

万古霉素键合固定相的分离性能

黄兰淇¹, 周魏华^{1*}, 陈义旺¹, 张凌怡², 万益群¹, 张维冰^{1,2}

(1. 南昌大学化学系, 江西 南昌 330031; 2. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237)

摘要: 万古霉素作为一种大环抗生素, 具有复杂的分子结构。在充分考虑万古霉素分子结构特征的情况下, 采用戊二醛间隔臂法制备了万古霉素键合固定相, 在反相、亲水、离子交换等分离模式下研究了其色谱分离性能。结果表明, 当流动相中有机调节剂含量较低时, 该色谱柱表现出典型的反相色谱分离模式特征; 随着有机调节剂含量的增加, 逐渐转变成亲水模式, 分离特性发生明显改变。由于万古霉素分子结构中含有可以解离的氨基, 因此该固定相也能够用于阴离子交换模式下的分析方法的发展。分别在反相、亲水和阴离子交换模式下, 将其应用于扑尔敏等多种非对映体药物和新型甜味剂甜菊糖的高效液相色谱分离; 仅通过改变分离条件, 即可在3种不同分离模式下完成分离。这些结果可以为新型色谱固定相的设计, 以及发展采用特殊结构改性基团的色谱固定相在相应分离模式下的分析方法提供指导。

关键词: 万古霉素; 固定相; 分离模式

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)09-0821-04

Separation performance of vancomycin-bonded stationary phase

HUANG Lanqi¹, ZHOU Weihua^{1*}, CHEN Yiwang¹, ZHANG Lingyi²,

WAN Yiqun¹, ZHANG Weibing^{1,2}

(1. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Vancomycin is one of the macrocyclic antibiotics with complex molecular structure. Based on the various functional groups of vancomycin, a vancomycin-bonded stationary phase using glutaraldehyde as the spacer was prepared. Its chromatographic properties in reversed-phase, ion exchange and hydrophilic phase modes were investigated separately. The prepared stationary phase showed the typical characteristic of the reversed-phase stationary, when the organic solvent content was low in the mobile phase. On the contrary, its chromatographic characteristic transformed into hydrophilic phase mode with the organic solvent content increased in the mobile phase. Owing to the amino groups of vancomycin, ion exchange mode can also be applied to the separation method development. The vancomycin-bonded stationary phase was applied to the separation of eight achiral drugs and stevioside in reversed-phase, ion exchange and hydrophilic phase modes. The separations were achieved in three different kinds of separation modes by using appropriate chromatographic conditions. The results provide guidance for the design of new types of stationary phase, and method development of chromatographic stationary phases modified by special compounds with complex construction in corresponding separation modes.

Key words: vancomycin; stationary phase; separation mode

自1994年Armstrong等^[1]首次将大环糖肽抗生素作为手性选择器合成手性固定相并成功应用于手性化合物分离后, 大环抗生素的应用得到飞速发展。大环抗生素在高效液相色谱(HPLC)、毛细管

电色谱(CEC)、毛细管电泳(CE)等手性分离技术中都有广泛应用^[2-5]。相比于其他手性试剂, 大环抗生素类化合物不仅可与分析物进行多种相互作用(如疏水作用、静电作用、偶极叠加作用、氢键作用

* 通讯联系人. Tel: (0791)5289570, E-mail: zhouweihua@ncu.edu.cn.

基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室2010年度开放基金(SKLF-KF-201002).

