

• 药物分析 •

羟丙基-β-环糊精—毛细管电泳法分离伪麻黄碱

周大铮¹, 姜子洋¹, 武向峰¹, 刘荔荔¹, 张国庆², 柴逸峰¹ (1. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433; 2. 东方肝胆外科医院, 上海 200433)

摘要: 目的: 本文选择立体异构体伪麻黄碱(1S, 2S) - (-) 和(1R, 2R) - (+) 进行 CE 手性分离, 系统考察了分离条件的影响与优化, 并建立准确、可靠、快速的分析方法。方法: 毛细管柱: 50 μ M (I. D.) \times 60 cm (Ld); 紫外检测波长 214nm; 电泳条件: 分离电压 20kV; 温度 25 $^{\circ}$ C; 虹吸进样, 高度 10cm, 时间 3s; 分离用缓冲液为 25mmol/L 的 Tris- 磷酸缓冲液, 含 35mmol/L 的羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD), pH 2.94。结果: 伪麻黄碱得到的最佳分离条件: 分离电压 20kV; 温度 25 $^{\circ}$ C; 虹吸进样, 高度 10cm, 时间 3s; 紫外检测波长 214nm; 分离用缓冲液为 25mmol/L 的 Tris- 磷酸缓冲液, 含 35mmol/L 的 HP-β-CD, pH2.94。结论: 为开展此类药物对映体的研制和临床研究提供一种有效可靠的分析方法。

关键词: 羟丙基-β-环糊精; 毛细管电泳法; 伪麻黄碱

中图分类号: TQ460.7⁺ 2 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2001)01-0024-02

目前, 毛细管电泳的手性分离成为国际上的研究热点, 发展非常迅速。与目前常用的 HPLC 法相比, 毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 在手性分离分析中具有如下优势^[1]: 1. 高分离效率使具有较小的分离选择系数的对映体也可以达到满意的分离度, 且分离速度快; 2. 分离模式多, 且变换简便, 通过在背景电解质中加入不同或多种手性选择剂可以对手性化合物进行有效分离; 3. HPLC 法中许多对映体需经衍生化后分离, 而研究表明 CE 可直接分离大部分对映体; 4. HPLC 常用手性柱分离, 成本高, CE 所用的手性试剂, 消耗极少, 运行成本低, 环保好^[3]。伪麻黄碱是西药复方感冒药中的主要成分, 分子式见图 1, 目前, 有人工合成, 但与天然植物不同, 许多为消旋体, 需要拆分或手性合成。常用的含量测定方法^[2] 有比色法、紫外分光光度法、容量法、旋光法、气相色谱法等, 但这些方法无手性选择性。本文以 HP-β-CD 为手性选择剂, 利用 CE 技术对伪麻黄碱的对映体的手性分离进行了系统研究, 为开展此类药物对映体的研制及临床研究提供一种有效可靠的分析方法。

1 仪器与试剂

Waters Capillary Ion Analyzer, 50 μ M (I. D.) \times 60 cm (Ld) 空心熔融石英毛细管柱, 柱上紫外检测。消旋伪麻黄碱和右旋伪麻黄碱由华东理工大学化学工程学院提供, 纯度大于 99%。羟丙基-β-环糊精 (HP-β-CD) 纯度大于 98%。甲醇、磷酸和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均为分析纯, 水为重蒸馏水。

1.1 电泳条件

分离电压 20kV; 温度 25 $^{\circ}$ C; 虹吸进样, 高度 10cm, 时间 3s; 紫外检测波长 214nm; 分离用缓冲液为 25mmol/L 的 Tris- 磷酸缓冲液, 含 35 mmol/L 的 HP-β-CD, pH 2.94。

2 方法

2.3 样品制备

2.3.1 样品溶液的制备: 伪麻黄碱和右旋伪麻黄碱分别用甲醇溶解, 摇匀, 置冰箱中保存备用。

2.3.2 背景电解质 (BGE) 的配制: 吸取一定体积的 0.1mol/L 磷酸, 滴加 0.1mol/L Tris 至所需 pH 值, 然后加入适量蒸馏水得到一定浓度的磷酸- Tris 缓冲溶液。取适量手性选择剂 HP-β-CD 直接加入上述溶液中, 即得到含一定手性选择剂浓度的背景电解质溶液。

2.4 最低检测限的测定 配制一系列稀的对照品溶液, 按 1.1.2 所述条件, 以 S/N 为 3:1 测定最低检测限 (LOD)。

3 结果与讨论

3.1 最低检测限

以信噪比等于 3:1 为标准, 测定伪麻黄碱的最小检测浓度分别为 3 μ g/ml。

3.2 分离条件的影响与优化

3.2.1 手性选择剂对分离的影响

分别以 β-CD、羟丙基-β-CD 为手性选择剂, 我们考察了手性选择剂的浓度、pH 值、柱长和柱内径对分离选择性的影响, 发现用 β-CD 选择性较

差, 改变条件后均未能完全分离伪麻黄碱, 羟丙基-β- CD 对伪麻黄碱有较好的分离度。

3.2.2 手性选择剂浓度对分离的影响

在 25mmol/L 磷酸-Tris(pH 2.94) 缓冲溶液中加入不同浓度的手性选择剂以考察手性选择剂用量对手性分离效果的影响。结果表明以 HP-β-CD35mmol/L 作为手性选择剂的浓度, 从分离时间和分离度综合评价, 结果最佳。

