

柱前衍生化 RP-HPLC 测定米格列奈钙光学纯度

王金朝^{1,2}, 曾苏¹, 胡功允^{2*} (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.浙江华海药业股份有限公司制剂研发部, 浙江 台州 317024)

摘要: 目的 建立柱前衍生化-反相高效液相色谱法测定 *S*-米格列奈钙的光学纯度。方法 采用手性衍生化试剂 *S*-萘乙胺(*S*-NEA), 以 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)为偶联剂对样品 *S*-米格列奈钙进行衍生化。衍生产物以乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(pH 2.5)(50:50)为流动相, 在 Agilent Zorbax C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱上进行分离, 流速为 1.5 mL·min⁻¹, 检测波长为 225 nm, 柱温为 30 ℃。结果 *R*-米格列奈在 0.3~3.0 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 检测限和最低定量下限分别 0.1 和 0.3 μg·mL⁻¹, 平均回收率为 102.4%, 日内日间精密密度考察中 RSD 均小于 5%。结论 该方法灵敏度高, 衍生化产物稳定, 重复性好, 可用于 *S*-米格列奈钙光学杂质的检测。

关键词: 米格列奈钙; 光学纯度; 高效液相色谱法; 柱前衍生化

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)06-0486-04

Enantiospecific Analysis of Mitiglinide Calcium by RP-HPLC with Precolumn Derivatization

WANG Jinzhao^{1, 2}, ZENG Su¹, HU Gongyun^{2*} (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Department of Formulation R&D, Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., LTD, Taizhou 317024, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a chiral precolumn derivatization method for optical purity test of mitiglinide calcium.**METHODS** The enantiomers of mitiglinide calcium were derivatized with a precolumn chiral derivatization reagent *S*-(-)-1-(1-naphthyl) ethylamine (*S*-NEA). The diastereoisomers produced were separated on an Agilent Zorbax C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mobile phase composed of acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 2.5) (50:50). The flow rate was set at 1.5 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 225 nm. **RESULTS** The method was linear in the range of 0.30-3.0 μg·mL⁻¹ for the *R*-mitiglinide calcium. The lower limit of detection for *R*-mitiglinide calcium was 0.1 μg·mL⁻¹ and the lower limit of quantification was 0.3 μg·mL⁻¹. The inter- and intra- day precision (RSD) was below 5.0% and the average recovery was 102.4%. **CONCLUSION** The derivatives are stable in the mobile phase. The method is sensitive and suitable for the test of optical purity of mitiglinide calcium.

KEY WORDS: mitiglinide calcium; optical purity; HPLC; precolumn derivatization

米格列奈钙(mitiglinide calcium)是由日本桔生公司(kisses)研制的一种新型 2 型糖尿病治疗药物。临床上以 *S* 型给药, 因此需要对其 *R* 型异构体进行控制。邢玉仁^[1]和吉同琴等^[2]分别报道了使用

基金项目: 浙江省博士后科研择优资助项目(2007-bsh-33)

作者简介: 王金朝, 男, 博士 Tel: (0576) 85016539

E-mail: wangjinzhao@huahaipharm.com

*通信作者: 胡功允, 男, 高级工

程师 Tel: (0576) 85016030

E-mail: hu@huahaipharm.com

Sumichiral OA 手性柱拆分米格列奈对映体。但在本实验室重现这些方法时发现, 由于米格列奈具有末端吸收的特点, 无论采用报道的正相模式(正己烷、甲醇、三氟乙酸和氯仿混合体系)还是反相模式(乙腈、甲醇和醋酸铵混合体系), 均对于样品中含有的微量异构体(特别是小于 0.3% 时)无法有效分离。手性试剂柱前衍生化技术是手性药物分析的常用手段之一, 优良的手性试剂不仅可以将对映体转变成能良好分离的非对映体对衍生物, 还可以使衍生物具有良好的可检测性^[3]。Sigma 公司已有商品化的高光学纯度的 *S*-萘乙胺(*S*-NEA)出售, 它可以为衍生化产物引入萘环结构从而大大提高检测灵敏度, 常用于羧酸类手性药物的拆分研究^[4-5]。本试验对米格列奈钙的衍生化反应条件进行了优化, 考察了分析化学, 并对实际样品进行了测定。结果表明该方法适用于 *S*-米格列奈钙中的微量 *R* 型光学杂质检测。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 液相色谱仪(配备 UV 检测器), Empower 色谱工作站。