收稿日期: 2013-02-04

等^[6]),还可应用于多种分离模式(如反相、正相、亲水模式等^[7-8])。万古霉素作为大环抗生素,含有1个以缩氨酸为核心的复合氨基酸及相连的石炭酸根、1个或多个中性糖残基和1个或多个氨基糖,在糖苷配基部分都有1个氨基,其他可离子化部分都含有酚基,熔融大环的糖苷配基有1个半刚性的“篮子”结构^[9,10](见图1)。并且结构中的苯环疏水性较强,氨基、羧基等极性基团在酸性或碱性条件下可被离子化,因此其可应用于多种不同分离模式。

例如,丁国生等^[11]合成了去甲万古霉素键合的手性固定相,并在反相模式下成功分离了4种丹酰化氨基酸。毕玉金等^[12]利用万古霉素手性固定相在反相模式下对曼尼布碱类手性化合物进行了分离。2011年Rao等^[13]利用万古霉素固定相在离子色谱模式下对鼠血浆中的代谢物和米氮平进行了分离。在我们前期工作中^[14],发展出一种新型万古霉素固定相制备技术,并将该固定相成功用于手性化合物的分离。本文基于万古霉素结构特征,进一步将其应用于在反相、亲水色谱及离子交换等多种分离模式下非手性样品的分离,为拓宽其在实际样品分离分析中的应用奠定基础。

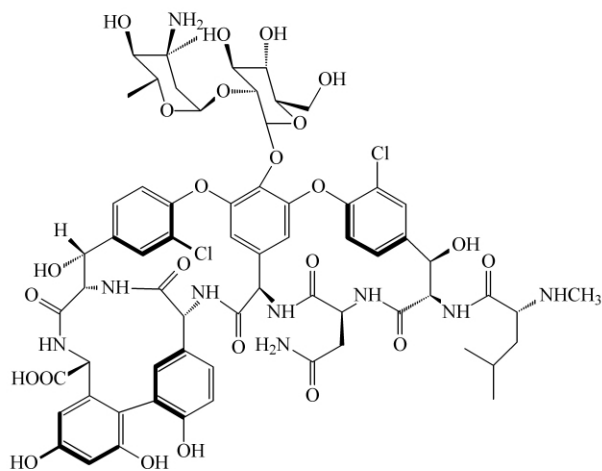


图1 万古霉素的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of vancomycin

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与样品

HPLC系统由P1201泵、UV1201多波长紫外分光检测器、Rheodyne-7725i进样阀及依利特色谱工作站EC2006组成(大连依利特公司);超纯水由Arium 611超纯水仪(德国Sartorius公司)纯化。

氨基硅填料(10 μm)购自大连依利特公司;戊二醛购自上海凌峰试剂有限公司;万古霉素购自上海阿拉丁公司;甲醇、乙腈(色谱纯)购自山东禹王实

业有限公司;NaBH₄、NaH₂PO₄、NaCl、对氨基苯甲酸、苯甲酸购自上海凌峰化学试剂有限公司;扑尔敏、氨基比林、巴比妥、烯丙异丙基巴比妥、安定片、盐酸麻黄碱、氯氮平购自公安部物质鉴定中心;三唑仑购自中国药品生物制品检定所;甜菊糖粗品由江西北洋食品添加剂有限公司提供。

1.2 万古霉素键合色谱柱的制备

按照雷雯等^[14]的方法,利用氨基硅胶颗粒作为基质,合成出万古霉素键合固定相。

将制备好的色谱固定相装入250 mm×4.6 mm的不锈钢色谱柱管中。装柱压力为70 MPa,匀浆液为丙酮,顶替液为乙醇。

2 结果与讨论

2.1 万古霉素键合固定相在反相模式下的应用

在反相模式等度洗脱条件下,以20%(体积分数,下同)乙腈为流动相,以尿嘧啶、萘、芴为样品对万古霉素键合固定相进行评价。如表1所示,3种物质的出峰顺序为尿嘧啶、萘、芴,符合反相模式机理。尿嘧啶的柱效为1.35×10⁴塔板/m。分离柱效偏低的主要原因是本文采用粒径为10 μm的硅胶颗粒合成万古霉素键合固定相,但较大粒径硅胶颗粒可用于填充制备色谱柱。

表1 万古霉素键合固定相在反相模式下分离尿嘧啶、萘、芴

Table 1 Separation results of uracil, naphthalene and fluorene in reversed-phase mode using vancomycin-bonded stationary phase

Compound	Retention time/min	Retention factor
Uracil	3.78*	0
Naphthalene	16.98	3.49
Fluorene	35.74	8.46

Mobile phase: acetonitrile-water (20:80, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 254 nm.

