正相高效液相色谱法同时测定瑞舒伐他汀叔丁酯中的对映异构体和非对映异构体

曲喜龙[1,2]，李铁健[1,2]，刘治军[1,2]，魏瑞霞[1,2]，张贵民[1,2]*

（1. 鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 276006；2. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400）

摘要：建立了正相高效液相色谱法同时测定瑞舒伐他汀叔丁酯（**1**）中的对映异构体（**2**）和非对映异构体Ⅰ、Ⅱ（**3**、**4**）。采用 Daicel CHIRALPAK® AD-H 手性色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以正己烷∶正丙醇（90 ∶ 10）为流动相，等度洗脱，紫外检测波长为 242 nm，流速为 1.0 ml/min，柱温为 25 ℃。结果显示，建立的方法专属性良好，**1** ～ **4** 分别在相应浓度范围内线性关系良好；**2**、**3**、**4** 的平均回收率（*n*=9）分别为 97.2%、96.5%、97.6%，RSD 分别为 4.1%、3.6%、3.1%。建立的方法操作简便、灵敏度高，可用于 **1** 中对映异构体和非对映异构体含量的检测。

关键词：瑞舒伐他汀叔丁酯；正相高效液相色谱法；对映异构体；非对映异构体

中图分类号：O657.72；R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)05-0698-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.015

Simultaneous Determination of the Enantiomer and Diastereomers in *tert*-Butyl Rosuvastatin by Normal Phase High Performance Liquid Chromatography

QU Xilong[1,2], LI Tiejian[1,2], LIU Zhijun[1,2], WEI Ruixia[1,2], ZHANG Guimin[1,2]*

(*1. National Chiral Pharmaceutical Engineering and Technology Research Center, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006; 2. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400*)

ABSTRACT: A normal phase high performance liquid chromatography was established for the simultaneous determination of the enantiomer (**2**) and the diastereomers Ⅰ and Ⅱ (**3** and **4**) in *tert*-butyl rosuvastatin (**1**). A Daicel CHIRALPAK® AD-H chiral column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted with *n*-hexane∶*n*-propanol (90∶10) as the mobile phase (isocratic elution). The UV detection wavelength was 242 nm, the flow rate was 1.0 ml/min, and the column temperature was 25 ℃. The results showed that the established method had good specificity, and it was linear for **1** – **4** in the corresponding concentration ranges. The average recoveries (*n*=9) of **2**, **3**, and **4** were 97.2%, 96.5% and 97.6% with the RSDs of 4.1%, 3.6% and 3.1%, respectively. The established method is simple and sensitive, which can be used for the detection of the enantiomer and diastereomers in **1**.

Key Words: *tert*-butyl rosuvastatin; normal phase high performance liquid chromatography; enantiomer; diastereomer

瑞舒伐他汀钙，化学名为双［(3*R*,5*S*,6*E*)-7-［4-(4-氟苯基)-6-异丙基-2-［甲基（甲磺酰基）氨基］-嘧啶-5-基］-3,5-二羟基庚-6-烯酸］钙盐，是一种选择性、竞争性的 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶抑制剂，可通过抑制内源性胆固醇的合成，发挥降血脂和抗动脉粥样硬化的作用[1—3]。瑞舒伐他汀钙的合成工艺如图 1 所示，瑞舒伐他汀叔丁酯（*tert*-butyl rosuvastatin，**1**）是其关键中间体。化合物 **1** 结构中有 2 个手性中心，存在 4 种光学异构体，除 **1** 外，还有瑞舒伐他汀叔丁酯

收稿日期：2021-05-07

作者简介：曲喜龙(1980—)，男，工程师，从事药物分析方法开发。

通信作者：张贵民(1969—)，男，研究员，从事新药研究与开发。

E-mail：Lunanzhangguimin@163.com

对映异构体（**2**）、非对映异构体Ⅰ（**3**）和非对映异构体Ⅱ（**4**），**1** ～ **4** 的化学结构式如图 2 所示。为保证后续药物质量，需要开发相关分析方法对其对映异构体和非对映异构体进行控制。

