

文章编号: 1006-2858(2010)01-0052-04

α_1 -酸性糖蛋白柱分离甲溴后马托品溴化物及硫酸阿托品对映体

林丽娜, 张华燕, 郭兴杰

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 以 α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AGP) 为固定相, 建立甲溴后马托品溴化物及硫酸阿托品的对映体拆分方法。方法 采用 HPLC 法分离。考察流动相中有机改性剂种类和比例、pH 值、缓冲盐溶液的浓度、流速、柱温等对对映体分离的影响。结果 甲溴后马托品溴化物最佳色谱条件: 流动相为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (pH 值 5.5) 缓冲液, 流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 室温; 硫酸阿托品最佳色谱条件: 流动相为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (pH 值 6.5) 缓冲液, 流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 室温。结论 甲溴后马托品溴化物及硫酸阿托品对映体可以在 α_1 -AGP 固定相上得到完全分离。

关键词: α_1 -酸性糖蛋白固定相; 高效液相色谱法; 甲溴后马托品溴化物; 硫酸阿托品; 对映体分离
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AGP) 为蛋白质类手性固定相。能被 α_1 -AGP 手性固定相拆分的药物分子结构有如下特点: 具有与手性中心相邻的芳环基团; 至少含有 1 个氢键结合点; 芳环基团和氢键结合点间的间隔不得超过 3 个原子^[1]。

甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品 (图 1) 均为抗胆碱药, 具有阻断乙酰胆碱、使瞳孔括约肌和睫状肌麻痹的作用, 常用于眼科检查和验光。阿托品是莨菪碱的外消旋体, 临床上以消旋体形式

给药, 但抗胆碱活性主要来自左旋体。目前国内外已有文献报道使用手性固定相法^[2-4]、高效毛细管电泳法^[5-7]等拆分阿托品对映体, 甲溴后马托品溴化物对映体的拆分尚未见报道。由于药物对映体在药理、毒理和临床疗效方面差异较大, 因此, 建立适宜的方法拆分药物对映体具有重要意义。作者以 α_1 -AGP 为固定相, 建立了甲溴后马托品溴化物与硫酸阿托品对映体的 HPLC 拆分方法。

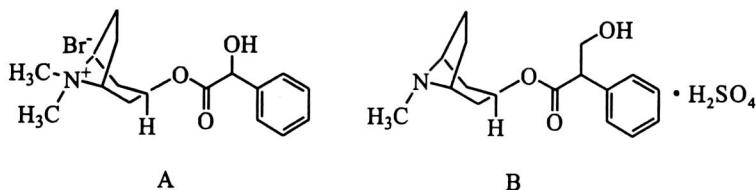


Fig 1 Chemical structures of homatropine methylbromide (A) and atropine sulfate (B)

1 仪器与材料

Jasco PU-2080 液相色谱仪、Jasco UV-2075 紫外检测器 (日本分光公司), Sepu3000 色谱工作站 (杭州普惠科技有限公司), 甲溴后马托品溴化物 (消旋体, 沈阳药科大学药剂教研室), 硫酸阿托品 (消旋体, 批号 0040-9109, 中国药品生物制品检定所), 异丙醇、乙腈、甲醇 (色谱纯, 天津博迪化工有限公司), 醋酸铵 (分析纯, 沈阳经济技术

开发区试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件选择

色谱柱: Chiral-AGP 柱 ($100\text{ mm}\times 4.0\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 以醋酸铵缓冲液 (pH 值 4.5~6.5, 浓度为 $10\sim 60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 为主体, 选择异丙醇、甲醇和乙腈为有机改性剂; 检测波长 212 nm ; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。色谱图见图 2。

收稿日期: 2009-03-04

作者简介: 林丽娜 (1984-), 女 (汉族), 辽宁锦州人, 硕士研究生, E-mail llm-84@163.com; 郭兴杰 (1956-), 女 (汉族), 辽宁葫芦岛人, 教授, 博士, 主要从事手性药物的拆分研究, Tel 024-23986285, E-mail gxjhyz@yahoo.com.cn。

