

HPLC 测定他达拉非中的对映异构体和非对映异构体

靖雅^a, 王丽敏^a, 杜诗琦^a, 李博^a, 狄斌^{a,b*} (中国药科大学, a.药学院, b.药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

摘要: 目的 建立他达拉非原料药中对映异构体和非对映异构体的定量分析方法。方法 采用 CHIRALPAK-IC (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水(40:60), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 222 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 20 μL。加校正因子的自身稀释对照法计算异构体含量, 其中异构体 A、异构体 B 和异构体 C 的校正因子分别为 1.22, 1.07 和 1.25。结果 他达拉非及异构体 A、异构体 B 和异构体 C 峰分离良好, 分离度>1.5, 异构体 A、异构体 B 和异构体 C 分别在 25.3~379.5, 50.6~379.5, 50.4~378.0 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好(r 为 0.997 3~0.998 7), 加样回收率分别为 107.5%, 96.9%, 98.5%($n=9$), 进样精密度 RSD≤2%, 重复性 RSD 分别为 1.44%, 1.64% 和 4.89%。检测限分别为 12.7, 25.3, 25.2 ng·mL⁻¹。3 批样品中异构体 A 最高含量为 0.018%, 异构体 B 及异构体 C 均未超过检测限(<0.010%)。结论 该方法简单, 准确, 重复性好, 可用于他达拉非原料药中对映异构体和非对映异构体的测定。

关键词: 他达拉非; 对映异构体; 非对映异构体; 高效液相色谱法; 手性色谱柱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)01-0089-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.021

Determination of Enantiomers and Diastereoisomers in Tadalafil by HPLC

JING Ya^a, WANG Limin^a, DU Shiqi^a, LI Bo^a, DI Bin^{a,b*} (China Pharmaceutical University, a.College of Pharmacy, b.Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for the determination of enantiomers and diastereoisomers in tadalafil. **METHODS** A CHIRALPAK-IC column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was acetonitrile-water(40:60) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and injection volume of 20 μL. The UV-detection wavelength was set at 222 nm with the column temperature of 30 °C. The isomer contents were calculated by self contrast method with the correction factor, and the correction factor of isomer A, isomer B and isomer C were 1.22, 1.07 and 1.25 respectively. **RESULTS** Calibration curves were found to be linear in the ranges of 25.3~379.5 ng·mL⁻¹ for isomer A, 50.6~379.5 ng·mL⁻¹ for isomer B and 50.4~378.0 ng·mL⁻¹ for isomer C($r=0.997\ 3\sim0.998\ 7$). The average recovery($n=9$) of isomer A, isomer B, and isomer C were 107.5%, 96.9%, and 98.5%, respectively. RSD of repeatability was 1.44%, 1.64% and 4.89% respectively, and the RSD of sampling precision was ≤2%. The LOD of isomer A, isomer B and isomer C were 12.7, 25.3, 25.2 ng·mL⁻¹. Isomer B and C were not detected (<0.01% of tadalafil) and the content of isomer A was up to 0.018% in 3 batches of samples. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible. It can be reliable for the quality control of enantiomers and diastereoisomers of tadalafil.

KEY WORDS: tadalafil; enantiomers; diastereoisomers; HPLC; chiral columns

他达拉非, 化学名为: (6R-12aR)-6-(1,3-苯并二恶茂-5-基)-2-甲基-2,3,6,7,12,12a-六氢吡嗪并[1',2'-1,6]-吡啶并[3,4-b]咪唑-1,4-二酮, 分子式: C₂₂H₁₉N₃O₄, 相对分子质量: 389.41。他达拉非片是环磷酸鸟苷(cGMP)特异性磷酸二酯酶 5(PDE-5)的选择性可逆抑制剂, 能特异性的抑制 PDE-5, 现主要用于治疗勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)。相对于目前临床使用的 PDE-5 抑制剂, 他达拉非的半衰期更长^[1], 心血管安全性好, 不会增加心血管事件的风险以及严重程度, 具有良好的安全性和耐受性^[2]。另外, PDE-5 抑制剂还可有效治

