

HPLC 法测定知非沙班中 R 异构体

靳文仙^{1,2}, 刘欢^{1,2}, 黄长江¹, 王成港^{1,2*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 释药技术及药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定知非沙班中 R 异构体的方法。方法 采用 HPLC 法, 以多糖衍生物共价键合手性柱 Chiralpak[®] IA (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 作为固定相; 以甲醇-乙腈-二乙胺 (90:10:0.1) 作为流动相; 检测波长: 235 nm; 柱温: 35 °C; 体积流量为 0.85 mL/min; 进样体积: 20 μL。结果 知非沙班 R 异构体在 0.007 5~1.000 0 μg/mL 与峰面积线性关系良好 ($r=0.999\ 5$), 平均回收率为 99.32%, RSD 值为 2.90% ($n=12$)。结论 本法操作简便快速, 结果准确可靠, 可用于知非沙班中 R 异构体的控制。

关键词: 知非沙班; R 异构体; 高效液相色谱

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)09-0988-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.09.007

Determination of R isomer in zifaxaban by HPLC

JIN wen-xian^{1,2}, LIU huan^{1,2}, HUANG chang-jiang¹, WANG cheng-gang^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of R optical isomer in zifaxaban. **Methods** The HPLC was performed on a Chiralpak[®] IA column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Methanol-acetonitrile-diethylamine (90:10:0.1) was used as mobile phase. The detective wavelength was set at 235 nm. The temperature of column was set at 35 °C. The flow rate was 0.8 mL/min with injection volume of 20 μL. **Results** A good linear relationship was obtained in the range of 0.007 5—1.000 0 μg/mL ($r=0.999\ 5$), and the average recovery was 99.32% with RSD of 2.90% ($n=12$). **Conclusion** The method is convenient, rapid, accurate, and can be used for the determination of zifaxaban R optical isomers.

Key words: zifaxaban; R isomers; HPLC

血栓栓塞性疾病是心血管疾病中危害最严重的疾病, 是人类健康的第一杀手。随着生活水平的提高和人口老龄化的加剧, 该类疾病的发生率、死亡率、致残率逐年增加。现有抗血栓栓塞性疾病的药物分为抗血小板药物、抗凝血药物和纤维蛋白溶解药物。近年研究表明, 凝血因子 Xa 是研制新型抗凝药物的最佳靶点^[1]。我院自主研发的新分子实体知非沙班是一种新的噁唑烷酮衍生物, 能与游离的凝血酶原结合, 结构上具有 1 个手性中心, 起药效作用的为知非沙班 S 构型 (图 1)。知非沙班是凝血

因子 Xa 的低相对分子质量可口服给药抑制剂, 可用于预防或治疗静脉血栓栓塞性疾病。

许多药物或生理上非常重要的化合物都是手性的, 这些化合物光学异构体之间的生物活性差异较为复杂。如果两种异构体在体内转运过程中受到手性生物大分子 (如酶、受体、载体) 立体选择性的影响, 则可使两种异构体表现出不同的药理作用及毒副作用^[2]。知非沙班中的 R 异构体不具有药学活性, 其含量高低与知非沙班的疗效和安全性有着密切的关系。因此, 严格控制知非沙班中的 R 异构体

收稿日期: 2014-06-16

基金项目: 天津市科技计划项目 (12ZCZDSY01100)

作者简介: 靳文仙 (1982—), 女, 硕士, 助理研究员, 2007 年毕业于天津大学制药工程专业, 一直从事药物研发工作。

Tel: (022)23006879 E-mail: jinwx@tjpr.com

*通信作者 王成港, 男, 副研究员。Tel: (022)23006879 E-mail: wangcg@tjpr.com

含量尤为重要。本研究通过实验条件的优化,建立了一个可以用来检测知非沙班中R异构体的高效液相色谱法。经方法学验证,本方法灵敏度高、专属性强,具有良好的重复性和准确性,可以用来控制知非沙班中R异构体含量,保证用药的安全有效。

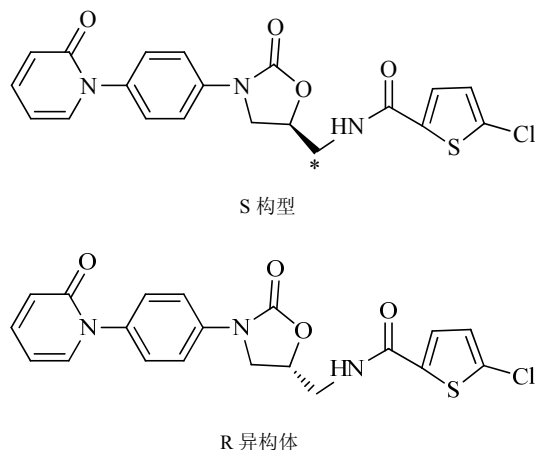


图1 知非沙班构型

Fig. 1 Structure of S isomer in zifaxaban

1 仪器与试剂

Series 1500 液相泵、Model 500 紫外检测器(美国 LabAlliance 公司), Spectra System AS1000 自动进样系统(美国 Thermo Finnigan 公司), MS105 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司), KQ—2200B 超声波清洗器(巩义市英峪予华仪器厂)。

