件重复测定 6 次, 测得 *S* 异构体衍生产物峰面积的 RSD 为 1.8%。

2.4.5 重复性实验 取 100.0 mg/L 盐酸托莫西汀和 1.0 mg/L *S* 异构体混合液 6 份, 分别衍生化后, 按“1.2”色谱条件分析, 测得 *S* 异构体衍生产物峰面积的 RSD 为 2.5%。

2.4.6 稳定性实验 取 100.0 mg/L 盐酸托莫西汀和 1.0 mg/L *S* 异构体混合液, 衍生化后, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 测定, 考察 *S* 异构体衍生产物峰面积的变化情况。测得峰面积 RSD 为 2.8%, 表明测定溶液室温放置 24 h 稳定。

2.4.7 回收率实验 取适量盐酸托莫西汀储备液 9 份, 分别加入不同量的 *S* 异构体溶液, 用乙腈稀释, 制成盐酸托莫西汀的质量浓度为 100.0 mg/L, *S* 异构体质量浓度分别约为 0.5、1.0、2.0 mg/L 的测定液, 每个质量浓度平行 3 份, 衍生化后, 每份重复进样 2 次, 取平均峰面积计算。根据测得值和理论值分别计算标准加入法和外标法回收率, 结果见表 1, RSD 均不高于 3.0%。

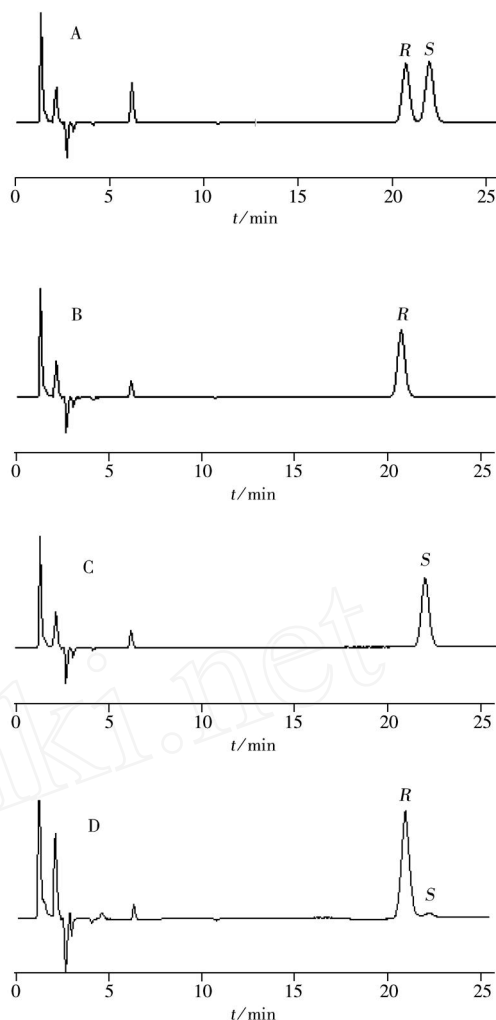


图 3 盐酸托莫西汀及其 *S* 异构体衍生产物的色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of atomoxetine hydrochloride and its diastereoisomer after derivatization
A. 30.0 mg/L atomoxetine hydrochloride - 30.0 mg/L *S*-isomer; B. 30.0 mg/L atomoxetine hydrochloride;
C. 30.0 mg/L *S*-isomer; D. 100.0 mg/L atomoxetine hydrochloride - 1.0 mg/L *S*-isomer

表 1 *S* 异构体的回收率与相对标准偏差 ($n = 3$)
Table 1 Recoveries and RSDs of *S*-optical isomer ($n = 3$)

Added $\rho_A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Standard addition method			External standard method		
	Found	Recovery	RSD	Found	Recovery	RSD
	$\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$	$\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$
0.491	0.452	92	3.0	0.459	94	2.9
1.022	1.012	99	1.6	0.991	97	1.7
1.979	1.959	99	0.55	2.019	102	0.9

2.4.8 *S* 异构体的浓度校正因子 精密移取“1.3”制备的混合溶液适量, 加乙腈稀释成 10.0 mg/L 的混合溶液, 再逐步稀释成 8、4、2、1、0.5 mg/L, 按“1.4”条件操作, 进样, 记录色谱图。根据不同浓度下盐酸托莫西汀和 *S* 异构体衍生产物所得色谱峰面积, 按式 $F = (A_{\text{样}} / A_{\text{异}}) \cdot (\rho_{\text{异}} / \rho_{\text{样}})$ 计算 *S*-异构体的浓度校正因子 (F), 用于校正两个化合物与检测器响应的差异。测得该 *S* 异构体的浓度校正因子 $F = 0.99 \pm 0.04$, RSD 为 4.0%。

