

# 毛细管电泳分离手性药物罗格列酮钠对映体的方法研究

杜国华<sup>1</sup>, 刘力宏<sup>2</sup>, 魏君<sup>1</sup>, 张淑珍<sup>1</sup>, 刘勤<sup>1</sup>, 谢剑炜<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 厦门大学 化学化工学院 化学系  
现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 以环糊精及其衍生物为手性选择剂, 通过优化缓冲液的浓度、酸度以及采用环糊精的种类和浓度等, 建立了罗格列酮钠对映体的水介质和非水介质两种毛细管电泳拆分方法。最佳条件为: 150 mmol/L Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液, pH=2.0 含有 1 mmol/L  $\beta$ -CD 或 DM- $\beta$ -CD, 10% (v/v) 甲醇的运行液, 分离电压为 25 kV, 检测波长 215 nm。也可以使用含有 9 mmol/L LHDMS- $\beta$ -CD, 20 mmol/L 磷酸和 10 mmol/L NaOH 的甲醇电泳液。两种拆分体系均实现了罗格列酮钠对映体的基线分离, 而且拆分效率基本相当。方法简便、快速, 可作为罗格列酮钠的手性分离方法。

**关键词:** 水/非水介质毛细管电泳; 手性分离; 罗格列酮钠

中图分类号: O 657.8 R 977.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2005)06-0062-04

## Chiral Separation of Rosiglitazone Sodium by Aqueous/Nonaqueous Capillary Electrophoresis

DU Guo hua<sup>1</sup>, LIU Li hong<sup>2</sup>, WEI Jun<sup>1</sup>, ZHANG Shu zhen<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, XIE Jian wei<sup>1</sup>

(1. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850 China; 2. Department of Chemistry and Key Laboratory of Analytical Sciences of the Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005 China)

**Abstract:** HPLC methods for separating and determining the rosiglitazone sodium enantiomers were established. The effects of buffer concentration, pH, and the type and concentrations of CDs in the chiral separation of rosiglitazone sodium were investigated. The buffer solution used in aqueous capillary electrophoresis (ACE) was 150 mmol/L Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution, pH=2.0 containing 1 mmol/L  $\beta$ -CD or DM- $\beta$ -CD, and 10% (v/v) methanol. The voltage applied was 25 kV, and the detective wavelength was 215 nm. In addition, a simple method for the separation of rosiglitazone sodium enantiomers was described by nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) after establishing suitable separation conditions. Under the experiment conditions adopted, the baseline separation of rosiglitazone sodium enantiomers was obtained by the two methods. The proposed methods were simple, rapid and accurate, and could be used for the chiral separation of rosiglitazone sodium.

**Key words:** Aqueous/nonaqueous capillary electrophoresis (ACE/NACE); Chiral separation; Rosiglitazone sodium

目前, 全球已上市药物中有很一部分具有手性中心, 其对映体间的活性存在着较大差异, 从而显示出不同的疗效和毒理学性质。罗格列酮钠(分子结构式如图 1)为胰岛素增敏剂, 用来治疗 II 型糖尿病。研究建立罗格列酮钠的手性分离方法可为其立体选择性代谢研究, 了解其药理作用、药效以及临床研究都具有重要的理论和实际意义。

高效毛细管电泳具有高效快速, 简便等特点而被广泛应用于药物手性分离<sup>[1~3]</sup>。其中非水介质毛细管电泳(NACE)被认为是非常有力的手性化合物分离工具<sup>[4~6]</sup>。文献<sup>[7]</sup>通过添加磺化丁基- $\beta$ -环糊精(SB- $\beta$ -CD)和 2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精(DM- $\beta$ -CD)混合手性添加剂于水介质中, 拆分了罗格列酮外消旋体。本文采用

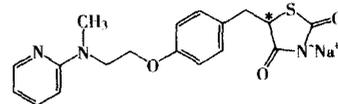


图 1 罗格列酮钠的分子结构式  
Fig. 1 The structure of rosiglitazone sodium

收稿日期: 2004-11-08 修回日期: 2005-02-05

作者简介: 杜国华(1967-), 女, 河北南宫人, 博士; 谢剑炜, 联系人, Tel: 010-66931640 E-mail: xiejw@nic.bmi.ac.cn

单一的中性环糊精 DM- $\beta$ -CD 或  $\beta$ -CD 作为手性选择剂, 通过均匀设计实验确定了水介质毛细管电泳 (ACE) 拆分的实验条件, 并在此基础上对各实验条件进行了更为系统的优化; 另外, 还采用带负电荷的环糊精作为手性选择剂, 建立了罗格列酮钠的 NACE 拆分体系。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