甲醇、乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),二乙胺(色谱纯,天津光大科技有限公司),纯净水。

知非沙班 R 异构体对照品(自制,批号 R121026,质量分数 99.3%),知非沙班供试品(自制,批号 H130225、H130423、H130608)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3-5]

以多糖衍生物共价键合手性柱 Chiralpak[®] IA (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 作为固定相;以甲醇-乙腈-二乙胺(90:10:0.1)作为流动相;检测波长: 235 nm;柱温: 35 °C;体积流量为 0.85 mL/min;进样体积: 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制

取知非沙班 R 异构体对照品适量,精密称定,加甲醇超声溶解并稀释制成 0.5 μg/mL 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取知非沙班供试品适量,精密称定,加甲醇超声溶解并稀释制成 100 μg/mL 的溶液。

2.4 选择性溶液的制备

取知非沙班供试品和 R 异构体对照品各适量,精密称定,加甲醇超声溶解并稀释制成含知非沙班 100 μg/mL、R 异构体 0.5 μg/mL 的混合溶液。

2.5 专属性试验

分别进样流动相、溶剂甲醇、知非沙班供试品溶液、知非沙班 R 异构体对照品溶液和选择性溶液。由结果可知,流动相和溶剂甲醇均对知非沙班 R 异构体的测定没有干扰。保留时间为 11.5 min 的色谱峰为知非沙班峰,13.5 min 的色谱峰为 R 异构体峰,选择性溶液中知非沙班及其 R 异构体的分离度为 3.24,色谱图见图 1。

2.6 线性关系考察

精密称定知非沙班 R 异构体适量,加甲醇配制 5 μg/mL 溶液,作为线性贮备液。分别精密移取 0.15、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0 mL 溶液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样测定。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,

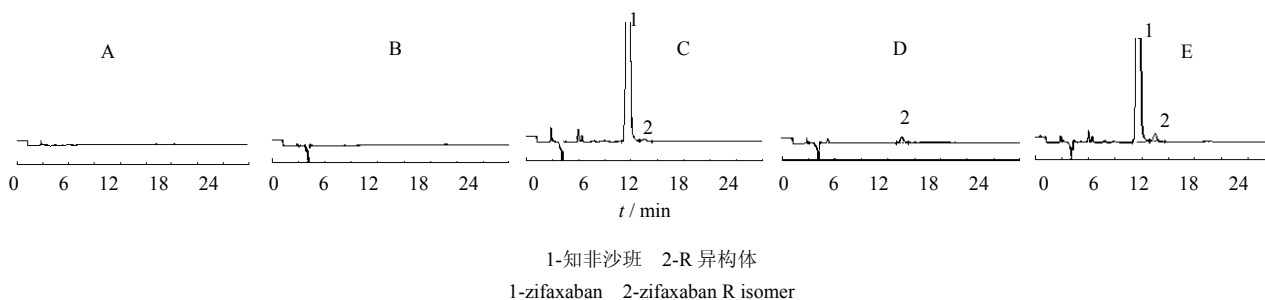


图1 流动相(A)、甲醇(B)、知非沙班(C)、知非沙班 R 异构体(D)和选择性溶液(E) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mobile phase (A), methanol (B), zifaxaban (C), zifaxaban R isomer (D), and selected solution (E)

进行线性回归。得回归方程 $Y=56\ 600\ X+87.221$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明知非沙班 R 异构体质量浓度在 $0.007\ 5\sim 1.000\ 0\ \mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.7 检测限和定量限的确定

用稀释法将知非沙班 R 异构体稀释成一定质量浓度的溶液进行测定,当 S/N 约为 3 时,该样品质量浓度为最低检测限浓度,当 S/N 约为 10 时,该样品质量浓度为最小定量限浓度。结果 R 异构体的最低检测限为 $25\ \text{ng/mL}$ (相当于样品浓度的 0.025%),最低定量限为 $75\ \text{ng/mL}$ (相当于样品浓度的 0.075%)。取定量限样品重复进样 6 针, R 异构体峰面积的 RSD 值为 2.05%,说明在定量限水平的测定结果具有一定的精密度和准确性。

2.8 重复性试验

配制知非沙班 R 异构体对照品溶液及 6 份知非沙班供试品溶液,分别进样,记录色谱行为,按外标法以峰面积计算 6 份供试品溶液中 R 异构体质量分数,结果 R 异构体质量分数的平均值为 0.161%, RSD 值为 2.62%。

