

反相离子对色谱法分析阿仑膦酸酰胺化衍生物*

卢婷利¹, 胡惠静¹, 陈涛^{1,2}, 马玉樊¹

(1. 西北工业大学生命科学院空间生物模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072 2 陕西脂质体研究中心, 西安 710075)

摘要 目的: 建立高效液相色谱分析亲脂性阿仑膦酸酰胺化衍生物的方法。方法: 采用反相离子对色谱法、示差折光检测器, 以 Agilent CLC- ODS C₁₈ 为固定相, 流动相为甲醇-水(含 5 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢铵, 2 mmol·L⁻¹ 十二烷基三甲基溴化胺, pH 7.2), 两者比例为 75:25 等度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 衍生物与其他物质分离良好, 方法在 0.5~30 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好 (r=0.9994), 回收率为 98.3%, RSD=0.4% (n=6)。结论: 该方法操作简单方便, 重复性较好, 结果令人满意, 可用于阿仑膦酸钠衍生物的分析。

关键词 阿仑膦酸钠; 酰胺化衍生物; 亲脂性; 反相离子对色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0627-04

Antiphase ion-pair HPLC determination the hydrophobic amidated derivatives of alendronate sodium*

LU Ting-li¹, HU Hui-jing¹, CHEN Tao^{1,2}, MA Yu-fan¹

(1 Key Laboratory for Space Biosciences & Biotechnology Faculty of Life Science Northwest Polytechnical University, Xi'an 710072 China

2 Liposome Research Centre of Shaanxi Province Xi'an 710075 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination content of hydrophobic bisphosphonate derivatives. **Method** Agilent C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the isocratic elution using aqueous solution (containing 5 mmol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate and 2 mmol·L⁻¹ dodecane tributyl bromination amine, pH 7.2) - methanol (25:75) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and determined by differential refractive index detector. **Results** The derivatives could be baseline separated and the calibration curve was linear in the range of 0.5-30 mg·L⁻¹ (r=0.9994). The average recovery was 98.3%, precision (RSD) was 0.4% (n=6). **Conclusion** This method is rapid, accurate, sensitive and can be used for determination of the content of hydrophobic bisphosphonate derivatives.

Key words alendronate sodium; amidated derivatives; hydrophobicity; antiphase ion-pair HPLC

阿仑膦酸钠 (alendronate sodium) 是第三代羟基二膦酸盐类骨吸收抑制制剂, 与骨内羟基磷灰石有强亲和力, 是一种骨代谢调节剂^[1-3]。从二膦酸盐抗骨吸收的机理来看, 二膦酸盐起作用是通过细胞膜, 被细胞内吞后在细胞内发挥作用, 而不是在细胞外发挥作用, 所以亲脂性高, 药物穿透细胞的能力就强, 药效就更显著^[4,5]。为此, 我们设计并制备了一种分子中含有较长烷基链的阿仑膦酸盐酰胺化衍生物, 其结构如图 1 所示。与阿仑膦酸钠分子相比, 酰胺化衍生物分子中带有较长的烷基链, 其疏水性增加, 有利于药物穿透细胞膜而发挥作用。

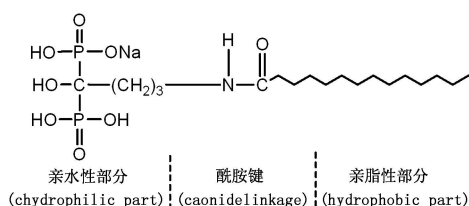


图 1 阿仑膦酸钠酰胺化衍生物分子设计图

Fig 1 Design chemical molecular structure of amidated alendronate sodium derivatives

一种新型化合物的合成, 离不开分析方法的建立, 本文在结合阿仑膦酸钠分析方法的基础上^[6,7],

* 国家自然科学基金 (20872119); 中国博士后科学基金资助项目 (20060390322)

第一作者 Tel: (029) 88491817 Fax: (029) 88460332 E-mail: lutinglixin@nwpu.edu.cn

采用离子对反相高效液相色谱法, 配以示差折光检测器, 建立了阿仑膦酸钠酰胺化衍生物的方法。测试结果表明, 该法操作简便快速, 特异性好, 不需复杂的样品处理过程, 为酰胺化衍生物的常规检查及质量控制提供了简便可靠的分析手段。

1 仪器与药品

Waters-2986 高效液相色谱仪 (美国光谱物理公司), Waters-2410 示差折光检测器, HW-2000 色谱工作站 (南京千谱软件有限公司)。阿仑膦酸钠原料药 (含量为 98.5%, 西安华萃生物技术有限责任公司); 甲醇为色谱纯 (Tedia 公司, 美国); 磷酸二氢铵、四丁基溴化胺、十二烷三丁基溴化胺均为分析纯; 试验用水均使用二次重蒸水。