手性药物罗格列酮钠由军事医学科学院毒物药物研究所合成。  $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -CD)、 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)、羟丙基- $\beta$ -环糊精(HP- $\beta$ -CD)(ACROS 产品, Belgium); 2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精(DM- $\beta$ -CD)(Sigma 产品, USA); 2,3-二甲基-6-磺酸基- $\beta$ -环糊精(HDMS- $\beta$ -CD)(Fluka 产品, Switzerland); 甲醇 (Fisher 公司, USA, HPLC 级); 实验中其它试剂均为分析纯; 所用水为双蒸水。

### 1.2 仪器

Agilent HP<sup>3D</sup> CE 毛细管电泳仪(美国安捷伦公司)配二极管阵列检测器, 检测波长 190~320 nm; 未涂层石英毛细管柱(河北省永年锐沅色谱器件有限公司) 58.5 cm(有效长度 50 cm)  $\times$  50  $\mu$ m ID 裸 pHM 64 型酸度计(丹麦)。

### 1.3 溶液配制

精密称量罗格列酮钠外消旋体 2 mg, 用水或甲醇定容至 10 mL。水介质背景缓冲体系由 150 mmol/L Tris 溶液, 用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调 pH 至 2.0 加入环糊精使之浓度为 1 mmol/L。非水介质背景缓冲体系由适量的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 NaOH 溶于甲醇, 加入 HDMS- $\beta$ -CD 至所需浓度。所有溶液经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 超声脱气后使用。

### 1.4 毛细管电泳实验方法

每次开机后依次用双蒸水冲洗 2 min, 0.1 mol/L NaOH 冲洗 3 min, 再用双蒸水冲洗 3 min, 最后用运行液冲洗 5 min, 两次运行之间用运行液冲洗 2 min。采用压力进样, 进样量为 5 kPa  $\times$  4 s, 选定合适的操作电压和适宜的检测波长进行毛细管电泳分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 均匀实验拆分罗格列酮钠对映体

选取对手性分离影响较大的因素: 背景电解质 pH 值、背景电解质浓度、环糊精浓度及有机添加剂含量为 4 个主要条件, 每个条件选取 6 个水平, 取值如表 1 所示。

表 1 影响因素及对应的水平取值  
Table 1 Experimental parameters and related levels

Factors	1	2	3	4	5	6
pH values	2	2.5	3	3.5	4	4.5
Tris concentration $c$ /(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	50	75	100	150	200	250
$\beta$ -CD concentration $c$ /(mmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	1	3	5	7	9	12
Methanol $\varphi$ /%	5	10	15	20	25	30

采用均匀设计 U<sub>18</sub>(12<sup>10</sup>)表中的 1, 6, 7, 9 列, 进行实验安排, 对罗格列酮钠进行手性分离。

根据均匀设计的实验结果初步确定了较好的分离条件: pH=2 含  $\beta$ -CD 1 mmol/L, 100 mmol/L 的 Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液, 在均匀实验的基础上对各影响因素进行如下更为系统的优化。

### 2.2 背景电解质 pH 值的影响

保持均匀实验确定的其它条件不变, 在酸性范围内选取 pH=2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 进行 pH 值影响因素的考察。结果表明, 随着 pH 值的提高, 迁移时间没有较明显的变化, 分离度也无明显变化。仅在 pH=4.5 时分离度变小。因此, 选择最佳酸度为 pH=2.0。

### 2.3 背景电解质浓度的影响

在  $\beta$ -CD 浓度为  $1\text{ mmol/L}$ ,  $10\%$  甲醇存在的条件下, 控制最佳酸度为  $\text{pH}=2$  进行 Tris 浓度的优化(如图 2)。结果表明, 随着 Tris 浓度的增加, 迁移时间逐渐延长, 分离度逐渐增大。实验选择  $150\text{ mmol/L}$  Tris 浓度为最佳条件。

### 2.4 环糊精添加剂类型的影响

在  $\text{pH}=2$ ,  $c(\text{Tris})=150\text{ mmol/L}$ ,  $10\%$  甲醇的情况下, 考察不同种类的环糊精对手性药物拆分的影响。实验结果表明,  $\beta$ -CD ( $1\text{ mmol/L}$ ) 与 DM- $\beta$ -CD ( $1\text{ mmol/L}$ ) 都可以使对映体得到基线分离, 而  $\alpha$ -CD 与 HP- $\beta$ -CD 却对罗格列酮钠没有拆分作用(如图 3)。

### 2.5 环糊精浓度的影响

随着  $\beta$ -CD 浓度由  $0.5\text{ mmol/L}$  逐渐增大到  $7\text{ mmol/L}$ , 对映体的分离度先由小到大, 再由大到小直至完全不能分离, 其中  $1\text{ mmol/L}$   $\beta$ -CD 浓度条件下分离度最大(如图 4)。但随着环糊精浓度的增加, 迁移时间明显延长。在类似情况下作 DM- $\beta$ -CD 浓度系列实验, 结果表明其分离度随浓度变化趋势与  $\beta$ -CD 相同, 至  $5\text{ mmol/L}$  DM- $\beta$ -CD 浓度时不能基线分离(如图 5)。这与 Wren 和 Rowe<sup>[10]</sup> 提出的理论相一致, 他们认为选定一种手性选择剂时, 它的拆分浓度存在一最佳值, 此时两对映体淌度值的差最大。