* Dead time.

在反相模式下,将万古霉素固定相应用于5种药物的分离。以30%甲醇为流动相,扑尔敏、氨基比林、巴比妥、烯丙基异丙基巴比妥、安定等5种药物按照极性由强到弱的顺序依次流出色谱柱(见图2)。其中烯丙基异丙基巴比妥与巴比妥相比,结构上多了2个烷基,疏水性更强,保留时间更长。因此,实际药物分离结果符合反相模式的机理。

2.2 万古霉素键合固定相在亲水色谱模式下的应用

在高浓度有机溶剂(85%乙腈)洗脱条件下,以尿嘧啶和萘为样品评价万古霉素键合固定相。萘和尿嘧啶出峰顺序与低有机调节剂条件下相反,显示出与反相模式相反的分离特征。反相模式下,样品

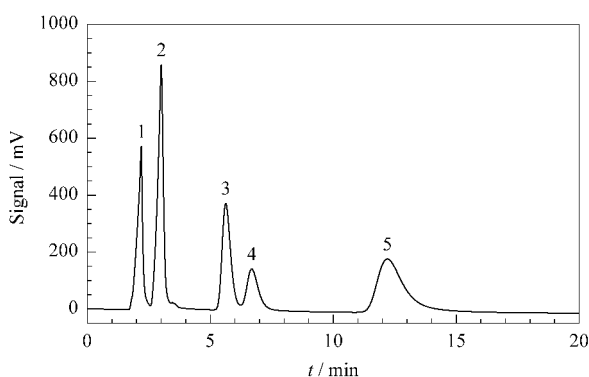


图 2 反相模式下 5 种药物的分离谱图

Fig. 2 Chromatogram of five drugs in reversed-phase mode

Column: 250 mm × 4.6 mm, vancomycin-bonded stationary phase; mobile phase: methanol-water (30:70, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection wavelength: 214 nm.

Peaks: 1. chlor-trimeton; 2. aminopyrine; 3. barbital; 4. allyl isopropyl barbitone; 5. diazepam.

与固定相间疏水相互作用较强而可能存在的其他分离机制的分离能力相对较弱。当有机调节剂浓度增加时,固定相与流动相的极性差相对变小,使得疏水作用对总体分离结果的影响变弱,而其他相互作用的影响相对增强,宏观表现为分离模式的改变。因此强极性的尿嘧啶保留时间更长,符合亲水模式分离机理(见图 3a)。亲水模式分离条件下,萘的柱效为 1.27×10^4 塔板/m。

在上述亲水模式条件下,对甜菊糖粗品进行分离。甜菊糖是从菊科草本植物甜叶菊中精提的新型天然甜味剂,主要包含甜菊甙(STV)、莱鲍迪甙 A(RA)、莱鲍迪甙 C(RC)等组分,RA 和 STV 为主要成分。如图 3b 所示,STV 具有疏水性,保留较弱,最先出峰,符合亲水模式的机理。

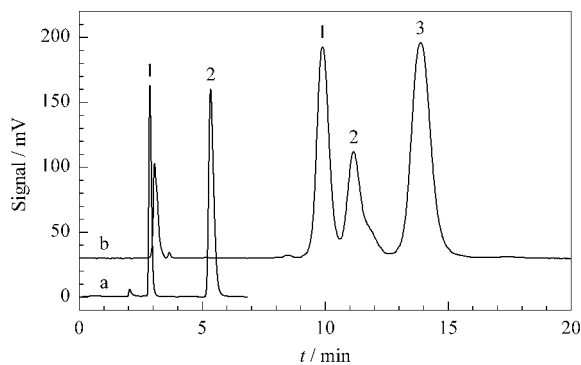


图 3 亲水模式下的分离谱图

Fig. 3 Chromatograms in HILIC mode

Mobile phase: acetonitrile-water (85:15, v/v); detection wavelength: (a) 254 nm; (b) 210 nm; for other conditions see Fig. 2.

