

HPLC U环糊精手性流动相添加剂的研究

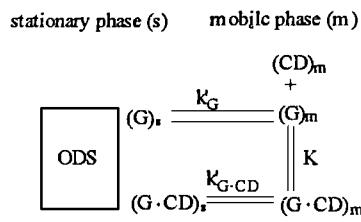
III. U环糊精手性选择性包含稳定常数的简化计算及验证

梁宏 Durham DG¹(中国药科大学分析计算中心,南京 210009; ¹罗伯特·戈登大学药学院,英国阿伯丁 AB9 1FR)

摘要 用简化的计算公式对不同的色谱条件下的 U环糊精流动相手性添加剂对甲基苯巴比妥对映异构体的保留行为的影响进行了探讨,同时探讨了 U环糊精包含稳定常数与流动相中溶剂强度的关系。结果表明简化的数学模型具有运算简便、误差小和线性范围宽的特点。

关键词 U环糊精; 甲基苯巴比妥; 反相高效液相色谱; 手性选择性

对于在用 U环糊精作为手性流动相添加剂的高效液相色谱体系中的药物分子的保留行为,文献^[1,2]已有报道。这样的体系可用下列平衡组成来描述^[3]:



其中 G 代表药物分子, CD 代表 U环糊精分子, G° CD 代表药物分子的 U环糊精包合物。下标 s 和 m 分别代表固定相和流动相。 k'_G 和 $k'_{G \cdot CD}$ 分别代表游离药物分子和药物分子的环糊精包合物的容量因子; K 代表环糊精与药物分子以 1: 1 包合时的稳定常数。那么药物分子在这样的色谱体系中的表观容量因子 k' 可以用公式 (1) 表达^[4,5]:

$$k' = \frac{k'_G - k'}{K \cdot [CD]_m} + k'_{G \cdot CD} \quad (1)$$

由 k' 对 $(k'_G - k') / [CD]_m$ 进行回归计算时, 可由斜率及截距计算出包合稳定常数 K 和环糊精包合物在色谱体系中的容量因子

$k'_{G \cdot CD}$ 但这个公式的应用存在着三个缺点: (1)当 k'_G 与 k' 差值较小时会引入较大的计算误差; (2) $(k'_G - k') / [CD]_m$ 造成在横坐标上的分布权重不均, 因而在一定程度上影响了其线性范围; (3)计算较为繁琐。文献^[4]根据 U环糊精本身在反相色谱系统中保留时间很短的实验现象认为药物分子的 U环糊精包合物的保留时间因而也可以忽略不计。所以公式 (1) 可简化为:

$$k' = \frac{k'_G - k'}{K \cdot [CD]_m} \quad (2)$$

进而可以转换为公式 (3)

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k'_G} + \frac{K \cdot [CD]_m}{k'_G} \quad (3)$$

以 k' 对 $[CD]_m$ 进行线性回归可以由斜率和截距计算出 K 及 k'_G 值。显然, 公式 (3) 在一定程度上避免了公式 (1) 的不足。文献^[4]的结果也表明公式 (3) 的良好线性。但由此及文献^[4]的结论认定药物分子的 U环糊精包合物的保留时间可以忽略不计的依据尚不够充分。这是因为: (1)不能仅根据 U环糊精本身在反相色谱系统中保留时间很短就认定药物分子的 U环糊精包合物的保留时间也可以忽略不计进而将 $k'_{G \cdot CD}$ 忽略不计; (2)仅仅根据将 $k'_{G \cdot CD}$ 忽略不计后得到的公式 (3) 的线

性的改善就认定 $k'_{G \cdot CD}$ 可以忽略不计, 在理论上也不够严谨。由于在包含过程中化学平衡使得药物分子的 U环糊精包合物 $G \cdot CD$ 不能单独存在, $k'_{G \cdot CD}$ 无法直接测得。

