

毛细管区带电泳法拆分匹伐他汀钙对映体

程晓昆^{1,2}, 王利娟^{1,2}, 杨更亮^{1,2*}, 程 佳^{1,2}, 张轶华³

(1. 河北大学药学院, 河北 保定 071002 ; 2. 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北 保定 071002 ; 3. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

摘要 :建立了匹伐他汀钙对映体的毛细管区带电泳(CZE)拆分方法。分别考察了电泳电压、缓冲溶液种类、浓度及 pH 值、环糊精种类及浓度、添加剂种类及浓度等参数对实验结果的影响,从而确定了匹伐他汀钙对映体的最佳拆分条件:电泳电压为 18 kV,运行缓冲溶液为 80 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲体系, pH 值为 3.20,其中含有 50 mmol/L HP- β -CD(羟丙基- β -环糊精)和 5 mmol/L SDS(十二烷基磺酸钠);采用重力进样,进样高度 17 cm,进样时间为 2 s。在优化的实验条件下,匹伐他汀钙对映体得到了较好的分离,分离度可达 2.17。实验结果表明该方法可用于匹伐他汀钙对映体的分离,具有快速、便捷、准确性好等优点。

关键词 :毛细管区带电泳;手性拆分;匹伐他汀钙;对映体

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1089-05

Chiral separation of pitavastatin calcium enantiomers by capillary zone electrophoresis

CHENG Xiaokun^{1,2}, WANG Lijuan^{1,2}, YANG Gengliang^{1,2*}, CHENG Jia^{1,2}, ZHANG Yihua³

(1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China ;

2. Hebei Province Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control, Baoding 071002, China ;

3. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract : A method of capillary zone electrophoresis (CZE) has been established for the chiral separation of pitavastatin calcium enantiomers. Several parameters, such as the running voltage, the composition and the pH value of the running buffer, the types of additive and so on, were evaluated. The optimal separation conditions were as follows : capillary, 53 cm (45 cm effective length, 50 μ m); running buffer, 80 mmol/L Tris-HCl, pH 3.20, which contained 50 mmol/L HP- β -CD (hydroxypropyl- β -cyclodextrin) and 5 mmol/L SDS (sodium dodecylsulphate); applied voltage, 18 kV (54 μ A); column temperature, 23 $^{\circ}$ C ; injection, 2 s at the height of 17 cm. Under these conditions, pitavastatin calcium enantiomers were separated well with the resolution of 2.17. The results indicate that this method is rapid, simple, accurate and suitable for the chiral separation of pitavatin calcium enantiomers.

Key words : capillary zone electrophoresis (CZE); chiral separation ; pitavastatin calcium ; enantiomers

新型他汀类药物匹伐他汀钙(pitavastatin, pitavastatin calcium, Livalo)因具有较强的 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶抑制作用,且呈肝细胞选择性,药代动力学性质优异,安全性和耐受性良好而被制药界称为“超级他汀类药物”(Superstatin)^[1]。其主要用于原发性高胆固醇

血症和复合性血脂异常的基础治疗,辅助膳食调整以降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 B 和甘油三酯,增加高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)^[2]。目前世界上广泛应用的他汀类药物主要有洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、西伐他汀(cerivastatin)、氟

* 通讯联系人:杨更亮,教授,博士生导师。Tel : (0312) 5971108, E-mail : ygl@hbu.edu.cn.

基金项目 : 国家自然科学基金项目(No. 20675084)、河北省科技攻关项目(Nos. 06276479D, 07276407D)和河北省教育厅项目(No. Z2007225)。

收稿日期 : 2010-07-21

伐他汀(fluvastatin)和阿托伐他汀(atorvastatin) 6 种。临床试验表明,匹伐他汀钙作用效果与阿托伐他汀相似,强于其他 5 种他汀类药物^[3],现已被列为全球 18 种销售潜力最大的新药,发展前景十分广阔^[4]。

