

HPLC 测定盐酸达泊西汀片中的异构体

张因¹, 周健鹏² (1.天津市儿童医院, 天津 300074; 2.天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要: 目的 建立盐酸达泊西汀片中异构体的 HPLC 检测方法。方法 采用 DAICEL CHIRALPAK OZ-H 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温: 40 ℃, 检测波长: 293 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 流动相: 正己烷-异丙醇-二乙胺(80:20:0.05)。结果 盐酸达泊西汀及其异构体在 0.01~0.50 mg·mL⁻¹ 内具有良好的线性关系($r=0.999\ 9$), 盐酸达泊西汀定量限为 0.002 mg·mL⁻¹(相当于 0.02%), 最低检测限为 0.001 mg·mL⁻¹(相当于 0.01%); 异构体定量限浓度为 0.001 mg·mL⁻¹(相当于 0.01%), 最低检测限为 0.000 5 mg·mL⁻¹(相当于 0.005%)。结论 该方法操作简便, 结果准确, 可用于盐酸达泊西汀片中异构体的含量测定。

关键词: 盐酸达泊西汀片剂; 高效液相色谱法; 光学异构体

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)09-1309-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.020

引用本文: 张因, 周健鹏. HPLC 测定盐酸达泊西汀片的异构体[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1309-1312.

Determination of Isomer in Dapoxetine Hydrochloride Tablets by HPLC

ZHANG Nan¹, ZHOU Jianpeng² (1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China; 2. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of HPLC for the determination of isomer in dapoxetine hydrochloride tablets. **METHODS** The column of DAICEL CHIRALPAK OZ-H (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Column temperature was 40 ℃, detection wavelength was 293 nm, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the mobile phase consisted of *n*-hexane-isopropanol-diethylamine(80:20:0.05). **RESULTS** The calibration curves of dapoxetine hydrochloride and isomer were linear over the range of 0.01–0.50 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$). The limit of quantification was 0.002 mg·mL⁻¹(equivalent to 0.02%). The minimum detection limit was 0.001 mg·mL⁻¹(equivalent to 0.01%). The limit of quantification of isomer was 0.001 mg·mL⁻¹(equivalent to 0.01%), and the minimum detection limit was 0.000 5 mg·mL⁻¹(equivalent to 0.005%). **CONCLUSION** The method is proved to be simple and accurate, which is suitable for the content determination of optical isomer in dapoxetine hydrochloride tablets.

KEY WORDS: dapoxetine hydrochloride tablets; HPLC; isomer

盐酸达泊西汀, 化学名为(+)(*S*)-*N,N*-二甲基- α -[2-(1-萘氧基)乙基]-苯甲胺盐酸盐, 是一种选择性的 5-羟色胺再摄取抑制剂, 由强生制药和子公司杨森制药研发。盐酸达泊西汀口服给药可以迅速吸收, 60 mg 剂量给药后 1.3 h 左右达到峰浓度, 并且可迅速清除, 给药后 24 h 血浆浓度不到峰浓度的 5%。盐酸达泊西汀的这种药动学特点可以使药物释放最大化, 并且为期望口服治疗早泄的患者提供了一种选择, 也使其成为首个获准用于早泄的口服处方药。盐酸达泊西汀分子结构中存在于一个手性中心, 具有对映异构体, 具有药理活性的为 *S* 构型^[1-8], 见图 1。盐酸达泊西汀异构体分析方法尚未见文献报道。本实验通过高效液相色谱法测定盐酸达泊西汀片中的异构体, 对盐酸达泊西汀片进行质量控制。

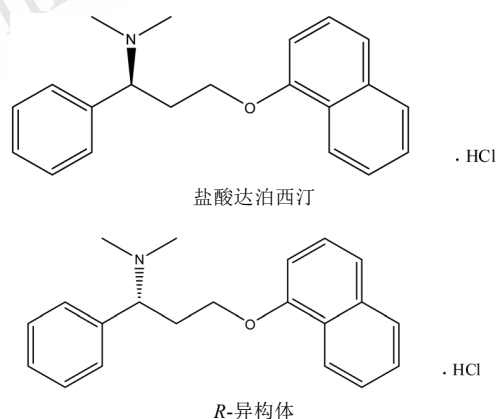


图 1 盐酸达泊西汀与 *R*-异构体的结构图

Fig. 1 The structure of dapoxetine hydrochloride and *R*-isomer

1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 PDA 检测器, Empower 3 色谱工作站(美国 Waters