作者对前期实验结果^[5]作了进一步的探讨, 发现在用公式(1)将甲基苯巴比妥对映异构体在反相色谱条件下的表观容量因子 k' 对 $(k'_{G \cdot} - k') / [CD]_m$ 进行线性回归的截距都集中在原点附近(文献^[5]之图 6), 由公式(1)可认为 $k'_{G \cdot CD}$ 很小因而可以忽略不计。至此, 从实验上证明了公式(3)的成立。

本文在文献报道及实验结果的基础上, 用简化了的数学模型(公式(3))对在不同的色谱条件下的环糊精流动相手性添加剂对药物分子保留行为的影响进行了进一步的探讨, 对包含稳定常数 K 与溶剂强度的关系进行了研究。结果表明简化的数学模型具有运算简便、误差小和线性范围宽的优点。

1 实验结果及计算

所用仪器与试剂均同文献^[5]。所有实验数据均取自文献^[5]的实验结果。因此流动相中乙腈浓度及 U环糊精浓度对甲基苯巴比妥表观容量因子 k' 的影响见文献^[5]中图 4 及

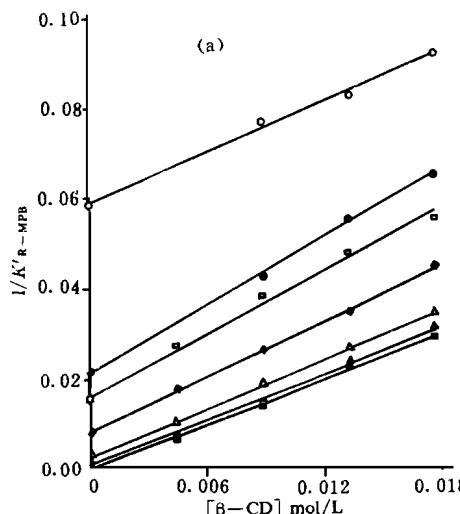


Fig. 1. (a) $1/k'_{R-MPB}$ and (b) $1/k'_{S-MPB}$ vs. $[\beta-CD]$ in the mobile phase

□ 0.00 MeCN; ▲ 2.5% MeCN; ▼ 5.0% MeCN; ◇ 10.0% MeCN; ★ 13.0% MeCN; ● 15.0% MeCN; ○ 20.0% MeCN

图 5

2 U环糊精包合稳定常数 K

2.1 U环糊精包合稳定常数 K 及 $k'_{G \cdot}$ 值的简化计算

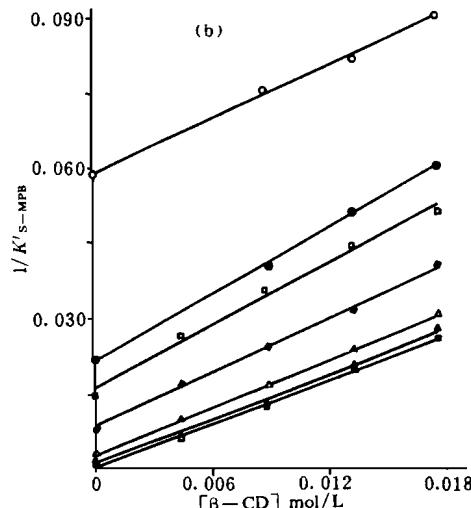
将文献^[5]中不同乙腈浓度的流动相条件下的 $1/k'$ 对 $[\beta-CD]$ 回归, 得图 1。根据公式(3), 截距为 $1/k'_{G \cdot}$, 而斜率为 U环糊精与甲基苯巴比妥的包含稳定常数 K 与 $k'_{G \cdot}$ 之比。因此以 $1/k'$ 对 $[\beta-CD]$ 回归, 由斜率和截距值可以计算出 K 值及 $k'_{G \cdot}$ 值。结果见表 1。

Tab. 1. The stability constants K of inclusion complex between U-CD and M PB enantiomers and $k'_{G \cdot}$ by simplified calculation with equation (3)

