

西他沙星差向异构体的毛细管电泳分离

袁 佩¹, 林 蕾², 范 琦¹, 曾令高³

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆工商大学理学院, 重庆 400020;
3. 重庆市药品检验所, 重庆 400015)

摘要 :以 γ -环糊精和 D-苯丙氨酸为手性选择剂,采用毛细管区带电泳成功地分离了新型抗菌素西他沙星差向异构体。考察了添加剂的种类、浓度和缓冲溶液的 pH 对毛细管电泳分离西他沙星的影响。分离电压为 15 kV,选用 60 cm(有效长度 52.5 cm) \times 50 μ m i. d. 的石英毛细管,缓冲溶液组成为 10 mmol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 4.5), 10 mmol/L CuSO_4 , 20 mmol/L γ -环糊精和 10 mmol/L D-苯丙氨酸。实验结果表明,添加剂的种类和浓度是影响西他沙星手性分离的重要因素,只有当 D-苯丙氨酸、铜离子和 γ -环糊精同时存在并达到一定浓度时,西他沙星差向异构体在毛细管电泳中才具有良好的分离效果。该方法可用于西他沙星差向异构体的定量分析。

关键词 :毛细管电泳;西他沙星;差向异构体

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)05-0513-03 栏目类别 :研究论文

Separation of Sitafloxacin Epimers by Capillary Electrophoresis

YUAN Pei¹, LIN Lei², FAN Qi¹, ZENG Linggao³

(1. Pharmaceutical Department, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;
2. College of Sciences, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400020, China;
3. Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 400015, China)

Abstract : Sitafloxacin epimers were separated by capillary zone electrophoresis using γ -cyclodextrin (γ -CD) and D-phenylalanine (D-Phe) as chiral selector. The effects of the concentrations of γ -CD, D-Phe, Cu^{2+} and pH of buffer were investigated. An uncoated fused-silica capillary of 50 μ m i. d. and 60 cm (effective length 52.5 cm) was used. The capillary temperature was maintained at 25 $^\circ\text{C}$. Samples were injected under a pressure of 7 kPa for 5 s and separated at 15 kV. A baseline separation of sitafloxacin epimers was achieved with a background electrolyte of 10 mmol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 4.5), 10 mmol/L CuSO_4 , 20 mmol/L γ -CD and 10 mmol/L D-Phe. The linear range for sitafloxacin was 32 - 400 mg/L (0.996). The relative standard deviations (RSDs) of migration time and peak area were less than 1.9% and 3.8% respectively. This method can be applied in qualitative and quantitative analysis for sitafloxacin epimers.

Key words : capillary electrophoresis (CE); sitafloxacin; epimers

在药物分析中,手性拆分占有重要地位。大约有 80% 以上的药物都是手性药物,大多数情况下,其中一种异构体具有药理活性,而另一种异构体通常活性差,甚至有毒副作用。因此,对手性异构体的分析显得极为重要。目前,气相色谱和液相色谱方法已大量用于手性药物分析,尤其是各种型号的手性色谱柱已广泛用于药物分析。但是,这些色谱柱通常价格昂贵、使用寿命短且柱效低^[1]。毛细管电泳(CE)是 20 世纪 80 年代兴起的一种分离分析技术,其分离效率高、分离模式多、低耗、快捷、简便,在手性药物分离中得到十分广泛的应用^[2-4]。喹诺酮

类药物是近年来迅速发展起来的抗菌药物,具有抗菌谱广、抗菌力强、结构简单、给药方便,与其他常用抗菌药物无交叉耐药性、通过合成方法生产、疗效价格比高等优势,因而愈来愈受到各国的重视,成为竞相生产和应用的热点药品。西他沙星属于第四代喹诺酮类抗菌素,其抗菌谱及抗菌力达到了新的高峰^[5-6]。西他沙星(结构见图 1)具有 3 个手性中心,在其合成过程中,仅 $-\text{NH}_2$ 位为外消旋体,其差向异构体分离困难,目前对它的手性分离主要采用手性柱高效液相色谱法,但所用色谱柱昂贵,色谱平衡时间长。本实验选用 γ -环糊精(CD)和 D-苯丙氨