作者简介: 张因, 女, 硕士生, 主管药师 Tel: (022)23962655

E-mail: lvd1314@126.com

公司); XSE 105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Sigma1-14 型离心机(德国 Sigma 公司); KQ3200DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

正己烷和异丙醇均为色谱纯, 均购自天津市康科德科技发展有限公司; 二乙胺为分析纯(天津市光复精细化工研究所)。盐酸达泊西汀片(德国 Berlin-Chemie AG 公司, 规格: 60 mg, 批号: DEZS0011, DEZS0028, DEZS0052)。盐酸达泊西汀对照品(自制, 批号: 20161209, 纯度: 99.9%); 盐酸达泊西汀 *R*-异构体对照品(自制, 批号: 20161225, 纯度: 99.9%)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

DAICEL CHIRALPAK OZ-H 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温: 40 °C, 检测波长: 293 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 流动相: 正己烷-异丙醇-二乙胺(80:20:0.05), 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适应性溶液的制备 分别取 5 mg 盐酸达泊西汀对照品与 5 mg *R*-异构体对照品, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 稀释至刻度。精密量取 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取研细的盐酸达泊西汀片粉末适量(约含盐酸达泊西汀 100 mg), 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min 使溶解; 冷却至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 取 10 mg *R*-异构体对照品, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 稀释至刻度。精密量取 1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 空白辅料溶液 按处方比例取片剂辅料适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min 使溶解; 冷却至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。过滤, 即得。

2.3 系统适用性试验

按“2.1”项下色谱条件取系统适应性溶液进样测定, 结果盐酸达泊西汀与 *R*-异构体的分离度为 16.6, 理论板数按盐酸达泊西汀峰计为 10 937, 按 *R*-异构体峰计为 11 355, 空白辅料不干扰异构体的测定。色谱图见图 2。

2.4 专属性试验

酸破坏试验: 精密称取本品片粉约 141.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min; 冷却至室温, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸甲醇溶液 0.2 mL, 水浴加热 3 h, 冷却; 用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠甲醇溶液调 pH 值至中性, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。同法进行空白辅料试验。

碱破坏试验: 精密称取本品片粉约 141.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min; 冷却至室温, 加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠甲醇溶液 0.2 mL, 水浴加热 3 h, 冷却; 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸甲醇溶液调 pH 值至中性, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。同法进行空白辅料试验。

加热破坏试验: 精密称取本品片粉约 141.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min; 冷却至室温, 水浴加热 50 min, 冷却, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。同法进行空白辅料试验。

氧化破坏试验: 精密称取本品片粉约 141.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min; 冷却至室温, 加 30% 的过氧化氢溶液 0.2 mL, 摇匀, 放置 2.5 h, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。同法进行空白辅料试验。

光照破坏试验: 精密称取本品片粉约 141.5 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇 7 mL, 超声 30 min; 冷却至室温, 日光照 3 d, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。同法进行空白辅料试验。

试验结果表明, 盐酸达泊西汀片在氧化破坏下, 不稳定; 在酸、碱、加热、光照破坏下, 稳定。分解出来的杂质都能与 *R*-异构体色谱峰和主成分色谱峰分离良好, 不干扰 *R*-异构体的测定。空白辅料在酸、碱、加热、氧化、光照破坏试验条件下, 不干扰 *R*-异构体的测定。结果表明方法专属性良好。色谱图见图 2。