疗肺动脉高压, 能够提高患者的运动耐量、生活质量和生存率^[3]; 此外, 他达拉非还能够抑制急性缺氧性肺血管收缩, 抑制低氧诱导的肺动脉表达肿瘤坏死因子, 在治疗缺氧性 PH 方面, 比其他 2 种 PDE-5 抑制剂西地那非和伐地那非有一定优势^[4]; 对代谢综合征动物模型的研究中发现, 他达拉非能够减少内脏脂肪蓄积, 提高胰岛素的敏感性^[5]。

他达拉非的分子结构中有 2 个手性中心, 光学异构体包括他达拉非、异构体 A、异构体 B 和异构体 C, 结构见图 1。他达拉非异构体 B 和异构体 C 为他达拉非的对映异构体和非对映异构体。

作者简介: 靖雅, 女, 硕士生 Tel: 15151820597
(025)83271316 E-mail: dibin@cpu.edu.cn

E-mail: jingxiaoya@163.com

*通信作者: 狄斌, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

它们对 PDE-5 几乎没有抑制作用,而他达拉非的非对映异构体-异构体 A 对 PDE-5 具有一定的选择性抑制作用^[6],药典将他达拉非的各异构体列为杂质,需对其进行研究与控制。而已报道的文献多为他达拉非做为非法添加物的测定,如裘一婧等^[7]采用 UPLC Q-TOF-MS 测定保健品中西地那非类似物,对他达拉非的异构体的测定的文献报道较少。欧洲药典^[8]和美国药典^[9]对他达拉非的异构体及异构体 A 的分析方法均使用手性色谱柱,流动

相为正己烷-异丙醇系统。一方面,他达拉非在这种非极性流动相中的溶解性较差;另一方面,正己烷和异丙醇价格较高,易挥发且极易燃,并且对环境有害,对人体有刺激作用。因此开发一个流动相为反相系统的方法,不仅样品在系统中的溶解度更好,还能够降低分析成本,减少对环境和人体的伤害。另外采用反相流动相系统研究他达拉非异构体,还可适用于 LC-MS 系统,能扩大分析方法的应用。

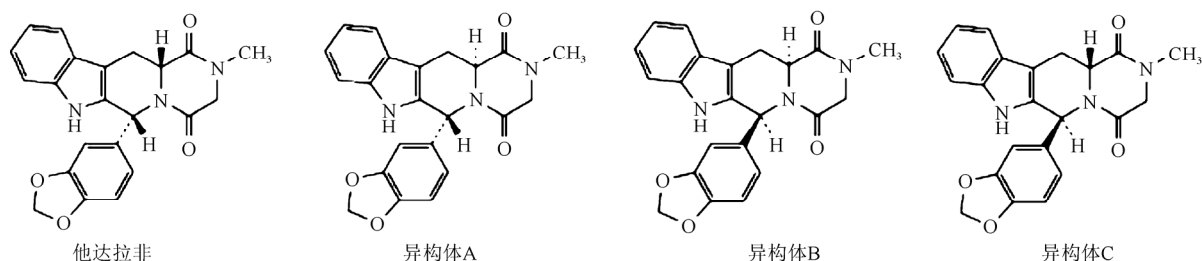


图 1 他达拉非、异构体 A、异构体 B 和异构体 C 结构图
Fig. 1 Structure of tadalafil, isomer A, isomer B and isomer C

