

# 非索非那定对映体柱前手性衍生化反相高效液相色谱分析方法的建立

姚青青, 屈伯宣, 周 权, 曾 苏

浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室 浙江省抗肿瘤药物临床前研究重点实验室, 浙江 杭州 310058

**[摘 要]** **目的:**建立适用于体外细胞模型的 OATP1B1 手性底物非索非那定柱前手性衍生化分析方法,为测定细胞中非索非那定对映体提供分析手段。**方法:**选择 R-(+)-苯乙基异氰酸酯作为手性衍生化试剂,与非索非那定生成氨基甲酸酯衍生物,应用液相色谱-串联质谱法确定对映体衍生物色谱峰,通过反相高效液相色谱法实现对映体的分离分析。**结果:**在建立的手性分离条件下,成功实现非索非那定对映体分离分析,非索非那定两个对映体衍生物在 25 ~ 100 ng/ml 浓度范围内线性关系良好 ( $R^2 = 0.9992, 0.9989$ ),日内、日间精密度均小于 10%。**结论:**本实验建立的非索非那定对映体柱前手性衍生化反相高效液相色谱分析方法灵敏、准确,可用于体外细胞模型中盐酸非索非那定立体选择性分析。

**[关键词]** 特非那定/化学;异氰酸盐类;立体异构现象;色谱法, 高压液相/方法;指示剂和试剂

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A

## Establishment of reverse-phase high-performance liquid chromatography with chiral reagent derivatization for separation of fexofenadine enantiomers

YAO Qing-qing, QU Bo-xuan, ZHOU Quan, ZENG Su (*Laboratory of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Anti-Cancer Drug Research, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

Corresponding author: ZHOU Quan, E-mail: zhouquan142602 @zju.edu.cn

**[Abstract]** **Objective:** To establish a precolumn chiral derivatization method for determination of fexofenadine enantiomers, a chiral substrate of OATP1B1, in cellular model. **Methods:** R-(+)-phenylethylisocyanate was selected as chiral derivatization reagent, which was reacted with fexofenadine to form carbamate derivatives.

收稿日期:2013-10-11 接受日期:2013-12-04

基金项目:国家药典委员会科研基金(20120820);国家重点基础研究发展计划(2011CB710800)。

作者简介:姚青青(1989-),女,硕士研究生,主要从事药物代谢研究;E-mail: sunshine.yqq@gmail.com

通讯作者:周 权(1977-),男,博士,主任药师,硕士生导师,主要从事药物转运与代谢研究;E-mail: zhouquan142602 @zju.edu.cn

Enantiomers were identified by LC/MS and separated by RP-HPLC. **Results:** Under the experimental conditions, the fexofenadine enantiomers were separated completely. The standard curve was linear over the concentration range of 25-100 ng/ml ( $R^2 = 0.9992$ , 0.9989). Accuracy was 101.1% and 98.3%, intra-precision was 2.4% and 3.1%, inter-precision was 3.1% and 4.0% for D1 and D2, respectively. **Conclusion:** The method established is sensitive and accurate for determination of fexofenadine enantiomers in cells.

[ **Key words** ] Terfenadine/chemistry; Isocyanates; Stereoisomerism; Chromatography, high pressure liquid/methods; Indicators and reagents

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2014, 43(2):155-159. ]

有机阴离子转运多肽 OATP1B1 (又称 OATP-C) 是一种特异性分布于肝细胞基底膜上的转运蛋白, 与体内诸多内源性或外源性物质的肝脏摄取作用关系密切。Chang 等<sup>[1]</sup>对 OATP1B1 底物进行了药效团模型构建研究, 发现 OATP1B1 的底物应具有 2 个氢键受体、1 个氢键供体和 2 个疏水区域。根据该研究结果以及其他文献报道, OATP1B1 的手性药物底物有抗组胺药物非索非那定 (fexofenadine)、降脂药氟伐他汀、降糖药那格列奈、瑞格列奈和罗格列酮等<sup>[2-4]</sup>。本文选择非索非那定作为立体选择性细胞转运研究的模型药物, 该药物结构中有一个手性碳原子 (图 1), 存在一对光学异构体, 临床上使用的是其盐酸盐的外消旋体。

