

高效毛细管电泳法分离氟西汀和联苯苄唑的对映体

滕怀凤*,李尚颖,刘慧颖(辽宁省药品检验检测院,沈阳 110023)

中图分类号 R917;R978.5;R971⁺.43 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)29-2756-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.29.23

摘要 目的:建立拆分氟西汀和联苯苄唑两种药物手性对映体的方法。方法:采用高效毛细管电泳法,以羧甲基-β-环糊精(CM-β-CD)为手性选择剂,以未涂层熔融石英毛细管柱为分析柱,重力进样5 s,高度差10 cm,柱温20 ℃。分别对缓冲盐浓度、手性选择剂的浓度、缓冲盐的pH、分离电压进行考察,确定两种药物最佳分离条件;并以分离度为指标对两种药物的原料药进行分离验证试验。结果:氟西汀对映体在pH 4.5的30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲溶液(含1.0% CM-β-CD)为运行电解质时达到最佳分离,分离度为3.70;联苯苄唑对映体在pH 3.0的30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲溶液(含1.0% CM-β-CD)为运行电解质时达到最佳分离,分离度为5.44。方法精密度的RSD均≤0.9%(n=6)。结论:CM-β-CD的加入对氟西汀和联苯苄唑有很高的对映体选择性,可有效分离两种药物;建立的方法精密度好、经济、简便、快捷。

关键词 高效毛细管电泳法;氟西汀;联苯苄唑;手性分离;羧甲基-β-环糊精

Separation of Fluoxetine and Bifonazole Enantiomer by High Performance Capillary Electrophoresis

TENG Huai-feng, LI Shang-ying, LIU Hui-ying (Liaoning Provincial Institute for Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the separation of chiral enantiomers of fluoxetine and bifonazole. METHODS: High performance capillary electrophoresis was established using carboxymethyl-β-cyclodextrin (CM-β-CD) as chiral selective agent; the separation of enantiomers was performed on uncoated fused-silica capillary column with gravity sampling time of 5 s, height difference of 10 cm and column temperature of 20 ℃; the concentration and pH value of phosphate buffer, the concentration of chiral selective agent and the separation voltage were investigated, and the optimal separation condition of 2 kinds of drugs were determined. The validation test of 2 kinds of raw materials was conducted using separation rate as index. RESULTS: Under the optimal conditions, the resolutions of fluoxetine and bifonazole enantiomers were 3.70 and 5.44 by using 30 mmol/L NaH₂PO₄ buffer solution (pH 4.5 and 3.0, containing 1.0% CM-β-CD) as running electrolyte, respectively. RSD of method precision was ≤ 0.9% (n=6). CONCLUSIONS: CM-β-CD is high enantio-selective for the fluoxetine and bifonazole and can separate them effectively. The method is accurate, economical, convenient and rapid.

KEYWORDS High performance capillary electrophoresis; Fluoxetine; Bifonazole; Chiral separation; Carboxymethyl-β-cyclodextrin

不同的立体异构体在体内的药理学、药动学和毒理学性质不同,并表现出不同的治疗作用与不良反应,因此对映体的分离具有重要意义^[1]。拆分光学对映体的方法有很多种,常用

的高效液相色谱法有的采用手性柱进行分离^[2],但采用手性柱分离费用高,适合的种类少,柱效比较低,无法满足众多手性药物分离的需要。高效毛细管电泳(HPCE)法是近十几年高

该方法操作简单,线性、重复性、回收率、精密度均较好,可作为右旋兰索拉唑缓释胶囊的光学纯度测定方法。

参考文献

- [1] 兰聪贤,刘倩,周燕文.兰索拉唑肠溶片健康人体药动学研究[J].中国药房,2007,18(8):588.
- [2] 金荣庆,刘树芳,陈小玲.R-兰索拉唑的合成[J].中南药学,2011,9(9):667.
- [3] 房超,包冰初,陈庆华.右旋兰索拉唑双相控释制剂的药动学研究及其临床疗效[J].世界临床药物,2011,32(7):428.
- [4] 张义文,宋航,林凡,等.手性固定相HPLC法拆分3-叔丁

- 基己二酸对映体[J].分析测试学报,2010,29(7):739.
- [5] 翁文,姚碧霞,陈秀琴,等.液相色谱手性拆分机理的热力学方法研究[J].化学进展,2006,18(7):1 056.
 - [6] Toribio L, del Nozal MJ, Bernal YL, *et al.* Semipreparative chiral supercritical fluid chromatography in the fractionation of lansoprazole and two related antiulcer drugs enantiomers[J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(8):1 307.
 - [7] Andersson S, Nelander H, Ohlen K. Preparative chiral chromatography and chiroptical characterization of enantiomers of omeprazole and related benzimidazoles[J]. *Chirality*, 2007, 19(9):706.