匹伐他汀钙的化学结构式见图 1^[5]。在临床上发挥药理作用的是其右旋体(+)-{双[(3*R*, 5*S*, 6*E*)-7-[2-环丙基-4-(4-氟代苯基)-3-喹啉基]-3,5-二羟基-6-庚烯酸]}单钙盐。在合成过程中,其左旋体可能会作为杂质存在^[6]。为了使产品能够达到较好的疗效并保障用药的安全性,对匹伐他汀钙中对映异构体的分离检测是一项非常必要的工作。但是目前国内外大部分文献仅仅针对匹伐他汀钙含量测定进行研究^[7-11],而对匹伐他汀钙异构体拆分方法的研究并不多见。曹建军等^[12]采用高效液相色谱法(HPLC)对匹伐他汀钙对映体进行分离检测,但该方法是采用手性柱进行分离,费时费力且成本较高。

高效毛细管电泳法(HPCE)作为分离手性化合物的一种强有力的手段,与 HPLC 相比,具有简单、快速、分离效率高、消耗试剂少、运行成本低等优点,但至今尚未见采用 HPCE 拆分匹伐他汀钙对映体的文献报道。本文以毛细管区带电泳模式拆分匹伐他汀钙对映体,采用手性添加剂法构建了手性环境,从而使对映异构体得到了较好的分离。该方法无需复杂烦琐的样品预处理过程,体系简单易操作,具有分析速度快、分析成本低、环境污染小等优点,是一种拆分匹伐他汀钙对映体较为理想的方法。

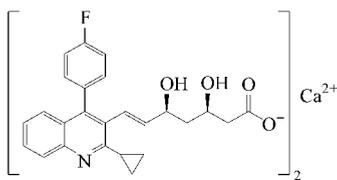


图 1 匹伐他汀钙的化学结构式

Fig. 1 Structure of pitavastatin calcium

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司,中科院研究生院应用化学所),配有可变波长紫外检测器;HW-2000 色谱工作站(南京千谱软件有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海精科仪器有限公司);BS210S 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

匹伐他汀钙对映体(河北省药品检验所提供);三羟甲基氨基甲烷(Tris,北京双旋微生物培养基制品厂);十二烷基磺酸钠(SDS,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司); β -环糊精(β -CD)、羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)、甲基- β -环糊精(M- β -CD)、磺基醚- β -环糊精(S- β -CD)(分析纯,山东新大精细化工有限公司产品);其他试剂均为分析纯。实验用水均为超纯水。

1.2 溶液配制

称取匹伐他汀钙左旋、右旋异构体各 5 mg,分别用甲醇-水(1:1, v/v)溶解并定容至 1 mL。实验前,各取上述储备液 0.1 mL,用甲醇-水(1:1, v/v)定容至 1 mL,配制成 0.5 g/L 匹伐他汀钙对映体的混合溶液。

1.3 电泳条件

未涂层熔硅弹性石英毛细管柱(内径 50 μ m,柱长 53 cm,有效长度 45 cm,邯郸市鑫诺光纤色谱有限公司);运行缓冲溶液含 80 mmol/L Tris、50 mmol/L HP- β -CD、5 mmol/L SDS,用盐酸调节 pH 值至 3.20;检测波长 244 nm;分离温度 23 $^{\circ}$ C;分离电压 18 kV;样品采用重力进样,进样高度 17 cm,进样时间 2 s。

毛细管柱在使用之前用 0.1 mol/L NaOH 溶液平衡 1 h,超纯水冲洗 10 min。每次进样之前用 0.1 mol/L NaOH 溶液冲洗毛细管柱 5 min,超纯水冲洗 10 min,缓冲溶液平衡 10 min。缓冲溶液和试液均经过 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,超声脱气后使用。每个样品重复进样 3 次测定。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

在 1.3 节电泳条件下,匹伐他汀钙对映体得到了较好的分离,分离度(R_s)达到 2.17(见图 2)。

2.2 电泳电压的选择

理论和实验均表明电泳电压影响分离效率。运行电压较低时,分析所用时间较长,色谱峰拖尾严重,分离度较小;随着运行电压逐渐增大,分析所用时间逐渐缩短,分离效率逐渐提高,但运行电压过大时,产生大量的焦耳热,引起分离效率下降,色谱峰变宽,且随着电压增大,仪器噪声逐渐增加,也不利于分离。本文在其他实验条件不变的条件下,考察了不同分离电压对拆分效果的影响,最终选用了 18 kV 作为分离电压,此时电流强度(I)适当,保留时间(t_R)适宜,分离效率较高,且仪器噪声较低。实验结果见表 1。

