

替考拉宁键合手性固定相高效液相色谱法 直接拆分泮托拉唑钠对映体

丁国生^{1,2}, 唐安娜³, 王俊德², 丛润滋², 包建民¹

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 中国科学院大连化学物理研究所,
辽宁 大连 116023; 3. 南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要 :以替考拉宁为手性选择剂制备了大环抗生素类手性固定相——替考拉宁键合手性固定相(T-CSP),建立了T-CSP反相液相色谱直接拆分泮托拉唑钠对映体的方法。考察了流动相中有机改性剂的种类和比例、柱温以及流动相流速对拆分泮托拉唑钠对映体的影响。研究发现,用甲醇作有机改性剂比乙腈更有利于对映体的分离;在研究的温度范围内,随着柱温的升高,对映体的保留时间缩短,同时分离因子和分离度降低;在一定范围内降低流速有利于对映体的分离。采用T-CSP色谱柱(150 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm),以甲醇-水(体积比为35:65)为流动相,在流速0.6 mL/min、检测波长290 nm、柱温20 °C的条件下,泮托拉唑钠对映体获得了近于基线的分离,所建立的方法具有简便快速及重复性好等优点。

关键词 :反相高效液相色谱法;手性固定相;手性分离;替考拉宁;泮托拉唑钠

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)01-0046-03 栏目类别 :研究论文

Direct Enantioseparation of Pantoprazole Sodium by High Performance Liquid Chromatography on Teicoplanin-Bonded Chiral Stationary Phase

DING Guosheng^{1,2}, TANG Anna³, WANG Junde², CONG Runzi², BAO Jianmin¹

(1. College of Pharmaceutical and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Dalian
Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
3. College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract : Teicoplanin-bonded chiral stationary phase was prepared and used for the direct chiral separation of racemic pantoprazole sodium by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The influences of organic modifiers, the composition of mobile phase, the flow rate and column temperature on enantioseparation were studied. It was found that methanol was preferred than acetonitrile when used as organic modifier. With the increase of column temperature, chiral solutes were less retained and the separation factor value decreased indicating that lower temperature was better for the enantioseparation. Better resolution was obtained at lower flow rates as a result of minimization of the resistance of mass transfer. Based on these experimental data, the chiral HPLC method for the analysis of pantoprazole sodium on prepared chiral column (150 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm) was established with simplicity and good reproducibility, by using methanol-water (35:65, v/v) as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min and 20 °C.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); chiral stationary phase; enantioseparation; teicoplanin; pantoprazole sodium

大环抗生素作为一类新型的手性选择剂已成功地应用于高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱、毛细管电泳和毛细管电色谱等以分离各类光学异构体。大环抗生素类手性固定相可与被分离物质发生多种作用,如静电作用、疏水作用、包合作用、偶极叠加作

用、 π - π 电荷转移作用、形成氢键和立体排斥等。其拆分机理综合了蛋白质、环糊精等手性固定相所具有的特点,同时又具有较高的柱容量,成为目前极具发展潜力的一类新型手性固定相^[1,2]。

药物泮托拉唑钠(pantoprazole sodium)是一

种新型的质子泵抑制剂^[3-5],可用于治疗胃及十二指肠溃疡与反流性食管炎。其分子结构中有一个硫原子的手性中心(结构见图 1),临床以消旋体的形式给药。为深入研究此手性药物在人体内的代谢和作用机制,其对映异构体的拆分工作具有非常重要的意义。截止到目前,对它的拆分报道不多,且拆分多在蛋白质^[6,7]以及多糖类衍生物^[8,9]手性固定相上进行。以抗生素类手性固定相对此种药物的外消旋体进行拆分尚未见文献报道。本文以替考拉宁为手性选择剂制备了大环抗生素类手性固定相——替考拉宁键合手性固定相(T-CSP),并在此固定相上考察了流动相中有机改性剂的种类和比例、柱温以及流动相流速对泮托拉唑钠对映体拆分的影响,从而优化了泮托拉唑钠对映体的拆分条件,实现了泮托拉唑钠对映体的基线分离。

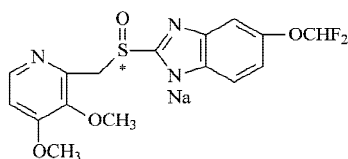


图 1 泮托拉唑钠的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of pantoprazole sodium

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

HPLC 色谱系统由日本岛津 LC-10AD 泵、SPD-10A 多波长紫外分光检测器、Rheodyne 7125 进样阀及江申色谱工作站 JS-3000 组成。