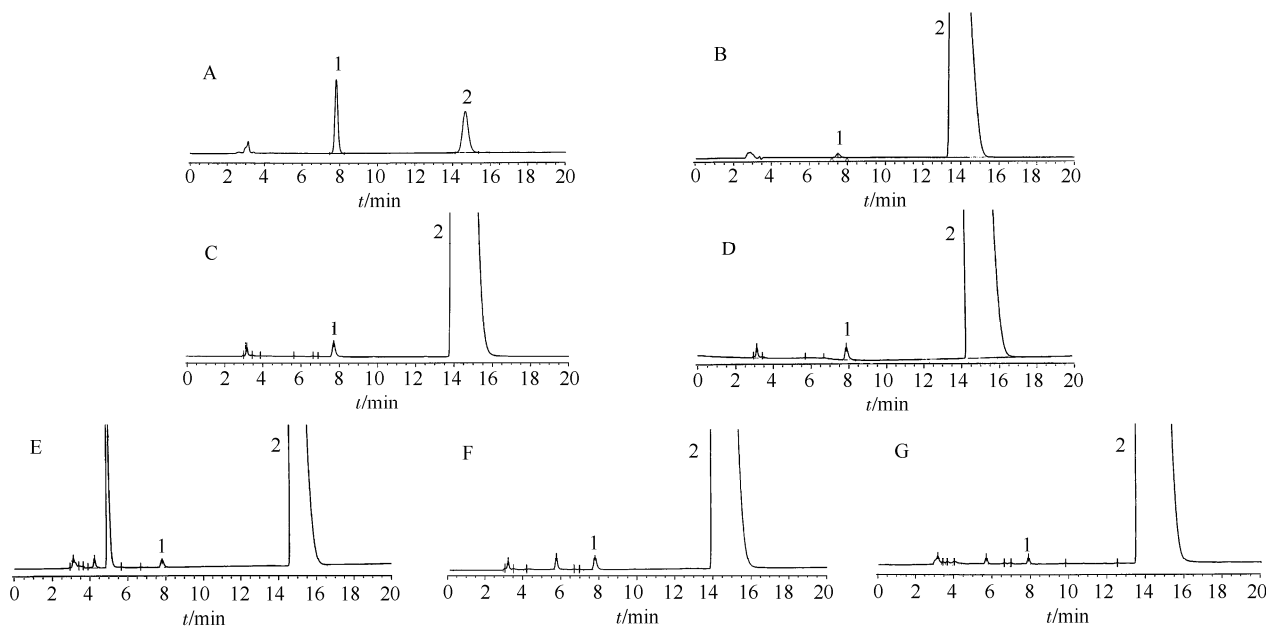


图2 高效液相色谱图谱

A—系统适用性溶液；B—供试品溶液；C—高温破坏；D—光照破坏；E—氧化破坏；F—酸破坏；G—碱破坏。1—*R*-异构体；2—盐酸达泊西汀。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A—the system suitability solution; B—sample; C—high temperature damage; D—light damage; E—oxidation damage; F—acid damage; G—base damage. 1—*R*-isomer; 2—dapoxetine hydrochloride.

2.5 线性试验

取系统适应性溶液，作为线性储备溶液，精密量取该溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 5.0, 10 mL，分别置 1 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，分别精密量取上述 6 个浓度的溶液各 20 μ L 注入色谱仪中，记录色谱图。结果表明，在 0.01~0.50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内盐酸达泊西汀浓度与峰面积呈良好的线性关系 $r=0.9999$ ；在 0.001~0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内 *R*-异构体浓度与峰面积呈良好的线性关系， $r=0.9999$ 。

2.6 检测限与定量限

取系统适应性溶液，以逐级稀释法测定检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图。实验结果表明，盐酸达泊西汀检测限浓度为 0.001 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于 0.01%， $n=6$ ， $\text{RSD}=1.92\%$)，*R*-异构体检测限浓度为 0.0005 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于 0.005%， $n=6$ ， $\text{RSD}=1.87\%$)。盐酸达泊西汀定量限浓度为 0.002 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于 0.02%， $n=6$ ， $\text{RSD}=1.22\%$)，*R*-异构体定量限浓度为 0.001 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于 0.01%， $n=6$ ， $\text{RSD}=1.64\%$)。

2.7 重复性试验

取 DEZS0011 批样品 6 份，按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液，精密量取 20 μ L 注入液相色谱

仪，记录色谱图。以外标法计算，供试品中含有异构体的量的 RSD 为 1.22% ($n=6$)。结果表明，本方法重复性良好。

2.8 仪器精密度试验

取 DEZS0011 批样品 1 份，按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液，精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪，进样 6 次，记录色谱图。以外标法计算，供试品中含有异构体的量的 RSD 为 0.88% ($n=6$)。结果表明，本方法仪器精密度良好。

2.9 回收率试验

取 DEZS0011 批样品约 100 mg，共 9 份，按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液，按异构体限度值(0.2%)的 100%精密加入异构体对照品 9 份，用稀释液稀释至刻度，摇匀，即得。按“2.1”项下的色谱条件进样分析，用外标法分别计算回收率，平均值为 99.5%， RSD 为 1.20%，符合要求。结果见表 1。

2.10 溶液稳定性考察

取 DEZS0011 批样品 1 份，按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样，按“2.1”项下色谱条件测定。记录色谱图。结果表明供试品溶液放置 24 h 内异构体含量无明显变化，基本稳定。