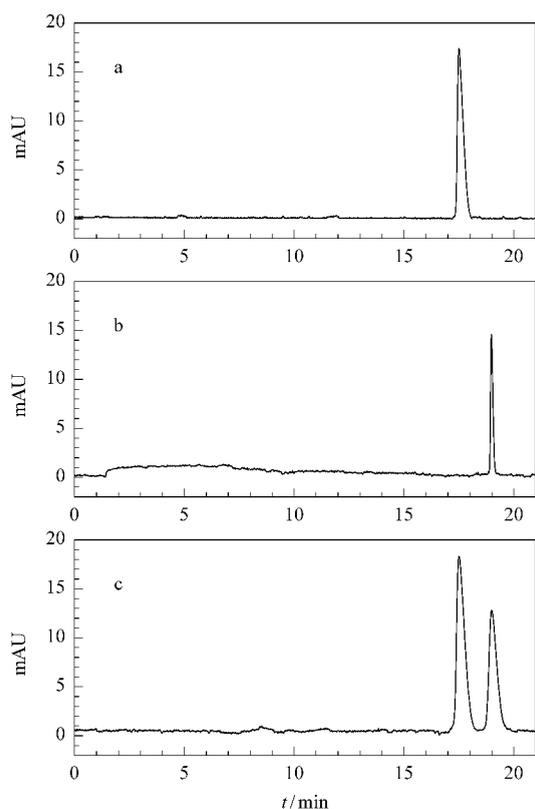


图 2 匹伐他汀钙对映体的电泳图

Fig. 2 Electropherograms of pitavastatin calcium enantiomers

a. (+) pitavastatin calcium reference substance; b. (-) pitavastatin calcium reference substance; c. pitavastatin calcium enantiomers.

表 1 电压对匹伐他汀钙对映体拆分的影响

Table 1 Influence of the voltage on the resolution of pitavastatin calcium enantiomers

Voltage/kV	t_{R1}/min	t_{R2}/min	R_s	$I/\mu\text{A}$
10	40.961	41.536	1.26	40
15	27.793	28.323	1.45	47
16	23.826	23.826	1.49	50
17	21.787	22.153	1.51	52
18	19.361	19.722	1.58	54
20	14.046	14.254	1.05	73

t_{R1} : retention time of the (+) pitavastatin calcium; t_{R2} : retention time of the (-) pitavastatin calcium.

Conditions: fused-silica capillary, 50 μm i. d., length to detector of 45 cm; injection, 2 s at the height of 17 cm; running buffer: 100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L HP- β -CD, 5 mmol/L SDS, pH 3.35.

2.3 缓冲溶液的影响

2.3.1 缓冲体系的选择

本文试验了 NaAC-H₃BO₃、NaH₂PO₄-Na₂HPO₄、Tris-NaH₂PO₄、Tris-HCl 等缓冲体系,结果表明以 Tris-HCl 缓冲体系的分离效果最好。故本文选择以 Tris-HCl 缓冲体系为分离液。

2.3.2 Tris 浓度的影响

固定其他实验参数不变,改变 Tris 浓度考察匹

伐他汀钙对映体的拆分情况。实验结果见表 2。由表 2 可以看出,当 Tris 浓度在 60 ~ 80 mmol/L 范围内,随着浓度的增大,保留时间逐渐缩短,分离度逐渐增大,这是因为电解质浓度的增大使石英毛细管内壁双电层的厚度减小,电渗下降,分离效率得到提高;当 Tris 浓度大于 80 mmol/L 时,随着浓度的增大,虽然保留时间继续缩短,但分离度却开始降低,这可能是因为电解质浓度过高,产生了较强的焦耳效应,导致体系过热,反而使分离效率下降。因此本文选择 Tris 的浓度为 80 mmol/L。

表 2 Tris 浓度对匹伐他汀钙对映体拆分的影响

Table 2 Influence of the concentration of Tris on the resolution of pitavastatin calcium enantiomers

$\alpha(\text{Tris})/(\text{mmol/L})$	t_{R1}/min	t_{R2}/min	R_s
60	25.068	25.483	1.48
80	21.887	22.734	1.66
100	19.361	19.722	1.58
120	17.305	17.305	1.23

The conditions are the same as in Table 1 except for Tris concentration and the voltage is 18 kV.