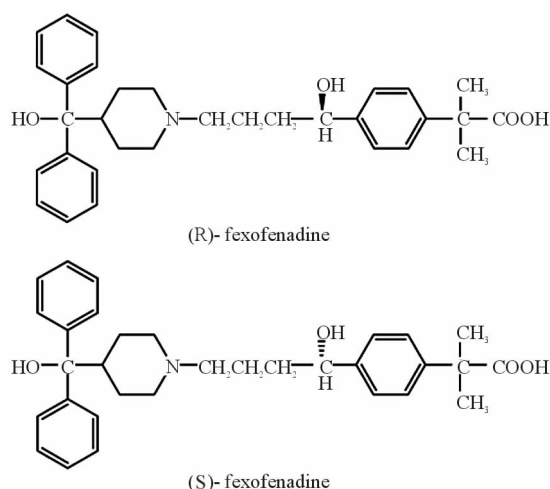


图 1 非索非那定化学结构式

Fig. 1 The structure of fexofenadine enantiomers

本文采用 R-(+)-苯乙基异氰酸酯 [R-(+)-

phenethyl isocyanate, R-(+)-PEIC, 图 2] 作为手性衍生化试剂, 与非索非那定手性碳原子上的羟基反应生成两个非对映异构的氨基甲酸酯衍生物, 建立一种新的分离非索非那定对映体反相高效液相色谱 (reversed-phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC) 分析方法, 以期研究体外细胞模型中盐酸非索非那定的立体选择性转运提供分析手段。

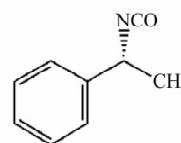


图 2 R-(+)-PEIC 化学结构式

Fig. 2 The structure of R-(+)-PEIC

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器

二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司)、JYP2-IID 型超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司)、LA613 型纯水器 (英国 ELGA 公司)、THZ-82 气浴恒温振荡器 (江苏金坛市金城国胜实验仪器厂)、离心浓缩仪 (美国 LABCONCO 公司)、303-3 型电热培养箱 (上海锦屏仪器仪表公司通州分公司)、Waters UPLC-TQD 三重四级杆质谱系统 (美国 Waters 公司)、Masslynx<sup>TM</sup> V 1 管理软件 (英国 Micromass 公司)。

### 1.2 实验材料

盐酸非索非那定 (中国食品药品检定研究院)、抗孕唑 (浙江仙居制药股份有限公司); 手性

衍生化试剂 R-(+)-PEIC 购自日本 TCI 生物试剂公司;色谱纯乙腈、色谱纯甲醇购于美国 Merck 公司和 Tedia 公司;超纯水;三乙胺、醋酸铵为分析纯。

### 1.3 溶液的配制

盐酸非索非那定消旋体、内标抗孕唑分别用乙腈配制成 1 mg/ml 的储备液,贮存于 -20 ℃ 冰箱,每次使用前再以乙腈稀释成各种浓度的工作液。手性衍生化试剂 R-(+)-PEIC 避光贮存于 -20 ℃ 冰箱,临用前以乙腈稀释为 0.2‰ 浓度的工作液;三乙胺用乙腈稀释为 0.1‰ 的工作液。

### 1.4 样品手性衍生化分析

**1.4.1 样品衍生化** 细胞基质样品加两倍体积的 25 ng/ml 内标抗孕唑乙腈溶液沉淀蛋白,涡旋 1 min,静置 3 min 后,12 000 r/min(离心半径为 52.5 mm)离心 2 min,定量移取一定体积的上清液离心浓缩至溶液挥干,残渣加 50 μl 三乙胺的乙腈溶液复溶,充分混匀后加 100 μl R-(+)-PEIC 的乙腈溶液,充分混匀,80 ℃ 水浴反应 30 min 后 30 ℃ 水浴避光放置 2 h,挥干,残渣用流动相复溶,13 000 r/min(离心半径为 52.5 mm)离心 10 min,取上清液备用。