酸(Phe)为手性添加剂,以毛细管区带电泳法分离西他沙星手性药物,方法简单,易于操作。

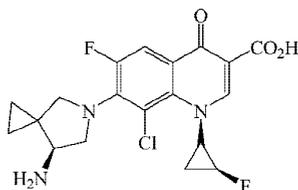


图 1 西他沙星的结构
Fig.1 Structure of sitafloxacin

1 实验部分

1.1 仪器与药品

Beckman P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪,配二极阵列检测器,高压电源(-30 kV ~ +30 kV)(美国贝克曼公司)ϕ0 cm × 50 μm i. d.(有效长度 52.5 cm)石英毛细管(河北永年光导纤维厂)。

α-CD、β-CD、γ-CD(纯度 99.1%,Sigma 公司),西他沙星(自制);实验用水为超纯水(Milli-Q Biocel 除热源超纯水系统);所有试剂均为分析纯。

1.2 实验条件及方法

配制运行缓冲溶液,其组成为:10 mmol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄,10 mmol/L CuSO₄,20 mmol/L γ-CD 和 10 mmol/L D-苯丙氨酸,并用 H₃PO₄ 调节 pH 值至 4.5,经 0.45 μm 的纤维树脂膜过滤并超声脱气后使用。石英毛细管使用前先后用 0.1 mol/L NaOH、0.1 mol/L 磷酸、超纯水和运行缓冲溶液加压冲洗各 15 min。每两次运行之间用缓冲液冲洗 3 min,冲洗压力 50 kPa,检测波长 295 nm。压力进样 7 kPa × 5 s,运行电压 15 kV,实验温度 25 ℃。

2 结果与讨论

2.1 手性试剂对拆分的影响

首先,选用 α-CD、β-CD 和 γ-CD 3 种环糊精进行试验,运行缓冲溶液的组成为:10 mmol/L 环糊精,10 mmol/L 硫酸铜,10 mmol/L D-苯丙氨酸和 10 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾(pH 4.5)。结果发现以 γ-CD 为手性试剂时,西他沙星差向异构体有较好的分离。

同时,在运行缓冲溶液的其他组成和仪器条件不变而只改变 γ-CD 浓度的情况下进行试验,结果发现,西他沙星差向异构体的分离度随着 γ-CD 浓度的增加而增加,但是当 γ-CD 的浓度超过 20 mmol/L 后则分离度略有减小,结果见图 2-a。

2.2 金属离子对拆分的影响

在运行缓冲溶液中分别加入 10 mmol/L Fe-

SO₄、NiSO₄、CuSO₄ 和 ZnSO₄ 缓冲溶液的其他组成为 20 mmol/L 环糊精、10 mmol/L 苯丙氨酸和 10 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾,pH 值调节到 4.5。结果表明:在含有 Fe²⁺ 的缓冲溶液中几乎无拆分现象;在含有 Ni²⁺、Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 的缓冲溶液中都有一定的拆分效应;含有 Cu²⁺ 时拆分得最好。

进一步考察 CuSO₄ 在运行缓冲液中的适宜浓度,结果发现(见图 2-b):当运行缓冲溶液中没有 CuSO₄ 时,几乎没有拆分现象;随着 CuSO₄ 浓度的增加,拆分的分离度逐渐增大;当达到 10 mmol/L 后变化较平缓,可较好地达到拆分要求。因此最终选用 10 mmol/L CuSO₄ 配制运行缓冲液。

2.3 氨基酸对拆分的影响

在运行缓冲溶液中加入不同的 D 型氨基酸,如 D-Phe、D-Glu、D-Asp 和 D-Lys 等,其他条件保持不变。结果表明:当运行缓冲溶液中加入 D-Phe 时西他沙星差向异构体的拆分效果最好;加入酸性氨基酸 D-Glu 和 D-Asp 时,几乎没有拆分效应;加入碱性氨基酸 D-Lys 时只有较小的分离度。因此选择 D-Phe 作为运行缓冲溶液的添加剂。