2.3.3 缓冲溶液 pH 的影响

缓冲溶液的 pH 是手性拆分试验中需要优化的关键参数。随着样品和所用添加剂种类的不同,缓冲溶液的最佳 pH 值不尽相同。对于 CD 类添加剂,最佳 pH 值通常在酸性范围内,大多数是在 pH 2 ~ 4 之间^[13]。本文首先在 pH 2 ~ 4 之间取值(2.00、2.53、3.35、3.66、4.00)进行较宽范围的考察,结果见表 3。由表 3 可知,当 pH 为 4.0 时,匹伐他汀对映体没有被拆分;当 pH 接近 2.0 时,电流突然急剧增加,这可能是因为此酸度范围已经超出了 Tris 的缓冲能力,打破了缓冲溶液体系的平衡,使离子强度增大造成的。当 pH 为 3.35 时,拆分效果较好,电流强度适当,保留时间适宜。再在 pH 为 3.35 附近较窄范围内取值(3.15、3.20、3.30、3.40、3.50)以选择最佳的 pH 值。结果表明,在上述 pH 值下,对映体间的分离度分别为 1.11、2.17、1.89、1.27、1.15,表明当 pH 为 3.20 时,匹伐他汀钙对映体的拆分效果最好,故本实验在 pH 3.20 下进行拆分。

表 3 缓冲溶液 pH 对匹伐他汀钙对映体拆分的影响

Table 3 Influence of the pH of running buffer on the resolution of pitavastatin calcium enantiomers

pH	t_{R1}/min	t_{R2}/min	$I/\mu\text{A}$	R_s
2.00	12.678	12.778	82	0.88
2.53	12.968	13.102	64	0.95
3.35	20.221	21.673	54	1.66
3.66	24.503	24.641	52	0.88
4.00	21.075	21.075	52	0

2.4 手性添加剂的选择

相对于其他手性添加剂,环糊精及其衍生物是最常用的一类手性添加剂。它们具有易溶于水、紫外吸收弱、不影响 CE 检测等优点,能够得到较好的手性分离效果,且具有一定的普适性。实验分别考察了 β -CD、HP- β -CD、S- β -CD、M- β -CD 对匹伐他汀

钙对映体的拆分效果,在缓冲溶液其他组成条件不变的情况下,分别加入上述 4 种环糊精(15 mmol/L)进行考察。实验结果表明,只有 HP- β -CD 和 M- β -CD 对匹伐他汀钙对映体有拆分趋势,其中 HP- β -CD 效果较好(见图 3)。因此选择 HP- β -CD 为本实验的手性添加剂。

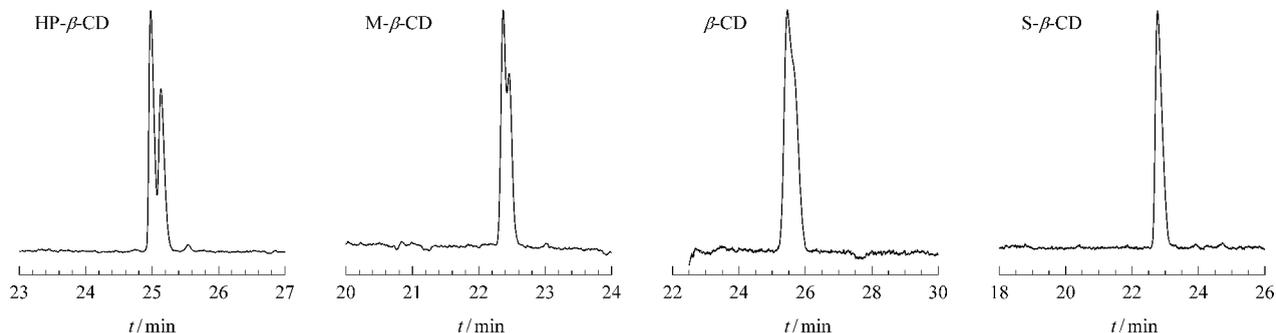


图 3 不同种类的环糊精拆分匹伐他汀钙对映体的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of pitavastatin calcium enantiomers separated by four different CD additives

Conditions: voltage, 18 kV; running buffer, 80 mmol/L Tris-HCl (pH 3.35) and 5 mmol/L SDS with different CD additives (15 mmol/L); other conditions are the same as in Table 1.