*主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:024-25435807。E-mail:nicole.teng@163.com

(收稿日期:2013-09-27 修回日期:2013-11-25)

速发展起来的一种现代分离分析技术^[3-4],基本原理是在电场作用下,以毛细管为通道,依据离子迁移速度的差异实现对不同立体异构体的分离,具有简便、快速、高效的优点^[5]。在HPCE法手性拆分中,环糊精(CD)及其衍生物是应用最广泛的手性选择剂^[6]。虽有文献报道以羧甲基-β-环糊精(CM-β-CD)为手性选择剂拆分氟西汀^[7]对映体,但本方法与其采用的背景电解质及试验条件不同,且可以使氟西汀对映体分离度更高,分离效果更好,从而更适用于如有关物质检查等方面的应用。

联苯苄唑系广谱抗真菌药,其对映体未见有以CM-β-CD为手性选择剂、采用毛细管电泳法拆分的文献报道。因此,本文使用CM-β-CD作为毛细管电泳背景电解质手性选择剂,对氟西汀和联苯苄唑进行了对映体拆分研究。通过考察CM-β-CD浓度、pH、缓冲盐浓度、电压等因素对对映体分离的影响,确定最佳的电泳条件。

1 材料

1.1 仪器

CL1030型毛细管电泳仪,包括CL101A高压电源、CL1030紫外检测器、HW-2000色谱工作站(北京京陆科学仪器公司);pHS-3DC精密数显酸度计(上海科学公司)。

1.2 药品与试剂

CM-β-CD(天津博迪化工有限公司,批号:20100106);氟西汀(批号:100513-200401,纯度:100%)、联苯苄唑对照品(批号:100326-200201,纯度:100.0%)均来源于中国食品药品检定研究院;氟西汀原料药(礼来苏州制药有限公司,批号:1803A,纯度:100.0%)、联苯苄唑原料药(北京华泰制药有限公司,批号:112052,纯度:100.0%);其余试剂为分析纯;水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 毛细管电泳条件

分析柱:未涂层熔融石英毛细管柱(50 cm×50 μm)。

背景电解质:配制30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲盐溶液,加入一定量的CM-β-CD,用H₂PO₄调节至所需pH,经0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。进样方式:重力进样5 s,高度差10 cm;分离电压:20 kV;检测波长:氟西汀226 nm,联苯苄唑254 nm;中性标记物:丙酮;柱温:20 ℃。新毛细管柱用1.0 mol/L NaOH溶液冲洗10 min,然后用水冲洗5 min。试验开始前,依次用0.1 mol/L NaOH溶液、水、背景电解质溶液冲洗10 min;进样间用背景电解质溶液冲洗3 min后进行下次进样。

2.2 溶液的配制

氟西汀和联苯苄唑对照品用甲醇溶解并稀释制成1.0 mg/ml溶液,运行时用背景电解质溶液稀释至质量浓度为0.1 mg/ml。取氟西汀原料药和联苯苄唑原料药适量,加甲醇溶解并稀释制成1.0 mg/ml的溶液,运行时用背景电解质溶液稀释至质量浓度为0.1 mg/ml。

2.3 分离条件的选择

2.3.1 CM-β-CD浓度对分离的影响。CM-β-CD等手性选择剂的浓度是影响分离效果的一个重要因素,因为其可与手性药物形成包合物,被包合的对映体由于构型或构象的不同,在包合作用力上有差别,进而实现对映体分离^[8]。笔者考察了氟

西汀在pH 4.5的30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲盐溶液条件下,联苯苄唑在pH 3.0的30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲盐溶液条件下,CM-β-CD浓度分别为0.2%、0.5%、1.0%、2.0%(g/ml)时,对氟西汀和联苯苄唑对映体分离度的影响,结果见图1。