HPLC 法已被用于瑞舒伐他汀钙原料药中异构体和非对映异构体的分析[4—6]，但关于其合成中间产物异构体的分析尚未见报道。目前，手性固定相 HPLC 法已被广泛应用于异构体的检测[7—9]。本研究采用正相高效液相色谱法，使用手性色谱柱对 **1** 中的对映异构体和非对映异构体进行分离分析，以期为最终产品质量研究提供参考。

1 仪器与试药

1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；MS205DU 型精密电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1（含量 99.96 %、99.95 %、99.96 %，批号 181001、181002、181003）和 **1** 对照品（含量 99.9%，批号 181101）均为本公司自制；**2** 对照品（山东博洛德生物科技有限公司，含量 98.9%，批号 RSF20171019）；**3** 对照品（美国 Hi-Chemical 公司，含量 99.3%，批号 XH17-1122）；**4** 对照品（深圳菲斯生物科技有限公司，含量 95.8%，批号 17090621）；正己烷、无水乙醇、异丙醇和正丙醇均为色谱纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Daicel CHIRALPAK® AD-H 手性色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 正己烷：正丙醇

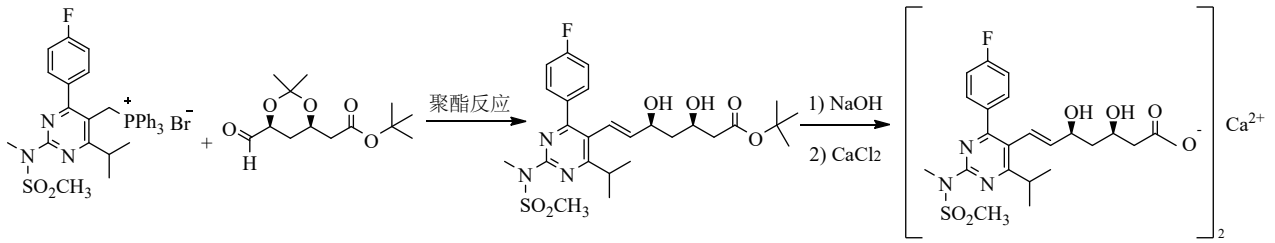


图 1 瑞舒伐他汀钙的合成路线

Fig.1 Synthesis Route of Rosuvastatin Calcium

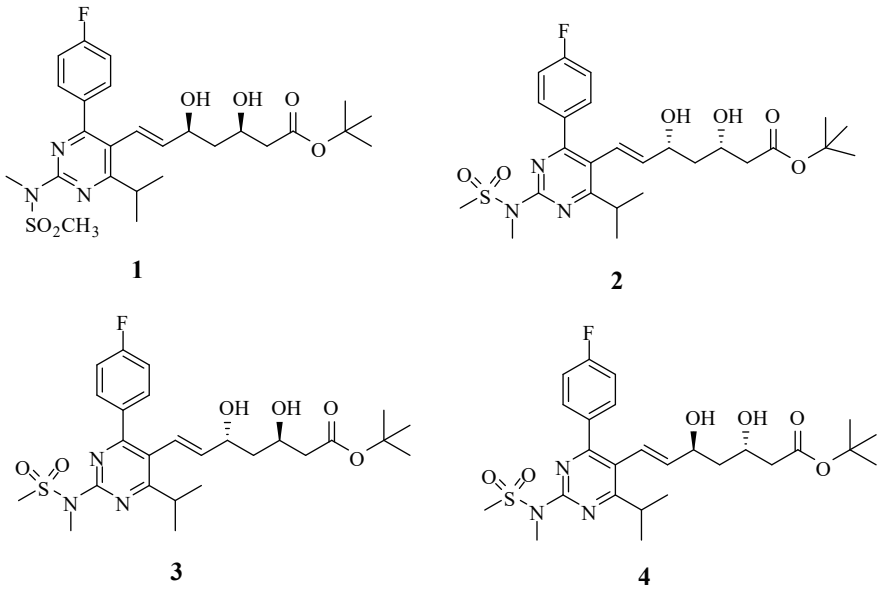


图 2 1 及其立体异构体的化学结构式

Fig.2 Chemical Structures of **1** and Its Stereoisomers

(90 ∶ 10)，等度洗脱；紫外检测波长 242 nm；流速 1.0 ml/min；柱温 25 ℃；进样量 20 μl。

2.2 溶液配制

空白溶剂：正己烷∶无水乙醇 (70 ∶ 30)。

1、**2**、**3**、**4** 对照品贮备液：取 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品适量，分别加入空白溶剂溶解，配制成质量浓度约为 0.2 mg/ml 的 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品贮备液。

