

蛋白质及纤维素衍生物手性固定相分离盐酸西替利嗪对映体

张哲峰^{1,2}, 杨更亮^{1,4*}, 梁贵键³, 周宇¹, 陈义⁴

(1. 河北大学 化学与环境学院, 河北省分析科学重点实验室, 河北 保定 071002; 2. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011; 3. 空军总医院, 北京 100850; 4. 中国科学院 化学研究所 分子科学中心, 北京 100080)

摘要: 目的 研究盐酸西替利嗪对映体在蛋白质及纤维素衍生物固定相上的保留行为, 优化分离条件。方法 聚 α -葡萄糖苷酯 α_1 -酸性糖蛋白及卵粘蛋白为固定相时, 流动相分别为正己烷-异丙醇-乙醇-三氟乙酸(430: 45: 25: 1)、乙腈-10 mmol \cdot L⁻¹磷酸盐缓冲液(NaOH调至pH 7.0)(4: 96)及乙腈-20 mmol \cdot L⁻¹磷酸二氢钾(三乙胺调至pH 7.0)(12.7: 87.3)。蛋白柱柱温25 $^{\circ}$ C, 检测波长均为230 nm。结果 本法准确、灵敏、专属性好。结论 两类固定相均可较好地分离盐酸西替利嗪对映体。

关键词: 高效液相色谱法; 蛋白质固定相; 纤维素衍生物固定相; 盐酸西替利嗪; 对映体; 手性分离

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)02 - 0204 - 04

Study on the enantiomer separation of cetirizine dihydrochloride using proteinate- and amylose-based chiral stationary phase

ZHANG Zhe-feng^{1,2*}, YANG Geng-liang^{1,4}, LIANG Gui-jian³, ZHOU Yu¹, CHEN Yi⁴

(1. College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 3. General Hospital of the Air Force PLA, Beijing 100850, China; 4. Center for Molecular Science, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: **Aim** To study the chromatographic behavior of cetirizine dihydrochloride on the proteinate- and amylose-based chiral stationary phases so as to optimize the chromatographic condition of its enantiomers separation. **Methods** When using amylose-based, α_1 -acid glycoprotein and ovomucoid protein chiral stationary phase, the mobile phase was hexane-isopropyl alcohol-alcohol-trifluoroacetic acid (430: 45: 25: 1), acetonitrile-10 mmol \cdot L⁻¹ phosphate buffer solution (adjusted to pH 7.0 with sodium hydroxide) (4: 96) and acetonitrile-20 mmol \cdot L⁻¹ KH₂PO₄ solution (adjusted to pH 7.0 with triethylamine) (12.7: 87.3), respectively. The temperature of proteinate column was 25 $^{\circ}$ C. The detective wavelength was 230 nm. **Results** The two enantiomers could be separated on the two kinds of chiral stationary phases without derivatization and the resolution was above 2.0. The methods developed on the two kinds of chiral stationary phases are accurate, sensitive and specific. **Conclusion** Both the proteinate- and amylose-based chiral stationary phases can be used to separate the enantiomers of cetirizine.

Key words: HPLC; proteinate-based chiral stationary phase; amylose-based chiral stationary phase; cetirizine dihydrochloride; enantiomer; chiral separation

西替利嗪(cetirizine, CTZ)为第2代H₁受体拮抗剂,含1个手性中心,故有一对对映体(图1),我国

近年批准上市的为其消旋体。研究^[1,2]表明其抗组胺活性源于左旋体,后者能进一步提高H₁受体拮抗作用的选择性,降低中枢镇静等副作用;不会引起心脏Q_T间期延长及其他心律失常现象;安全范围宽,病人耐受性好,是一很有前途的第3代H₁受体拮抗剂。建立本品对映体的色谱分离方法,对于控

收稿日期: 2003-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20075005, 29205037); 河北省自然科学基金资助项目(200077).

* 通讯作者 Tel: 86 - 312 - 5079359, E-mail: ygl@mail.hbu.edu.cn

制其光学纯度、监测不对称合成中对映体纯度及研究其体内代谢的立体选择性,开发单一光学异构体新药具有重要意义。本文研究了纤维素衍生物及蛋白质手性固定相上,分别以正相和反相色谱法分离 CTZ 对映体的情况,建立了对映体分离测定法。

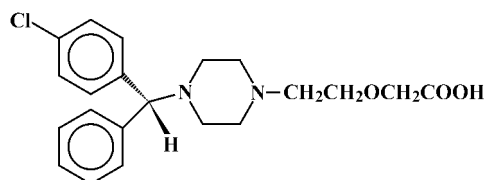


Figure 1 Structure of cetirizine (CTZ)

