

HPLC 法测定安立生坦原料药中有关物质

陈保来, 李家春, 仲 艳, 郭庆明, 沈 旺, 王振中, 萧 伟*

江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘 要: 目的 建立安立生坦原料药中有关物质的测定方法。方法 采用 HPLC 法。Waters Atlantis T3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.02% 三氟乙酸水溶液 - 0.01% 三氟乙酸乙腈溶液为流动相, 进行梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 自动进样器控温 5 ℃; 检测波长 220 nm。结果 安立生坦与各杂质的分离度良好, 杂质 Z1、Z2、Z3、Z4、DP1 的定量限分别为 2.14、2.54、2.44、2.45、2.41 ng, 平均回收率分别为 102.9%、96.0%、93.1%、104.6%、115.2%, RSD 值分别为 2.1%、4.6%、2.9%、2.7%、4.9% ($n=10$)。结论 该方法检测灵敏度高, 精密度好, 可以用于安立生坦原料药中有关物质的质量控制。

关键词: 安立生坦; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)02-0149-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.008

Determination of related substances in ambrisentan active pharmaceutical ingredients

CHEN Bao-lai, LI Jia-chun, ZHONG Yan, GUO Qing-ming, SHEN Wang, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei

Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of related substances in ambrisentan active pharmaceutical ingredients. **Methods** HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Atlantis T3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of 0.02% trifluoroacetic acid - acetonitrile (containing 0.01% trifluoroacetic acid) with gradient elution. The temperature of column was set at 30 ℃. The flow rate was 1.0 mL/min with automatic injection volume of 5 μL. The detective wavelength was set at 220 nm. **Results** Ambrisentan and its related substances could be separated completely. The LOQ of the related substances, such as Z1, Z2, Z3, Z4, and DP1 were 2.14, 2.54, 2.44, 2.45, and 2.41 ng, respectively. They all had good linearity. The average recovery were 102.9%, 96.0%, 93.1%, 104.6%, and 115.2% with RSD values of 2.1%, 4.6%, 2.9%, 2.7%, and 4.9% ($n = 10$), respectively. **Conclusion** The method is sensitive and accurate, and can be used for quality control of related substances in ambrisentan active pharmaceutical ingredients.

Key words: ambrisentan; related substances; HPLC

安立生坦是由美国 Myogen 生物制药公司开发的一种选择性内皮素受体拮抗剂, 其化学名为 (+)-(2*S*)-2-[(4,6-二甲基嘧啶-2-基)氧]-3-甲氧基 3,3-二苯基丙酸, 分子式为 $C_{22}H_{22}N_2O_4$, 相对分子质量 378.43。安立生坦可强效抑制内皮素所致血管收缩, 2007 年 6 月 15 日获得美国 FDA 批准, 口服用于肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 的治疗^[1-2]。2010 年 10 月中国批准进口安立生坦片

上市。文献报道^[3-4]采用乙腈 - 磷酸盐缓冲溶液梯度洗脱的方法对安立生坦中有关物质进行测定。缓冲盐溶液在 220 nm 波长下容易引起基线噪声增加和鬼峰, 影响杂质的有效检出。并且由于合成工艺不同, 所测定杂质的种类和侧重也不同。根据安立生坦的合成工艺和强降解试验结果, 分析其可能存在的微量杂质包括: 合成中间体, 如 *S*-1-苯乙胺 (Z1)、4,6-二甲基-2-甲磺酰基嘧啶 (Z2)、3-甲氧基-2-羟基-

收稿日期: 2014-11-03

作者简介: 陈保来, 男, 工程师, 研究方向为药物分析。Tel: 13812328502 E-mail: cbl0501@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518) 81152337 E-mail: wzhhz-nj@163.net

3,3-二苯基丙酸甲酯 (Z3)、2-嘧啶氧基-3-甲氧基-3,3-二苯基丙酸甲酯 (Z4); 降解产物, 如 4,6-二甲基-2-(2,2-二苯基-乙烯氧基)嘧啶 (DP1), 见图 1。本实验以 0.02%三氟乙酸-0.01%三氟乙酸乙腈为流动相, 使用 Waters Atlantis T3 色谱柱进行梯度洗脱, 克服了磷酸盐梯度洗脱造成的基线噪声增加及鬼峰, 使不同极性的杂质均有保留、相互完全分离。经方法学验证试验, 该方法灵敏度高、重现性好、专属性强, 可以作为安立生坦中有关物质的控制方法。

