

α_1 -酸性糖蛋白柱拆分西酞普兰对映异构体

杨倩, 刘文英*

(中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

摘要 目的: 建立西酞普兰对映异构体的拆分方法。方法: 采用 α_1 -酸性糖蛋白 (AGP) 手性柱固定相, 考察了流动相组成、pH 值、流速、柱温、有机改性剂对拆分的影响, 优化后色谱条件为 Chrom Tech CHIRAL-AGP 柱 (150 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μ m), 流动相为 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液 (乙酸调节 pH 至 4.3), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 240 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C。结果: 西酞普兰对映异构体保留时间分别为 6.8 和 8.4 min, 能够达到基线分离。结论: 缓冲盐浓度和 pH 值是影响对映体分离的重要因素, 同时可以在一定范围内调节流速和柱温来提高柱效, 改善分离。

关键词 西酞普兰; 对映体; 手性拆分; α_1 -酸性糖蛋白

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2007)03-0243-04

Enantiomeric separation of citalopram by HPLC using α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase

YANG Qian, LIU Wen-ying

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To develop a chiral separation method for enantiomers of citalopram by HPLC using α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AGP) chiral stationary phase. **Methods:** Influences of the pH value of the mobile phase, the kind and concentration of the buffer solution, organic modifiers, the flow rate and the column temperature on the enantiomeric separation of citalopram using α_1 -AGP chiral stationary phase were investigated. **Results:** Citalopram enantiomers were separated on an α_1 -AGP chiral stationary phase column using water as the mobile phase consisting of 50 mmol/L NH_4Ac buffer (pH = 4.3) at a flow rate of 0.8 mL/min. **Conclusion:** The pH value of the mobile phase and the concentration of the buffer solution are very important parameters in the optimization of the enantiomeric separation of the cationic racemates. Higher column efficiency can be achieved with lower flow rate.

Key words citalopram; enantiomers; enantiomeric separation; α_1 -acid glycoprotein

氢溴酸西酞普兰 (citalopram, 结构式见图 1) 是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂, 对内源性和非内源性的抑郁症均有较好疗效, 已成为抑郁症治疗的一线药物^[1]。西酞普兰分子中存在一个手性中心, 临床上现多以消旋体给药。西酞普兰右旋体即 S-西酞普兰 (escitalopram) 的药理活性至少是 R 型的 100 倍^[2]。2002 年, 作为单旋体给药的 S-西酞普兰在瑞士上市。我国目前也在积极开发单旋体给药形式, 以达到减少剂量和不良反应及提高疗效的目的。因此, 研究西酞普兰对映异构体拆分方法有助于药品的质量控制。有文献报道, 采用 Chiralpak

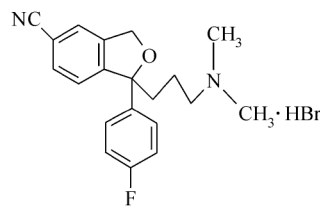


Fig.1 Structure of citalopram

AD-H 手性柱^[2]和 Chiralcel OD-H 柱^[3]配合正相系统拆分西酞普兰; 使用 Chirobiotic V 手性柱以甲醇-乙酸-三乙胺为流动相, 需 18 min 才能完成拆分^[4]; Haupt D^[5]应用 AGP 手性柱配合更复杂的流动相系

统达到拆分的目的,而且未对分离因素进行研究。本文建立了 α_1 -酸性糖蛋白(AGP)手性柱固定相分离西酞普兰对映异构体的方法,简化了流动相组成,分析时间缩短为 10 min,并从流动相组成、pH 值、流速、柱温、有机改性剂等多个方面优化了对映体分离的条件,并对保留机制进行了初步探讨。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪,1100 UVD 紫外检测器,1100 自动进样器,Agilent 化学工作站(美国安捷伦公司)。

氢溴酸西酞普兰对照品(浙江黄岩东升医药化工有限公司,纯度 99.7%);草酸艾司西酞普兰对照品(合肥合源医药科技有限公司,纯度大于 99.0%);乙腈(色谱纯,美国默克公司);异丙醇(色谱纯,山东禹王化学试剂厂);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 对照品溶液的配制