混合对照品贮备液：精密量取 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品贮备液各 5 ml，置同一 50 ml 量瓶中，用空白溶剂定容，摇匀，即得混合对照品贮备液。

1、**2**、**3**、**4** 对照品溶液：精密量取 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品贮备液各 0.5 ml，分别置 100 ml 量瓶中，分别加入空白溶剂稀释成质量浓度约为 1.0 μg/ml 的 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品溶液。

系统适用性溶液：精密称取 **1** 对照品 100 mg，分别加入 **2**、**3**、**4** 对照品贮备液各 0.5 ml，再加入空白溶剂溶解并定容至 100 ml，摇匀，即得系统适用性溶液。

供试品溶液：取适量 **1**，加入空白溶剂溶解并制成质量浓度约为 1.0 mg/ml 的供试品溶液。

2.3 专属性试验

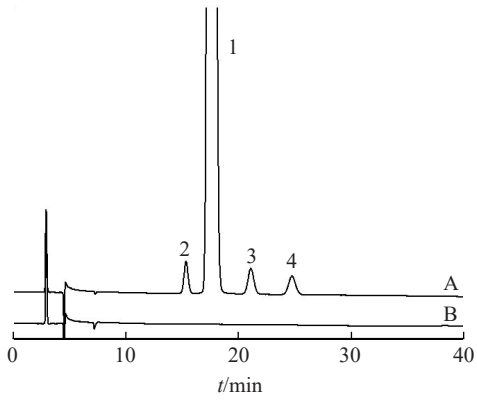
取“**2.2**”项下空白溶剂和系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果见图 3，**1**、**2**、**3**、**4** 间均可实现基线分离，分离度均大于 2.0，空白溶剂不干扰测定，专属性良好。

2.4 检测限与定量限

取“**2.2**”项下 **1**、**2**、**3**、**4** 对照品溶液，分别加入空白溶剂逐步定量稀释后，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，按信噪比 (*S*/*N*) 为 10 计算得 **1**、**2**、**3** 及 **4** 的定量限分别为 0.134 2、0.107 2、0.170 2、0.213 6 μg/ml，分别相当于供试品浓度的 0.013 5%、0.010 7%、0.017 0%、0.021 4%；按 *S*/*N* 为 3 计算得 **1**、**2**、**3** 及 **4** 的检测限为 0.040 8、0.034 8、0.043 4、0.057 0 μg/ml，分别相当于供试品浓度的 0.004 1%、0.003 5%、0.004 3%、0.005 7%。

2.5 线性试验

精密量取“**2.2**”项下的混合对照品贮备液，加入空白溶剂定量稀释，制成各异构体定量限 (LOQ)、0.4、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0 μg/ml 的线性试验溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。以峰面积 (*A*) 为纵坐标、质量浓度 (*c*) 为横坐标进行线性回归，结果见表 1。



A：系统适用性溶液，B：空白溶剂

1－**1**；2－**2**；3－**3**；4－**4**

图 3　典型色谱图

Fig.3　Typical Chromatograms

表 1　1 和各异构体的线性回归方程、线性范围及相关系数

Tab.1　Linear Regression Equations, Linear Ranges, Correlation Coefficients of **1** and Its Stereoisomers

化合物	回归方程	线性范围/μg·ml^{-1}	*r*
1	*A*=25 163*c*－70.356	0.134 2～3.004	0.999 8
2	*A*=26 308*c*+22.936	0.103 2～3.096	0.999 8
3	*A*=24 361*c*－68.496	0.170 2～3.005	0.999 9
4	*A*=23 624*c*－95.640	0.213 6～3.011	0.999 8

2.6 重复性和中间精密度试验

取“**2.2**”项下的系统适用性溶液 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析并记录色谱图，分别计算 **2**、**3**、**4** 的含量。结果显示，其含量结果的 RSD (*n*=6) 为 1.8%～2.6%，表明方法的重复性良好。