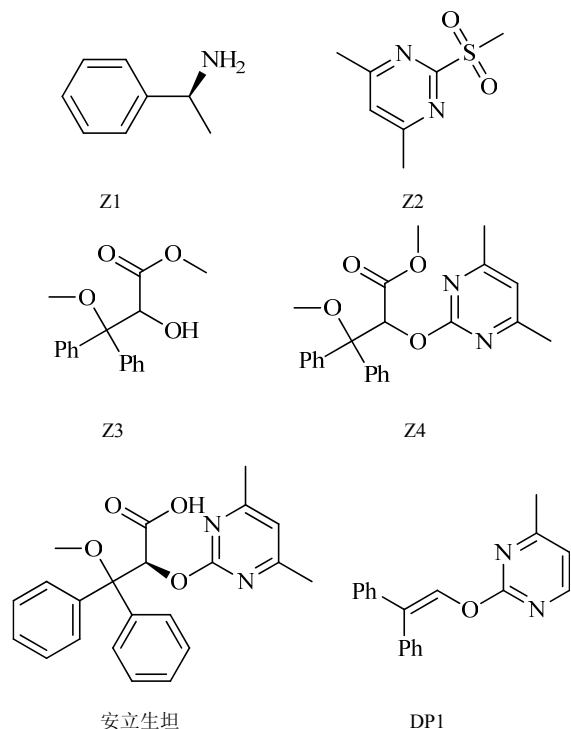


图 1 安立生坦及有关物质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of ambrisentan and its related substances

1 材料

1.1 试药

安立生坦对照品 (批号 120401DZ, 质量分数为 99.8%)、原料药 (批号 120501、120502、120503)、杂质对照品 Z1 (批号 BH-6032-100801, 质量分数大于 99.0%)、Z2 (批号 11101309, 质量分数大于 99.0%)、Z3 (批号 120113, 质量分数大于 99.5%)、Z4 (批号 120201, 质量分数大于 99.5%)、DP1 (批号 120610, 质量分数大于 99.0%) 均由江苏康缘药业股份有限公司提供; 乙腈、三氟乙酸、乙酸均为色谱纯; 水为去离子水。

1.2 仪器

岛津高效液相色谱仪, 包括 LC-20AD 泵、

SIL-20AC 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20A 检测器、Labsolution 工作软件; Sartorius BP221D 电子天平。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Atlantis T3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.02%三氟乙酸水溶液 (A) - 0.01%三氟乙酸乙腈溶液 (B) 为流动相, 进行梯度洗脱, 时间/流动相 A 分别为 0 min/75%、17 min/40%、22 min/40%、45 min/20%; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 自动进样器控温 5 °C; 检测波长 220 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 安立生坦及杂质储备液的制备 称取安立生坦、杂质 Z1、Z2、Z3、Z4、DP1 对照品各约 12.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取安立生坦原料药约 12.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加 0.01%三氟乙酸乙腈溶液 - 0.02%三氟乙酸水溶液 (25:75) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得原料药供试品溶液。精密量取 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得 1%自身对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取安立生坦原料药约 12.5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加入杂质储备液 0.5 mL, 再加 0.01%三氟乙酸乙腈溶液 - 0.02%三氟乙酸水溶液 (25:75) 溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 20 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果各杂质峰均能完全分离, 杂质峰面积的 RSD 值均在 2.0%以下, 表明系统适用性良好。

2.4 专属性试验

取 3 份安立生坦原料药约 12.5 mg, 分别加 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL、1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL、3%过氧化氢溶液 2 mL, 置 80 °C 水浴加热 6 h, 取出冷却, 调至中性, 即得酸、碱、氧化降解样品; 另取安立生坦原料药适量, 分别置于 80 °C 烘箱及 4 500 lx 光照试验箱中放置 10 d, 即得高温、强光照降解样品。分别取各样品, 制备供试品溶液, 进样分析。结果安立生坦原料药在酸性、氧化条件下不稳定, 主要降解产物为杂质 DP1; 安立生坦原料药在碱性、高温和强光照条件下稳定, 未发生显著变化。各降解条件产生的杂质均能完全分开, 色谱图见图 2。