精密称取氢溴酸西酞普兰对照品约 12 mg,甲醇溶解,再用去离子水稀释成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 西酞普兰溶液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Chiral-AGP 柱(150 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μm , Chrom Tech Sweden);流动相:以醋酸铵缓冲液(pH 4~6,浓度为 20~60 mmol/L)为主体,选择异丙醇和乙腈为有机改性剂;流速:0.8 mL/min;检测波长:240 nm;进样量 20 μL 。

2.2 醋酸铵缓冲液 pH 值对对映体分离的影响

在室温条件下,以 20 mmol/L 醋酸铵缓冲液作为流动相主体,流动相流速 0.8 mL/min,用冰醋酸调节 pH 分别为 4.0, 4.3, 4.5, 5.0, 6.0, 考察 pH 变化对拆分对映体的影响。结果表明随着 pH 的升高,容量因子增大,保留增强而分离度(R_s)下降。pH 为 6.0 时 30 min 内未见出峰(结果见表 1)。

2.3 缓冲盐种类及浓度对分离的影响

在室温和流动相流速为 0.8 mL/min 条件下,分别考察了磷酸二氢钠缓冲液(磷酸调节 pH 至 4.3)和醋酸铵缓冲液,结果表明磷酸二氢钠缓冲液对对映异构体的拆分能力明显弱于醋酸铵缓冲液。

实验中分别尝试了 5, 25 和 45 mmol/L 的磷酸二氢钠缓冲液,虽然随着缓冲盐浓度的增加分离度逐渐改善,但始终没有达到基线分离(见图 2),且因为磷酸盐难以挥发,使其在某些仪器上的使用受到限制,因此我们选用醋酸铵缓冲液并考察缓冲盐浓度变化对容量因子,分离因子及分离度的影响。

Tab.1 Effect of pH value on the separation of citalopram

pH	k_1'	k_2'	α	R_s
4.0	1.18	1.50	1.27	1.29
4.3	1.53	1.87	1.22	1.22
4.5	1.82	2.12	1.16	0.98
5.0	5.61	5.96	1.06	0.53

k_1' , k_2' : capacity factor of the first and the second peak; α : relative retention; R_s : resolution

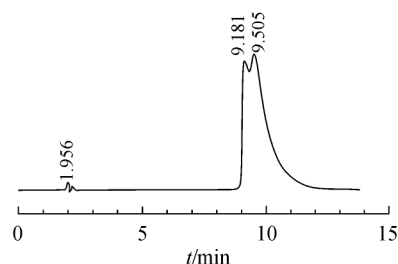


Fig.2 Chromatogram of citalopram enantiomers with 45 mmol/L NaH_2PO_4 buffer (pH 4.3) as mobile phase at 25 $^{\circ}\text{C}$

Tab.2 Effect of ammonium acetate concentration on the separation of citalopram

$C_{\text{ammonium acetate}}$ (mmol/L)	k_1'	k_2'	α	R_s
20	1.53	1.87	1.22	1.22
30	1.95	2.43	1.25	1.35
40	2.15	2.76	1.28	1.60
50	2.20	2.89	1.31	1.77
60	2.23	2.93	1.33	1.82

由表 2 可见,改善分离度可以通过增加缓冲盐浓度实现,随着缓冲盐浓度增加,容量因子,分离因子及分离度逐渐变大,当缓冲盐浓度大于等于 40 mmol/L 时,可以达到基线分离。当浓度大于 50 mmol/L 时,分离度变化不显著。这个结果提示,在一定范围内离子强度对西酞普兰对映异构体的分离和保留有一定影响。一般情况下,AGP 柱所使用的缓冲盐浓度是 0~100 mmol/L,达到分离要求的情况下尽量选择低浓度缓冲盐,故本实验最终选择了 50 mmol/L 的醋酸铵缓冲液作为流动相。

2.4 柱温变化对分离的影响

以 50 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 4.3)为流动相,流速 0.8 mL/min,考察柱温变化对分离的影响。