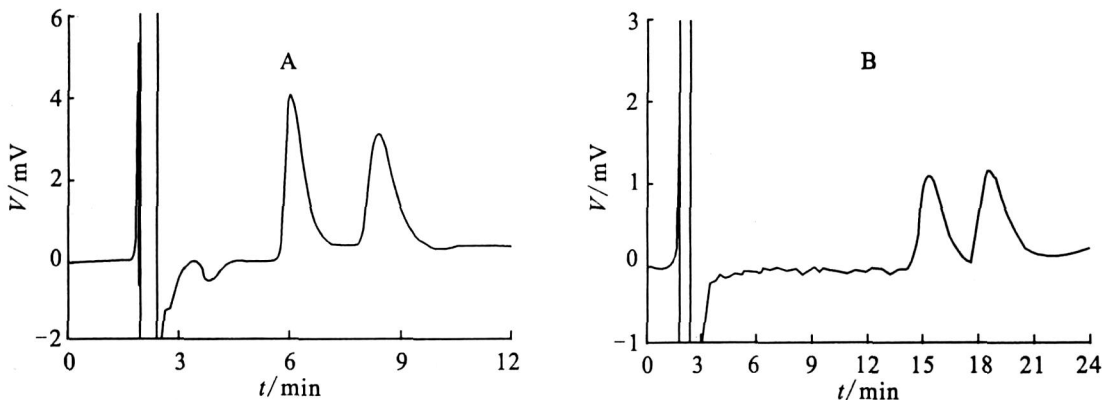


Fig 2 Chromatograms of homatropine methylbromide enantiomers(A) and atropine sulfate enantiomers(B)

2.2 样品溶液的制备

分别精密称取甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品适量,用水溶解并稀释制成质量浓度约为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,即得。

2.3 对映体分离影响因素考察

2.3.1 有机改性剂种类及比例的影响

当醋酸铵缓冲液 (pH 值 5.5) 浓度为 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 时,分别选择异丙醇、甲醇、乙腈为有机改性剂,考察有机改性剂种类及比例对甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品对映体分离的影响。

样品在 α_1 -AGP 柱上的保留时间与有机改性

剂极性的关系是:有机改性剂的极性越大,对映体的保留时间越长;有机改性剂的比例越高,保留时间越短^[8]。甲醇的极性最大,因此以甲醇作为改性剂时对映体保留时间最长;随着流动相中有机改性剂比例的增加,两对映体容量因子 (k)、保留时间、分离因子 (α) 及分离度 (R) 均减小。有机改性剂对甲溴后马托品溴化物对映体分离的影响见表 1。对于硫酸阿托品,流动相中即使含有体积分数 1% 的有机改性剂也不能实现两对映体的完全分离。综合考虑,最后选择流动相中不添加有机改性剂进行拆分研究。

Table 1 Effect of different kinds of organic modifier on the separation of homatropine methylbromide enantiomers

Organic modifier	$\Phi/\%$	k_1	k_2	α	R
Isopropanol	0	2.10	3.26	1.57	2.12
	1	1.52	2.26	1.49	1.55
	2	0.88	1.10	1.25	0.48
	5	s	s	s	s
Acetonitrile	1	1.61	2.70	1.57	2.09
	2	1.20	1.81	1.50	1.42
	5	0.89	1.16	1.29	0.78
Methanol	1	1.81	2.78	1.53	1.71
	2	1.46	2.07	1.41	1.18
	5	1.39	1.90	1.36	1.05

s—Single peak

2.3.2 醋酸铵缓冲液 pH 值的影响

在室温下,以 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液作为流动相,用冰乙酸或三乙胺调节流动相 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,考察 pH 值对甲溴后马托品溴化物及硫酸阿托品对映体分离的影响。在 pH 值 4.5 时,甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品均不能实现分离。随着 pH 值的升高,甲溴后马托品

溴化物及硫酸阿托品对映体的保留时间增加,分离度增大,其中 pH 值的变化对甲溴后马托品溴化物分离的影响更为显著。结果见图 3。 α_1 -AGP 的等电点为 2.7,当流动相的 $\text{pH} > 2.7$ 时, α_1 -AGP 带负电。甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品均为胺类药物。甲溴后马托品溴化物为季铵盐,氮原子带正电荷;阿托品具有叔胺结构,在低 pH 值溶液中氮原子带正电,这就使得两种药物与 α_1 -AGP