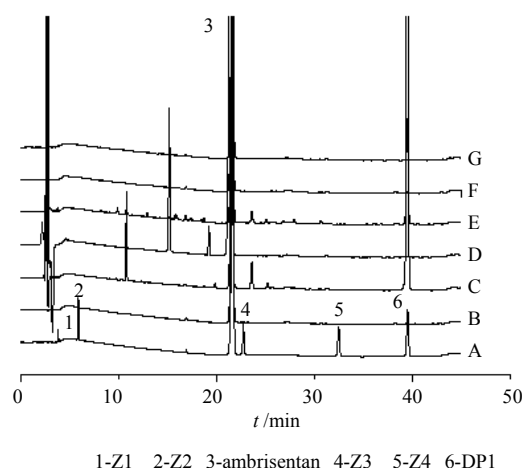


图 2 安立生坦加已知杂质 (A)、安立生坦原料药 (B)、酸降解样品 (C)、碱降解样品 (D)、氧化降解样品 (E)、高温降解样品 (F)、强光照降解样品 (G) HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC chromatograms of ambrisentan spiked with known impurities (A), ambrisentan active pharmaceutical ingredients (B), acid degradation sample (C), alkaline degradation sample (D), oxidative degradation sample (E), high-temperature degradation sample (F), and light degradation sample (G)

2.5 线性关系及检测限测定

取安立生坦及杂质储备溶液，加溶剂稀释制成约 0.15、0.20、0.25、0.375、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溶液。精密量取 20 μL ，进样分析，记录色谱图。以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归，得安立生坦及其杂质的回归方程、相关系数及线性范围。逐步稀释线性试验溶液，定义信噪比 S/N 为 3 时为最低检出限，S/N 为 10 时为定量限。结果见表 1。

2.6 稳定性试验

取 0.25 mg/mL 安立生坦原料药 (批号 120501) 供试品溶液，分别于 0、1、2、4、6、8、12 h 进样分析，结果已知杂质 Z1、DP1、未知最大单杂质及杂质总和的 RSD 值分别为 1.2%、3.7%、0.9%、1.8%

($n=7$)，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取安立生坦原料药 (批号 120501) 适量，平行制备 6 份供试品溶液，分别进样测定，结果已知杂质 Z1、DP1、未知最大单杂质及杂质总和的 RSD 值分别为 1.3%、1.8%、0.8%、1.4% ($n=6$)。

2.8 回收率试验

取安立生坦原料药约 12.5 mg ，精密称定，置 50 mL 量瓶，分别加入相当于安立生坦 0.05%、0.08%、0.1%、0.12%、0.15% 的杂质对照品，每个质量浓度制备 2 份供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果杂质 Z1、Z2、Z3、Z4、DP1 的平均回收率分别为 102.9%、96.0%、93.1%、104.6%、115.2%，RSD 值分别为 2.1%、4.6%、2.9%、2.7%、4.9% ($n=10$)。

2.9 样品测定

取批号 120501、120502、120503 安立生坦原料药适量，制备供试品溶液，进样测定。已知杂质以外标法计算，未知杂质以主成份 1% 自身对照法计算，结果见表 2，供试品溶液液相色谱图见图 3。

3 讨论

3.1 流动相选择的优势

安立生坦片进口药品注册标准采用乙腈 - 磷酸盐缓冲盐梯度洗脱，在不进样空运行梯度程序时有鬼峰出现，影响杂质的检查，可能与缓冲盐中的微量杂质在色谱柱上的蓄积有关，不易消除。文献报道^[3]磷酸盐缓冲盐溶液 pH 值为 6.5，安立生坦分子 (pK_a 为 4.0) 以离子形式在反相色谱柱上进行分离，安立生坦色谱峰拖尾严重。虽然文献报道^[4]的磷酸二氢钾溶液 pH 值调至 2.5，但在不进样空运行梯度程序时仍有鬼峰出现，影响杂质的检查。文献报道^[3-4]中的色谱条件对杂质 Z1 均保留较弱，与溶剂峰未完全分开。本实验建立的 0.02% 三氟乙酸 - 0.01% 三氟乙酸乙腈为流动相的梯度洗脱体系可以有效的

