

万古霉素键合手性固定相高效液相色谱法 直接分离泰妥拉唑对映体

关 瑾^{1,2}, 杨 晶¹, 毕玉金¹, 石 爽², 李发美¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016 ; 2. 沈阳化工学院应用化学学院, 辽宁 沈阳 110124)

摘要 利用反相高效液相色谱法在大环抗生素类手性固定相万古霉素键合手性固定相(Chirobiotic V)上直接分离了泰妥拉唑对映体。考察了缓冲溶液的种类、浓度和 pH 值, 有机改性剂的种类和浓度, 柱长和柱温等对手性分离的影响。优化后的色谱条件为: Chirobiotic V 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.02 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH 6.0)-四氢呋喃(体积比为 93:7), 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 20 $^{\circ}$ C, 检测波长为 306 nm。在此条件下泰妥拉唑对映体达到了基线分离, 分离度达 1.68; 对映体保留时间的相对标准偏差分别为 0.48% 和 0.49% ($n=6$), 峰面积的相对标准偏差分别为 0.45% 和 0.55% ($n=6$)。所建立的手性分离方法具有简便快速及重复性好等优点。

关键词 高效液相色谱; 手性固定相; 手性分离; 泰妥拉唑对映体

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)05-0732-03 栏目类别: 研究论文

Chiral Separation of Tenatoprazole Enantiomers Using High Performance Liquid Chromatography on Vacomycin-Bonded Chiral Stationary Phase

GUAN Jin^{1,2}, YANG Jing¹, BI Yujin¹, SHI Shuang², LI Famei¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China ;

2. School of Applied Chemistry, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110124, China)

Abstract : Vacomycin-bonded chiral stationary phase was used for the direct chiral separation of tenatoprazole enantiomers using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The influences of the kinds and concentration of buffer and organic modifier, the pH value of buffer, column length and column temperature on the separation were examined. The chiral HPLC method for the separation of tenatoprazole enantiomers on a Chirobiotic V column (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m) was established with simplicity and good reproducibility using 0.02 mol/L ammonium acetate buffer (pH 6.0)-tetrahydrofuran (93:7, v/v) as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min and 20 $^{\circ}$ C. Under the above conditions, the enantiomers were separated on baseline with the resolution of 1.68. The relative standard deviations (RSDs) for the retention times of tenatoprazole enantiomers were 0.48% and 0.49% ($n=6$). The RSDs for the peak areas of tenatoprazole enantiomers were 0.45% and 0.55% ($n=6$).

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); chiral stationary phase; chiral separation; tenatoprazole enantiomers

Chirobiotic V 固定相是由大环多肽类化合物万古霉素与 5 μ m 硅胶以多个共价键键合而成。万古霉素的结构中含有 18 个手性中心和 3 个空腔, 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-偶极作用、 π - π 电荷迁移作用、氢键作用和立体排斥作用等。其分离机理综合了蛋白质、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, 已成为极具发展潜力的一类新型手性固定相^[1]。

泰妥拉唑(tenatoprazole)是一种新型的胃 H^{+}/K^{+} -ATP 酶抑制剂(即质子泵抑制剂), 主要用于治疗十二指肠溃疡、胃溃疡、反流性食管炎、Zollinger-Ellison 综合征等与胃酸分泌失调有关的疾病。现已批准上市的质子泵抑制剂有奥美拉唑、

收稿日期 2007-02-14

第一作者: 关 瑾, 女, 博士研究生, 主要从事药物分析法研究。

通讯联系人: 李发美, 女, 教授, 博士生导师, Tel (024)23986289, E-mail: lfameili@163.com。

基金项目: 沈阳市科技局资助项目(1063307-1-03)。

兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑及左旋奥美拉唑。泰妥拉唑与上述药物相比 ,其抑制 H^{+}/K^{+} -ATP 酶的活性更强 ,抑制胃酸分泌的效果更好^[2-4] ,而且具有理化性质稳定的特点。泰妥拉唑化学名为 5-甲氧基-2-(4-甲氧基-3,5-二甲基吡啶-2-甲基亚磺酰基)咪唑并[4,5-*b*]吡啶 ,其分子结构中有一个硫原子手性中心(结构式见图 1) ,因而具有一对对映异构体。目前 ,关于泰妥拉唑对映体手性分离方法以及单一对映体的药理活性、药代动力学研究均未见文献报道。建立泰妥拉唑手性分离方法对深入研究其对映体的药效、药理作用具有重要意义。本文采用万古霉素键合手性固定相高效液相色谱法实现了泰妥拉唑对映体的直接分离。方法简单 ,操作方便 ,重现性好 ,可以用于泰妥拉唑对映体的质量控制及立体选择性药代动力学的研究。