Tab.3 Effect of column temperature on the separation of citalopram

$T(^{\circ}\text{C})$	k_1'	k_2'	α	R_s
20	2.26	2.97	1.31	1.77
25	2.20	2.89	1.31	1.77
30	2.09	2.72	1.29	1.75
35	1.99	2.56	1.29	1.70

由表3可知,柱温升高使容量因子变小,对分离因子和分离度影响不明显。这是因为当柱温升高时,溶质在固定相和流动相之间传质速度变快,保留时间变短,同时半峰宽变小,峰形改善。两者综合作用对分离度影响较小。因此,在手性柱拆分西酞普兰的实验中,改善柱温不能明显改善分离,且AGP柱在满足分离要求的情况下,尽量采用较低柱温。综合考虑本实验选用25℃柱温。

2.5 流动相流速对分离的影响

在室温下以50 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 4.3)为流动相,考察在0.6、0.7和0.8 mL/min 流速条件下西酞普兰分离情况。结果发现当流速由0.6 mL/min 升至0.8 mL/min 时,分离度由1.82下降至1.77, α 值基本保持不变(约1.30)。由此看出,降低流速可以改善分离度,这是因为溶质和蛋白质类固定相结合是一个相对较慢的动力学过程^[6],在低流速时,溶质与固定相作用更充分,而使柱效增加,分离改善。考虑到分析所用时间且在0.8 mL/min 时对映体已可以达到基线分离,因此最终选用该流速。

2.6 有机改性剂种类及比例对分离的影响

在室温下以50 mmol/L 醋酸铵缓冲液(pH 4.3)为流动相主体,分别以乙腈和异丙醇为改性剂,流速在0.8 mL/min 的条件下进行考察。结果显示:当乙腈-醋酸铵缓冲液比例为(2:98)时保留减弱,分离度降至0.78。流动相中加入2%异丙醇时,对映体完全不能分离。

综上所述,分离西酞普兰对映体的最佳色谱条件是:流动相:50 mmol/L 醋酸铵缓冲液(乙酸调pH至4.3),流速:0.8 mL/min,柱温:25℃。色谱图见图3。

3 讨 论

3.1 α_1 -AGP 柱性质

AGP柱是一种键合蛋白类手性柱,因其具有稳定性好,柱效较高,采用反相色谱系统,拆分范围广等优点而广泛使用。西酞普兰在AGP柱的峰形略

有拖尾,但该色谱条件下西酞普兰对映异构体出峰顺序为R型在前,S型在后,这对于检测痕量R型异构体有利,因此本实验建立的方法可用于测定西酞普兰对映异构体的纯度检查及立体选择性药代动力学研究。

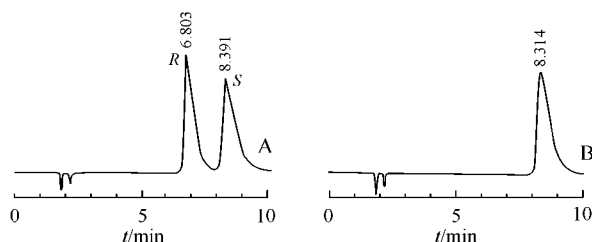


Fig.3 Chromatogram of citalopram enantiomers (A) and escitalopram (B) with 50 mmol/L ammonium acetate (pH=4.3) buffer as mobile phase at 25℃

3.2 pH 对分离和保留的影响

使用AGP柱时pH值的范围是4.0~7.0,而AGP的等电点为2.7,即当pH大于等电点时,AGP带负电荷。西酞普兰是弱碱性药物,在pH小于7.0时带正电,其保留机制是正负电荷的静电作用而产生^[7]。随着pH的升高,AGP所带负电荷增加,与西酞普兰作用加大,导致保留时间延长,峰形变宽,但选择性下降,分离度变小,因此仅依靠调节pH值无法完成对西酞普兰对映异构体的拆分。