1 仪器与试剂

1260 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent chemStation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);BS215 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。他达拉非对照品(HPLC 纯度 100.74%,自制);他达拉非异构体 A 对照品(HPLC 纯度 98.42%,自制);他达拉非异构体 B 对照品(HPLC 纯度 100.00%,自制);他达拉非异构体 C 对照品(HPLC 纯度 99.76%,自制);他达拉非样品(自制);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: CHIRALPAK-IC 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-水(40:60);检测波长: 222 nm;柱温: 30 °C;流速: 1.0 mL·min⁻¹;进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取异构体 A、异构体 B、异构体 C 对照品各 25 mg,置 100 mL 量瓶中,加乙腈 40 mL 溶解,用水稀释定容,摇匀;分别精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加乙腈 40 mL,用水稀释定容,摇匀,作为对照品储备液;精密量取对照品储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加乙腈 4 mL,用水稀释定容,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取他达拉非供试品 25 mg,置 100 mL 量瓶中,加乙腈 40 mL 溶解,用水稀释定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 0.1%自身稀释对照溶液 精密量取他达拉非供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加乙腈 40 mL,用水稀释定容,摇匀,作为自身稀释对照储备液;精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加乙腈 4 mL,用水稀释定容,摇匀,作为 0.1%自身稀释对照溶液。

2.3 测定法

精密量取“2.2.3”项下 0.1%自身稀释对照溶液 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,调节检测灵敏度,使主峰的峰高约为满量程的 20%;再精密量取“2.2”项下供试品溶液与 0.1%自身稀释对照溶液各 20 μL,分别注入液相色谱仪,以 0.1%自身稀释对照溶液为对照,按加校正因子的自身稀释对照法计算异构体含量,其中异构体 A、异构体 B 和异构体 C 的校正因子分别为 1.22, 1.07, 1.25。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 ①系统适用性试验。取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂(40%乙腈水溶液)各适量,按“2.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱图,结果见图 2。结果显示,空白无干扰,他达拉非及异构体 A、异构体 B 和异构体 C 峰分离良好,分离度>1.5,他达拉非、异构体 A、

异构体 B 和异构体 C 理论板数分别为 6 372, 6 865, 7 147, 6 678。

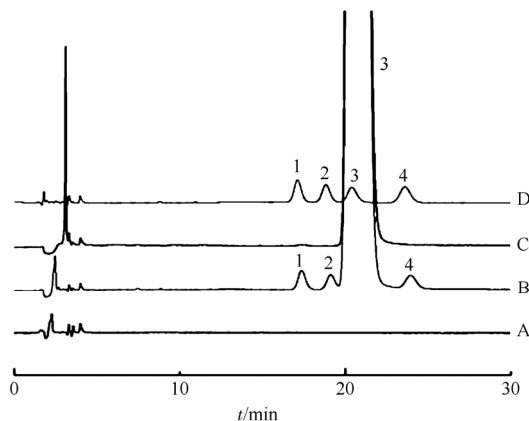


图2 系统适用性试验结果图

A-空白; B-供试品加入异构体对照品; C-供试品; D-混合对照品; 1-异构体 A; 2-异构体 B; 3-他达拉非; 4-异构体 C。

Fig. 2 HPLC chromatograms of interference experiment results

A-blank; B-sample with isomer references; C-sample; D-mixed references of tadalafil and isomers; 1-isomer A; 2-isomer B; 3-tadalafil; 4-isomer C.

②强力破坏试验。称取他达拉非供试品 25 mg, 置 10 mL 量瓶中, 乙腈溶解并定容, 摇匀, 作为破坏母液。分别进行酸破坏试验(加 4 mol·mL⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 50 °C 加热 1 h, 用 4 mol·mL⁻¹ 氢氧化钠溶液中和)、碱破坏试验(加 2 mol·mL⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 30 min, 用 2 mol·mL⁻¹ 盐酸中和)、高温破坏试验 (60 °C 放置 8 h) 和光破坏 [(4 500±500)lx 光照强度下放置 72 h], 由于过氧化氢会破坏选用色谱柱的固定相, 因此未进行氧化破坏。将破坏后的溶液用流动相稀释定容于 10 mL 量瓶, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果见图 3。试验结果显示, 他达拉非在光破坏及热破坏条件下稳定, 碱破坏条件下主要生成异构体 A, 酸破坏条件下主要生成少量的异构体 A 和异构体 C。破坏产物与主峰, 破坏产物之间分离良好。