固定相之间产生静电作用。随着 pH 值增大, α_1 -AG 的负电荷增大, 与甲溴后马托品溴化物的静电作用增强, 使两对映体之间的分离度增大。而阿托品分子所带正电荷随 pH 值增大而减少, 从而影响了静电作用, 因此 pH 值的变化对阿托品分离度影响较小。综合考虑样品保留时间和分离度, 最后选择分离甲溴后马托品溴化物的 pH 值为 5.5, 硫酸阿托品的 pH 值为 6.5。

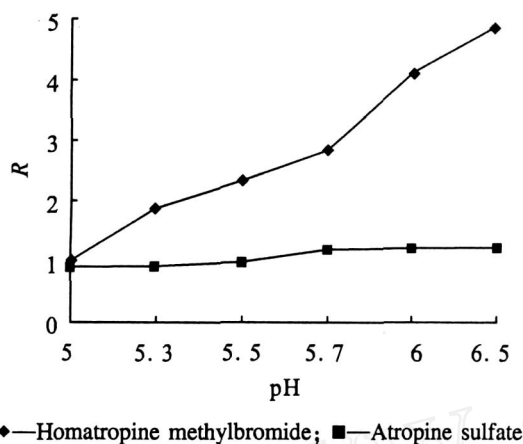


Fig 3 Effect of pH of ammonium acetate buffer on the separation of enantiomers

2.3.3 醋酸铵缓冲液浓度的影响

在室温下, 分别选择 10、20、30、40、60 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液 (甲溴后马托品溴化物 pH 值 5.5, 硫酸阿托品 pH 值 6.5) 作为流动相, 流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 考察缓冲盐浓度变化对对映体分离的影响。随着醋酸铵浓度的增大, 容量因子 (k)、分离因子 (α) 及分离度 (R) 均减小。可能是由于在对映体的选择过程中存在离子交换机制^[9]: 流动相中的 NH_4^+ 与带正电荷的手性药物竞争固定相上带负电荷的位置, 从而使手性药物与固定相之间的作用力减小。 α_1 -AGP 柱适用的缓冲盐浓度为 $10 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 为延长其使用寿命, 最终甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品均选用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液。

2.3.4 流速的影响

固定其他色谱条件, 室温下考察在不同流速 ($0.3, 0.4, 0.5, 0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 下对映体的分离情况。当流速由 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 增大至 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 甲溴后马托品溴化物的分离度由 2.87 降至 2.20, 硫酸阿托品的分离度由 1.75 降至 1.41, 而分离因子基本保持不变。由此可以看出, 在一定范围内, 降低流速会改善分离度, 但不能改善手性选择性。考虑到流速太低色谱峰

展宽严重, 最后选择流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.5 柱温的影响

分别考察了不同柱温 ($20, 25, 30, 35^\circ\text{C}$) 对对映体分离的影响。当柱温升高时, 由于样品在固定相和流动相之间的传质速度变快, 使得样品与固定相之间的作用力减小, 容量因子减小, 分离度减小, 分离因子略有下降。在本实验中, 改变柱温并不能明显改善分离, 因此实验在室温 (20°C) 进行。

3 结论

醋酸铵缓冲液的 pH 值和浓度是影响甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品对映体分离的主要因素。分离甲溴后马托品溴化物的最佳色谱条件为: 流动相 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (pH 值 5.5) 缓冲液, 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为室温; 分离硫酸阿托品的最佳色谱条件为: 流动相 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵 (pH 值 6.5) 缓冲液, 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为室温。在此色谱条件下, 甲溴后马托品溴化物和硫酸阿托品的分离度分别为 2.34 和 1.50, 分离因子分别为 1.57 和 1.24, 两对映体均达到了完全分离。

参考文献:

- [1] 尤启冬, 林国强. 手性药物研究与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 89 - 90.
- [2] 翟宗德, 罗兴平, 李欣, 等. 用两种相似多糖类手性固定相拆分阿托品外消旋对映体的比较 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 89 - 91.
- [3] BRETON D, BURET D, CLAIR P, et al Chiral separation of atropine by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1088: 104 - 109.
- [4] DANUTA S, DONALD E M, NAOMI G, et al HPLC-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for enantioselective determination of R, S-proprianol and R, S-hyoscyamine in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2007, 859: 213 - 221.
- [5] 李学仁, 程庆春, 杨跃伟, 等. 高效毛细管电泳法研究阿托品类药物的手性分离 [J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(1): 9 - 11.
- [6] LIDAM, SAMR C, PHILIPPE C, et al Enantioseparation of atropine by capillary electrophoresis using sulfated β -cyclodextrin: application to a plant extract [J]. J Chromatogr A, 2000, 868: 285 - 294.
- [7] SYUN-CHIRO T, AKIKO O, YOSHIMIKI, et al Enantiomeric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors [J]. J Chromatogr A, 1999, 848: 465 - 471.
- [8] 杨凌, 冉桂梅, 张才华, 等. α_1 酸性糖蛋白柱拆分马来酸曲美布汀对映体 [J]. 分析化学, 2005, 33(5):

668 - 670

[9] JORGEN H, ANDERS G Optimization of the separation of enantiomers of basic drugs retention mechanisms and

dynamic modification of the chiral bonding properties on an α_1 -acid glycoprotein column [J]. J Chromatogr A, 1995, 694: 57 - 69.

Chiral separation of homatropine methylbromide and atropine sulfate using high performance liquid chromatography with α_1 -acid glycoprotein column

LIN Li-na, ZHANG Hua-yan, GUO Xing-jie

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To investigate the separation of the enantiomers of homatropine methylbromide and atropine sulfate using high performance liquid chromatographic (HPLC) on α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) chiral stationary phase **Methods** The influence of the pH value and flow rate of the mobile phase, the concentration of buffer solution and organic solvents and temperature were examined **Results** The best separation was obtained with $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH 5.5) buffer as mobile phase for homatropine methylbromide and $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH 6.5) buffer as mobile phase for atropine sulfate at ambient temperature. The optimal flow rate was $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. **Conclusions** Homatropine methylbromide and atropine sulfate enantiomers can be separated completely on the α_1 -AGP chiral stationary phase.

Key words: α_1 -acid glycoprotein stationary phase; HPLC; homatropine methylbromide; atropine sulfate; enantiomeric separation

(上接第 51 页)

Quantitative determination of five ginsenosides in Shizhu Ginseng and its tablets by HPLC

PENG Xu-ling, FU Yong-hui, XIONG Zhi-li, SUN Chang-shan, LI Fa-mei

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To provide a scientific data for quality control of Shizhu ginseng, and determine the contents of five ginsenosides in Shizhu Ginseng (a kind of *Panax ginseng* C. A. Mey) and its tablets **Methods** A Kromasil C_{18} column with the mobile phase consisted of acetonitrile-water was used. The column temperature was set at $25\text{ }^\circ\text{C}$. The flow rate was $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the UV detection wavelength was set at 203 nm. **Results** Five Ginsenosides were baseline separated. The calibration curves of ginsenoside Rg_1 , Re, Rb_1 , Rc and Rb_2 were linear in the concentration range of $19.8\text{--}198\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $20.6\text{--}206\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $33.0\text{--}330\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $18.0\text{--}180\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $13.0\text{--}130\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The average recoveries of ginsenoside Rg_1 , Re, Rb_1 , Rc and Rb_2 of Shizhu Ginseng were 99.8%, 98.3%, 99.2%, 95.4% and 96.8%, the RSD were 3.0%, 3.0%, 2.6%, 2.2% and 2.8% ($n=6$), respectively. And the average recoveries of ginsenoside Rg_1 , Re, Rb_1 , Rc and Rb_2 of the tablets of Shizhu Ginseng were 100.2%, 99.0%, 99.7%, 96.4% and 98.4%, the RSD were 2.2%, 3.1%, 3.6%, 2.6% and 2.8% ($n=6$), respectively. **Conclusions** The method can be applied to the quality control of Shizhu Ginseng and its tablets.

Key words: Shizhu Ginseng; Shizhu Ginseng tablet; ginsenoside; HPLC; quantitative determination