从图 2-c 可以看出,随着 D-Phe 浓度的增加,西他沙星差向异构体的分离度迅速增加,达到 7 mmol/L 后分离度的增加速度减缓,浓度超过 11 mmol/L 后分离度开始逐渐减小。因此最终选择 D-Phe 的浓度为 10 mmol/L。

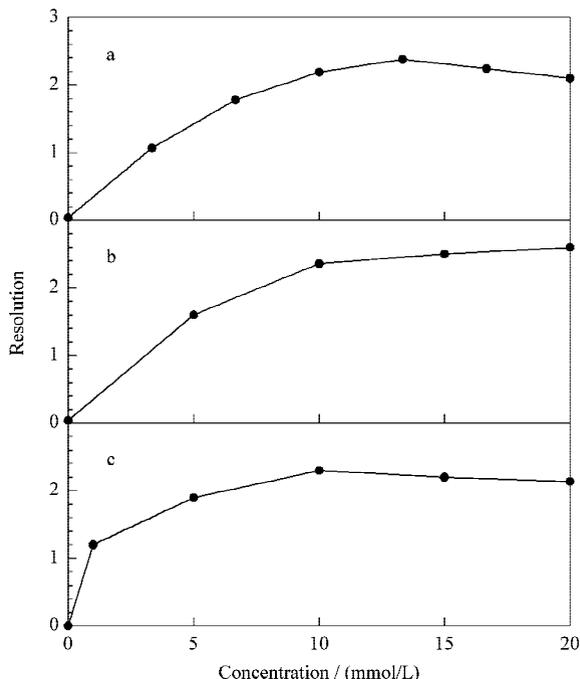


图 2 (a) γ-CD、(b) Cu(II) 和 (c) D-Phe 浓度对西他沙星分离的影响
Fig.2 Effects of concentrations of (a) γ-CD, (b) Cu(II) and (c) D-Phe on resolution of sitafloxacin

2.4 缓冲溶液的 pH 值及电压对拆分的影响

通过上述实验发现,缓冲溶液的组成为 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, 10 mmol/L CuSO_4 , 20 mmol/L $\gamma\text{-CD}$ 和 10 mmol/L D-Phe 时,两种异构体可达到基线分离,但迁移时间较长。因此,在此基础上进一步优化操作条件。

用磷酸调节缓冲溶液的 pH 值分别为 5.8, 5.2, 4.5, 3.2, 考察 pH 值对分离和迁移时间的影响。图 3 显示在 25 $^{\circ}\text{C}$, 15 kV 条件下缓冲液的 pH 对西他沙星差向异构体迁移时间和分离度的影响。pH 对迁移时间影响的总趋势是迁移时间随着 pH 的升高而增长。这主要是由于在低 pH 溶液中,毛细管壁的硅醇基离解减少,电荷数减少, Zeta 电位降低,电渗速度亦随之减缓。另外,缓冲液的 pH 对溶质的离解也产生影响,当 pH 降低时,西他沙星主要以共轭酸的形式存在,带更多的正电荷,因而迁移速度增大,并且迁移速度的增加大于电渗速度的减少,因此西他沙星的表现迁移速度仍然增大,迁移时间缩短。同时, pH 值减小,使得西他沙星的离解程度增加,带更多的正电荷,因而在毛细管中的泳动主要依靠本身的迁移,缔合作用进一步体现在表现迁移速度上,从而使西他沙星差向异构体的分离得到改善。但若 pH 过低,则迁移速度过快,会使西他沙星与添加剂的作用时间缩短,导致分离效果下降。

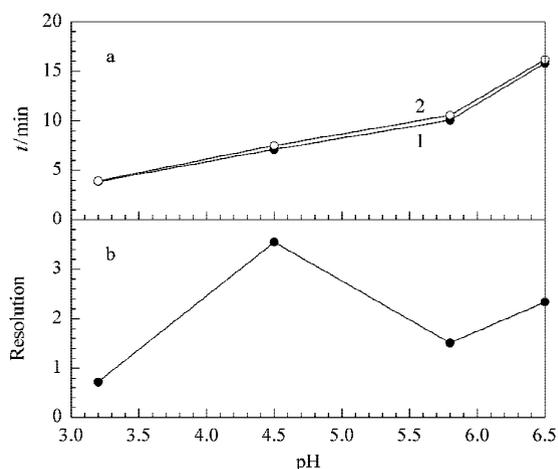


图 3 pH 对西他沙星的 (a) 迁移时间和 (b) 分离度的影响
Fig. 3 Effects of pH on (a) migration time and (b) resolution of sitafloxacin