2.9 精密度试验

配制知非沙班供试品溶液,重复进样 6 针,记录色谱行为。结果知非沙班主峰峰面积的 RSD 值为 1.04%, R 异构体峰面积的 RSD 值为 1.27%。

2.10 准确度试验

精密称定知非沙班供试品适量,加甲醇配制成 $0.5\ \text{mg/mL}$ 的溶液,作为知非沙班贮备液;精密称定 R 异构体适量,加甲醇配制成 $5\ \mu\text{g/mL}$ 的溶液,作为 R 异构体贮备液。精密量取知非沙班贮备液 $2\ \text{mL}$,置 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,分别移加 R 异构体贮备液 0.15 、 0.5 、 1.0 、 $1.5\ \text{mL}$,按照 15% (即 LOQ 水平)、50%、100%、150%水平配制,每个浓度平行配制 3 份,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别进样测定。按外标法以峰面积计算 R 异构体的总量,扣除知非沙班中 R 异构体的量,得到对照品的测得值,并与对照品实际加入值进行比较,得到各水平的回收率。结果知非沙班中 R 异构体的平均回收率为 99.32%, RSD 值为 2.90% ($n=12$)。

2.11 稳定性试验

取知非沙班供试品溶液分别于自然条件下放置 0、1、2、4、6、8、24 h 后进样测定,记录色谱图,计算得知非沙班峰面积的 RSD 值为 1.09%, R 异构体峰面积的 RSD 值为 1.20%,说明供试品溶液在

24 h 内稳定性良好。

2.12 耐用性考察

通过改变不同的体积流量、波长、柱温、调节流动相中乙腈比例、二乙胺用量等参数评估测定条件有微小变动,测定结果不受影响的承受程度。按照表 1 进行色谱条件的调整,结果不同体积流量、波长、柱温、流动相乙腈比例、二乙胺用量对知非沙班中的 R 异构体的测定无显著影响。

表 1 耐用性考察中色谱条件参数的变动

Table 1 Parameters changes of chromatographic conditions in durability test

色谱条件	规定值	变动的范围
体积流量	0.85 mL/min	0.8、0.9 mL/min
波长	235 nm	230、240 nm
柱温	35 °C	30、40 °C
流动相中乙腈比例	10%	5%、15%
二乙胺用量	0.1%	0.05%、0.15%

2.13 样品测定

精密称定 3 批知非沙班供试品各适量,用甲醇制备 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的溶液,精密称定 R 异构体对照品适量,用甲醇制备浓度约为 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,记录色谱图,按外标法计算知非沙班样品中的 R 异构体质量分数,结果见表 2。

表 2 知非沙班中 R 异构体的测定结果

Table 2 Determination of R isomers in zifaxaban

批号	R 异构体/%
H130225	0.164
H130423	0.247
H130608	0.095

3 讨论

手性化合物的测定时,通常选用专门的手性色谱柱进行,流动相常选用极性相对较小的正己烷-异丙醇体系。实验发现知非沙班在上述溶剂中均无法溶解,因此需要采用极性较强的溶剂进行优化。经考察知非沙班在乙醇、甲醇、乙腈中经超声可溶解,因此分别选择乙醇、甲醇、乙腈作为流动相考察知非沙班与 R 异构体的分离情况。实验中发现单独的低级醇作为流动相,知非沙班及其异构体的峰形较差,拖尾严重,且出峰时间较晚。单独采用乙

腈作为流动相, 出峰时间提前, 但二者完全重合而无法分离。最终选择甲醇-乙腈按一定比例混合作为流动相, 既可以实现知非沙班与 R 异构体的分离, 且出峰较快, 保证了较高的测定效率。

本实验摸索并建立了高效液相色谱法测定知非沙班中 R 异构体的方法, 该方法快速、简便, 具有专属性和重现性好、灵敏度高、测定结果准确等优点。可有效控制知非沙班的光学纯度和质量, 从而保证临床用药的安全性与有效性。

参考文献

[1] Mani H, Lindhoff-Last E. New oral anticoagulants in

patients with nonvalvular atrial fibrillation: a review of pharmacokinetics, safety, efficacy, quality of life, and cost effectiveness [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 789-798.

[2] 贾湘曼. 手性药物的研究与制备 [J]. 承德医学院学报, 2005, 22(2): 146-148.

[3] 葛 滨, 时贞平. 奥沙利铂左旋异构体测定方法研究 [J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 73-74.

[4] 刘凤丽, 沈园园. HPLC 法测定左亚叶酸钙中的右旋异构体 [J]. 北方药学, 2013, 10(8): 1-2.

[5] 于彩岩, 李晓光, 王 海, 等. 盐酸去氧肾上腺素光学异构体测定方法研究 [J]. 内蒙古石油化工, 2010, 4: 9-10.