2.4.2 线性关系的考察及校正因子的测定 分别取“2.2.1”项下异构体 A 对照品储备液, “2.2.3”项下自身稀释对照储备液 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL, 取“2.2.1”项下对异构体 B, 异构体 C 对照储备液 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 流动相稀释定容, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以待测物质量浓度(x, ng·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标,

进行线性回归, 结果各异构体及他达拉非在各自进样浓度范围内与峰面积线性关系良好, 见表 1。

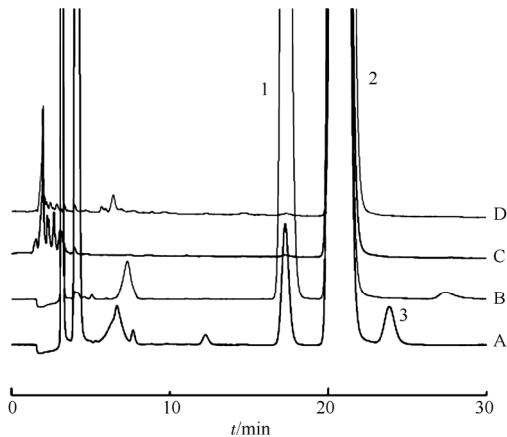


图3 破坏试验结果图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-热破坏; D-光破坏; 1-异构体 A; 2-他达拉非; 3-异构体 C。

Fig. 3 HPLC chromatograms of Forced degradation experiment results

A-acid degradation; B-base degradation; C-heat degradation; D-light degradation; 1-isomer A; 2-tadalafil; 3-isomer C.

表1 线性关系及校正因子

Tab. 1 Results of linearity and

成分	回归方程	r	线性范围/ ng·mL ⁻¹	校正 因子
异构体 A	y=0.128 9x+0.848 5	0.998 7	25.3~379.5	1.22
异构体 B	y=0.113 4x+0.646 7	0.997 6	50.6~379.5	1.07
他达拉非	y=0.105 9x+1.214 4	0.998 5	26.6~399.0	—
异构体 C	y=0.132 1x+1.097 8	0.997 3	50.4~378.0	1.25

2.4.3 检测限和定量限 将“2.2.1”项下对照品溶液用流动相逐级稀释进样, 当信噪比约为 3 时, 测得检测限; 当信噪比约为 10 时, 测得定量限。结果表明, 异构体 A、异构体 B 和异构体 C 的检测限分别为 12.7, 25.3, 25.2 ng·mL⁻¹; 定量限分别为 25.3, 50.6, 50.4 ng·mL⁻¹ (n=6, RSD 分别为 5.37%, 2.88%, 2.54%)。

2.4.4 仪器精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件重复进样分析 6 次。结果表明, 异构体 A、异构体 B 和异构体 C 的峰面积的 RSD 分别为 1.15%, 1.14%, 1.94%, 表明该方法仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取他达拉非供试品适量共 6 份, 分别加入一定量的异构体 A, 异构体 B, 异构体 C 对照品储备溶液, 乙腈溶解, 水稀释定容制成每 1 mL 约含他达拉非 0.25 mg, 含各异构体 0.25 μg 的溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果异构体 A、异构体 B、他达拉非和异构

体 C 的峰面积的 RSD 分别为 1.44%, 1.64%, 4.89%。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取他达拉非供试品共 9 份, 分别加入一定量的异构体 A、异构体 B 和异构体 C 对照品储备溶液, 制成含异构体 A、异构体 B 和异构体 C 低、中、高浓度(125, 250, 375 ng·mL⁻¹)的模拟样品。依法测定, 计算回收率, 加样回收率分别为 107.5%, 96.9%, 98.5%(*n*=9)。