3.3 AGP 手性柱分离机理探讨

目前普遍认同的手性分离机制是由Dalglish首次提出的三点相互作用识别模型理论^[8],即手性识别至少需要手性固定相和对映体之间存在三点相互作用,而且至少有一点作用与其它两点不在同一平面上。对于AGP手性柱,这种相互作用主要包括氢键效应、疏水效应和静电作用。流动相中改性剂能够和溶质竞争在固定相上的氢键结合位点,同时可以减弱固定相和溶质间的疏水作用使保留时间缩短,从而影响溶质在固定相上的手性选择性^[6]。氢键作用和疏水作用减弱也是使手性柱对西酞普兰对映体分离度明显降低的主要原因。

参 考 文 献

- [1] 杜 瑜(Du Y),李焕德(Li HD). 抗抑郁新药西酞普兰的药代动力学[J]. 中国临床药理学杂志(Chin J Clin Pharmacol), 2005, 21(4):307-310.
- [2] 潘红娟(Pan HJ),朱雪炎(Zhu XY). 氢溴酸西酞普兰的手性拆分及草酸依地普仑 ee 值检查[J]. 中国医药工业杂志(Chin J Pharm), 2004, 35(8):484-485.

- [3] Rochat B, Amey M, van Gelderen H, *et al.* Determination of the enantiomers of citalopram, its demethylated and propionic acid metabolites in human plasma by chiral HPLC[J]. *Chirality*, 1995, **7** (6):389–395.
- [4] 杨雪梅(Yang XM), 刘旭(Liu X). HPLC 测定 S-西酞普兰[J]. 第一军医大学学报(*Acad J First Med Coll PLA*), 2004, **24** (6):716–717.
- [5] Haupt D. Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral-AGP column[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, **685**(2):299–305.
- [6] Hermansson J. Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with α 1-acid glycoprotein [J]. *Trends Anal Chem*, 1989, **8**(7):251–259.
- [7] 杨永健(Yang YJ), 侯美琴(Hou MQ). α_1 -酸性糖蛋白柱拆分沙美特罗对映体[J]. 药物分析杂志(*Chin J Pharm Anal*), 2001, **21**(2):97–100.
- [8] Dalgliesh CE. The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms[J]. *J Chem Soc*, 1952, **137**:3 940–3 942.

新型复方制剂 Atripla 将占市场主导地位

巨大的市场潜力加速了新药研发进程,虽然该市场已较为成熟,但据预测在未来 10 年中, HIV 市场将经历重大改变,几种已上市或即将上市的新药将改变目前状况,展现出良好的前景。

Atripla 是全球第一个将分别来自两个不同类别的 3 种艾滋病治疗药物合为一体的药物,含有依发韦仑(efavirenz, Sustiva)、恩曲他滨(emtricitabine, Emtriva)和替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, Viread)3 种活性成分,2006 年 7 月首次获得 FDA 批准上市。Atripla 是复方制剂,每日只需服用 1 次,因此,它的上市对于艾滋病的治疗具有极其重要的意义。

新生代治疗药物各具特色

1. 核苷类逆转录酶抑制剂是最主要的一类,对市场的推进作用举足轻重;
2. CCR5 抑制剂、整合酶抑制剂等新类别药物的作用亦不可小觑。

辉瑞公司的 CCR5 抑制剂 maraviroc(Celsentri)和默克公司的整合酶抑制剂 raltegravir(Isentress)就属于新类别药物,预计这两种产品分别于 2007 年和 2008 年进入市场。

maraviroc 和 raltegravir 等均是可生物利用的口服药物,且价格亦相对低廉,因此,这些药物一旦上市,将会对老药恩夫韦地构成竞争。

其他类药物

由美国 Tibotec 公司研究开发的 rilpivirine(TMC-278)和 darunavir(Prezista)在未来抗 HIV 市场中被看好。

rilpivirine 作为继恩夫韦地之后的第 2 个非核苷逆转录酶抑制剂,对于常见的 NNRTI 耐受 HIV 病毒株显示出了较强的活性,目前 rilpivirine 尚处于 II 期临床。而 darunavir 已于 2006 年 7 月 15 日首次在美国上市。该产品为蛋白酶抑制剂,通过检测患者血液中的 HIV 病毒水平, darunavir 与低剂量的利托那韦(Ritonavir)联合使用可显著提高 HIV 患者的生存率。

(摘自中国药网,本刊有删节)