1.2 药品与试剂

米格列奈钙样品由浙江华海药业股份有限公司提供; *S*-米格列奈钙(批号: 060501, 纯度: $\geq 99.0\%$)及其异构体对照品(批号: 060501, 纯度 $\geq 99.0\%$)由上海医药工业研究院提供; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳酰亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 批号: 1251845, 纯度 $\geq 99.0\%$)和 *S*-NEA(Chiral Select, 批号: S27216-165, 光学纯度 $\geq 99.5\%$)购自美国 Sigma 公司; 1-羟基-苯并-三氮唑(HOBt, 批号: L290F04, 纯度 $\geq 97.0\%$)购自美国 B&J 公司; 乙腈、甲醇、磷酸二氢钾、浓磷酸均为色谱纯; 水为 Milli-Q 超纯水。

1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(用浓磷酸调 pH 值至 2.5)(50 : 50); 流速: 1.5 mL·min⁻¹; 检测波长: 225 nm; 进样量: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

1.4 光学异构体测定方法

1.4.1 对照品溶液和衍生化试剂的配制 精密称取 *R*-米格列奈钙对照品 10.0 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 得 100 μ g·mL⁻¹ *R*-米格列奈钙对照品溶液, 以此来配制系列浓度的对

照品溶液。精密称取 *S*-米格列奈钙对照品或样品 100.0 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 得 10 mg·mL⁻¹ *S*-米格列奈钙溶液。以上溶液均置于室温避光保存。准确称取 EDC 10.0 mg 置于具塞三角瓶中, 用 10 mL 二氯甲烷溶解, 摇匀, 得 1 mg·mL⁻¹ EDC 溶液; HOBt 和 *S*-NEA 溶液配制同 EDC, 配制 HOBt 溶液时加入 1% 体积比的吡啶助溶。衍生化试剂均新鲜配制。

1.4.2 样品处理 用微量进样器准确移取 *S*-米格列奈钙溶液 10 μ L 于 10 mL 尖底玻璃离心管中, 于氮气流下小心吹干, 依次加入 EDC 溶液、HOBt 溶液和 *S*-NEA 溶液各 100 μ L。于 70 $^{\circ}$ C 烘箱中放置 60 min。待溶液冷却后, 于氮气吹干, 用 100 μ L 流动相复溶, 进样分析。

2 结果与讨论

2.1 衍生化条件的优化

2.1.1 手性衍生化反应试剂和催化剂用量 手性胺与羧酸生成酰胺的反应常利用 EDC 和 HOBt 作为偶联剂和催化剂。保持 *S*-米格列奈钙浓度不变, 在 70 $^{\circ}$ C 和放置 60 min 条件下, 考察了 EDC 溶液、HOBt 溶液和 *S*-NEA 溶液 50, 100, 200, 300 μ L 添加量对于衍生化反应的影响。结果见表 1, 当添加各溶液 100 μ L 时, 衍生化产物峰面积已达到稳定。

表 1 衍生化试剂浓度对于衍生化反应的影响($n = 3$)

Tab 1 Effect of concentration of derivatization reagent on the derivatization ($n = 3$)

	衍生化试剂体积/ μ L			
	50	100	200	400
反应率/%	77.9	100.0	99.7	99.8

2.1.2 反应时间和温度 分别考察了温度为 30, 50, 70, 80 $^{\circ}$ C 放置 60 min 和 70 $^{\circ}$ C 下放置时间为 30, 60, 90 min 的衍生化效果。如表 2 所示, 70 $^{\circ}$ C 条件下放置 60 min, 衍生化反应已经完成。

表 2 反应时间和温度对于衍生化反应的影响($n = 3$)

Tab 2 Effect of time and temperature on the derivatization ($n = 3$)

	时间 /min			温度 / $^{\circ}$ C			
	30	60	90	30	50	70	80
反应率/%	88.7	100.0	99.1	67.0	92.8	100.0	99.1

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察 取空白甲醇和含有 *R*-和 *S*-米格列奈钙对照品的甲醇溶液各 10 μ L, 按“1.4.2”项下操作, 所得色谱图见图 1。由图可见, 在上述

色谱条件下,米格列奈钙两个对映体具有良好的分离度,可能由于 *S*-米格列奈衍生物与色谱柱填料作用更强些,所以其色谱峰较 *R*-异构体要宽,空白不干扰样品分析。