表 1 安立生坦及已知杂质的线性关系及检测限结果

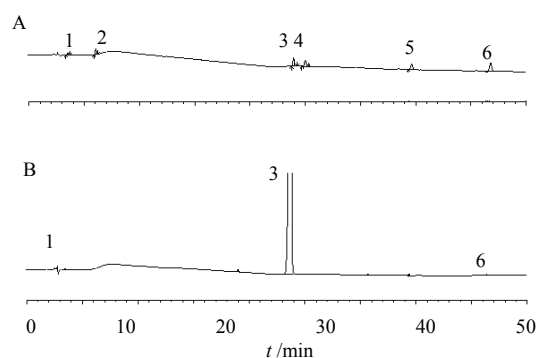
Table 1 Linearity, LOD, and LOQ of ambrisentan and its impurity

样品	回归方程	r	范围/ ng	检出限/ ng	定量限/ ng
Z1	$Y=3.335 \times 10^5 X+1\ 768$	0.999 9	3.36~11.21	1.28	2.14
Z2	$Y=6.319 \times 10^5 X-998.9$	0.999 9	2.93~9.78	1.02	2.54
Z3	$Y=8.171 \times 10^5 X-1\ 284$	0.999 9	3.01~10.03	0.97	2.44
Z4	$Y=9.434 \times 10^5 X-1\ 574$	0.999 8	3.02~10.06	0.98	2.45
安立生坦	$Y=9.905 \times 10^5 X+3\ 832$	0.999 0	2.99~9.96	0.96	2.41
DP1	$Y=1.561 \times 10^5 X-1\ 401$	0.999 9	2.98~9.94	0.10	2.50

表2 安立生坦中有关物质检测结果

Table 2 Determination of related substances in ambrisentan samples

批 号	杂质 Z ₁ /%	杂质 DP ₁ /%	其他最大单杂/%	杂质总和/%	安立生坦%
120501	0.021	0.065	0.042	0.13	99.87
120502	0.033	0.055	0.034	0.13	99.87
120503	0.064	0.052	0.058	0.18	99.82



1-Z1 2-Z2 3-安立生坦 4-Z3 5-Z4 6-DP1
1-Z1 2-Z2 3-ambrisentan 4-Z3 5-Z4 6-DP1

图3 有关物质对照品(A)和原料药(B)的HPLC图谱
Fig. 3 HPLC chromatogram of related substances reference substances (A) and ambrisentan active pharmaceutical ingredients (B)

解决上述问题:(1)流动相中添加三氟乙酸,使极性大的杂质(S-1-苯乙胺)得以在色谱柱上有所保留;(2)采用梯度洗脱,使极性小的杂质(DP1)能够洗脱下来;(3)乙腈、三氟乙酸在220 nm波长处均有紫外吸收,且吸收强度不同,经预试验及三

氟乙酸浓度耐用性考察,确定在有机相及水相中加入不同浓度的三氟乙酸可以部分抑制梯度洗脱过程中因流动相比比例变化带来的基线波动,有利于杂质的检出)。

3.2 供试品制备溶剂的选择及温度控制

本法选择初始流动相作为供试品溶液的制备溶剂,可以减小溶剂峰及溶剂效应的影响。经供试品溶液稳定性考察,本品供试品溶液在自动进样器控温5℃环境中12 h内稳定。但本品在酸性条件下热不稳定,供试品溶液还需临用新鲜配制。

参考文献

- [1] Vatter H, Seifert V. Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006, 24(1): 63-76.
- [2] Frampton J E. Ambrisentan [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2011, 11(4): 215-226.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 安立生坦片进口药品注册标准 JX20090317 [S]. 2010.
- [4] Narayana M B, Chandrasekhar K B, Rao B M. A validated specific stability-indicating RP-HPLC assay method for ambrisentan and its related substances [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(8): 818-825.