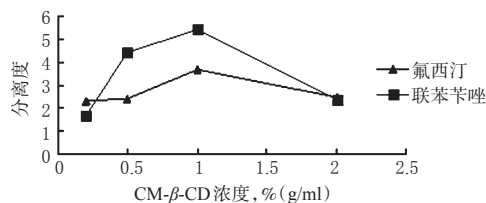


图1 CM-β-CD浓度对两种药物对映体分离度的影响

Fig 1 Effects of CM-β-CD concentration on the enantiomeric separation of the two drugs

从图1中可见,CM-β-CD浓度为1.0%时,氟西汀和联苯苄唑对映体分离度达到最大。继续升高CM-β-CD浓度,分离度出现减小趋势。这可能是随着手性选择剂浓度的增加,手性选择剂与两对映体之间的相互作用的程度增加,有利于对映体与手性选择剂之间形成络合物所致。但当浓度过高时形成的两种络合物的差异程度减小,故分离度随之减小^[8]。因此,CM-β-CD最佳浓度确定为1.0%。

2.3.2 pH对分离的影响。在HPCE分离中,电解质溶液的pH可影响电渗流的大小以及手性药物的荷电情况,从而影响对映体与手性选择剂的相互作用及对映体的分离^[9]。氟西汀和联苯苄唑均为碱性药物,在酸性条件下质子化而带正电荷,其电泳方向与电渗流方向相同。CM-β-CD是一种阴离子修饰的CD,在缓冲液中因电离而变为带有负电荷的阴离子,其电泳方向与手性分子相反^[7]。在pH 2.5~6.5范围内,被分离样品质子化程度随pH的增大而逐渐减小,CM-β-CD的电离度迅速增加,使两者之间相互作用的几率增大。在适宜的pH时可以达到理想的分离效果。本试验在30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲盐溶液中加入1.0% CM-β-CD,考察了pH分别为2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.5时对对映体分离的影响。结果在pH 4.5时氟西汀对映体的分离度达到最大;在pH 3.0时联苯苄唑对映体的分离度达到最大,结果见图2。

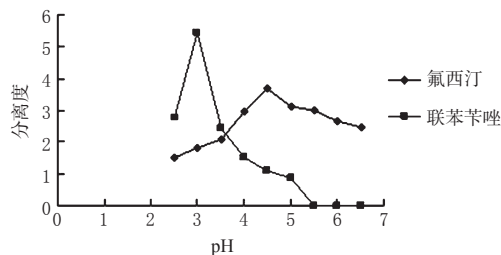


图2 pH对两种药物对映体分离度的影响

Fig 2 Effects of pH value on resolution of the two drugs

2.3.3 缓冲盐浓度对分离的影响。缓冲盐的浓度对改善分离、抑制吸附、控制焦耳热等均有影响。保持其他条件不变,笔者考察了不同浓度的NaH₂PO₄缓冲盐溶液对对映体分离的影响。结果表明,NaH₂PO₄的浓度为20、30、60 mmol/L时,分离度呈现先增加后减小的趋势。缓冲盐浓度为30 mmol/L时,分离度达到最大。这可能是由于缓冲盐浓度增大,减小了组

分与管壁的相互作用,增加了对映体与手性选择剂的相互作用所致。当缓冲盐浓度增至60 mmol/L时,由于离子强度的过度增加,使电流增大,焦耳热增大,分离度下降。因此最终确定缓冲盐浓度为30 mmol/L,结果见表1。

表1 缓冲盐浓度对两种药物对映体分离度的影响

Tab 1 Effects of different concentration of phosphate buffer on the resolutions of the two drugs

药物	20 mmol/L	30 mmol/L	60 mmol/L
氟西汀	2.32	3.70	3.45
联苯苄唑	2.78	5.44	5.11

2.3.4 电压对分离的影响。考察了分离电压为15、20、25 kV时对分离度的影响。结果表明,增加电压可缩短分离时间,但同时电泳电流值增加导致焦耳热增加,柱效和分离度反而下降。综合考虑,选择分离电压为20 kV,结果见表2。

表2 电压对两种药物对映体分离度的影响

Tab 2 Effects of different voltage on the resolutions of the two drugs

药物	15 kV	20 kV	25 kV
氟西汀	3.69	3.70	3.01
联苯苄唑	5.45	5.44	4.78

2.4 方法验证

2.4.1 仪器精密度。取氟西汀对照品溶液和联苯苄唑对照品溶液,在“2.3”项条件下分别进样6次,结果表明,氟西汀和联苯苄唑的精密度良好,RSD均 $\leq 0.9\%$ ($n=6$)。