2.4.7 稳定性试验 取“2.2.1”项下对照品溶液, 于室温及 4℃ 下放置 0, 3, 6, 20, 26, 48 h 进样测定; 取“2.2.2”项下供试品溶液于室温及 4℃ 下放置 0, 3, 12, 24, 36, 48 h, 按“2.1”项下色谱条件进样测定; 各异构体对照的峰面积 RSD<15%, 他达拉非供试品的峰面积 RSD<1%。说明供试品和杂质对照品在 48 h 内基本稳定。

2.4.8 样品测定 取他达拉非原料药 3 批, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下

色谱条件进行测定, 记录色谱图, 按照加校正因子的自身稀释对照法计算异构体含量, 结果见表 2。

表 2 3 批样品测定结果(*n*=3)

Tab. 2 Determination results of samples(*n*=3)

样品批号	异构体/%		
	异构体 A	异构体 B	异构体 C
第 1 批	0.018	<0.010	<0.010
第 2 批	0.016	<0.010	<0.010
第 3 批	<0.005	<0.010	<0.010

3 讨论

3.1 异构体的产生

他达拉非以 D-色氨酸甲酯盐酸盐和胡椒醛为起始原料, 依次与氯乙酰氯及甲胺反应, 最终生成他达拉非, 合成过程见图 4。异构体 C 由于手性合成引入, 而他达拉非异构体 A 和异构体 B 由起始原料 D-色氨酸甲酯盐酸盐中的 L 型异构体反应后引入^[10]。异构体生成过程见图 5。

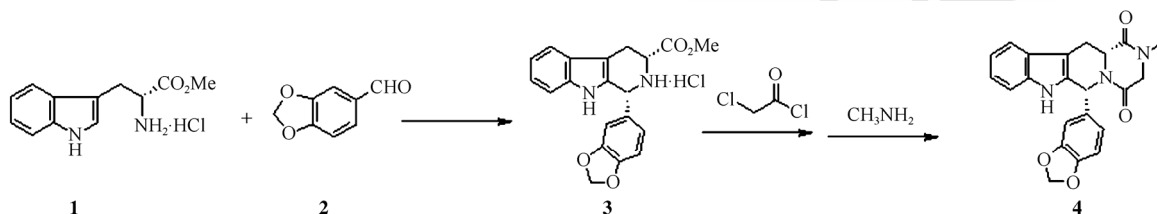


图 4 他达拉非合成过程

1-D-色氨酸甲酯盐酸盐; 2-胡椒醛; 3-(6R,12aR)-四氢喹啉; 4-他达拉非。

Fig. 4 Synthetic route of tadalafil

1-D-tryptophan methyl ester hydrochloride; 2-heliotropin; 3-(6R,12aR)-tetrahydroquinoline; 4-tadalafil.