材料与方法

仪器、试剂及色谱条件 Agilent HP1100 高效液相色谱仪,1100 VWD 紫外可见检测器,1100 自动进样器,HP 化学工作站。PE-241 MC 旋光分光仪。

CTZ 及(-), (+)-CTZ(纯度分别为 99.8%, 99.2%和 99.0%)及其盐酸盐、聚 α -葡糖苷 3,5-二甲苯氨基甲酸酯柱、 α_1 -酸性糖蛋白柱及卵粘蛋白柱由本校色谱与分离科学教研室合成与制备。乙腈、异丙醇为 HPLC 级,其余试剂为分析纯,水为重蒸馏水。

聚 α -葡糖苷酯、 α_1 -酸性糖蛋白及卵粘蛋白柱上的流动相分别为:正己烷-异丙醇-乙醇-三氟乙酸(430:45:25:1)、乙腈-10 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(NaOH 溶液调至 pH 7.0)(4:96)及乙腈-20 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾(三乙胺调至 pH 7.0)(12.7:87.3)。蛋白柱柱温 25 ℃,检测波长均为 230 nm。

蛋白质固定相上分离影响因素考察 在 α_1 -酸性糖蛋白柱(150 mm×4.0 mm ID,5 μ m)上,分别固定磷酸盐缓冲液与乙腈的比例,调整 pH 值;固定磷酸盐缓冲液与乙腈的比例及 pH 值,调整缓冲液浓度;使用不同的有机改性剂;固定磷酸盐缓冲液浓度及 pH 值,调整其与乙腈的比例。在这些条件下考察 CTZ 对映体的分离情况。

聚 α -葡糖苷酯固定相上分离影响因素考察 在聚 α -葡糖苷 3,5-二甲苯氨基甲酸酯柱(150 mm×4.0 mm,5 μ m)上,用正己烷-异丙醇(90:10)及正己烷-乙醇(85:15)系统作流动相,考察 CTZ 对映体的分离情况,优化流动相组成。

两类固定相分离 CTZ 对映体的方法学 称取 CTZ 适量,加流动相制成系列浓度溶液,在两类固定相上考察各色谱系统的线性范围;按信噪比为 3,测定两对映体的检测限;并重复进样 5 次,考察方法精

密度。

色谱峰的确证 取(-)和(+)-CTZ 及其盐酸盐制成水溶液,测定其比旋度,并以峰位及峰重叠法对色谱峰进行归属确认。

结果与讨论

1 在蛋白质固定相上的手性分离

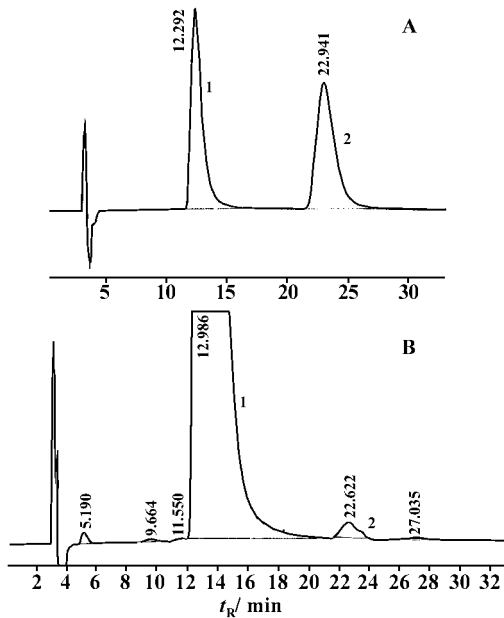
α_1 -酸性糖蛋白和卵粘蛋白是两种天然蛋白质,分子中具有一些特殊的结合位点,这对药物对映体具有高度立体选择性,故可固化为手性固定相。 α_1 -酸性糖蛋白(AGP)是由 181 个氨基酸残基和 5 个糖链(分别占 55%和 45%)组成的糖蛋白^[3],其等电点为 2.5,该固定相可用于多种药物特别是阳离子化合物对映体的拆分^[4];卵粘蛋白分离自蛋清,等电点 3.9,在很宽的 pH 范围内具有较好稳定性,键合在氨基丙基硅胶上,制成第 3 代蛋白类手性固定相,可分离多种胺和羧酸类药物对映体^[5]。pH 值大于等电点时,蛋白质带负电荷,随 pH 值的降低,负电荷量减少^[6,7]。试验表明,静电作用是影响保留的因素之一,可通过调节流动相 pH 值优化对映体分离(表 1)。由于溶质在蛋白类固定相中的传质较慢^[3],所以在一定范围内,降低流速,有利于提高柱效,改善分离。