2.4.2 验证结果。取氟西汀原料药溶液和联苯苄唑原料药溶液适量,按“2.2”项下方法制备,在“2.3”项条件下对氟西汀原料药和联苯苄唑原料药进行拆分,结果对映体分离图见图3。

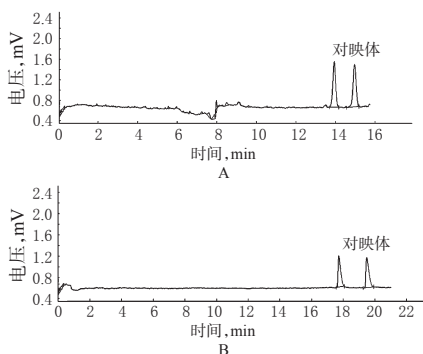


图3 2种样品对映体分离图

A. 氟西汀; B. 联苯苄唑

Fig 3 Electrophoresis of the separation of 2 enantiomers samples

A. fluoxetine; B. bifonazole

综上所述,以pH 4.5的30 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲盐溶液(含1.0%CM- β -CD的手性选择剂)为运行电解质,氟西汀对映体达到最佳分离,分离度为3.70;以pH 3.0的30 mmol/L NaH_2PO_4

缓冲盐溶液(含1.0%CM- β -CD的手性选择剂)为运行电解质,联苯苄唑对映体达到最佳分离,分离度为5.44。

3 讨论

手性选择剂的种类和浓度、背景电解质的pH和离子强度是影响药物对映体分离的主要因素。本试验对CM- β -CD浓度、pH、缓冲盐浓度等条件进行优化,结果在优化的电泳条件下,氟西汀、联苯苄唑的对映体达到了完全分离,分离度分别为3.70和5.44。该方法的建立为氟西汀和联苯苄唑对映体的分离分析奠定了基础。CM- β -CD在背景电解质中电离而带负电,带正电的胺基与CM- β -CD外缘带负电的羧甲基产生较强的静电作用。除此之外,对于阴离子型CD类手性选择剂,主体和客体分子之间还可能存在着疏水作用、范德华力(包括偶极-偶极、偶极-诱导偶极和色散力)、氢键作用等作用力,这些作用力促进了CD分子对客体分子的包合作用,使药物两个对映体之间包合作用的差值变大,分离度变大,从而使两种药物各自的对映体得到很好的分离^[8]。

在本文的研究中,由于采用的是正极进样负极检测方式,CM- β -CD分子带负电,向正极移动;分析物分子带正电,向负极移动(与电渗流方向一致),故其之间的相对运动也有利于主客体之间的相互作用,这也是采用阴离子型CD衍生物分离碱性药物的优势之一。

参考文献

- [1] Nguyen LA, He H, Phar-Huy C. Chiral drugs: an overview[J]. *Int J Biomed Sci*, 2006, 2(2): 85.
- [2] 白宝清. Chiralcel OD-RH手性柱拆分卡维地洛对映体[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(4): 585.
- [3] 李云, 赵胜芳, 崔瑞杰, 等. β -环糊精/离子液体/毛细管电泳法拆分3种手性药物[J]. *中国药房*, 2013, 24(25): 2280.
- [4] 杨千姣, 刘丹, 曲蕾, 等. 手性拆分技术及其在手性药物合成中的应用新进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(6): 429.
- [5] 孔德志, 张兰桐. 手性选择剂在高效毛细管电泳手性分离中的应用与进展[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(1): 153.
- [6] 郑志侠, 汪家权, 程红, 等. 基于环糊精手性选择剂的几种手性药物对映体的毛细管电泳拆分[J]. *化学研究*, 2010, 21(1): 76.
- [7] 周婕, 李颖慧, 邵红, 等. 羧甲基- β -环糊精用于5种苯乙胺类药物的毛细管电泳拆分[J]. *郑州大学学报: 理学版*, 2012, 44(1): 92.
- [8] 李学仁, 程庆春, 杨跃伟, 等. 羧甲基- β -环糊精用于若干手性药物的毛细管电泳拆分[J]. *中国药科大学学报*, 1998, 29(3): 210.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-31)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