2.5 HP- β -CD 浓度的影响

手性添加剂的浓度对于手性拆分是一项至关重要的影响因素。本文采用分离效果较好的 HP- β -CD 作为手性添加剂,分别在缓冲液中添加浓度为 30、40、50、60、70 mmol/L 的 HP- β -CD 来考察其对匹伐他汀钙对映体拆分效果的影响,结果见图 4。由图 4 可知,当 HP- β -CD 浓度逐渐增大时,由于运行缓冲溶液的黏度增大,电渗降低,分离度逐渐增大;当其浓度过大时,运行缓冲溶液黏度过大,导致电渗下降过多,不利于分离;当 HP- β -CD 浓度为 50 mmol/L 时,运行缓冲溶液的黏度适宜,匹伐他汀钙

对映体的拆分效果最佳。因此本文选择 HP- β -CD 的浓度为 50 mmol/L。

2.6 SDS 浓度的影响

分别考察了 NaCl、SDS、无水 CuSO_4 、乙腈、甲醇、异丙醇、尿素作为添加剂对匹伐他汀钙对映体拆分的影响。其中甲醇、异丙醇影响分离效果;乙腈、NaCl 没有影响;无水 CuSO_4 、尿素和 SDS 改善了分离效果,且以 SDS 最佳。

在 0 ~ 7.5 mmol/L 范围内,考察了 SDS 浓度对柱效和分离度的影响。实验结果如图 5 所示。当 SDS 浓度 < 2.5 mmol/L 时,随着 SDS 浓度的增

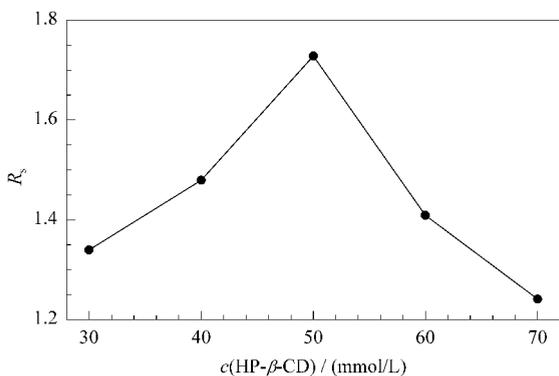


图 4 HP- β -CD 浓度对匹伐他汀钙对映体拆分的影响

Fig. 4 Influence of the concentration of HP- β -CD on the resolution of pitavastatin calcium enantiomers

Conditions: running buffer, 80 mmol/L Tris-HCl (pH 3.35) and 5 mmol/L SDS with different concentrations of HP- β -CD; other conditions are the same as in Fig. 3.

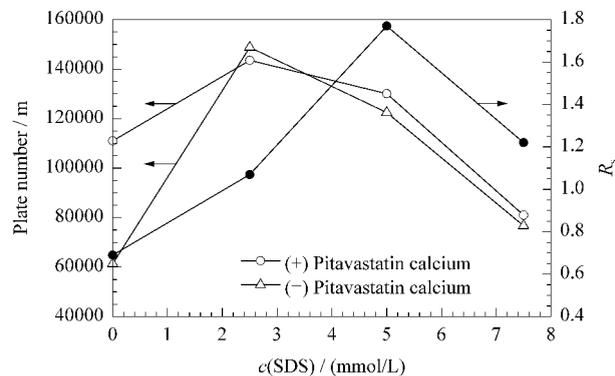


图 5 SDS 浓度对柱效和分离度的影响

Fig. 5 Influences of SDS concentration on the column efficiency and resolution of pitavastatin calcium enantiomers

Conditions: running buffer, 80 mmol/L Tris-HCl (pH 3.35) and 50 mmol/L HP- β -CD with different concentrations of SDS; other conditions are the same as in Fig. 4.