2 色谱条件

色谱柱: 反相 Agilent CLC-ODS C_{18} 高效液相柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)。HPLC 条件: 流动相为甲醇-水溶液 (含 5 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢铵, 2 mmol·L⁻¹ 四丁基溴化胺, 调节 pH 至 7.2 左右), 两者按不同的体积比进样。浓度: 1.0 mg·mL⁻¹, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 20 μ L, 柱温: 室温 ~ 50 °C, 检测器: 示差折光检测器。

3 溶液的配制

3.1 对照品溶液 精密称取阿仑膦酸钠对照品 10 mg 加至 10 mL 量瓶中, 用水溶解并定容到刻度, 超声 10 min 制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的溶液。

3.2 供试品溶液 精密称取阿仑膦酸钠衍生物 10 mg 加至 10 mL 量瓶中, 用流动相溶解并定容到刻度, 超声 10 min 制成 1.0 mg·mL⁻¹ 的溶液。

4 方法与结果

4.1 色谱结果 图 2 是阿仑膦酸钠 (ALN)、脂肪酸 (十二酸) 以及相应的阿仑膦酸盐衍生物 (BP-C12) 分别进样的色谱图。在相同的条件下, 阿仑膦酸钠的出峰时间是 6.08 min 而十二酰胺衍生物的出峰时间是 7.12 min, 也就是相对于阿仑膦酸钠而言, 酰胺化衍生物极性降低, 出峰时间延长。

将 3 种化合物样品混合, 按照上述色谱条件测定, 其色谱图如图 3 所示, 结果表明, 反应起始原料与合成的衍生物均能有效分离。

图 4 是带有不同烷基链长的阿仑膦酸钠衍生物 (BP-C₁₂、BP-C₁₄、BP-C₁₆) 的色谱图对比情况, BP-C₁₂ 的出峰时间 7.12 min, BP-C₁₄ 的出峰时间是 7.42 min, BP-C₁₆ 的出峰时间是 8.79 min, 体现了这 3 种衍生物在极性上的差异。事实上这 3 种衍生物的不同之处在于其分子中引入的烷基链长短

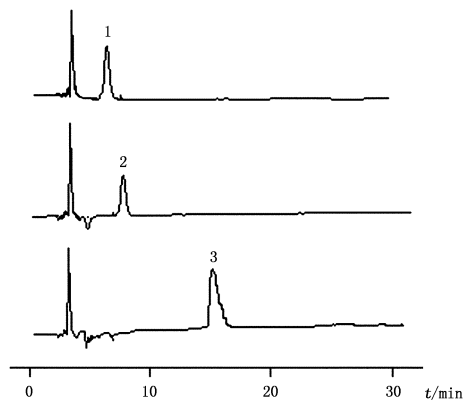


图 2 阿仑膦酸钠、脂肪酸以及衍生物的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of alendronate sodium, fatty acid and derivatives

1. 阿仑膦酸盐 (alendronate) 2 阿仑膦酸脂肪酰胺衍生物 (alendronate fatty amide derivative) 3 脂肪酸 (fatty acid)

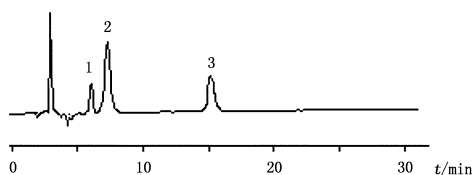


图 3 阿仑膦酸脂肪酰胺衍生物的 HPLC 系统适应性分离度图

Fig 3 HPLC chromatogram of system suitability of alendronate fatty amide derivative

1. 阿仑膦酸盐 (alendronate) 2 阿仑膦酸脂肪酰胺衍生物 (alendronate fatty amide derivative) 3 脂肪酸 (fatty acid)

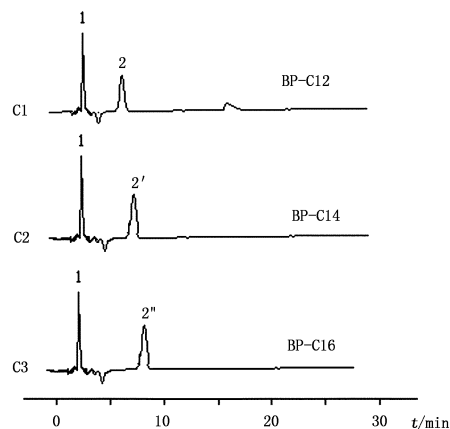


图 4 不同烷基链长阿仑膦酸钠衍生物的 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC spectra of alendronate sodium derivatives with different alkyl introduced