**1.4.2 LC-MS/MS 条件** Waters UPLC-TQD 三重四级杆质谱系统;ZOBAX Eclipse XBD-C<sub>8</sub> 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm);流动相为甲醇-醋酸铵(20 mmol/L, pH 7.0)=52:48;流速 0.25 ml/min;进样 5 μl;柱温 35 ℃;样品管理器温度为 4 ℃;电离方式为电喷雾(ESI<sup>+</sup>);离子源温度 120 ℃;脱溶剂温度 350 ℃;脱溶剂气流量 600 L/h;毛细管电压 3.2 kV、锥孔电压 40 V、碰撞能量 51 eV;监测离子对 649.4/171.0(非索非那定手性衍生物)和 280.16/236.9(内标抗孕唑)。

**1.4.3 RP-HPLC 条件** Venusil MP C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流速 0.8 ml/min;紫外检测波长 220 nm;流动相 A 为甲醇、B 为醋酸铵(20 mmol/L, pH 5.5),梯度洗脱方式见表 1。

### 1.5 方法学验证

**1.5.1 线性范围确定** 取一定体积的盐酸非索非那定对照品溶液和内标抗孕唑溶液,置减压干燥器中挥干,残渣加入 100 μl 空白细胞基质溶解,配成不同浓度(50、75、100、150、200 ng/ml,相当于每个对映体 25、37.5、50、75、100 ng/ml)的标准液,按照“1.4.1”项操作后,进行 RP-HPLC 测

表 1 RP-HPLC 梯度洗脱方式

Table 1 The gradient elution fraction of mobile phase

| (%)     |       |       |
|---------|-------|-------|
| 时间(min) | 流动相 A | 流动相 B |
| 0 ~ 15  | 60    | 40    |
| 15 ~ 20 | 70    | 30    |
| 20 ~ 40 | 70    | 30    |
| 40 ~ 41 | 60    | 40    |
| 41 ~ 45 | 60    | 40    |

定。以药物浓度为横坐标,非索非那定衍生物与内标峰面积比值为纵坐标进行线性回归。

**1.5.2 准确度及精密度** 精密配制低、中、高 3 种浓度(25、50、100 ng/ml)样品各平行 5 份,按照“1.4.1”项操作后测定细胞裂解液中非索非那定对映体衍生物的浓度,代入标准曲线获得的浓度,与加入的对照品浓度比较,计算分析方法的准确度(方法回收率)及其相对标准偏差(日内精密度);同样的实验连续进行 3 d,计算相对标准偏差(日间精密度)。

## 2 结果

### 2.1 手性衍生化产物鉴定

经 RP-HPLC 分析,将非索非那定与 R-(+)-PEIC 衍生化之后的产物色谱图与非索非那定、R-(+)-PEIC 分别单独衍生化后的产物色谱图进行对比分析(图 3),发现 4、5 两个产物峰有可能是两个非对映异构体的峰。

衍生化反应产物通过 RP-HPLC 分离后,分别收集两个可能的衍生产物峰(见图 3 中 4、5),再采用 LC-MS/MS 直接进样检测,初步结果显示有质荷比为 649 的准分子离子峰(图 4)与衍生化产物分子量一致,进一步断定盐酸非索非那定与 R-(+)-PEIC 在本实验的反应条件下成功反应生成两个非对映异构体的氨基甲酸酯类衍生物。