为考察随机变动因素对精密度的影响，于不同日期、由另一名分析员独立建立系统，重新制备 6 份系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析并记录色谱图。结果显示，12 份样品（另 6 份为上述重复性测试样品）中 **2**、**3**、**4** 含量的 RSD (*n*=12) 为 2.1%～3.2%，说明本法中间精密度良好。

2.7 准确度试验

精密称取 **1**（批号 181001）500 mg，置 50 ml 量瓶中，加入空白溶剂溶解并定容，摇匀，精密量取 1 ml，共 9 份，各置 10 ml 量瓶中，分别加入 **2**、**3**、**4** 对照品贮备液 0.4 ml（80%）、0.5 ml（100%）、0.6 ml（120%）（每个浓度各 3 份），用空白溶剂定容，摇匀，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，按外标法计算。结果显示，**2**、**3** 和 **4** 的平均回收率（n=9）分别为 97.2%、96.5%和 97.6%，RSD 分别为 4.1%、3.6%和 3.1%，表明本法准确度良好。

2.8 稳定性试验

取“**2.2**”项下的系统适用性溶液，于常温放置，分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果表明，系统适用性溶液在 24 h 内，**1**、**2**、**3**、**4** 峰面积 RSD（n=9）均小于 2.0%，且无新杂质出现，表明系统适用性溶液于室温条件下放置 24 h 内稳定。

2.9 耐用性试验

分别考察了改变流速（±10%）、柱温（±5 ℃）、流动相配比（±1%）及采用不同批次色谱柱的条件下，系统适用性溶液中 **1**、**2**、**3**、**4** 之间的分离度和 **2**、**3**、**4** 含量的变化情况。结果显示，各条件下 **2**、**3**、**4** 含量的 RSD（n=8）分别为 3.8%、4.1%、3.9%。当色谱参数发生小范围变动时，虽然保留时间有一定的变化，但 **1**、**2**、**3**、**4** 之间的分离度均大于 2.0，说明该方法的耐用性良好。

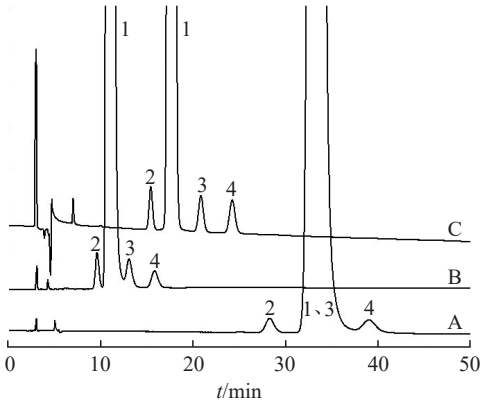
2.10 样品测定

取 3 批 **1**，按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，**2**、**4** 均未检出，批号为 181001、181002、181003 的 **1** 中 **3** 的含量分别为 0.05%、0.03%、0.06%。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

分别考察了 Daicel CHIRALPAK® IC 手性色谱柱、Daicel CHIRALPAK® OD-H 手性色谱柱和 Daicel CHIRALPAK® AD-H 手性色谱柱对目标物分离的影响。结果表明，前 2 种手性色谱柱均不能使 **1**、**2**、**3**、**4** 色谱峰达到基线分离，而采用最后 1 种手性色谱柱时，**1**、**2**、**3**、**4** 色谱峰能够良好分离（分离度均大于 2.0，图 4），因此选择 Daicel CHIRALPAK®AD-H 手性色谱柱进行试验。



A：Daicel CHIRALPAK® IC 手性色谱柱，
B：Daicel CHIRALPAK® OD-H 手性色谱柱，
C：Daicel CHIRALPAK® AD-H 手性色谱柱
1－**1**；2－**2**；3－**3**；4－**4**