### 2.6 有机添加剂的影响

缓冲液中添加有机溶剂具有改善峰形, 提高柱效的效果。因为它可以提高手性化合物的溶解能力, 降低毛细管壁的吸附, 从而减少峰的展宽, 使柱效提高<sup>[10]</sup>。本实验甲醇量的增加对于迁移时间和对映体的分离没有明显的影响 ( $R_s$  在 1.30 左右), 但甲醇含量较高 ( $30\%$ ) 时迁移时间延长, 而且分离度变差 ( $R_s=0.80$ )。这与 Wem<sup>[10]</sup> 所得结果相一致, 是由于有机溶剂的加入降低了化合物与环糊精内腔发生作用, 因而削弱了环糊精与样品结合的能力, 使选择性下降。

### 2.7 电压的影响

实验还考察了电压对罗格列酮钠拆分的影响(如图 6), 结果表明随着电压的提高, 迁移时间变短, 但当电压较高时, 基线噪音较大, 因此兼顾到迁移时间与噪音两方面因素, 选择  $25\text{ kV}$  作为分离电压。

### 2.8 非水介质毛细管电泳拆分罗格列酮钠对映体

选用紫外吸收截止波长  $205\text{ nm}$  的甲醇作有机溶剂, 以带负电荷的环糊精衍生物 HDMS- $\beta$ -CD 作为手性选择剂, 采用磷酸和 NaOH 作为背景电解质, 保持磷酸的浓度  $20\text{ mmol/L}$  不变, 依次改变 NaOH 的浓度为  $5$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20\text{ mmol/L}$ , 来考察背景电解质浓度和溶液酸度的影响。

实验结果表明, 当  $\text{H}_2\text{PO}_4$  和 NaOH 浓度均为  $20\text{ mmol/L}$  时因过饱和导致溶质析出, 其它 3 种酸性缓冲溶液中以  $20$

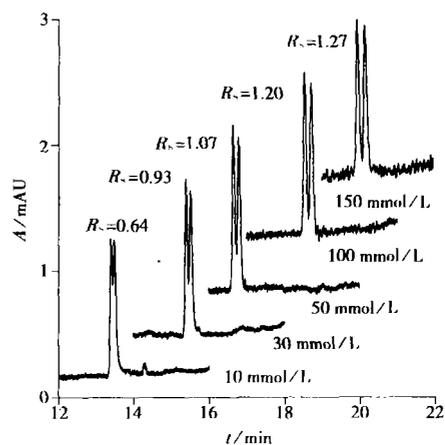


图 2 背景电解质浓度的影响  
Fig. 2 Effects of Tris concentrations on chromatographic resolution

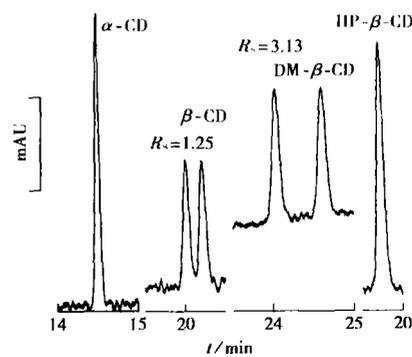


图 3 不同环糊精对罗格列酮钠对映体拆分结果  
Fig. 3 Effects of CD types on chromatographic resolution

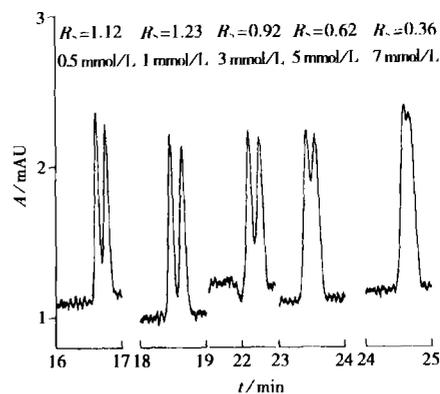


图 4  $\beta$ -CD 浓度对罗格列酮钠对映体拆分的影响  
Fig. 4 Effects of  $\beta$ -CD concentrations on chromatographic resolution

mmol/L  $\text{H}_2\text{PO}_4$  和 10 mmol/L NaOH 缓冲溶液对罗格列酮钠的分离效果最好 ( $R_s = 1.75$ )。因此, 选择此缓冲溶液作为分离介质。