甲醇、乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司),水(二次蒸馏,0.45 μm 微孔膜过滤);实验中其他试剂皆为分析纯。泮托拉唑钠外消旋体(纯度 ≥ 99.9%)由沈阳药科大学制药工程学院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 T-CSP 的制备和色谱柱的装填

T-CSP 的制备及柱的装填方法参见文献[10]。

1.2.2 色谱条件

T-CSP 色谱柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm)流动相为甲醇-水(体积比为 35:65),流速 0.6 mL/min;检测波长 290 nm;柱温为 20 °C,进样量为 2 μL。在此条件下泮托拉唑钠外消旋体的拆分色谱图见图 2。

2 结果与讨论

2.1 流动相缓冲液及 pH 值对对映体分离的影响

取水或配制的 2% 三乙胺乙酸缓冲液,用冰醋酸或三乙胺调节至不同的 pH 值(3.0 ~ 6.5),然后加入 35% 的有机改性剂(甲醇或乙腈)配成流动相,

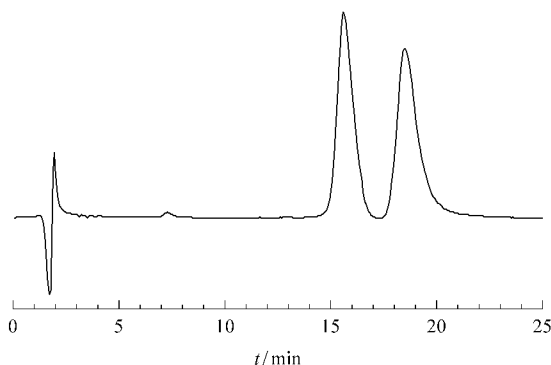


图 2 泮托拉唑钠对映体拆分的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of pantoprazole sodium enantioseparation

Mobile phase: methanol-water (35:65, v/v); column temperature: 20 °C; flow rate: 0.6 mL/min.

考察了不同 pH 条件下泮托拉唑钠的色谱保留情况。结果显示与水-甲醇(或乙腈)流动相比较,使用三乙胺乙酸缓冲液-甲醇(或乙腈)流动相体系对对映体的保留和分离没有显著的影响。从操作和色谱柱使用寿命的角度考虑,选择流动相的组成为水-甲醇(或乙腈)。

2.2 有机改性剂的种类及含量对对映体分离的影响

分别用甲醇和乙腈作流动相的有机改性剂,在流速 0.8 mL/min 下,考察了有机改性剂种类和含量对对映体分离的影响,实验结果表明甲醇更有利于对映体的分离。当流动相中甲醇与水的体积比在 35:65 时,对映体获得了最大限度的分离;甲醇比例低于此值时,分离因子 α 和分离度 R_s 均降低;而甲醇比例高于此值时,尽管对映体在 T-CSP 柱上有较高的 α 值,但由于保留时间太短,分离度 R_s 反而降低(见表 1)。

表 1 甲醇含量对对映体分离的影响

Table 1 The effect of methanol content in mobile phase on enantioseparation

V(Methanol) : V(water)	t_R /min	α	R_s
60:40	4.09/4.50	1.249	0.898
50:50	8.24/9.59	1.232	1.102
35:65	11.34/13.32	1.221	1.422
20:80	28.45/32.82	1.168	0.986
15:85	32.48/36.23	1.125	0.531

Enantiomers were not identified because of no standard samples.

2.3 流动相流速对对映体分离的影响

在流动相组成为甲醇-水(体积比为 35:65)条件下,考察了流动相流速(1.0 ~ 0.4 mL/min)对柱效及分离度的影响,结果见表 2。在研究的流速范围内,随着流速的增加,色谱柱的理论塔板数降低;分离因子 α 和分离度 R_s 先增加后降低。当流速为

0.6 mL/min 时, 色谱柱有较高的柱效, 且此时分离因子和分离度达到最高值, 因此最后确定流速为 0.6 mL/min。

表 2 流动相¹⁾流速对对映体分离的影响

Table 2 The influence of flow rates of mobile phase¹⁾ on pantoprazole sodium enantioseparation

Flow rate/ (mL/min)	t_R /min	α	R_s	Column efficiency/(N/m)
0.4	32.03/35.94	1.222	1.809	9899
0.6	15.68/18.57	1.231	1.855	9276
0.8	11.34/13.32	1.221	1.468	8106
1.0	8.68/10.10	1.210	1.452	6719

1) Mobile phase: methanol-water (35:65, v/v).