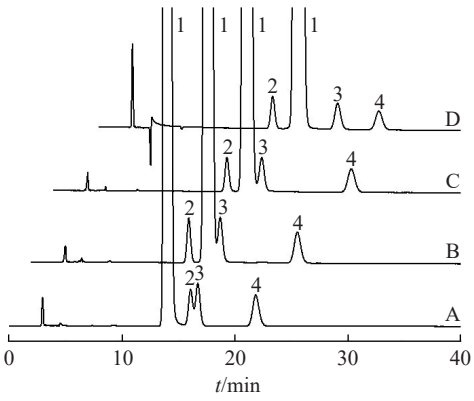
图 4 不同色谱柱条件下所得的色谱图

Fig.4 Chromatograms Obtained with Different Columns

3.2 流动相的选择

分别选用正己烷：无水乙醇（90 ： 10）、正己烷：异丙醇：无水乙醇（90 ： 9 ： 1）、正己烷：异丙醇（90 ： 10）、正己烷：正丙醇（90 ： 10）为流动相，考察其对 **1**、**2**、**3**、**4** 的分离效果。试验表明，以正己烷：无水乙醇（90 ： 10）为流动相时，**2**、**3** 分离效果较差；以正己烷：异丙醇：无水乙醇（90 ： 9 ： 1）和正己烷：异丙醇（90 ： 10）为流动相时，**1**、**3** 分离效果较差；以正己烷：正丙醇（90 ： 10）为流动相时，**1**、**2**、**3**、**4** 之间的分离较好，且分离度均大于 2.0，结果见图 5。

本试验采用正相高效液相色谱法，利用手性固定相对 **1** 中的 **2**、**3**、**4** 进行了分离测定，经系统的方法学验证表明，建立的色谱分析方法可有效检出 **1** 中的 **2**、**3**、**4**，检测结果准确可靠、操作简便，可用于瑞舒伐他汀钙合成中间体 **1** 的异构体质量控制。



A：正己烷∶无水乙醇（90 ∶ 10），B：正己烷∶异丙醇∶无水乙醇（90 ∶ 9 ∶ 1），C：正己烷∶异丙醇（90 ∶ 10），D：正己烷∶正丙醇（90 ∶ 10）

1－**1**；2－**2**；3－**3**；4－**4**

图 5　不同流动相条件下所得的色谱图

Fig.5　Chromatograms Obtained with Different Mobile Phases

参考文献：

[1]　冯　中, 寻明金, 张贵民, 等. 瑞舒伐他汀钙片的研制及其体内外评价[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(7): 780-785.

[2]　佟　雪, 孙宏张, 吕慧侠. 瑞舒伐他汀钙和瑞舒伐他汀内酯稳定性研究[J]. 中国新药杂志, 2018, **27**(9): 1058-1064.

[3]　KALLOL J, BEDUIN M. Development and validation of a new improved RP-HPLC method for estimation of rosuvastatin calcium in pharmaceutical dosage form [J]. *Res J Pharm Technol*, 2020, **13**(6): 2886-2892.

[4]　GANGIREDDY R R, PAPAMMAGARI R R, POLISETTY S J. Development of a stability-indicating stereoselective method for quantification of the enantiomer in the drug substance and pharmaceutical dosage form of rosuvastatin calcium by an enhanced approach [J]. *Sci Pharm*, 2015, **83**: 279-296.

[5]　李桂芹, 米长江, 赵丽云, 等. 瑞舒伐他汀钙非对映异构体的检测[J]. 药物分析杂志, 2006, **26**(11): 1551-1554.

[6]　汪　涛, 丁立秀, 马　哲, 等. 瑞舒伐他汀钙原料药中有关物质的测定[J]. 现代药物与临床, 2014, **29**(6): 603-606.

[7]　滕怀凤, 温晓丽. Chiralcel OJ-H柱分离五种咪唑类药物异构体[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, **37**(6): 501-505.

[8]　HÄGELE J S, SEIBERT E, SCHMID M G. A simple HPLC-UV approach for rapid enantioseparation of cathinones, pyrovalerones and other novel psychoactive substances on a 2.5-μm cellulose *tris*-(3,5-dimethylphenylcarbamate) column [J]. *Chromatographia*, 2020, **83**(3): 321-329.

[9]　KIAN K, MARLENE K, MARTIN G S. Successful use of a novel Lux® i-Amylose-1 chiral column forenantioseparation of “legal highs” by HPLC [J]. *Chirality*, 2020, **32**(1): 42-52.