### 2.2 线性及范围

非索非那定两个对映体衍生物 D1 和 D2 在浓度范围 25 ~ 100 ng/ml 的线性回归方程分别为  $Y_1 = 0.025X - 0.1957$  ( $R^2 = 0.9992$ ),  $Y_2 = 0.0257X - 0.1823$  ( $R^2 = 0.9989$ )。

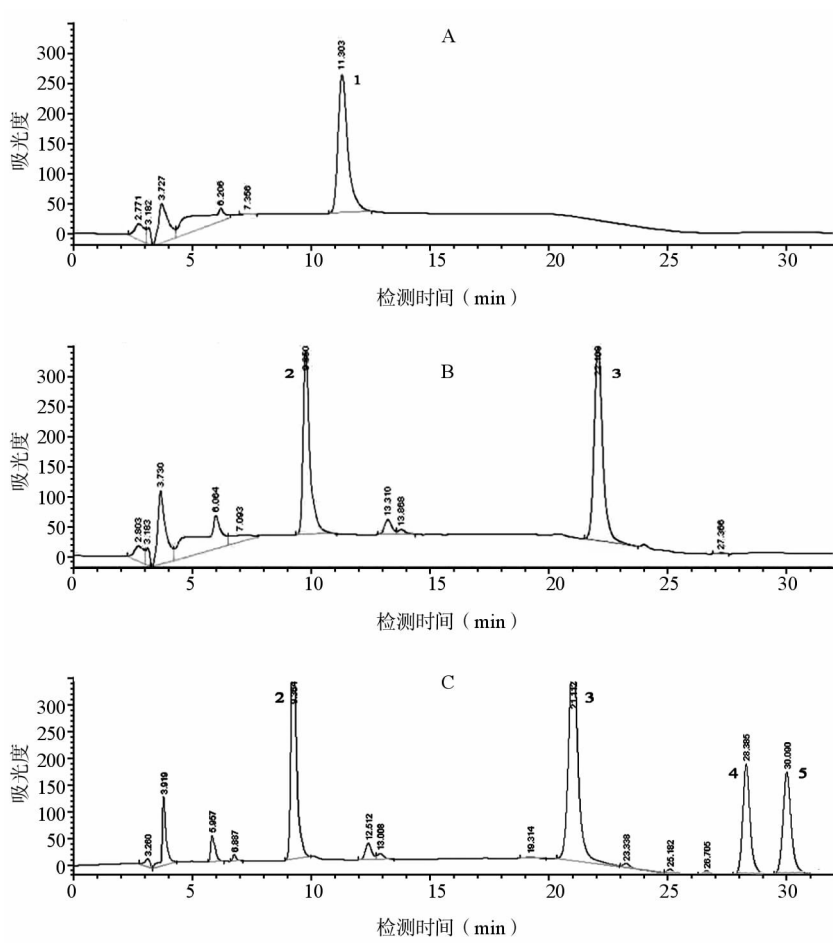
### 2.3 准确度和精密度

RP-HPLC 分离非索非那定对映体衍生物的平均方法回收率分别为 100.7% 和 98.5%,平均日内精密度分别为 2.31% 和 3.08%,平均日间精

密度分别为 3.11% 和 4.05%，见表 2。表明本法准确度和精密密度均较好。

### 3 讨论

关于非索非那定的立体选择性代谢和转运的研究目前相对比较少。曾有报道盐酸非索非那定经口服给药后,人血浆 R-型对映体的浓度高于 S-型对映体<sup>[5]</sup>。Tateishi 等<sup>[6]</sup>研究发现这种药物代谢动力学的立体选择性差异可能与 P-糖蛋白的转运有关。在非索非那定的立体选择性研究中,对于非索非那定消旋体手性分离方法的报道目前在国内外还比较少。Rustichelli 等<sup>[7]</sup>曾尝试采用 Chiralcel OD 柱分离非索非那定,但是由于非索非那定的羧基与分离柱手性选择性的填料具有很强的相互作用,导致在合适的保留时间内无法实现对映体的有效分离。之后,他们又尝试采用 diazomethane 手性衍生化的方法实现非索非那定的间接分离,在 20 min 左右的



