

HPLC 法测定安立生坦中 *R* 异构体

吴国顺¹, 王 博², 张海枝³, 孟 策², 任晓文^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定安立生坦中 *R* 异构体的方法。方法 采用 HPLC 法, 用硅胶键合蛋白质型手性色谱柱 ULTRON ES-OVM (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 至 4.0) - 乙腈 (80 : 20) 为流动相; 检测波长 220 nm; 柱温 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL。结果 安立生坦 *R* 异构体在 0.501~4.008 μg/mL 与峰面积线性关系良好 ($r=0.999\ 3$), 平均回收率为 98.62%, RSD 值为 2.82% ($n=12$)。结论 本法操作简便快速, 结果准确可靠, 可用于安立生坦中 *R* 异构体的控制。

关键词: 安立生坦; *R* 异构体; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)02-0185-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.014

Determination of *R* isomer in ambrisentan by HPLC

WU Guo-shun¹, WANG Bo², ZHANG Hai-zhi³, MENG Ce², REN Xiao-wen²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

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

3. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of *R* optical isomer in ambrisentan. **Methods** The HPLC was performed on a ULTRON ES-OVM column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); potassium dihydrogen phosphate solution (0.02 mol/L, adjusted to pH 4 with phosphoric acid) - acetonitrile, 80:20 as mobile phase; detection wavelength, 220 nm; column temperature, 30 °C; flow rate, 1 mL/min; volume of sample, 20 μL. **Results** A good linear relationship was obtained in the range of 0.501—4.008 μg/mL ($r=0.999\ 3$), and the average recovery was 98.62% with RSD of 2.82% ($n=12$). **Conclusion** The method is convenient, rapid, accurate, and can be used for the determination of *R* optical isomer in ambrisentan.

Key words: ambrisentan; *R* isomers; HPLC

安立生坦 (ambrisentan, 商品名凡瑞克[®]) 是由美国 Gilead Sciences 公司开发的一种选择性内皮素 ETA 受体阻滞剂, 其化学名为 (+)-(2*S*)-2-(4, 6-二甲基嘧啶-2-基) 氧基-3-甲氧基-3, 3-二苯基丙酸, 分子式为 C₂₂H₂₂N₂O₄, 相对分子质量为 378.42。安立生坦片于 2007 年 7 月获得美国 FDA 快速批准, 口服用于治疗 I~III 级肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH), 以提高活动能力和延缓临床恶化, 并授予罕见病用药待遇^[1-2]。

由于药物作用靶点如受体、酶或离子通道等结构上的高度立体特异性, 手性药物的不同对映体与靶点的相互作用有所不同, 从而产生不同的药理学活性, 表现出立体选择性。同样, 手性药物进入体内后, 与机体内的具有高度立体特异性的代谢酶及血浆蛋白或转运蛋白等相互作用, 手性药物的不同异构体在体内也将表现出不同的药动学特征, 具有立体专一性^[3]。手性药物对映体在体内的手性环境中易表现出显著的立体选择性, 对映体间药动学参

收稿日期: 2015-01-06

作者简介: 吴国顺 (1988—), 男, 河北唐山人, 在读硕士研究生, 新药研发。Tel: 13652016670

*通信作者 任晓文 Tel: (022)23006953 E-mail: renxw@tjipr.com

数存在差异^[4]。安立生坦中的 *R* 异构体不具有药学活性，其含量高低与安立生坦的疗效和安全性有着密切的关系。因此，严格控制安立生坦中的 *R* 异构体的含量尤其重要。本研究通过实验条件的优化，建立了一套可以用来检测安立生坦 *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，可以用来控制安立生坦中 *R* 异构体含量，保证用药的安全有效。