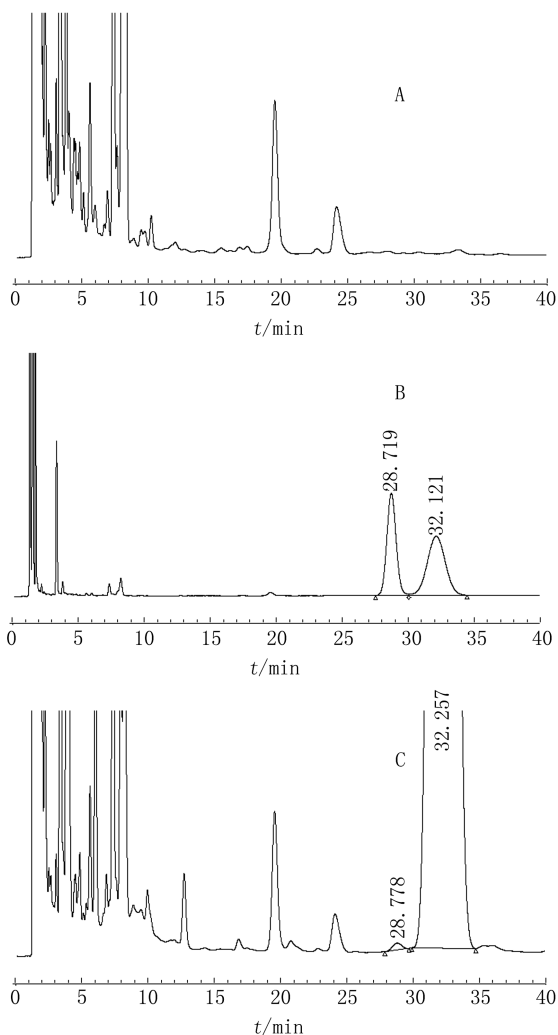


图1 高效液相色谱图

A-空白;B-*R*-和 *S*-米格列奈钙混合物;C-样品

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank; B-*R*- and *S*-mitiglinide calcium mixture; C-sample

2.2.2 线性范围和灵敏度 取不同浓度的 *R*-米格列奈钙对照品系列溶液,分别加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ *S*-米格列奈钙对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,终浓度分别为 $0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“1.4.2”项下操作。以扣除空白后所得异构体色谱峰的峰面积(*Y*)对浓度(*X*)进行线性回归。回归方程为: $Y = 147\,637 X - 5\,209$, $r = 0.999\,7$ 。以信噪比约等于 3 或 10 的样品浓度来表示方法的检出限和最小定量限。结果表明,本方法的检出限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低定量下限为 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 精密度和回收率 配制不同浓度的米格列

奈钙系列溶液,按“1.4.2”项下操作, *S*-米格列奈钙终浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, *R*-异构体终浓度分别为 $0.3, 0.9$ 和 $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以由标准方程计算得到的 *R*-米格列奈浓度与理论浓度的比值来计算回收率。同日内对同一样品分别进行 5 次分析,并连续测定 5 d,以测到的 *R*-异构体含量来计算日内和日间精密度。数据表明,方法的日内和日间精密度均小于 5.0%,回收率均在 99%以上。

2.2.4 储存溶液稳定性 配制一个 *R*-米格列奈钙和 *S*-米格列奈对照品溶液,连续 6 d 取样分析。所得峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明米格列奈钙两个对映体在甲醇溶液中稳定,且无消旋化发生。

2.3 分析方法在实际样品测定中的应用

采用公司自制的 3 批米格列奈钙样品,按“1.4.2”项下进行衍生化,进样分析后分别以标准曲线法和峰面积归一化法来计算异构体含量。结果显示两种方法测得的光学杂质含量比较一致,见表 3。样品的光学纯度用百分之百减去光学杂质百分含量来计算,3 批样品光学纯度均大于 99.9%。

表 3 光学异构体含量测定结果 ($n = 3$)

Tab 3 Determination of *R*-isomer in *S*-mitiglinide ($n = 3$)

批号	外标法测得的含量/%	面积归一化法测得的含量/%
07001	0.08	0.07
07002	0.09	0.08
07003	0.09	0.09

3 结论

本文报道了一种手性试剂柱前衍生化液相色谱测定米格列奈钙光学纯度的方法。样品经手性试剂衍生化处理后,检测灵敏度大大提高,而且可以采用普通的液相色谱柱分析。本方法拆分米格列奈钙具有灵敏度高、特异性好等优点,适用于样品中微量 *R* 型光学异构体的检测。

REFERENCES

- [1] XING Y R, ZHAO G M, LIU Y. Direct enantiomeric separation of mitiglinide by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26 (7): 1017-1018.
- [2] JI T Q, TANG Y P. HPLC determination of *R*-isomer of mitiglinide calcium [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2007, 15 (4): 336-338.
- [3] ZENG S. Chiral Drug and Chiral Pharmacology (手性药物与手性药理学)[M]. Vol 9. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2002: 74.
- [4] THOMASON M J, HUNG Y F, WILLIAMS W R, et al. Indirect enantiomeric separation of 2-arylpropionic acids and

structurally related compounds by reverse phase HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15 (11): 1765-1774.

- [5] WANG J Z, WANG X J, TANG Y H, et al. Simultaneous determination of mandelic acid enantiomers and

phenylglyoxylic acid in urine by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. J Chromatogr B, 2006, 840 (1): 50-55.

收稿日期: 2008-08-04