3.2.3 缓冲溶液浓度对分离的影响

以 HP-β-CD35mmol/L 作为手性选择剂, 研究了磷酸-Tris(pH 2.94) 缓冲溶液浓度对上述药物的手性分离效果的影响, 实验发现, 浓度太低, 离子强度不够, 毛细管壁易吸附, 影响分离选择性, 浓度太高, 增加背景电解质溶液离子强度增加, 增加焦耳热, 增加扩散, 影响分离选择性。缓冲溶液的最佳浓度为 25mmol/L。

3.2.4 pH 对分离的影响

通过调节 pH 值, 可调节电泳中电迁移和电渗的平衡, 达到增加分离度的目的, 本文考察了背景电解质中磷酸-Tris 缓冲溶液的 pH 值(pH2.4~5.0) 对上述手性药物分离的影响。实验表明在 pH 2.94 时, 手性分离效果最好, 可能原因是极低 pH 值能很好地抑制电渗流, 增加伪麻黄碱和 HP-β-CD 的结合, 从而增加分离的选择性。

3.2.5 电压和电渗流的影响

考察了不同电压对分离的效率和分离选择性的影响, 电压过低, 分离效率低, 电压过大, 使电渗流过大引起高焦耳热, 不利于手性化合物与手性选择性包合形成, 影响分离选择性, 本文的最佳电压为 20kV。

3.2.6 有机溶剂

有机溶剂的加入褒贬不一, 它可能会和客体竞争 CD 空腔, 从而不利于客体-CD 的包合, 但另一方面, 它又有可能参与形成 CD- 客体- 溶剂三元包合物, 三元包合物一般比二元包合物更为稳定, 因此可以促进 CD 与客体的包合作用。这两种相反的作用同时存在, 其中产生的最终效果决定于哪种因素占主导地位。本文也考察了有机溶剂加入对分离的影响, 发现无明显影响, 故不加有机溶剂。

3.2.7 毛细管柱的壁、内径和长度的影响

为了抑制碱性药物被毛细管壁的硅醇基吸附, 降低电渗流, 增加分离选择性, 因此此类药物的手性分离多采用涂渍的毛细管柱, 但涂渍柱的推广和使

用重现性还存在一定困难, 本文采用未涂渍柱, 通过低 pH 值和增加离子强度也能有效地抑制吸附和电渗流, 达到满意的分离。

考察了 75μm 和 50μm 毛细管对分离选择性的影响, 实验表明 75μm 柱分离选择性差, 原因是同样离子强度的背景电解质, 相同电场电渗流远大于 50μm 柱, 引起焦耳热的增加, 限制了高电压的使用, 从而, 影响了 CE 的高分离效率, 50μm 柱的焦耳热低, 且散热平衡快, 可使用高电压和高离子强度的背景电解质溶液, 使消旋体伪麻黄碱能完全分离。柱长增加可增加柱效, 但同时也降低了分离速度, 增加分离样品扩散引起的分离选择性的降低, 本文考察了 40cm、60cm 和 75cm 对分离的影响, 研究表明 60cm 最佳。

在上述优化条件下, 得到的最佳分离图谱见图 1。

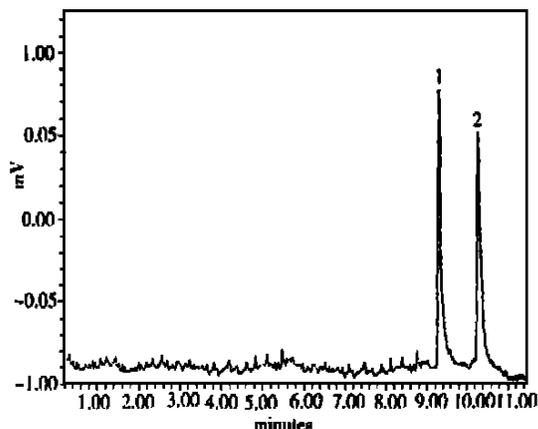


图 1 伪麻黄碱电泳分离图谱
1. (-) 伪麻黄碱 2. (+) 伪麻黄碱

本文采用 CE 技术通过向 BGE 中加入手性选择剂—衍生化环糊精(HP-β-CD) 的方法对伪麻黄碱的对映体的手性分离进行了较系统的研究, 结果表明衍生化环糊精(HP-β-CD) 比常用的β-CD 具有更强的手性识别能力。在所研究的优化条件下, 伪麻黄碱能达到很好的分离, 为开展此类药物对映体的研制和临床研究提供一种有效可靠的分析方法。

参考文献:

[1] Radin V, Peter B. Chiral separation in capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1999, 20: 2579.
[2] 梁生旺. 中药制剂定量分析[M]. 北京: 中国中医出版社, 1997. 168~176.
[3] Julianna S, Katalin G, Andras S, et al. Effect of the degree of substitution of cyclodextrin derivatives on chiral separations by HPLC and CE [J]. Journal Chromatography A, 1996, 782: 423