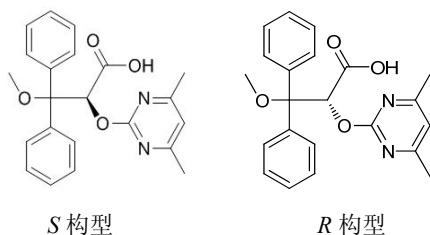


图1 安立生坦构型

Fig. 1 Configuration of ambrisentan

1 仪器与试剂

Waters e2695-2998PDA 高效液相色谱系统（美国 Waters 公司），Empower 色谱工作站（美国 Waters 公司），ULTRON ES-OVM（150 mm×4.6 mm，5 μm）（日本信和化工株式会社），Sartorius BP211D 电子天平（德国赛多利斯公司），AS3120 超声波清洗器（奥特赛恩斯仪器有限公司）。

乙腈（色谱纯，美国 Fisher Scientific），磷酸、磷酸二氢钾（分析纯，天津市天河化学试剂厂），注射用水。

安立生坦 *R* 异构体对照品（自制，批号 R130501，质量分数 99.6%），安立生坦供试品（自制，批号 130401、130402、130403）。

2 方法与结果^[5]

2.1 色谱条件

以硅胶键合蛋白质型手性色谱柱 ULTRON ES-OVM（150 mm×4.6 mm，5 μm）作为固定相；以 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液（用磷酸调节 pH 至 4.0）-乙腈（80：20）为流动相；检测波长 220 nm；柱温 30 ℃；体积流量为 1.0 mL/min；进样体积 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制

取安立生坦 *R* 异构体对照品适量，精密称定，用流动相溶解并定量稀释制成 2.5 μg/mL 的溶液，作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

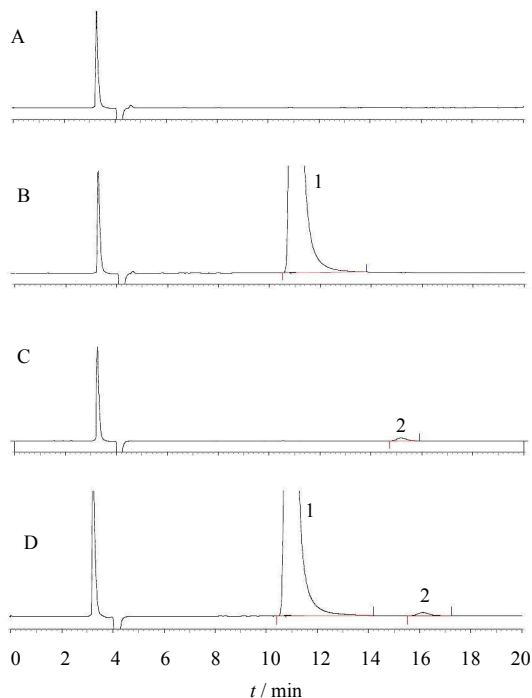
取安立生坦供试品适量，精密称定，用流动相溶解并定量稀释制成 0.5 mg/mL 的溶液，作为供试品溶液。

2.4 分离度溶液的制备

取安立生坦供试品和 *R* 异构体对照品各适量，精密称定，用流动相溶解并定量稀释制成约含安立生坦 0.5 mg/mL 和 *R* 异构体 2.5 μg/mL 的溶液，作为分离度溶液。

2.5 专属性试验

分别取流动相、安立生坦供试品溶液、安立生坦 *R* 异构体对照品溶液和分离度溶液进样。色谱图见图 2。由结果可知，流动相对安立生坦 *R* 异构体的测定没有干扰。保留时间为 10.908 min 的色谱峰为安立生坦峰，15.178 min 的色谱峰为 *R* 异构体峰，分离度溶液中安立生坦及其 *R* 异构体的分离度为 7.95。

1-安立生坦 2-*R* 异构体

1- Ambrisentan 2- Ambrisentan R isomer

图2 流动相(A)、安立生坦(B)、安立生坦 *R* 异构体(C)和选择性溶液(D) HPLC 图谱Fig. 2 HPLC of mobile phase (A), ambrisentan (B), *R* isomer in ambrisentan (C), and selected solution (D)