2.5 盐酸托莫西汀原料药中 *S* 异构体杂质的检测

精密称取 3 个批号的盐酸托莫西汀原料药各 5 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并定容, 得供

试溶液。取上述供试溶液稀释 100 倍作为对照溶液。取对照溶液 10 μL 进样, 调节仪器灵敏度, 使主成分峰高约为满量程的 20%。精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μL , 按“1.4”方法进行衍生化反应, 取 10 μL 进行测定, 峰面积乘以浓度校正因子 F , 与对照溶液比较, 不得大于对照溶液主成分峰面积 (小于 1.0%)。结果表明, 3 批样品中 S 异构体含量均小于 1.0%, 符合药典中有关物质的杂质限量 (1.0%) 要求。

3 结 论

本文通过对衍生化条件和色谱条件进行优化, 首次建立了盐酸托莫西汀中 S 异构体杂质限量的 G1TC 柱前衍生化 RP-HPLC 测定法, 该方法简单易行, 重复性好, 灵敏度高, 且比手性固定相法经济, 适用于盐酸托莫西汀中 S 异构体杂质限量的检测。

参考文献:

- [1] JASINSKID R, FARIES D E, MOORE R J, SCHUH L M, ALLEN A J. Abuse liability assessment of atomoxetine in a drug-abusing population[J]. Drug Alcohol Depend, 2008, 95(1/2): 140 - 146
- [2] 杜亚松. 治疗 ADHD 的新药——托莫西汀[J]. 中国儿童保健杂志, 2008, 16(1): 65 - 66.
- [3] 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 - 332
- [4] 国家食品药品监督管理局. 手性药物质量控制研究技术指导原则[S]. 2006: 11 - 13
- [5] 王文娜, 邓桂凤, 张玲娣, 姚彤伟. 手性高效液相色谱法检测恩替卡韦中光学异构体杂质的含量[J]. 分析化学, 2009, 37(8): 1206 - 1210
- [6] 刘莹峰, 翟翠萍, 周明辉, 郑建国, 肖前, 李全忠, 李丹, 萧达辉, 岳大磊. 酰胺类手性液相色谱柱对烯唑醇光学异构体的直接拆分[J]. 分析测试学报, 2009, 28(10): 1210 - 1212
- [7] SELLERS J A, OLSEN B A, OWENS P K, GAVIN P E. Determination of the enantiomer and positional isomer impurities in atomoxetine hydrochloride with liquid chromatography using polysaccharide chiral stationary phases[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(4): 1088 - 1094
- [8] 吴拥军, 傅收, 吕和平, 刘金平, 屈凌波. 盐酸托莫西汀旋光异构体的手性拆分研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1523 - 1525
- [9] JIND R, KUMAR A P, SONG G C, LEE Y I. Determination of thyroxine enantiomers in pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography - mass spectrometry with precolumn derivatization[J]. Microchem J, 2008, 88(1): 62 - 66
- [10] SHIMIZU T, HIRAKAWA M, NAKANOMIYO H. Enantioselective determination of sotalol enantiomers in biological fluids using high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1995, 674(1): 77 - 83
- [11] 尤启东, 林国强. 手性药物研究与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 96 - 98
- [12] YANG E, WANG S. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(3): 609 - 615
- [13] ZHU H J, WANG J S, DONOVAN J L, DEVANEY L, GIBSON B B, MARKOWITZ J S. Sensitive quantification of atomoxetine in human plasma by HPLC with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazole-2-yl) benzoyl chloride derivatization[J]. J Chromatogr B, 2007, 846(1/2): 351 - 354
- [14] 杨晶, 关瑾, 潘莉, 程卯生, 李发美. 柱前衍生化 RP-HPLC 法分离苯乙醇胺类化合物对映体[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(1): 36 - 44
- [15] SUN S P, SILVERMAN Q, FAN Z Z, QU J, LI G. Stereoselective HPLC assay of TJ0711 enantiomers by precolumn derivatization with G1TC using UV detection and its application in pharmacokinetics in rats[J]. Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2009, 29(4): 427 - 430