表 1 异构体加样回收率实验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery test($n=9$)

原有量/ μg	对照品加 入量/ μg	测得值/ μg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
130.4	201.3	331.5	99.94		
130.8		325.5	98.02		
130.1		331.6	100.05		
129.6	200.7	328.5	99.44		
131.0		329.5	99.33	99.5	1.2
130.5		324.2	97.88		
128.8	199.4	323.9	98.68		
128.9		334.1	101.77		
131.3		331.9	100.12		

2.11 耐用性考察

取 DEZS0011 批样品 1 份, 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图。考察柱温(38, 40, 42 $^{\circ}\text{C}$)、流速(0.8, 1.0, 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)变化及流动相比例[正己烷-异丙醇-二乙胺(78:22:0.05), 正己烷-异丙醇-二乙胺(80:20:0.05), 正己烷-异丙醇-二乙胺(82:18:0.05)]变化对测定的影响。结果显示, 柱温、流速与流动相比例的微小变化对异构体的测定无明显影响, 表明耐用性良好。

2.12 样品的测定

按“2.1”项下色谱条件取系统适应性溶液进样测定, 结果盐酸达泊西汀与 *R*-异构体的分离度 >3.0 , 符合要求。再取 3 个批号的供试品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 供试品溶液中如检出异构体(*R*型)峰, 按外标法计算, 其量不得过 0.2%。试验结果表明, 批号分别为 DEZS0011, DEZS0028, DEZS0052 的 3 批样品中异构体的含量分别为 0.13%, 0.07%, 0.04%。

3 讨论

3.1 提取工艺考察

本实验分别对提取溶剂和提取方式进行了考察, 提取溶剂分别考察了流动相, 甲醇和乙醇, 结果表明当提取溶剂发生变化时, 异构体检出的峰面积差异很大, 纯甲醇作为溶剂能的提取完全效率最高; 因此, 选择甲醇为提取溶媒。提取方

式考察了过滤和离心两种方式, 异构体检出的峰面积差异很小, 选择过滤处理方法。进一步对超声时间(15, 30, 45 min)进行了考察, 当超声时间发生变化时, 异构体检出的峰面积差异很大, 超声 30 min 就可提取完全。

3.2 色谱柱的选择

手性异构体的分离, 手性色谱柱是关键。分别考察了多种手性色谱柱, CHIRALPAK OJ-H, CHIRALPAK OD-H, CHIRALPAK AS-H, CHIRALPAK AD-H, CHIRALPAK OZ-H, 其中色谱柱 CHIRALPAK OZ-H 分离效果最好, 故选用该色谱柱。

本实验通过对提取工艺, 色谱柱, 流动相等条件的考察, 改变流动相和色谱条件, 建立了盐酸达泊西汀片剂异构体的 HPLC 检测方法。该方法操作简便, 结果准确, 可用于盐酸达泊西汀片剂中异构体的含量测定。

REFERENCES

- [1] JIANG Q H, XU Y X, YANG Y, et al. The progress in the synthetic methods of dapoxetine [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2013, 23(5): 417-421.
- [2] GUO J M, YANG R S, DU X, et al. Synthesis of key intermediate of dapoxetine [J]. J Luzhou Med Coll(泸州医学院学报), 2013, 36(1): 47-48.
- [3] WU P H, DU Q H, LU T. Improved synthesis of dapoxetine hydrochloride [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2016, 33(2): 181-183.
- [4] MUKUNDRAY D A, JASUBHAI P D, RAJIV K, et al. Process for preparing dapoxetine: WO, 2008035358 [P]. 2008-03-27.
- [5] ALT C A, ROBNEY R L, VANMETER E E. Intermediates to 1-phenyl-3-naphthalenyloxypropanamines: US, 5292962 [P]. 1994-03-08.
- [6] GUO J, LIAO Y Y, WANG F D, et al. Determination of dapoxetine hydrochloride in bulk form and its related substances by RP-HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2015, 13(10): 1073-1077.
- [7] ANDRAS D, GERGO T, JOZSEF K, et al. Structure elucidation of a process-related impurity of dapoxetine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(96): 272-277.
- [8] TAE K K, IN S K, SEOK H H, et al. Determination of dapoxetine in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2013(926): 42-46.

收稿日期: 2017-02-10

(本文责编: 曹粤锋)