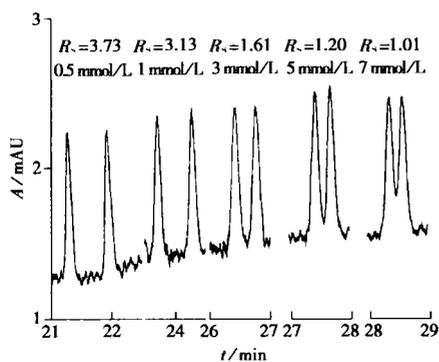


图 5 DM- $\beta$ -CD 浓度对罗格列酮钠对映体拆分的影响

Fig. 5 Effects of DM- $\beta$ -CD concentrations on chromatographic resolution

本文在含有 20 mmol/L 磷酸和 10 mmol/L NaOH 的甲醇介质中, 分别配制含有 HDMS- $\beta$ -CD 2.5、8、10 mmol/L 的运行液考察罗格列酮钠的手性分离情况。随着 HDMS- $\beta$ -CD 浓度的增加, 对映体的分离效果明显改善, 当 HDMS- $\beta$ -CD 浓度达到 8 mmol/L 时, 对映体得到了基线分离, 当 HDMS- $\beta$ -CD 的浓度等于 10 mmol/L 时, 仍然能够基线分离, 所以本文选择 HDMS- $\beta$ -CD 的最佳浓度为 9 mmol/L。

在 NACE 最佳实验条件下, 通过改变操作参数对罗格列酮钠进行拆分, 结果如图 7 所示。

### 3 结论

水介质毛细管电泳采用 Tris- $\text{H}_2\text{PO}_4$  缓冲液体系实现了罗格列酮钠对映体的基线分离, 其中手性选择剂  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD 对罗格列酮钠对映体具有较好的手性拆分能力, 而 HP- $\beta$ -CD 不具有手性拆分能力。同时还建立了非水介质毛细管电泳体系基线拆分罗格列酮钠对映体的方法。实验表明选用 DM- $\beta$ -CD 为手性选择剂, 采用水介质毛细管电泳对罗格列酮钠对映体的分离度可达 3.0 以上。

参考文献:

- WANG Zhi, SUN Yiliang, SUN Zengpei. *Journal of Instrumental Analysis* (王志, 孙亦梁, 孙曾培. *分析测试学报*), 1996, 15(2): 85-92
- HOU Jinguo, WANG Zhuming, MAO Xuefeng, *et al.* *Journal of Instrumental Analysis* (侯经国, 王柱命, 毛学峰, 等. *分析测试学报*), 2004, 23(2): 44-47
- SHI Yurong, XIE Tianyao, XIE Yuxuan, *et al.* *Journal of Instrumental Analysis* (石欲容, 谢天尧, 谢玉璇, 等. *分析测试学报*), 2004, 23(6): 47-49
- WANG F, KHALEDI M G. *J Chromatogr, A*, 2000, 875(1/2): 277-293
- CHANKVETADZE B, BLASCHKE G. *Electrophoresis*, 2000, 21: 4159-4178
- RIEKKOLA M L, JUSSILA M, PORRAS S P, *et al.* *J Chromatogr, A*, 2000, 892(1/2): 155-170
- KARBAUM A, JIRA Th. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 48: 155-162
- JAMALI B, THEILL G C, SORESENSEN L L. *J Chromatogr, A*, 2004, 1049(1/2): 183-187
- WREN S A C, ROWE R C. *J Chromatogr, A*, 1992, 603(1/2): 235-238
- CHANKVETADZE B, ENDRESZ G, BLASCHKE G. *J Chromatogr, A*, 1995, 700(1/2): 43-47

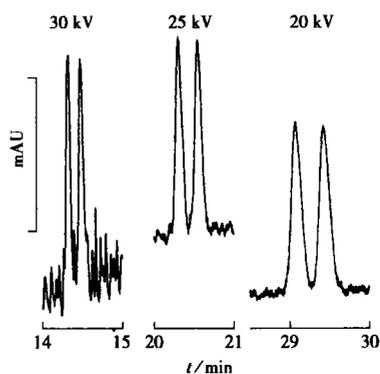


图 6 电压优化实验

Fig. 6 Effects of applied voltage on chromatographic resolution

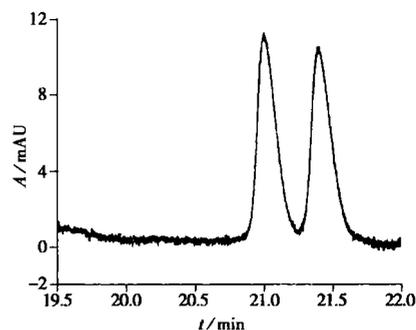


图 7 非水介质毛细管电泳体系拆分罗格列酮钠的电泳图

Fig. 7 Electrophoretogram of rosiglitazone sodium enantiomers in NACE