加,柱效和分离度都明显增大;当 $2.5 \text{ mmol/L} < \text{SDS 浓度} < 5 \text{ mmol/L}$ 时,随着 SDS 浓度的增加,柱效开始减小,但是分离度仍然明显增大;当 $5 \text{ mmol/L} < \text{SDS 浓度} < 7.5 \text{ mmol/L}$ (大于临界胶束浓度(CMC)值)时,柱效和分离度均明显降低。综合考虑柱效和分离度两方面因素,实验最终确定 SDS 的最佳浓度为 5 mmol/L 。

2.7 匹伐他汀钙左旋体质量分数的影响

匹伐他汀钙左旋体的质量分数($m_{\text{左旋体}}/m_{\text{右旋体}}$)对拆分结果也有一定影响。本实验在优化条件下,考察了左旋体质量分数在 $100\% \sim 0.1\%$ 范围内匹伐他汀钙对映体的拆分效果。结果表明,分离度随着左旋体质量分数的减小而逐渐减小,当 $m_{\text{左旋体}}/m_{\text{右旋体}} = 0.75\%$ 时,仍能实现对映体分离,分离度为 1.51。

2.8 其他影响因素

实验还考察了毛细管柱长度($45 \sim 60 \text{ cm}$)、进样时间($1 \sim 10 \text{ s}$)等因素对拆分效果的影响。结果表明,柱长 53 cm (有效长度 45 cm)、进样时间 2 s 时能达到最佳的拆分效果。

3 结论

目前国内外尚未见采用毛细管电泳对匹伐他汀钙对映体拆分的报道。本文采用手性添加剂法构建手性环境,研究并建立了对匹伐他汀钙对映异构体分离检测的毛细管区带电泳法。通过优化实验条件,使该对映异构体得到了较好的分离。该体系简单、易操作、分析速度快、分析成本低,且不污染环境,为匹伐他汀钙对映体的分离检测提供了良好的方法。

境,为匹伐他汀钙对映体的分离检测提供了良好的方法。

参考文献:

- [1] He X R, Zou D, Jiang W Q, et al. Chinese Journal of New Drugs (何笑荣,邹定,姜文清,等. 中国新药杂志), 2005, 14(4):483
- [2] Tang Z M. Journal of International Pharmaceutical Research (汤仲明. 国际药学研究杂志), 2010, 37(1):8
- [3] Yu W, Peng Y X, Cao D P, et al. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases (于薇,彭应心,曹东平,等. 疑难病杂志), 2009, 8(9):529
- [4] Wu F L. Chinese Journal of Medicinal Chemistry (武芳莉. 中国药物化学杂志), 2010, 20(2):155
- [5] Xu X, Shentu J Z, Hu Y J. Chinese Journal of New Drugs (许筱,申屠建中,胡应江. 中国新药杂志), 2009, 18(5):383
- [6] Suzuki M, Iwasaki H, Fujikawa Y, et al. Bioorg Med Chem, 2001, 9(10):2727
- [7] Wen J H, Xiong Y Q. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (温金华,熊玉卿. 中国现代应用药学), 2010, 27(1):62
- [8] Lv H, Sun J G, Wang G J, et al. Clin Chim Acta, 2007, 386:25
- [9] Shentu J Z, Xu X, Liu J, et al. Chromatographia, 2009, 69:1041
- [10] Di B, Su M X, Yu F, et al. J Chromatogr B, 2008, 868:95
- [11] Ojha A, Guttikar S, Vayeda C, et al. Chinese Journal of Chromatography (色谱), 2007, 25(5):715
- [12] Cao J J, Hao S X, Li Q S. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (曹建军,郝胜先,李青山. 药物分析杂志), 2008, 28(8):1333
- [13] Chen Y. Technology and Application of Capillary Electrophoresis. Beijing: Chemical Industry Press (陈义. 毛细管电泳技术及应用. 北京:化学工业出版社), 2000:114