实验发现,分离电压由 5 kV 升至 15 kV 时,分离度和峰形有所改善;升至 20 kV 时,分离效果下降。这是高电压下过量的焦耳热不能有效地散发而形成径向温度梯度,导致区带展宽、柱效下降的结果。因此选用 15 kV 作为分离电压。

在上述优化条件下西他沙星差向异构体的分离图谱见图 4。

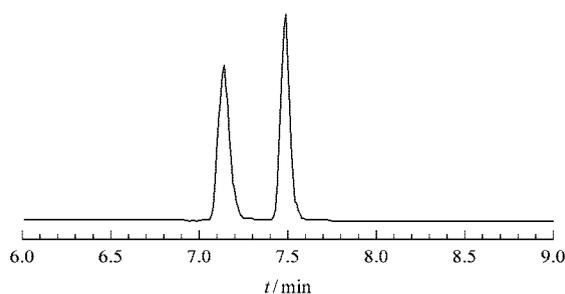


图 4 西他沙星差向异构体的毛细管电泳图谱
Fig. 4 Electropherogram of sitafloxacin epimers
Running solution: 10 mmol/L CuSO_4 , 20 mmol/L $\gamma\text{-CD}$, 10 mmol/L D-Phe, 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ (pH 4.5).

2.5 方法学考察

在选定的条件下,配制不同浓度西他沙星的溶液,结果发现西他沙星在质量浓度为 32 ~ 400 mg/L 时线性关系良好,相关系数为 0.996;检出限($S/N=3$)为 6.0 mg/L。

将 200.0 mg/L 西他沙星试样连续重复进样 5 次,测得迁移时间的相对标准偏差(RSD)小于 1.9%,峰面积的 RSD 小于 3.8%。实验结果表明本方法可应用于西他沙星差向异构体的分离分析。

2.6 分离机理的探讨

从上述实验结果可看出,西他沙星的手性分离依赖其存在的运行环境。当运行缓冲溶液中缺少一种组分(如环糊精、铜离子或氨基酸)时,手性分离能力便会大大减弱,甚至没有分离效果。这是因为在本研究体系中,差向异构体的西他沙星同文献[7]报道的氧氟沙星一样与氨基酸和金属离子形成了三元配合物,因而增加了异构体的差异性;再进一步与环糊精作用,从而达到很好的分离效果。试验结果发现,在运行缓冲溶液中,当缺少 Cu 或 D-Phe 时,各异构体的分离效果很差,此时样品不能形成三元配合物,而环糊精对单纯的西他沙星手性识别能力差,因此不会有好的分离效果出现。

参考文献:

- [1] Morikawa A, Hamase K, Zaitzu K. Anal Biochem, 2003, 312: 66
- [2] Zukowski J, de Biasi V, Berthod A. J Chromatogr A, 2002, 948(1/2): 331
- [3] Blaschke G, Chankvetadze B. J Chromatogr A, 2000, 875: 3
- [4] Wang Wei, Chen Yuyun, Yang Weiping, Zhang Zhujun. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王伟, 陈宇云, 杨维平, 章竹君. 分析化学), 2005, 33(8): 1113
- [5] Chen Chaosen, Zeng Zhuo, Xiong Shuqun. Fine Chemical Intermediates (陈超森, 曾卓, 熊淑群. 精细化工中间体), 2005, 35(5): 1
- [6] Onodera Y, Tanaka M, Sato K. J Antimicrob Chemother, 2001, 47(4): 447
- [7] Arai T, Koike H, Hirata K, Oizumi H. J Chromatogr, 1988, 448: 439