MeCN%	K_{R-MPB}	K_{S-MPB}	δK	$k'_{G \cdot}$
2.5	1433.6	1249.2	184.4	—
5.0	906.2	793.5	112.7	911.0
10.0	584.0	510.2	81.8	363.4
13.0	156.8	138.7	33.8	115.4
15.0	113.7	99.5	14.2	46.6
20.0	32.35	30.33	2.02	17.0

2.2 乙腈浓度对 $k'_{G \cdot}$ 的影响

由表 1 中的 $k'_{G \cdot}$ 数据对流动相中的乙腈浓度作图, 得图 2。以 $\ln k'_{G \cdot}$ 对流动相中的乙腈浓度作图, 表明 $\ln k'_{G \cdot}$ 与乙腈浓度呈线性关系如图 3。



2.3 乙腈浓度对 U环糊精包合常数 K 的影响

表 1 中的 U环糊精包合稳定常数 K 值对流动相中乙腈浓度的关系见图 4 U环糊精包合稳定常数 K 值取对数后对流动相中乙腈浓度作线性回归 结果在 0~15.0% 的乙腈浓度范围内, $\ln K$ 与乙腈浓度呈良好的

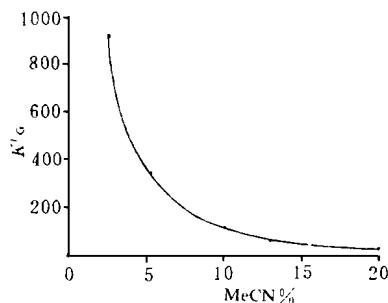


Fig. 2. The variation of $k'c$ against MeCN% in the mobile phase

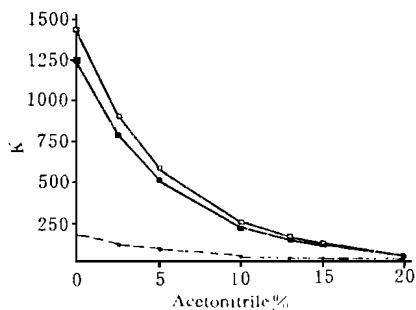


Fig. 4. Inclusion complex constant K for M PB vs. acetonitrile concentration in the mobile phase
 □ R-M PB; ■ S-M PB; ○ K

3 讨 论

1) $k'c$ 为药物分子在不含手性添加剂的流动相体系中的容量因子。为测定 U环糊精的手性选择性包合稳定常数 K , 须先行测定不同流动相有机改性剂浓度下的 $k'c$ 值^[5]。然后按公式 (1), 以表观容量因子 k' 对 $(k'c - k') / [CD]$ 回归计算, 由斜率的倒数求出包合稳定常数 K 。其中, $k'c$ 值的测定是必不可少的。但由于药物分子在此色谱体系的保留时

线性关系(图 5)可用公式 (4) 表示

在本文所涉及的色谱体系中, *S*-甲基苯巴比妥 (*S*-M PB) 和 *R*-甲基苯巴比妥异构体的 C 值分别为 1210.96 和 1389.1, D 值分别为 -0.1682 和 -0.1685