2.6 线性关系考察

精密称定安立生坦 *R* 异构体适量，加流动相配制成 10 μg/mL 的溶液，作为线性贮备液。分别精密

移取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mL 溶液，置 10 mL 量瓶中，加流动相至刻度，摇匀，进样测定。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归。得回归方程 $Y=34\ 814X-3\ 998.9$ ($r=0.999\ 3$)。结果表明安立生坦 *R* 异构体质量浓度在 0.501~4.008 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.7 检测限和定量限的确定

用稀释法将安立生坦 *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 10 时，该样品质量浓度为最小定量限浓度。结果 *R* 异构体的最小定量限为 0.501 $\mu\text{g/mL}$ (相当于样品浓度的 0.100 2%)，以最小定量限溶液稀释 3 倍确定最低检测限。取最小定量限样品重复进样 6 针，*R* 异构体峰面积的 RSD 值为 2.98%，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

配制安立生坦 *R* 异构体对照品溶液及 6 份安立生坦供试品溶液，分别进样，记录色谱图，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 0.075%，RSD 值为 2.12%。

2.9 精密度试验

配制安立生坦供试品溶液，重复进样 6 针，记录色谱行为。结果安立生坦主峰峰面积的 RSD 值为 1.32%，*R* 异构体峰面积的 RSD 值为 1.85%。

2.10 回收率试验

精密称定安立生坦供试品适量，加流动相配制成 0.5 mg/mL 的溶液，作为安立生坦贮备液；精密称定 *R* 异构体适量，加流动相配制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，作为 *R* 异构体贮备液。精密量取安立生坦贮备液 2 mL，置 10 mL 量瓶中，分别移加 *R* 异构体贮备液 0.5、2.0、2.5、3.0 mL，按照 20%、80%、100%、120% 水平配制，每个浓度平行配制 3 份，用流动相稀释至刻度，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，扣除安立生坦中 *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。结果安立生坦中 *R* 异构体的平均回收率为 98.62%，RSD 值为 2.82% ($n=12$)。

2.11 稳定性试验

取安立生坦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，计算得安立生坦峰面积的 RSD 值为 1.02%，*R* 异构

体峰面积的 RSD 值为 1.86%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.12 耐用性考察

通过改变不同的流速、波长、调节流动相中的乙腈比例、柱温等色谱参数评估测定条件有微小变动时，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，实验结果表明流动相流速、波长、流动相中的乙腈比例、柱温等参数发生微小改变对安立生坦中的 *R* 异构体的测定无显著性的影响。

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 investigation

色谱条件	规定值	变动范围
流动相流速	1 mL/min	0.9 mL/min、1.1 mL/min
波长	220 nm	215 nm、225 nm
流动相中乙腈	20%	15%、25%
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$

2.13 样品测定

精密称取 3 批安立生坦供试品样品各适量，用流动相制备成 500 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，精密称定 *R* 异构体对照品适量，用流动相制备成质量浓度约为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，记录色谱图，按外标法计算安立生坦样品中的 *R* 异构体质量分数，结果见表 2。

表 2 安立生坦中 *R* 异构体的测定结果
Table 2 Determination of *R* isomer in ambisentan

批号	<i>R</i> 异构体/%
130401	0.090
130402	0.093
130403	0.091

3 讨论

本试验中采用的 ES-OVM 手性柱是以卵类黏蛋白作为手性固定相，基于疏水作用和极性相互作用实现药物的手性分离，适用于含有疏水基团的芳香化合物。而其中流动相的 pH 值决定了溶质和蛋白质的电离程度，也改变了蛋白质分子的三维结构，影响其亲和性和手性选择能力。本试验中，流动相的 pH 变化对安立生坦及异构体拆分影响很大，是所有试验条件中需要首先考虑的因素。