A: 外消旋非索非那定对照品; B: R-PEIC 衍生化试剂; C: 外消旋非索非那定与 R-PEIC 的反应产物。1: 非索非那定; 2, 3: R-PEIC 降解产物; 4, 5: 非索非那定对映体 D1 和 D2 的衍生物。

图 3 非索非那定与苯乙基异氰酸酯衍生化产物色谱图

Fig. 3 Chromatograms of racemic fexofenadine derivatised with R-PEIC

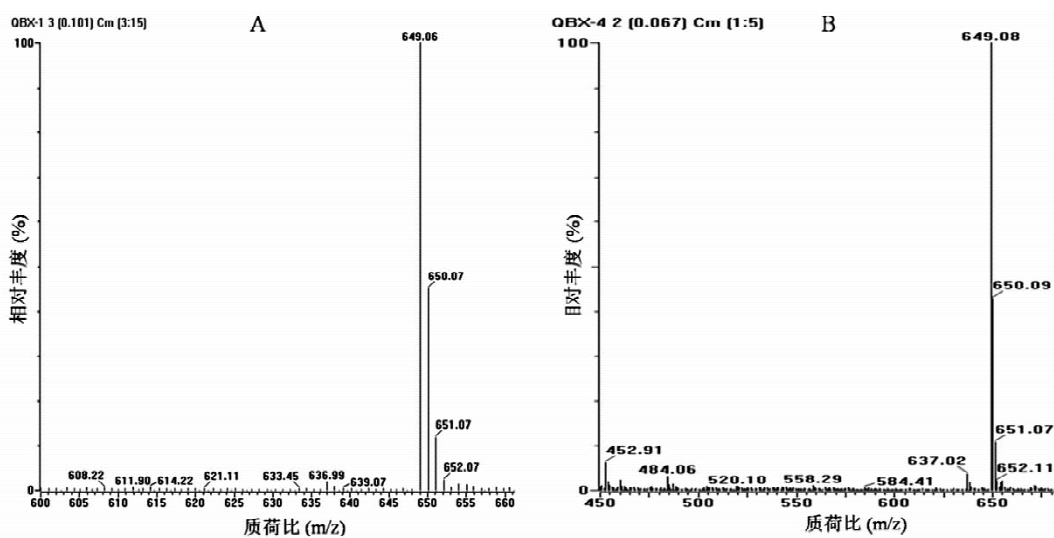


图 4 非索非那定对映体 D1 (A) 和 D2 (B) 衍生物质谱图

Fig. 4 Mass spectra of derivatives of fexofenadine enantiomers D1 (A) and D2 (B).

保留时间内,两个对映体的分离度达到 1.45。生物性样品的分析,只有 Miura 等<sup>[8]</sup>用 Chiral CD-Ph 反相手性柱实现了人血浆中非索非那定消旋体的手性分离分析。本实验针对盐酸非索非那定具有活泼羟基的特点,选用廉价、光学纯度高的 R-(+)-PEIC 作为手性衍生化试剂,应用 LC-MS/MS 确定对映体衍生物色谱峰,通过 RP-HPLC 实现分离分析,衍生化反应原理见图 5。反应温度选择实验表明,低温时反应时间延长,而且终产物见光会发生部分水解,通过摸索最终确定,80 ℃ 水浴反应 30 min 后 30 ℃ 水浴避光放置 2 h。