$$K = C^D e^{[MeCN]\%} \quad (4)$$

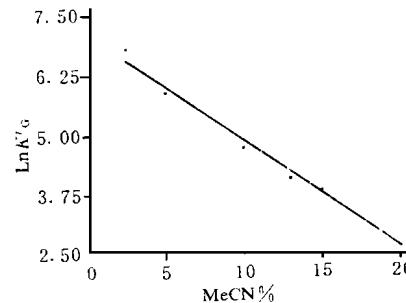


Fig. 3. $\ln k'c$ vs. MeCN% in the mobile phase

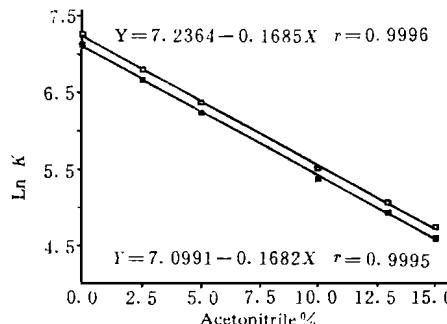


Fig. 5. $\ln K$ vs. acetonitrile concentration
 □ R-M PB; ■ S-M PB

间极长, $k'c$ 值的测定是一个很费时的过程, 且容易因此引入测定误差。而在本文所采用的简化计算方法中, $k'c$ 值不是测定计算 K 值的先决条件而无须先行测出; 反而, 在用 $1/k'$ 对 $[CD]$ 回归计算求 K 值时, 可由线性回归的截距 $(1/k'c)$ 将 $k'c$ 值求出。所以应用简化计算方法 [公式 (3)] 来进行 U环糊精包合稳定常数的计算的一大优点就是无须先要知道 $k'c$ 值并且可以将 $k'c$ 值计算出来。

2) 将本文结果与文献^[5]相比, 可见由简

化计算方法计算出来的 k'_{C} 值与实验测得的 k'_{C} 值及其与有机流动相改性剂的关系都是相吻合的。这说明了用简化计算方法计算出的 k'_{C} 值是可靠的,也证明了将公式(1)中 $k'_{C, \text{CD}}$ 项略去得到公式(3)的合理性。

3)如本文前述,应用公式(1)有三个主要缺点。本文所采用的简化公式(3)克服了公式(1)所具有的这些缺点,具有计算误差小、线性范围宽和计算直观简便的优点。

4)图4表明,U环糊精对药物对映体分子的包含稳定常数随流动相中有机改性剂的浓度增加而降低,同时对映异构体之间的U环糊精包含稳定常数的差值也随之降低。表明有机溶剂在降低U环糊精的包含稳定常数的同时也降低了U环糊精的手性选择性。这一现象进一步对简化计算公式的合理性作了支持。另外,用简化计算方法得到的结果(图4图5)与未经简化的计算方法得到的结果^[5]也是相吻合的。

参 考 文 献

- 1 Sybilska D, Zukowski J, Bojarski J. Resolution of mephenytoin and some chiral barbiturates into enantiomers by reversed phase high performance liquid chromatography via U-cyclodextrin inclusion complexes. *J Liq Chromatogr*, 1986, 9(2&3): 591
- 2 Sybilska D, Zukowski J. Chapter 7. Cyclodextrin additives. In: Krstulovic AM. *CHIRAL SEPARATIONS BY HPLC applications to pharmaceutical compounds*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1989. 147~174
- 3 Uekama K, Hirayama F, Nasu S, et al. Determination of the stability constants for inclusion complexes of cyclodextrins of cyclodextrins with various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26: 3477
- 4 Hoivath C, Melander W, Melander J, et al. Measurement of association constants for complexes by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr*, 1980, 26: 371
- 5 梁宏唏, Durham DG. HPLC U环糊精手性流动相添加剂的研究 II. 反相高效液相色谱系统中U环糊精与甲基苯巴比妥的手性选择性包含。中国药科大学学报, 1997, 28(2): 82
- 6 Durham DG, Liang H. Molecular modelling of the inclusion complexes between U-cyclodextrin and (R)/(S)-methylphenobarbitone and its application to HPLC. *Chirality*, 1994, 6: 239

An Investigation of U-Cyclodextrin Chiral Mobile Phase Additive in HPLC III. The Simplified Calculation and Experimental Verification of the Stability Constants of Enantioselective Inclusion Complexation with U-Cyclodextrin

Liang Hongxi, Durham DG¹

¹The Analytical & Computer Centre, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ¹School of Pharmacy, The Robert Gordon University, Aberdeen UK AB9 1FR

Abstract Based on the literature and experimental results, investigation on the effect of U-cyclodextrin as mobile phase additive on the retention behaviour of methylphenobarbital enantiomers was carried out with a simplified equation for the calculation of inclusion complex constant. The relationship between the inclusion complex constants of U-cyclodextrin and solvent strength was also studied. The results indicated that the simplified mathematical model had the advantages of simpler calculation, smaller error and better linearity.

Key words U-Cyclodextrin; Methylphenobarbital; RP-HPLC; Enantioselectivity