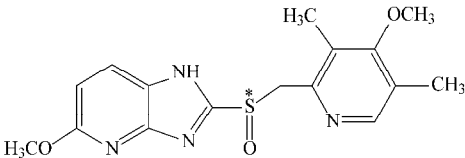


图 1 泰妥拉唑结构式
Fig. 1 The structure of tenatoprazole

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 ,包括脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、HP Chemstation 色谱工作站(Agilent 公司 ,美国) ;泰妥拉唑(HPLC 面积归一化法测定纯度为 99.95%) ,甲醇、乙腈、四氢呋喃(THF)为国产色谱纯试剂 ,所有其他试剂均为分析纯 ,实验用水为二次去离子水。

1.2 色谱条件

色谱柱 :Chirobiotic V 色谱柱(150 mm × 4.6 mm ,5 μm ;250 mm × 4.6 mm ,5 μm ;Advanced Separation Technologies Inc ,美国) ;流动相 :0.02 mol/L 醋酸铵缓冲溶液(pH 6.0)-四氢呋喃(体积比为 93:7) ;柱温 20 ℃ ;流速 0.5 mL/min ;检测波长 306 nm ;进样体积 5 μL。色谱柱死时间均以不保留的溶剂进样测定。

2 结果与讨论

2.1 不同因素对对映体分离的影响

2.1.1 缓冲液种类、浓度和 pH 值对对映体分离的影响

分别考察了醋酸铵、硝酸铵和磷酸二氢钠 3 种

盐在 0.02、0.04、0.06 和 0.08 mol/L 浓度下 ,pH 值在 4.0~7.0 范围内与四氢呋喃组成流动相(体积比为 93:7)对对映体分离的影响。实验结果表明 ,缓冲液种类、浓度对分离影响不大 ,pH 值对分离影响较大。在有机改性剂比例不变的情况下 ,对映体的分离度 R_s 随 pH 值升高而增大 ,pH 值为 4.0 时分离度 R_s 为 0.68 ,pH 值为 6.0 时对映体的色谱峰达到基线分离 ,分离度 R_s 为 1.68 ,此条件下泰妥拉唑对映体分离色谱图见图 2-a。泰妥拉唑为弱碱性化合物 , pK_a 约为 4 ,在 pH 值为 6.0 时化合物呈分子状态 ,因此 ,静电作用不是影响对映体分离的主要因素。由于低浓度缓冲盐有利于延长色谱柱使用寿命 ,本实验选择 0.02 mol/L 醋酸铵(pH 6.0)与四氢呋喃组成缓冲液。

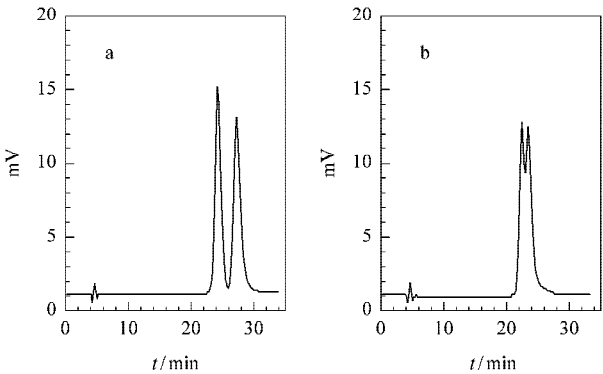


图 2 泰妥拉唑对映体在不同 pH 的流动相下的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of tenatoprazole enantiomers separated under different pH values of buffers

Mobile phase : 0.02 mol/L ammonium acetate buffer-THF (93:7 , v/v) ; temperature : 20 ℃ ; flow rate : 0.5 mL/min.
a. pH 6.0 ; b. pH 4.0.

2.1.2 有机改性剂的种类和浓度对对映体分离的影响

分别选用不同比例的甲醇、乙腈、四氢呋喃作为有机改性剂 ,考察有机改性剂的种类和浓度对对映体分离的影响。实验结果表明 ,四氢呋喃更有利于对映体的分离。流动相中四氢呋喃的比例对对映体分离的影响较大。随着流动相极性的减弱 ,两对映体的保留因子 k 和分离度 R_s 都增加(见表 1)。流

表 1 流动相中四氢呋喃的比例对分离泰妥拉唑对映体的影响
Table 1 Influence of tetrahydrofuran (THF) content in mobile phase on the chiral separation of tenatoprazole enantiomers

$V(0.02\text{ mol/L NH}_4\text{Ac}) : V(\text{THF})$	k_1	k_2	α	R_s
85:15	2.26	2.47	1.09	0.83
90:10	3.44	3.90	1.13	1.15
93:7	4.27	4.89	1.15	1.68
95:5	5.53	6.38	1.15	1.78

Enantiomers were not identified because of no standard samples.

