

盐酸多塞平顺、反式异构体的高效液相色谱法分离测定

刘琮¹, 杨水新² (1. 浙江英特药业有限责任公司, 浙江 杭州 310006; 2. 湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

摘要:目的 测定盐酸多塞平原料和片剂中顺、反式异构体的含量。方法 采用梯度洗脱高效液相色谱法。结果 盐酸多塞平 Z 式异构体在 $22 \sim 110 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, E 式异构体在 $90 \sim 470 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系, Z 式异构体的平均加样回收率为 99.98%, RSD = 0.25%, E 式异构体的平均加样回收率为 100.07%, RSD = 0.08%。结论 方法简单准确, 所选色谱条件温和, 可用于盐酸多塞平异构体的分离测定。

关键词: 高效液相色谱法; 盐酸多塞平; 异构体

中图分类号: R917.101 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2005)09-0866-02

Determination of doxepin hydrochloride isomers by HPLC

LIU Qiong¹, YANG Shui-xin (1, Zhejiang Int'l medicine Co. Ltd, hangzhou 310006 China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine and separate the Z- and E-isomer of doxepin hydrochloride in doxepin hydrochloride materials and tablets. **METHOD** A gradient HPLC was adopted. The column was Shimpack C18 (150 × 6mm, 5 μm), The mobile phase consisted of A (0.2mol. L⁻¹ Potassium dihydrogen phosphate-methanol (65:35)) and B (0.02mol. L⁻¹ Potassium dihydrogen phosphate-methanol (40:60)), with the gradient condition was 0→30min, A 100%→25%. The flow rate was 1mL. min⁻¹. The detection wavelength were 295nm. **RESULTS** The calibration linear was in the range of $22 \sim 110 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for Z-isomer and $90 \sim 470 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for E-isomer, and the average recoveries were 99.98% (RSD = 0.25%) for Z-isomer and 100.07% (RSD = 0.08) for E-isomer respectively. **CONCLUSION** The method developing at a mild condition appeared to be simple, accurate for the determination and separation of Z-, E-isomer of doxepin hydrochloride.

KEY WORDS: HPLC; doxepin hydrochloride; isomer

盐酸多塞平为临床常用的三环类抗抑郁药, 用于治疗焦虑性抑郁症或神经症性抑郁症。目前各国临床上所用的盐酸多塞平均为其一定比例顺(Z-), 反(E-)式异构体的混合物。《中国药典》以气相色谱法检测顺式异构体的含量; 《美国药典》采用高效液相色谱法检测顺式异构体的含量。也有文献报道采用高效毛细管电泳法和非水毛细管电泳法测定其顺式异构体。本文报道的高效液相色谱法, 则选用温和流动相, 以常用十八烷基键合硅胶柱为分离载体, 室温下对盐酸多塞平顺式异构体进行了分离和测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(美国), Waters 二极管

阵列检测器(DAD), Waters 515 泵, 7725I 进样阀, Millennium32 色谱管理系统; AT-130 柱温箱(天津)。

1.2 试剂 盐酸多塞平对照品(中国药品生物制品检定所, 含 Z-式异构体为 19.40%), 盐酸多塞平原料和盐酸多塞平片(每片 25mg)均为市售品。甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shimpack C₁₈ 柱(150 × 6mm, 5 μm), 加 Alltech C₁₈ 预柱; 流动相 A: 0.2mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾-甲醇(65:35), 流动相 B: 0.02mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾-甲醇(40:60), 洗脱梯度: 0→30min, 100% A→25% A; 流速: 1mL ·

min⁻¹;检测波长:295 nm;扫描范围:200 ~ 350nm。

2.2 典型色谱与光谱图 取对照品甲醇溶液 10μL 进样,按上述色谱条件测定,采集色谱图(图 1A)、光谱图(图 1B)和矢量光谱叠合图(图 1C)。

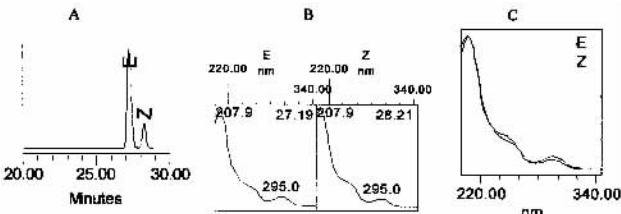


图 1 典型色谱图与光谱图。A 为盐酸多塞平对照品色谱图,B 为相应色谱峰的光谱图,C 为两异构体的矢量光谱叠合图。

Fig 1 typical chromatogram (A) and UV spectrum(B、C)
E: 盐酸多塞平 E 式异构体;Z: 盐酸多塞平 Z 式异构体
E: E-isomer of doxepin hydrochloride; Z: Z-isomer of doxepin hydrochloride