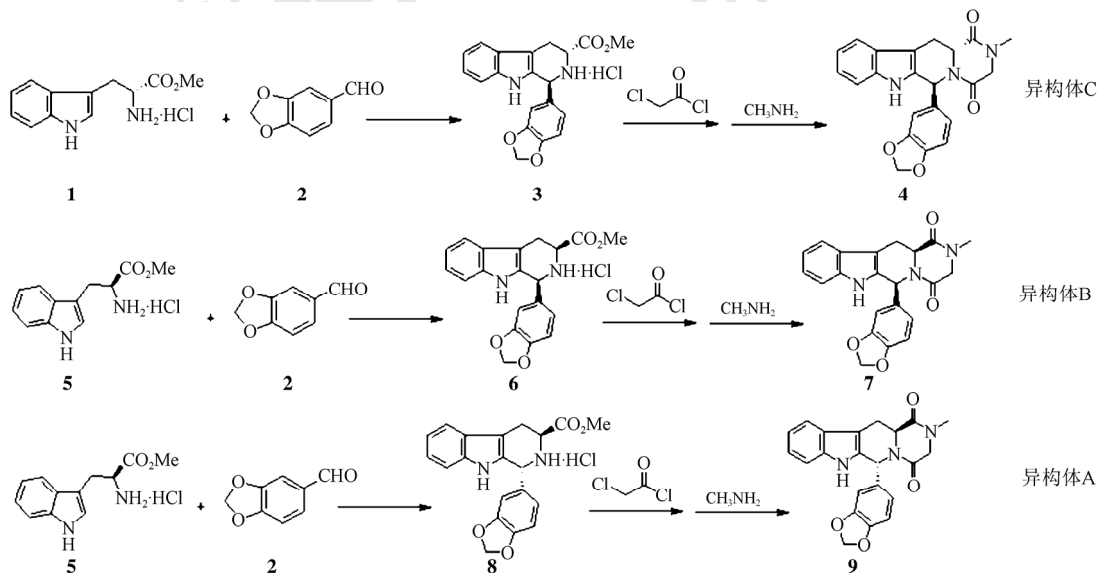


图 5 他达拉非异构体生成过程

1-D-色氨酸甲酯盐酸盐; 2-胡椒醛; 3-(6S,12aR)-四氢喹啉; 4-异构体 C; 5-L-色氨酸甲酯盐酸盐; 6-(6S,12aS)-四氢喹啉; 7-异构体 B; 8-(6R,12aS)-四氢喹啉; 9-异构体 A。

Fig. 5 Synthetic route of tadalafil isomers

1-D-tryptophan methyl ester hydrochloride; 2-heliotropin; 3-(6S,12aR)-tetrahydroquinoline; 4-isomer A; 5-L-methyl tryptophan hydrochloride; 6-(6S,12aS)-tetrahydroquinoline; 7-isomer B; 8-(6R,12aS)-tetrahydroquinoline; 9-isomer C.

3.2 液相条件的确定

3.2.1 波长的选择 对他达拉非、异构体 A、异构体 B 和异构体 C 进行紫外光谱扫描,结果异构体 A、异构体 B 和异构体 C,他达拉非的最大吸收波长均为 221~223 nm,因此选择 222 nm 为检测波长。

3.2.2 流动相比比例的选择 笔者考察了不同流动相比比例下,他达拉非及各异构体的分离效果。结果表明,随着有机相由 60%降低至 40%,他达拉非及其异构体的保留时间由 5~10 min 增加到 17~25 min,各物质间的最小分离度由 1.14 增加到 1.52,但有机相比比例继续降低至 35%,保留时间移至 30 min 以后,峰宽增大,且最小分离度降为 1.18,因此最终确定流动相比比例为乙腈-水(40:60)。

CHIRALPAK-IC 手性柱的硅胶表面键合了纤维素-3, 5-二氯苯基氨基甲酸酯,其主要的手性作用点是羰基或氨基甲酸酯,具有极性基团的外消旋化合物可以与氨基甲酸酯部位通过氢键相互作用而达到手性识别^[11]。他达拉非及各异构体分子中一个手性原子与羰基相连,该羰基可与固定相上的氨基之间形成氢键,也可与固定相上的羰基发生偶极-偶极作用,同时,与另一个手性原子相连的苯环,与固定相的苯环之间存在的 $\pi-\pi$ 作用,这些分子间作用力是固定相与他达拉非及其对映异构体及非对映异构体的主要识别机制。另外,固定相上苯基部分包含吸电子的氯,他达拉非及各异构体分子中有供电子的甲基,也会提高手性识别能力。同时,流动相中的乙腈中的氮含有孤对电子,能与他达拉非及异构体分子间形成氢键,降低流动相中的有机相比比例时,使得他达拉非及各异构体与流动相间的氢键作用力减弱,与固定相之间的氢键作用力增强,因此各物质在色谱柱上的保留增强,分离效果得到改善。