Table 1 Effects of the mobile phase on the separation of cetirizine enantiomers on the α_1 -acidglycoprotein column

Phosphate buffer (A) concentration / mmol·L ⁻¹	pH	Organic modifier (B)	A:B	Separation factor (α)	Resolution (Rs)
40	7.0	Acetonitrile	96:4	2.02	2.00
20	7.0	Acetonitrile	96:4	1.98	1.99
10	7.0	Acetonitrile	95:5	1.64	1.53
10	7.0	Acetonitrile	93:7	1.88	2.56
10	7.0	Acetonitrile	96:4	2.08	3.02
10	7.0	Methanol	92:8	1.76	1.92
10	7.0	Isopropanol	98:2	1.26	0.92
10	6.0	Acetonitrile	96:4	1.38	1.02
10	5.0	Acetonitrile	96:4	1.21	0.52
10	4.0	Acetonitrile	96:4	1.18	0.36

在 α_1 -酸性糖蛋白柱上优化后的分离条件为:乙腈-10 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(NaOH 溶液调至 pH 7.0)(4:96)为流动相,流速 1 mL·min⁻¹。两对映体分离度为 3.8(图 2),左、右旋体最低检出限分别为 3.2 ng 和 4.6 ng,重复进样的 RSD 均为 1.2%,浓度在 0.08~0.5 g·L⁻¹,进样量(X)与峰面积(Y)的线

性方程分别为 $Y = -2.74 \times 10^4 + 1.87 \times 10^7 X$ ($r = 0.9997$) 和 $Y = -2.99 \times 10^4 + 1.64 \times 10^7 X$ ($r = 0.9994$)。



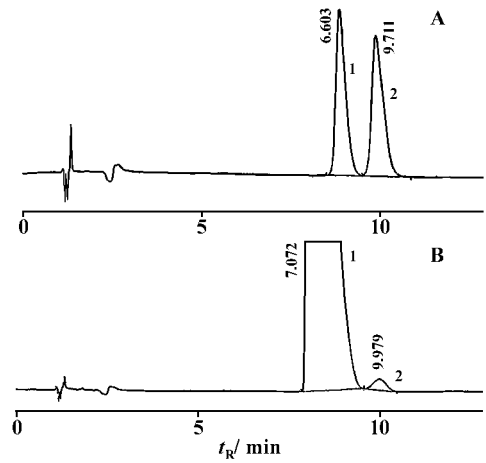
A: (-), (+)-Cetirizine; B: (-)-Cetirizine and 1% (+)-cetirizine; 1: (-)-Cetirizine; 2: (+)-Cetirizine

Figure 2 Chiral separation chromatogram of cetirizine on α_1 -acid glycoprotein column

在卵粘蛋白柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μ m)上优化后的流动相为乙腈-20 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾(三乙胺调至 pH 7.0)(12.7: 87.3), 流速 0.8 mL·min⁻¹。两对映体分离度为 2.3(图 3), 左、右旋体最低检出限分别为 2.4 ng 和 2.8 ng, 重复进样的 RSD 均为 1.5% 和 1.8%。在上述浓度范围内, 进样量(X)与峰面积(Y)的线性方程分别为 $Y = -3.21 \times 10^4 + 1.16 \times 10^7 X$ ($r = 0.9993$) 和 $Y = -3.85 \times 10^4 + 2.02 \times 10^7 X$ ($r = 0.9991$)。可见, 两种蛋白手性柱对本品对映体均有良好的分离效果。

2 在纤维素衍生物固定相上的手性分离

聚 α -葡糖苷酯属纤维素衍生物, 每个糖单元有 5 个手性碳原子, 为对映体提供了良好的手性环境, 而且每个单元糖 2, 3, 6 位上 3 个羟基易被衍生成酯或醚而增强其手性识别能力。所述 3 个羟基分别与 3, 5-二甲基苯氨基甲酸反应成酯再与硅胶共价结合即得聚 α -葡糖苷 3, 5-二甲基苯氨基甲酸酯固定相(图 4)。一般认为^[8,9]: 对映体进入其螺旋型手性腔中, 形成一种包含复合物而被拆分; 其规整的高级结构对光学拆分有重要作用, 取代苯基上的给电子基团(如甲基等)对螺旋型构象的规整性起稳定作用;



A: (-), (+)-Cetirizine; B: (-)-Cetirizine and 1% (+)-cetirizine. 1: (-)-Cetirizine; 2: (+)-Cetirizine