Peaks: (a) 1. naphthalene; 2. uracil. (b) 1. stevioside (STV); 2. rebaudioside C (RC); 3. rebaudioside A (RA).

2.3 万古霉素键合固定相在离子交换色谱模式下的应用

与固定相共价相连的荷电基团决定离子交换色谱柱的特性:阴离子交换固定相表面带正电荷,阳离子交换固定相表面带负电荷。以对氨基苯甲酸和苯甲酸为样品考察了万古霉素键合固定相的离子交换色谱分离特征,结果如图 4 所示。

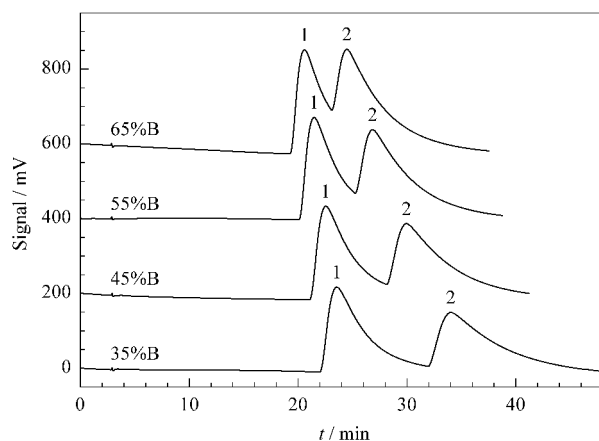


图 4 氨基苯甲酸和苯甲酸的分离色谱图

Fig. 4 Chromatograms of the separation of para aminobenzoic acid and benzoic acid

Mobile phases: A. 10 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 4.5); B. 10 mmol/L NaH_2PO_4 -0.5 mol/L NaCl; detection wavelength: 215 nm; for other conditions see Fig. 2.

Peaks: 1. para aminobenzoic acid; 2. benzoic acid.

采用 NaCl 线性梯度洗脱确定对氨基苯甲酸和苯甲酸的相对保留值后,研究了该固定相在不同等度洗脱条件下的分离能力。当流动相中盐浓度为 0.225 mol/L(45%B)时,对氨基苯甲酸和苯甲酸获得基线分离(见图 4)。由于万古霉素的 pI 为 7.20,在 pH 4.5 流动相条件下带正电荷;对氨基苯甲酸和苯甲酸的 pK_a 分别为 4.92 和 4.20,在此条件下分别带正电荷和负电荷。因此,苯甲酸保留更强,符合阴离子交换固定相分离机理。分别在 NaCl 浓度为 0.1、0.5、1.0 mol/L 条件下考察对氨基苯甲酸和苯甲酸的分离度。发现当盐浓度为 0.5 mol/L 时,两种物质获得较好分离。原因可能是当盐浓度过高,溶剂中的负电荷与固定相作用结合位点作用增强,流动相洗脱能力过强;而当盐浓度过低时,溶剂中的负电荷与固定相作用结合位点作用较弱,流动相洗脱能力减弱,保留较强的苯甲酸无法洗脱。同时考察流动相 pH 为 3.8、4.5、5.7 时对对氨基苯甲酸和苯甲酸的分离的影响,发现随着 pH 的增大保留时间增加。原因是样品在不同 pH 下所带电荷不同,与万古霉素之间作用存在差异。

扑尔敏、盐酸麻黄碱、三唑仑以及氯氮平 4 种药

物极性较强,在反相模式下保留较弱,死时间即流出色谱柱。当对这 4 种极性药物进行离子交换模式分离时,其保留显著增强,符合阴离子交换机理(见图 5)。在阴离子交换模式下,扑尔敏的柱效为 1.34×10^4 塔板/m。