在手性化合物的分离测定时，通常选用固定相极性较大的手性色谱柱，而流动相通常会选用极性相对较小的正己烷-异丙醇体系。正相色谱系统对液

相系统和液相条件均有较高的要求,如流动相中不能含水、流动相选择范围较小,而反相色谱系统对液相系统要求较低,可以采用极性较强的溶剂对测定药物进行优化。经过色谱条件的考察,本方法采用以硅胶键合蛋白质型手性色谱柱 ULTRON ES-OVM 作为固定相,磷酸二氢钾缓冲液-乙腈系统为流动相,实现了安立生坦与 *R* 异构体的分离,达到了分离测定的目的。

本实验考察并建立了一套反相色谱方法测定安立生坦供试品中 *R* 异构体的方法,该方法快速、简便,专属性和重复性良好、灵敏度高、测定结果准确。建立的方法可有效控制安立生坦的光学纯度和质量,从而保证临床用药的安全性与有效性。

参考文献

- [1] 朱 锋,熊长明. 肺动脉高压研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2011, 32(2): 167-170.
- [2] 刘文芳,傅得兴,胡 欣. 治疗肺动脉高压新药安立生坦的药理与临床研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23): 2070-2077.
- [3] 陶 林,刘 河,仲伯华. 手性转换在手性药物研究中的应用 [J]. 化学试剂, 2008, 30(12): 903-907.
- [4] 张寅瑛,洪战英,范国荣. 手性药物的药动学立体选择性研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(18): 1377-1381.
- [5] 靳文仙,刘 欢,黄长江,等. HPLC 法测定知非沙班中 *R* 异构体 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(9): 988-990.

• 新药快讯 •

FDA 批准银屑病治疗新药 Cosentyx

董江萍

国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038

美国 FDA 于 2015 年 1 月 21 日批准单抗类药物 Cosentyx 用于治疗成人中重度斑块状银屑病。

银屑病是一种会使患者皮肤出现斑块状发红和瘙痒疾病。该疾病属于自身免疫性疾病,通常在 15~35 岁时开始发病,患者一般有该疾病家族史。斑块状银屑病是银屑病中最常见的类型,患者皮肤上会出现密集的红斑,覆有薄而易剥落的银白色鳞屑。

Cosentyx 的活性成分是一种名为 secukinumab 的单克隆抗体,该抗体通过与炎症相关蛋白 (IL-17A) 结合,从而阻止该蛋白与其受体结合,进而阻止其诱发能够引起斑块状银屑病的炎性反应。

Cosentyx 的给药途径为皮下注射,适用于可以接受全身性治疗 (口服或注射后经血液循环系统流经全身的治疗)、光疗 (紫外线治疗) 或全身性治疗结合光线疗法的患者。

FDA 药品审评与研究中心药品审评三室副主任、医学博士、公共卫生学硕士 Amy Egan 表示:“斑块状银屑病给患者带来明显的皮肤瘙痒和不适,对患者而言,拥有多种治疗选择是十分必要的。”

纳入 2 403 名斑块状银屑病患者的 4 项临床试验结果证明了 Cosentyx 的安全性和有效性。2 403 名拟接受光线疗法或全身性治疗的受试者被随机分为两组,分别接受 Cosentyx 和安慰剂治疗。通过对皮肤银屑病病变范围、性质和严重程度指标的评估,结果显示 Cosentyx 组患者皮肤的银屑病病部位得以治愈或基本治愈, Cosentyx 的临床效果优于安慰剂的临床效果。

Cosentyx 的获批的同时, FDA 核定一项患者用药指南,由于 Cosentyx 作用于免疫系统,因此患者使用该药物可能会使感染风险增加,并且目前已有使用本品后出现严重过敏反应的报告。FDA 提示,慢性感染性疾病或有反复感染史的患者,以及克罗恩病患者应慎用本品。本品最常见的不良反应包括腹泻和上呼吸道感染。

Cosentyx 由位于新泽西州东汉诺威的诺华制药公司销售。