Figure 3 Chiral separation chromatogram of cetirizine on a amylose-based column

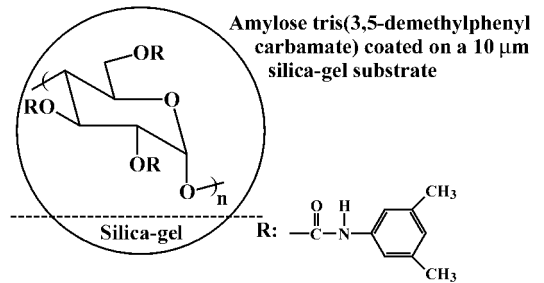


Figure 4 Structure of a amylose-based chiral stationary phases

被测物的保留与其和手性腔间的匹配程度有关; 纤维素衍生物结构中的酰胺基团、酯羰基和取代苯基与对映体之间较强的氢键作用和 π - π 电子相互作用使得这类固定相的手性识别能力大为增强。该类固定相对含苯环、萘环和极性取代基的对映体都具有较好的拆分能力, 流动相中应避免水、乙腈、氯仿、甲醇等, 以免引起直链淀粉的溶解或溶胀而损坏色谱柱, 故多在正相色谱系统中应用, 以正己烷-异丙醇或正己烷-乙醇系统作流动相。实践证明, 前者比例约在 90:10 时色谱效果较好, 后者因在 85:15 至 40:60 范围内时往往导致基线不稳, 多在该范围之外进行调整以实现良好分离。常依样品的酸碱性不同采用二乙胺或三氟乙酸作改良剂, 调整样品在流动相中的解离状态, 使具有合适的色谱保留, 实现对映体的良好分离。试验表明流动相中醇的增加可缩短样品保留时间, 乙醇的作用比异丙醇显著, 当流动相中极性添加剂量增大后, 它与固定相之间产生的氢键作用抑制了对映体与固定相之间的相互作用而使其保留减弱, 调整添加剂用量, 对映体选择因子变化不

大,但容量因子变化很大,可用于调节对映体的出峰时间及分离度,使分离在适当时间内完成。

结合两系统的特点,经综合优化,在该类固定相上以正己烷-异丙醇-乙醇-三氟乙酸(430:45:25:1)为流动相,在12 min内实现了两对映体的良好分离(分离度2.2,图3)。左、右旋体的最低检出限分别为2.0 ng和2.5 ng,重复进样的RSD为1.02%和1.15%,浓度在 $0.001 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,进样量(X)与峰面积(Y)的线性方程分别为 $Y = -1.56 \times 10^4 + 1.56 \times 10^7 X$ ($r = 0.9995$)和 $Y = -1.88 \times 10^4 + 1.52 \times 10^7 X$ ($r = 0.9998$)。

可见,经优化色谱条件,在蛋白质及纤维素衍生物两类手性固定相上,分别运用反相和正相色谱系统,均可实现CTZ对映体的分离,为研究单一光学异构体药物提供参考。

References:

- [1] Devalia JL, Devos C, Hanotte F, *et al.* A randomized, double-blind, crossover comparason among cetirizine levocetirizine, and ucb 28557 on histamine-induced cutaneous responses in healthy adult volunteers [J]. *Allergy*, 2001, **56** (1):50 - 57.
- [2] Wang DY, Hanotte F, De Vos C, *et al.* Effect of cetirizine, levocetirizine, and dextrocetirizine on histamine-induced nasal responses in healthy adult volunteers [J]. *Allergy*, 2001, **56** (4):339 - 343.
- [3] Hermansson J. Enantioomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with α_1 -acid glycoprotein [J]. *Trends Anal Chem*, 1989, **8**(7):251 - 258.
- [4] Mills MH, Mather LE, Gu XS, *et al.* Determination of ketorolac enantiomers in plasma using enantioselective liquid chromatography on an alpha 1-acid glycoprotein chiral stationary phase and ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, **568**(1):177 - 182.
- [5] Matsuoka M, Banno K, Sato T. Analytical chiral separation of a new quinolone compound in biological fluids by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, **676**(1):117 - 122.
- [6] Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development* [M]. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, 1997.551 - 555.
- [7] Hermansson J, Grahn A. Optimization of the separation of enantiomers of basic drugs retention mechanisms and dynamic modification of the chiral bonding properties on an α_1 -acid glycoprotein column [J]. *J Chromatogr A*, 1995, **694**(1):57 - 63.
- [8] Isaksson R, Erlandsson P, Hansson L, *et al.* Triacetylcellulose as a chiral stationary phase for HPLC [J]. *J Chromatogr*, 1990, **498**(2):257 - 261.
- [9] Chen XM, Mao XQ, Zhang ZZ, *et al.* Separation of enantiomers on bonded cellulose trisphenylcarbamate stationary phase by high-performance liquid chromatography [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2002, **60**(1):93 - 97.