1. 溶剂 (Solvents) 2 十二酰胺衍生物 (Derivatives BP-C₁₂) 2'. 十四酰胺衍生物 (Derivatives BP-C₁₄) 2''. 十六酰胺衍生物 (Derivatives BP-C₁₆)

不同, BP-C₁₆ 通过酰胺键在分子中引入了 16 碳原子, 因而其极性最弱, BP-C₁₄ 次之, BP-C₁₂ 引入的分子链最短, 因而极性最强, 在反相色谱图上, 在相

同的条件下, 出峰时间与物质的分子极性有关, 极性越弱, 其出峰时间越晚。

4.2 线性关系试验 精密称取二膦酸盐衍生物 250 mg 置 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 精密量取 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件, 分别进样 50 μ L, 记录色谱图。以二膦酸盐衍生物浓度 C ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 回归方程为:

$$A = 1.8608C + 4.5666 \quad r = 0.9994$$

本品在 0.5~30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内呈良好线性关系, 最低检测限 (LOD) 为 0.02 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($SN \geq 5$)。

4.3 精密度试验 取浓度为 1.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿仑膦酸钠供试品溶液, 连续进样分析 5 次, 测定峰面积, 计算得峰面积的 RSD 为 0.35%。

4.4 稳定性试验 取浓度为 1.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿仑膦酸钠供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 测定, 所得峰面积的 RSD 为 0.62%, 说明阿仑膦酸钠溶液在 8 h 内稳定。

4.5 回收率试验 按“3.1”项下方法, 将阿仑膦酸衍生物配制成 1~5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的一系列溶液, 依上述色谱条件进行测定, 测得 6 次结果的平均回收率为 98.3%, RSD = 0.4% ($n = 6$), 结果详见表 1。

表 1 阿仑膦酸钠酰胺化衍生物回收率试验结果

Tab 1 Recovery results of alendronate sodium derivatives

加入量 (added amount) / μg	测得量 (measured amount) / μg	回收率 (recovery) / %	平均回收率 (average recovery) / %	RSD / %
50	48.75	97.5	98.3	0.4
37.6	37.07	98.6		
30.1	29.62	98.4		
24.9	24.50	98.4		
20.1	19.84	98.7		
9.9	9.72	98.2		

5 讨论

5.1 衍生物分子结构与色谱行为关系分析 从图 5 阿仑膦酸钠与衍生物分子结构来看, 阿仑膦酸钠分子中含有较多的亲水性基团, 疏水性基团相对较少, 衍生物由于分子中带有较长的烷基链而疏水性有所增加, 衍生物在反相固定相保留时间要长于二膦酸盐, 其出峰时间应该晚于二膦酸盐。另外, 由于 2 个磷酸根基团在水溶液中均可发生解离, 因此在流动相中膦酸盐实际上是以游离态和解离态多种

形式存在的, 所以在采用反相柱子时, 需要加入一些离子对。

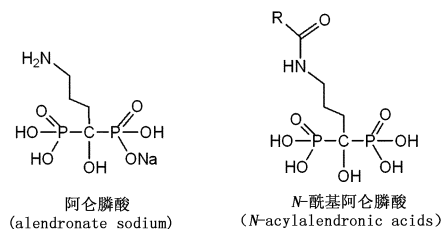


图 5 阿仑膦酸钠与衍生物分子结构

Fig 5 Chemical structure of alendronate sodium and its derivatives

5.2 离子对试剂的选择 由于阿仑膦酸钠在流动相中主要以阴离子的形式存在, 因此采用与呈阳离子的离子对试剂形成离子对的方法可以延长阿仑膦酸钠的出峰时间。在测定阿仑膦酸钠时, 我们选用四丁基溴化胺作为色谱系统的离子对试剂。而在同样的条件下, 对于阿仑膦酸钠的衍生物, 在选用四丁基溴化胺时效果不理想, 由于衍生物分子中含有较长的烷基链, 所以我们选用十二烷基溴化胺作为衍生物的离子对试剂, 具有较长烷基链的十二烷基溴化胺作为其离子对试剂可以较好的增加衍生物在反相柱上的保留时间, 延长出峰时间。