2.4 柱温对对映体分离的影响

在流动相为甲醇-水(体积比为 35:65)、流速为 0.6 mL/min 条件下, 通过改变色谱柱的温度(20 ~ 35 °C), 考察了柱温对分离的影响。在每一设定的温度下, 色谱柱至少平衡 30 min。实验结果发现, 在考察的温度范围内, 随着柱温的升高, 对映体的保留时间缩短, 同时分离因子和分离度降低(见图 3), 表明低温有利于对映体的分离。故实验选择柱温为 20 °C。

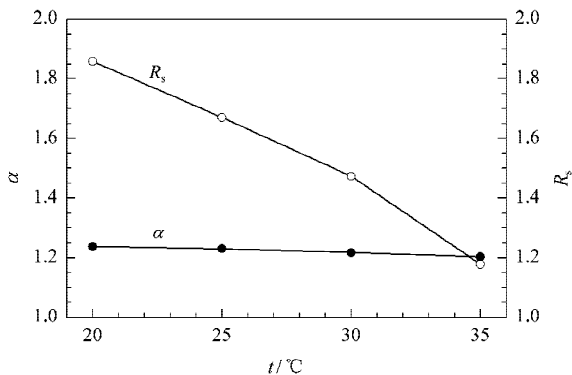


图 3 柱温对泮托拉唑钠对映体拆分的影响

Fig. 3 Effect of column temperature on pantoprazole sodium enantioseparation

Mobile phase: methanol-water (35:65, v/v); flow rate: 0.6 mL/min.

按照 Armstrong 等^[11]的观点, 如果在一定温度

范围内, $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系, 则可以有下关系式: $\ln \alpha = -\Delta_{R,S} \Delta H^0 / (RT) + \Delta_{R,S} \Delta S^0 / R$ 。

根据本实验考察温度为 20 ~ 35 °C, $\ln \alpha - 1/T$ 呈很好的线性关系 ($r^2 = 0.9928$), 计算出 $\Delta_{R,S} \Delta H^0 = -1.729$ kJ/mol, $\Delta_{R,S} \Delta S^0 = -4.820$ J/(mol · K), 说明泮托拉唑钠对映体和固定相之间的各种作用为焓控制过程。

2.5 泮托拉唑钠对映体分离的重复性

在优化的实验条件下, 即流动相为甲醇-水(体积比为 35:65), 流速 0.6 mL/min、柱温 20 °C、进样量 2 μ L 时, 可以实现对泮托拉唑钠对映体的基线分离。在相同的色谱条件下连续 6 次进样, 考察了对映体分离的重复性。结果发现对映体保留时间的相对标准偏差分别为 1.12% 和 1.84%, 峰面积的相对标准偏差分别为 2.64% 和 2.88%。

参考文献:

- [1] Armstrong D W, Tang Y B, Chen S S, Zhou Y W, Bagwill C, Chen J R. Anal Chem, 1994, 66: 1473
- [2] Ding Guosheng, Huang Xiaojia, Liu Xueliang, Wang Junde. Chinese Journal of Chromatography (丁国生, 黄晓佳, 刘学良, 王俊德. 色谱), 2002, 20(6): 519
- [3] Yang Rifang, Yun Lihong, Ding Zhenkai. Chinese Journal of New Medicine (杨日芳, 恽榴红, 丁振闾. 中国新药杂志), 1994, 3(6): 3
- [4] Adamek R J, Szymanski C, Pfaffenbach B. Am J Gastroenterol, 1997, 92: 1949
- [5] Jaspersen D, Diehl K L, Schoepfner H, Geyer P, Martens E. Alim Pharm Ther, 1998, 12(1): 49
- [6] Tanaka M, Yamazaki H. Anal Chem, 1996, 68(9): 1513
- [7] Cass Q B, Degani, A L G, Cassiano N M, Pedrazolli J. J Chromatogr B, 2002, 766: 153
- [8] Balmer K, Persson B A, Lagerstroem P O. J Chromatogr A, 1994, 660: 269
- [9] Xie Zhiyong, Zhong Dafang, Yang Binghua, Jin Xin. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (谢智勇, 钟大放, 杨炳华, 金鑫. 药物分析杂志), 2004, 24(1): 1
- [10] Ding Guosheng, Liu Ying, Cong Runzi, Wang Junde. Talanta, 2004, 62(5): 997
- [11] Berthod A, Li W Y, Armstrong D W. Anal Chem, 1992, 64: 873