

β -环糊精流动相和手性配位交换 HPLC 法分离药物对映体*

蔡小淦 姚彤炜¹ 潘莉¹ 宗俭¹ (杭州 310006 浙江省医药器械有限公司; ¹杭州 310031 浙江医科大学药物分析教研室)

摘要 目的:为生物样品手性药物对照体的分离测定建立手性流动相添加剂 HPLC。方法:以 β -环糊精和手性配位交换剂为流动相添加剂,分离测定了生物样品中羟基苯妥英、美芬妥英、叔丁喘安、氯噻酮、氧氟沙星等 5 种手性药物对映体。结果:测得结果各对映体之间均能得到较好的分离。以 β -环糊精为流动相添加剂法测得 4 种手性药物对映体的分离度(R)在 1.10~1.86 之间,各对映体的理论板数(n)在 1642~2022 之间。以手性配位交换法测得氧氟沙星两对映体的 R 为 2.10, n 为 2560 和 2600。并于制备柱上分离获得两对映体的纯品。结论:本法无需特殊设备,可在常规高效液相仪上进行手性药物的分离测定,操作简便、手性添加剂的种类多,适用范围广,便于推广。

关键词 药物对映体分离;手性流动相添加剂; β -环糊精,手性配位交换

Separation of drug enantiomers by HPLC with chiral mobile phase additive

Cai Xiaogan(Cai XG), Yao Tongwei(Yao TW), Pan Li(Pan L), *et al* (Zhejiang Province Medicines & Medical Appliances Co. LTD, Hangzhou 310006)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Develop a chiral mobile phase additive HPLC method to separate and determine drug enantiomers in biological sample. **METHODS:** β -CD, Mephentoin, Terbutaline, Chlorthalidone and Ofloxacin in biological sample were separated and determined using β -CD and chiral ligand exchange reagent as chiral mobile phase additive(CMPA). **RESULTS:** The R is 1.10~1.86 and n is 1642~2022 for four drug enantiomers using β -CD as CMPA. The R is 2.10 and n is 2560~2600 for ofloxacin enantiomers using chiral ligand exchange HPLC. **CONCLUSION:** The method is simple. The kinds of CMPA are abundant and the applicability is wide-range.

KEY WORDS separation of drug enantiomers, β -cyclodextrin, chiral ligand-exchange, chiral mobile phase additive

目前大多数合成的手性药物以外消旋体形式给药^[1]。然而,当外消旋体药物进入生物体内时,经历立体选择性的生物转化过程,光学异构体之间在药理学和毒理学等方面呈现差异。故一些国家的药品审评机构也强调手性新药光学异构体的安全性与临床有效性^[2]。但采用一般分析方法,所得结果往往是不可靠的,甚至有可能导致错误的结论^[3]。因此为研究手性药物对映体之间的差异,必须采用手性分析技术。手性 HPLC 是目前广泛采用的手性分离分析技术,其主要手性固定相法^[4];手性流动相添加剂法^[5-7]和手性衍生化试剂法^[8]。3 种方法各有优缺点,可以互相补充。本文采用手性流动相添加剂法,研究了分离生物样品中手性药物对映体的手性 HPLC 方法。

1 试剂与试剂

羟基苯妥英、美芬妥英、叔丁喘宁、氯噻酮、环己巴比妥(Sigma 和 Aldrich 化学公司);氧氟沙星对映体按

文献[9]制备。 β -环糊精(β -CD)为药用规格;L-苯丙氨酸、无水硫酸铜、脲、乙酸铵和甲醇为色谱纯或分析纯。去离子水再经 Millipore Q 纯化。

2 色谱系统

2.1 系统 I:日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪装备 SPD-6V 紫外检测器和 C-R4A 色谱数据处理机。分析色谱柱:FLC-C₈柱(50×4.0mm ID, 10 μ m),检测波长:254nm,进样体积:20 μ l,流动相:称取 β -CD 4g,脲 6g 和乙酸铵 1.5g,加水溶解,并稀释至 400ml,临用前过滤脱气,流速 0.6~1.0ml/min。

2.2 系统 II:Beckman 110B 高压泵和紫外检测器,RF-535 荧光检测器和 C-R4A 色谱数据处理机(日本岛津)。分析色谱柱:CLC-ODS 柱(150×4.6mm ID,

*国家自然科学基金(39370805)和浙江省自然科学基金(393031)资助项目

10 μ m);UV 检测波长:293nm,荧光检测波长:Ex 330nm, Em 550nm;进样体积:20 μ l。手性流动相添加剂(CMPA)溶液为含 6mmol/L L-苯丙氨酸和 3mmol/L 硫酸铜的水溶液,流动相:甲醇-CMPA 溶液(14:86),临用前过滤脱气,流速 1.0ml/min。

3 分析方法与结果

3.1 精密称取手性药物适量(约 5~15 μ g),若为生物样品,加入 1.0ml 甲醇沉淀蛋白质,以 4000r/min 离心 10min,取上清液,按色谱系统 I,注入高效液相色谱仪,各种手性药物对映体的分离结果见表 1。