5.3 保留时间与引入烷基链长的关系 阿仑膦酸酰胺化衍生物在反相柱上的保留时间与其分子中引入的烷基链长有关, 引入的烷基链越长, 衍生物在柱上的保留时间越长, 据此以引入的烷基链中碳原子数为横坐标, 保留时间为纵坐标, 可以建立一个半经验公式, 即衍生物在反相柱上的保留时间与分子中引入碳原子个数 N 之间存在关系式:

$$t = 0.415N + 1.965$$

可见, 衍生物在反相柱上的保留时间与其分子中引入的碳原子数目成线性关系, 也就是说, 在一定的条件下, 分子中引入的碳原子数越多, 烷基链越长, 衍生物的脂溶性越强, 其保留时间就相应地增加。由于衍生物的保留时间是化合物极性的一个体现, 烷基链越长, 分子极性越弱, 亲脂性越强, 脂溶性增加, 相应其与细胞的亲和力增强。据此, 我们可预见, 酰胺化衍生物作为一种新型的抗骨吸收的二膦酸盐类药物, 其药效的提高值得我们期待和进一步关注。

参考文献

1. Fried Saad B. Bisphosphonates Can prevent skeletal complications of malignant bone disease from prostate cancer and renal cell carcinoma *Eur Urol Suppl*, 2007, 6(11): 683
2. Molinuevo MS, Bruzzone L, Cortizo AM. Alendronate induces anti-

- migratory effects and inhibition of neutral phosphatases in UMR106 osteosarcoma cells *Eur J Pharmacol* 2007, 562(1-2): 28
- 3 Payer J, Killinger Z, ulkov I *et al* Therapeutic adherence to bisphosphonates *Biomed Pharmacother* 2007, 61(4): 191
 - 4 Monteil M, Guenin E, Mignani E, *et al* Bisphosphonate prodrugs synthesis of new aromatic and aliphatic 1-hydroxy-1,1-bisphosphonate partial esters *Tetrahedron* 2005, 61(31): 7528
 - 5 Ezra A, Breuer E, Amilon G, *et al* Peptidyl prodrug of bisphosphonates for improved oral absorption. *J Med Chem* 2000, 43(20): 3641
 - 6 JIANG Ye(蒋晔), XIE Zan(谢赞), ZHANG Xiao-qing(张晓青). Analysis of diphosphonic acid drugs in the biological specimens(生物样品中双膦酸类药物的分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(5): 597
 - 7 XIE Zan(谢赞), JIANG Ye(蒋晔), TIAN Shu-xia(田书霞). RPIC-ELSD determination of pamidronate and its related substances (反相离子对色谱-蒸发光散射法测定帕米膦酸钠及其有关物质). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(12): 1729

(本文于 2008 年 7 月 14 日修改回)

英国国家生物制品检定所 Robin Thorpe 博士一行应邀访问中检所

应中国药品生物制品检定所李云龙所长的邀请,英国国家生物制品检定所(NBSC)治疗类生物制品处处长 Robin Thorpe 博士和细胞与生长因子室主任 Meenu Wadhwa 博士于 2009 年 2 月 24-25 日对我所进行了正式友好访问。

李云龙所长对两位资深专家的来访表示热烈的欢迎。李云龙所长说,去年 NBSC 所长访问我所,双方都表达了加强合作交流的强烈愿望,此次两位资深专家的来访必将进一步推进两所之间的合作与交流,由于两位专家还是世界卫生组织(WHO)专家,希望在国际事务中双方可以相互帮助和支持。李云龙所长表示双方至少可以在以下几个方面进一步加强合作:1.生物制品标准物质的协作标定。我所希望参与双方以及国际间的一些协作标定,为此做出我们的贡献,加强与 NBSC 相互学习交流。2.加大人才培养合作力度。就我所感兴趣的领域派员去 NBSC 进修和合作研究,也希望 NBSC 派员来我所进行学术交流,促进双方生物制品质量控制水平的提高。3.批签发工作相关方面。双方在各自特点的基础上相互探讨,吸取对方优点,完善批签发工作,并在新技术、新方法上进行交流取得进一步的提高。

双方进行了为期两天的学术交流活动。两位 NBSC 资深专家就治疗类生物制品相关领域做了专题介绍。王军志副所长向外宾简要介绍了我所组织结构,职能职责、国际合作及生物制品批签发等内容。我所治疗类生物制品相关科室重组技术产品室、血液制品室和生化药品及基因工程药物室等也介绍了各自科室有关重组技术产品的质量控制,双方围绕相互关心的问题进行了热烈地交流讨论。英方专家参观了我所重组技术产品室、血液制品室、生化药品及基因工程药物室和中药标本馆。最后,双方就具体合作内容进行了详细讨论,在 2008 年双方所长签署的 MOU 框架下,就扩大标准品国际协作标定、双方共同感兴趣的研究项目、人员培训、邀请英方专家来我所讲学和参加我所 2009 年在北京举办的“生物制品质量控制与批签发国际会议”和建立工作协调机制五个方面进一步加深合作。

(中国药品生物制品检定所外事处、生检处供稿)