动相中加入有机改性剂影响溶质在色谱柱上的保留行为和手性作用,这是改性剂和溶质竞争固定相上作用点的结果。随着流动相中四氢呋喃的比例增加,溶质与固定相之间的作用减弱,保留因子 k 和分离度 R_s 都减小。在保证对映体达到基线分离的前提下,为使色谱分离时间尽量短,本实验确定流动相中四氢呋喃的比例为 7%。

2.1.3 柱长对对映体分离的影响

在流动相为 0.02 mol/L 醋酸铵缓冲溶液(pH 6.0)-四氢呋喃(体积比为 93 : 7)、流速为 0.5 mL/min、柱温为 20 ℃ 的色谱条件下 ,考察了 Chirobiotic V 色谱柱(150 mm × 4.6 mm ,5 μm 和 250 mm × 4.6 mm 5 μm)同一类型不同色谱柱长度对对映体分离的影响。实验结果表明 ,柱长对两个对映体分离有明显的影响。在 250 mm 柱长条件下 ,两个对映体分离度 R_s 达到 2.16 ,但分析时间需要 60 min 以上。这是因为色谱柱越长 ,两个对映体与固定相作用时间越长 ,保留时间和分离度都增大 ,两个对映体表现出更大的色谱行为差异。考虑到分析时间要适当 ,本文选择 150 mm 柱长的 Chirobiotic V 色谱柱为分离柱。

2.1.4 温度对对映体分离的影响

在 Chirobiotic V 色谱柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm)、流动相为 0.02 mol/L 醋酸铵缓冲溶液(pH 6.0)-四氢呋喃(体积比为 93:7)、流速为 0.5 mL/min 的色谱条件下,在 15 ~ 30 °C 范围内,考察了温度对对映体分离的影响。在每一个设定温度下,将色谱柱平衡 30 min。实验结果表明,温度对对映体分离的影响较大。在考察的温度范围内,随着温度的升高,保留因子 k 和分离度 R_s 都减小,说明低温有利于对映体的分离(见表 2)。按照 Armstrong 等^[5]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:

$$\ln \alpha = -\Delta_{R,S}\Delta H^0/(RT) + \Delta_{R,S}\Delta S^0/R$$

在本实验考察温度 15 ~ 30 °C 范围内, $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $\ln \alpha = 155.1 T^{-1} + 0.3897$ ($r = 0.9985$), 计算出 $\Delta_{R,S} \Delta H^0$ 、 $\Delta_{R,S} \Delta S^0$ 值分别为 -1.30 kJ (-0.31 kcal) 和 -3.22 J (-0.77 cal), 说明泰妥拉唑对映体和固定相之间的各种作用均为焓控过程。 $\Delta_{R,S} \Delta H^0$ 的绝对值为 1.30 kJ (0.31 kcal), 按照 Küsters 等^[6]认为手性识别主要因为立体障碍、弱的 $\pi - \pi$ 作用和弱的氢键作用。

表 2 温度对分离泰妥拉唑对映体的影响
Table 2 Influence of temperature on the chiral separation of tenatoprazole enantiomers

Temperature/°C	k_1	k_2	α	R_s
15	4.88	5.66	1.16	1.74
20	4.35	5.00	1.15	1.68
25	3.78	4.29	1.14	1.62
30	3.38	3.81	1.13	1.57

2.2 泰妥拉唑对映体分离的重复性

在优化的色谱条件下将 0.1 mg/L 泰妥拉唑试样连续重复进样 6 次,两个对映体保留时间的相对标准偏差分别为 0.48% 和 0.49%,峰面积的相对标准偏差分别为 0.45% 和 0.55%。

参考文献：

- [1] Ding G S , Tang A N , Wang J D , Cong R Z , Bao J M . Chinese Journal of Chromatography (丁国生,唐安娜,王俊德,丛润滋,包建民. 色谱), 2006 , 24(1) : 46
- [2] Shin J M , Homerin M , Domagala F , Fichoux H , Sachs G . Biochem Pharmacol , 2006 , 71 : 837
- [3] Galmiche J P , Des Varannes S B , Ducrotte P , Sacher-Huvelin S , Vavasseur F , Taccoen A , Fiorentini P , Homerin M . Aliment Pharmacol Ther , 2004 , 19(6) : 655
- [4] Hunt R H , Armstrong D , James C , Chowdhury S K , Yuan Y H , Fiorentini P , Taccoen A , Cohen P . Am J Gastroenterol , 2005 , 100(9) : 1 949
- [5] Berthod A , Li W Y , Armstrong D W . Anal Chem , 1992 , 64 : 873
- [6] Kusters E , Spondlin C . J Chromatogr A , 1996 , 737 : 333