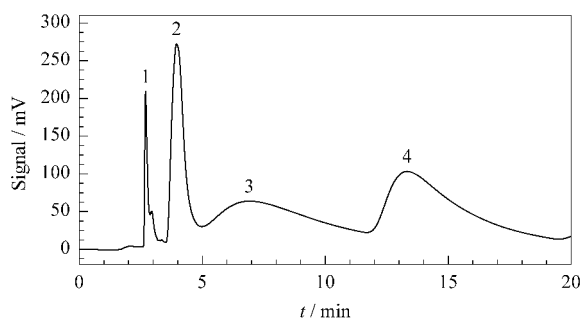


图 5 阴离子交换模式下 4 种极性药物的分离色谱图

Fig. 5 Chromatogram of four polar drugs in anion-exchange mode

Mobile phase: A. 10 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 3.8); B. 10 mmol/L NaH_2PO_4 -0.5 mol/L NaCl. Gradient elution: 0-30 min, 10%B-90%B; detection wavelength: 215 nm; other conditions see Fig. 2.

Peaks: 1. chlor-trimeton; 2. ephedrine hydrochloride; 3. triazolam; 4. clozapine.

2.4 万古霉素键合固定相制备的重复性和稳定性

为了考察制备方法的重复性,分别采用不同批次制备的万古霉素键合固定相填充了 3 根色谱柱,以 30% 甲醇为流动相,测定扑尔敏、氨基比林和巴比妥保留时间的相对标准偏差小于 15%。

采用戊二醛间隔臂法制备的万古霉素键合固定相稳定性较好,连续在不同分离模式下使用 3 个月,重复进样 300 余次,仍能保持良好的分离能力。

3 结论

万古霉素具有特殊结构,与分析物间存在多种

相互作用,因此可根据样品结构特征在多种模式下进行分离。本文制备的万古霉素键合固定相具有良好的稳定性并能同时实现反相、亲水、离子交换 3 种模式下的分离功能,拓展了万古霉素键合固定相的应用范围,因此对特殊选择性的样品具有良好的应用前景。同时为新型色谱固定相的设计,以及采用特殊结构改性基团的色谱固定相在相应分离模式下进行方法发展提供指导。

参考文献:

- [1] Armstrong D W, Tang Y, Chen S, et al. *Anal Chem*, 1994, 66(9): 1473
- [2] Kang J W, Bischoff D, Jiang Z J, et al. *Anal Chem*, 2004, 76(8): 2387
- [3] Sipos L, Ilisz I, Nonn M, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1232: 142
- [4] Mangelings D, Heyden V Y. *Electrophoresis*, 2011, 32: 2583
- [5] Malakova J, Pavek P, Svecova L, et al. *J Chromatogr B*, 2009, 877(27): 3226
- [6] Ilisz I, Berkecz R, Péter A. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(10): 1845
- [7] Bosáková Z, Kloučková I, Tesařová E. *J Chromatogr B*, 2002, 770(1/2): 63
- [8] Zhang X, Bao Y, Huang K, et al. *Chirality*, 2010, 22: 495
- [9] Ward T J, Farris III A B. *J Chromatogr A*, 2001, 906(1/2): 73
- [10] Chen Y L, Chen X G, Hu Z D. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (陈永雷, 陈兴国, 胡之德. 分析化学), 2004, 32(7): 964
- [11] Ding G S, Cong R Z, Wang J D. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (丁国生, 丛润滋, 王俊德. 分析化学), 2004, 32(5): 606
- [12] Bi Y J, Yang J, Jiang K, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (毕玉金, 杨晶, 江坤, 等. 分析化学), 2007, 35(6): 887
- [13] Rao R N, Kumar K, Ramakrishna S. *J Chromatogr B*, 2011, 879(21): 1911
- [14] Lei W, Zhang L Y, Zhu Y X, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (雷雯, 张凌怡, 朱亚仙, 等. 分析化学), 2010, 38(11): 1544