表 1 β -CD 流动相分离手性药物对映体

手性药物		保留时间(min)	α	R
羟基苯妥英	S	9.00	1.12	1.10
	R	10.09		
美芬妥英	S	9.30	1.13	1.31
	R	10.51		
叔丁喘宁	+	9.25	1.18	1.53
	-	10.87		
氯喹酮		14.58	1.25	1.86
		18.25		

3.2 精密称取手性药物适量(约 4 μ g),按 3.1 项操作,若为人尿则直接精密量取其滤液适量,加流动相稀释后,按色谱系统 II,注入高效液相色谱仪。氧氟沙星对映体的分离结果见表 2。

4 讨论

4.1 β -CD 的浓度对两对映体的分离起了关键作用,表 2 手性配位交换 HPLC 分离氧氟沙星对映体

对映体	保留时间(min)	α	R	n
S-(-)	17.48	1.18	2.10	2600
R-(+)	20.68			2560

在低浓度时,随 β -CD 浓度增加分离度增大,达到一定浓度后, β -CD 浓度增加,分离度不再增大。同时 β -CD 浓度受到其溶解度的制约,为此在分离度相近的情况下,我们选择了较低浓度的 β -CD 溶液,并经试验加适量脲作为增溶剂^[10]。

β -CD 在较宽的 pH 范围内稳定,并且不干扰 UV 检测。其分离对映体的机制是^[5,6]: β -CD 的腔体结构对疏水性和亲水性药物对映体都具有很强的包合作用,并使包合物的理化性质发生改变,通过各种疏水性和氢键反应分离对映体。表 1 所列 4 种药物对映体的分离度为 1.10~1.86,经计算各对映体的理论板数在 1642~2022 之间。

4.2 手性配位交换 HPLC 分离氧氟沙星对映体的原理可能是^[6,7]:L-苯丙氨酸中的手性碳原子上的 NH₂ 和 COOH、氧氟沙星分子中的羧基和其邻位羰基结构与二

价铜离子形成三元配位化合物非对映体对。由于非对映体对的稳定性差异并与固定相发生立体选择性的吸引或排斥反应,而得以在非手性固定相上差速迁移,获得分离^[5,6]。

当流动相 pH 为 3.1,3.4,3.5 和 4.0 时,S-(-)和 R-(+)-氧氟沙星的分离度分别是 1.23,1.71,1.75 和 1.69,可见流动相 pH 在 3.4~4.0 范围内对方法的立体选择性影响不大。本文曾采用相同的原理尝试分离洛美沙星对映体,但是没有成功。可能是由于其分子中手性碳原子距离手性配位部位太远,氧氟沙星两者之间相距 1 个氮和 2 个碳原子,而洛美沙星相距 1 个氮和 5 个碳原子。

将手性配位交换原理扩展到制备手性色谱,可在 PREP-ODS(250 \times 20mm ID)制备柱上分离获得氧氟沙星两个对映体的纯品。光学纯度以对映体比例(enantiomeric ratio;er)表示,对 S-(-)-氧氟沙星为 99.2:0.8,对 R-(+)-氧氟沙星为 99.6:0.4;若以对映体过量百分数(enantiomeric excess%;ee)表示,S-(-)-氧氟沙星为 98.3%,R-(+)-氧氟沙星为 98.6%。

手性配位交换 HPLC 方法^[11,13]可用于新药左旋氧氟沙星原料及其制剂的质量控制和氧氟沙星对映体的体内体外代谢差异研究。

4.3 手性流动相添加剂 HPLC 法,不需要特殊设备,即可在常规固定相上分离手性药物对映体,操作简便,适用范围较宽,手性添加剂种类多,因此便于推广应用。

参考文献

- 曾苏,沈向忠,刘志强.手性药物的药理及其体内对映体的 HPLC 测定.浙江医科大学学报,1994,23:234.
- Marzo A. Incoming guidelines on chirality. Arzneimittel Forsch, 1994,44:791.
- 曾苏,等.新药开发中的手性与临床药理学因素.中国医药工业杂志,1996,27:430.
- 曾苏.手性色谱学与手性药物分析,现代应用药学,1993,10(3):4.
- 姚彤炜,曾苏,丁海青.环糊精手性流动相添加剂及其在药物分析中的应用.色谱,1996,14:106.
- 曾苏.HPLC 手性流动相添加剂分离药物对映体.色谱,1995,13:21.
- 李新,曾苏.手性配位体交换流动相拆分对映体.色谱,1996,14:354.
- 曾苏.HPLC 手性试剂衍生化法及其应用.色谱,1994,12:406.
- 曾苏,宗俭,潘莉.制备手性色谱拆分氧氟沙星光学异构体.色谱,1996,14:281.
- 姚彤炜,曾苏,丁海青.手性流动相添加剂法测定 5-(对

-羟基苯基)-5-苯基乙内酰脲的体外代谢的立体选择性. 浙江医科大学学报, 1996, 25: 197.

11 王似菊, 宗俭, 潘莉. 对映体选择性 HPLC 测定微粒体中氧氟沙星光学异构体. 中国药学杂志, 1995, 30: 485.

12 曾苏, 章立, 刘志强. HPLC 手性流动相添加剂法分析尿

中氧氟沙星对映体. 药学学报, 1994, 29: 223.

13 Zeng S, Zhang L, Liu ZQ. Stereoselective metabolism of ofloxacin in human. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9: 87.

收稿日期: 1998-01-04