3.2.3 流动相 pH 的选择 以磷酸二氢钾缓冲溶液调节流动相 pH,考察了流动相 pH 对他达拉非及其异构体分离行为的影响。由于选用的色谱柱的 pH 使用范围为 2~7,因此主要考察 pH 为 2, 3, 4, 5, 6, 7 条件下的液相效果。结果表明,当流动相 pH 由 2 增加到 7,各物质之间的分离度增大,峰宽减小,但是分离度及峰宽变化幅度都很小,调节 pH 对分离的影响很小。

他达拉非结构中杂环氮原子显弱碱性,其 pK_a 为 18^[12]。在 pH 2~7 的范围内,调节流动相的 pH 值并没有明显改变分子的解离状态,由于 pH 的改变主要作用于他达拉非及各异构体结构中氮,对

于影响手性分离的羰基和苯环的影响不大,因此 pH 的改变对分离效果基本没有影响。

4 结论

本实验建立了他达拉非对映异构体和非对映异构体的定量分析方法。他达拉非及异构体 A,异构体 B,异构体 C 峰分离良好,分别在 25.3~379.5, 50.6~379.5, 50.4~378.0 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.997\ 3\sim0.998\ 7$),检测限分别为 12.7, 25.3, 25.2 ng·mL⁻¹,加样回收率分别为 107.5%, 96.9%, 98.5%,进样精密度及重复性 RSD $\leq 2\%$ 。3 批样品中异构体 A 最高含量为 0.018%,异构体 B 及异构体 C 均未超过检测限(小于他达拉非含量的 0.010%)。实验结果表明,本实验开发的 HPLC 方法简单、准确、方便,能够同时测定他达拉非的 3 种异构体,可用于控制他达拉非的对映异构体及非对映异构体。

REFERENCES

- [1] DUAN X G. Tadalafil for erectile dysfunction: An overview [J]. Natl J Androl(中华男科医学杂志), 2013, 19(4): 380-383.
- [2] BAI W J. Tadalafil for erectile dysfunction: excellent safety and tolerance [J]. Natl J Androl(中华男科学杂志), 2009, 15(1): 92-95.
- [3] ZHENG L, LIU Q Q, JINGZ C. Phosphodiesterase type 5 inhibitors in the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. World Clin Drug(世界临床药物), 2014, 35(6): 321-325.
- [4] TSAI B M, TURRENTINE M W, SHERIDAN B C, et al. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression [J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(1): 272-278.
- [5] MANESCHI E, CELLAI I, AVERSA A, et al. Tadalafil reduces visceral adipose tissue accumulation by promoting preadipocytes differentiation towards a metabolically healthy phenotype: studies in rabbits [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016(424): 50-70.
- [6] DAUGAN A, GRONDIN P, RUAULT C, et al. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2, 3, 6, 7, 12, 12a-hexahydropyrazino [1', 2': 1, 6] pyrido [3, 4-b] indole-1, 4-dione analogues [J]. J Med Chem, 2003, 46(21): 4533-4542.
- [7] QIU Y J, ZHOU Y H. Determination of illegal added unknown sildenafil substances in health care products by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Med Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(8): 1000-1004.
- [8] EP 8.0 [S]. 3359-3361.
- [9] USP 38 [S]. 5433-5437.
- [10] XIONG Y J. Research progress on synthetic process of tadalafil for treating erectile dysfunction [J]. Chin Pharm(中国药业), 2010, 19(15): 1-3.
- [11] MA S J, JIA X, SUN H B, et al. Enantioseparation of 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl on cellulose chiral [J]. J Zhengzhou Univ Med Sci(郑州大学学报:医学版), 2013, 48(1): 120-123.
- [12] FOSSEL E T. Treatment of erectile dysfunction and other indications: US, US 20140051707 A1[P]. 2014.

收稿日期: 2016-03-24