本实验所建立的柱前手性衍生化 RP-HPLC 分析方法能灵敏、准确地测定细胞裂解液中非索

非那定对映体含量,可用于分析体外细胞模型中盐酸非索非那定的立体选择性转运。

表 2 非索非那定对映体衍生物准确度和精密度测定结果  
Table 2 Accuracy and precision of determination of derivatized fexofenadine enantiomers

| 对映体衍生物<br>(ng/ml) | (%)          |       |                |      |                |      |
|-------------------|--------------|-------|----------------|------|----------------|------|
|                   | 回收率<br>(n=5) |       | 日内精密度<br>(n=5) |      | 日间精密度<br>(n=3) |      |
|                   | D1           | D2    | D1             | D2   | D1             | D2   |
| 25                | 99.5         | 95.0  | 3.55           | 4.72 | 5.07           | 6.44 |
| 50                | 99.2         | 100.3 | 2.49           | 3.34 | 2.42           | 3.74 |
| 100               | 101.7        | 99.7  | 0.88           | 1.18 | 1.83           | 1.97 |

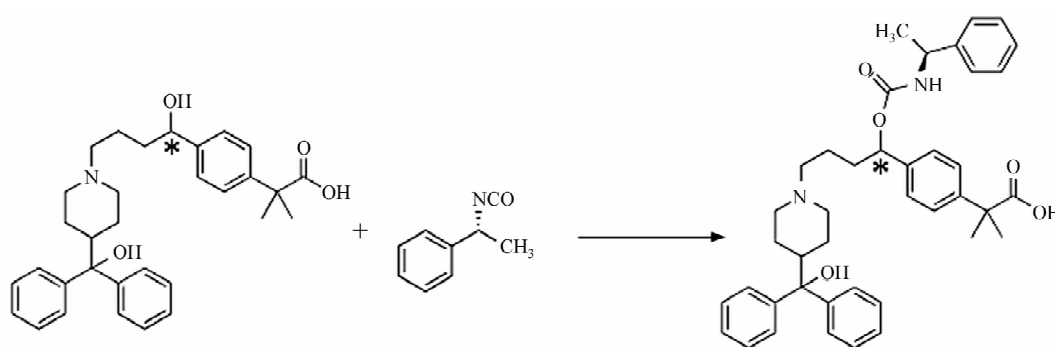


图 5 非索非那定与 R-(+)-PEIC 柱前衍生化机制

Fig. 5 Precolumn derivatization of fexofenadine with R-(+)-PEIC

#### 参考文献:

- [1] CHANG C, PANG K S, SWAAN P W, et al. Comparative pharmacophore modeling of organic anion transporting polypeptides: a meta-analysis of rat Oatp1a1 and human OATP1B1 [J]. **J Pharmacol Exp Ther**, 2005, 314(2): 533-541.
- [2] CVETKOVIC M, LEAKE B, FROMM M F, et al. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine [J]. **Drug Metab Dispos**, 1999, 27(8): 866-871.
- [3] DRESSER G K, BAILEY D G, LEAKE B F, et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine [J]. **Clin Pharmacol Ther**, 2002, 71(1): 11-20.
- [4] SHIMIZU M, FUSE K, OKUDAIRA K, et al. Contribution of OATP (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans [J]. **Drug Metab Dispos**, 2005, 33(10): 1477-1481.
- [5] SAKUGAWA T, MIURA M, HOKAMA N, et al. Enantioselective disposition of fexofenadine with the P-glycoprotein inhibitor verapamil [J]. **Br J Clin Pharmacol**, 2009, 67(5): 535-540.
- [6] TATEISHI T, MIURA M, SUZUKI T, et al. The different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers [J]. **Br J Clin Pharmacol**, 2008, 65(5): 693-700.
- [7] RUSTICHELLI C, GAMBERINI M C, FERIOLI V, et al. Enantioselective analyses of antihistaminic drugs by high-performance liquid chromatography [J]. **Chromatographia**, 2004, 60(1-2): 99-103.
- [8] MIURA M, UNO T, TATEISHI T, et al. Determination of fexofenadine enantiomers in human plasma with high-performance liquid chromatography [J]. **J Pharm Biomed Anal**, 2007, 43(2): 741-745.

[本文编辑 沈敏 蒋婉洁]