2.3 标准曲线 精密称取经 105℃ 干燥至恒重的盐酸多塞平对照品适量,置 50mL 量瓶中,加甲醇溶解并加至刻度,摇匀。精密吸取对照品溶液,以甲醇稀释成 5 份浓度,Z 式异构体浓度 22.66、45.32、67.98、90.64、113.30μg · mL⁻¹;E 式异构体浓度 94.14、188.28、282.42、376.56、470.70μg · mL⁻¹。各取 10μL 进样,以峰面积对相应浓度回归得回归方程分别为,Z-异构体:A = 5111.03C + 3799.30, r = 0.9998;E-异构体:A = 7220.63C + 6226.00, r = 0.9999。

2.4 重复进样精密度 取由原料制得的供试品溶液 1 份,以 10μL 等量进样 3 次,分别测定 Z 式和 E 式异构体的保留时间和峰面积。两异构体保留时间 RSD 均为 0.1%,峰面积 RSD 均为 0.5%,峰面积比值 RSD 为 0.1%。

2.5 重复性试验 取同批原料 6 份,精密称定后以甲醇配成约 300μg · mL⁻¹后直接测定;取同批片剂研得的细粉 6 份,以甲醇定量配成约含盐酸多塞平 300μg · mL⁻¹的溶液,离心后取上清液测定。按盐酸多塞平总量计算各异构体相对含量。以 Z 式和 E 式异构体计原料的方法重复性 RSD(n = 6)分别为 0.3% 和 0.5%;以 Z 式和 E 式异构体计片剂的方法重复性 RSD(n = 6)分别为 0.4% 和 0.3%。

2.6 回收率测定 精密称取已测定含量的盐酸多塞平原料和片剂(约 5mg)各 9 份,分别置 25mL 量瓶中,各加入 1.00mg · mL⁻¹对照品溶液 2.5mL、5mL 和 7.5mL,加甲醇至刻度,摇匀,进样 10μL。另取对照品溶液进样 10μL。计算,结果原料回收率为 99.8% ~ 100.3%;RSD 为 0.11% ~ 0.46%。片剂

回收率为 99.8% ~ 100.2%;RSD 为 0.21% ~ 0.52%。

2.7 样品测定 取 2 批原料(M1、M2)和 3 批片剂(T1、T2、T3),按 2.7 重复性试验方法进行配制、测定,并按盐酸多塞平总量计算各异构体相对含量。结果 E-异构体原料药为 72.9% ~ 74.7%,RSD 为 0.22% ~ 0.33%;片剂为 75.5% ~ 79.0%,RSD 为 0.03% ~ 0.21%;Z-异构体原料药为 24.6% ~ 26.4%,RSD 为 0.48% ~ 0.67%;片剂为 21.0% ~ 24.5%,RSD 为 0.08% ~ 0.79%。

2.8 峰面积归一化试验 从盐酸多塞平各异构体的光谱图可知,两者在 207.9nm 和 295nm 有最大吸收峰,但两者的矢量光谱图不能完全重叠,在 246nm 处差异最大,在 208nm 和 230nm 处几乎相同,对照品(S)和原料(M)在 4 个波长处测得的 Z-式异构体峰面积归一化结果见表 1。

表 1 不同波长处测得 Z-式异构体的相对含量(n = 6)
Tab 1 Relative content of Z-isomer at different wavelength(n = 6)

	208nm	RSD	230nm	RSD	246nm	RSD	295nm	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
S	18.88	0.27	19.07	0.33	21.26	0.29	14.71	0.35
M	24.31	0.31	24.51	0.24	27.09	0.16	19.41	0.33

3 讨论

3.1 盐酸多塞平的两个异构体理化性质接近,以甲醇-磷酸盐系统等度洗脱,虽可得到二个色谱峰,但理论板数不足 2000,分离度小于 1.5。采用本色谱条件后,二异构体峰的理论板数均大于 6000,基本实现基线分离。磷酸二氢钾浓度梯度的运用为本文的关键,不仅减少了色谱峰拖尾,而且可大大改善两者的分离度。

3.2 盐酸多塞平 Z-异构体和 E 异构体有相同的紫外吸收峰,但二者的紫外吸收行为并不完全相同,从矢量光谱图看,其差异较大的区间为 240 ~ 330nm,而对照品在 230nm 处测得的 Z-异构体含量为 19.1%,与实际含量 19.4% 最为接近,因此,如以峰面积归一化法控制盐酸多塞平中 Z-异构体的含量,230nm 是较为合适的测定波长。

3.3 温度对测定的影响。试验中曾以实验室温度(22℃)以及 30℃ 和 40℃ 柱温下测定,结果每升高 10℃,保留时间约减少 1 ~ 2min,但不能进一步改善分离,因此选择于室温下测定。

收稿日期:2004-03-25