

3.3 流动相的选择

分别比较了甲醇-水、甲醇-0.1%冰醋酸、甲醇-0.5%冰醋酸、乙腈-0.1%冰醋酸、乙腈-0.3%冰醋酸、乙腈-0.5%冰醋酸、乙腈-1%冰醋酸、乙腈-2.5%冰醋酸、乙腈-0.01%甲酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.2%甲酸为流动相, 以及各溶液不同配比, 结果表明乙腈-0.1%甲酸可将各待测成分良好分离, 且峰形对称性好, 故选择乙腈-0.1%甲酸为流动相。

本研究建立的分析方法简单、方便, 可同时测定多种成分的含量, 在提高分析效率的同时可有效节约分析的成本, 为该产品的质量控制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] ZHEN S C, LI X Y, OU Y B, et al. Research development on pharmacological of paeoniflorin [J]. Chin J Pharmacovigil(中国药物警戒), 2012, 9(2): 100-103.
- [2] YI H W, LU X M, FENG F, et al. Astilbin inhibits the adhesion of T lymphocytes via decreasing TNF- α and its associated MMP-9 activity and CD 44 expression [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(10): 1467-1474.
- [3] ZHAO J J, DAI X M, QU Y S, et al. Progress in the

- pharmacodynamics of chlorogenic acid [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2013, 32(4): 1-5.
- [4] LEE J, JUNG E, KOH J, et al. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis [J]. J Dermatol, 2008, 35(12): 768-771.
 - [5] SHI X Y. Progress in the research of pharmacological mechanism of glycyrrhizic [J]. China Foreign Med Treat(中外医疗), 2010(16): 125.
 - [6] ONUMAH N, KIRCIK L H. Psoriasis and its comorbidities [J]. J Drugs Dermatol, 2012, 11(Suppl 5): 5-10.
 - [7] MAK R K H, HUNDHAUSEN C, NESTLE F O. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis [J]. Actas Dermosifiliogr, 2009, 100(Suppl 2): 2-13.
 - [8] WANG Z J, WO S K, WANG L, et al. Simultaneous quantification of active components in the herbs and products of Si-Wu-Tang by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Bio Anal, 2009, 50(2): 232-244.
 - [9] CHEN L, YIN Y, YI H, et al. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in Rhizoma Smilacis Glabrae by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(5): 1715-1720.
 - [10] LI X, YU C, CAI Y, et al. Simultaneous determination of six phenolic constituents of danshen in human serum using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2005, 820(1): 41-47.
 - [11] WANG P. Survey of paeoniflorin transdermal absorption *in vitro* in Jingtong-Shu patch [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 66-69.

收稿日期: 2014-01-04

β -环糊精手性流动相添加剂法测定爱维莫潘中的异构体

游隽¹, 蔡盛², 吴淑萍² (1.浙江省肿瘤医院, 杭州 310022; 2.杭州新博思生物医药有限公司, 杭州 310030)

摘要: 目的 建立爱维莫潘的高效液相手性拆分分析法。方法 选用 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相为水溶液(含 0.5%冰醋酸, 0.5%三乙胺, 1% β -环糊精)-甲醇(80:20), 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 检测波长为 275 nm。结果 爱维莫潘和它的 3 个异构体都达到良好分离, 分离度符合要求。结论 本方法具有专属性强, 灵敏度高, 重复性良好, 耐用性好, 简便快捷, 使用成本低廉等优点。

关键词: β -环糊精; 手性流动相添加剂; 异构体分离; 爱维莫潘

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)09-1101-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.017

Separation of Alvimopan and Its Enantiomers by HPLC Using β -cyclodextrin as Chiral Mobile Phase Additive

YOU Jun¹, CAI Sheng², WU Shuping² (1.Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2.Hangzhou SIMBOS Pharm Co., Ltd., HangZhou 310030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To separate the enantiomers of alvimopan by HPLC which was developed using chiral mobile phase. **METHODS** Separation was performed on a C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μ m). The mobile phase was methanol-water(concentration of 0.5% glacial acetic acid, 0.5% triethylamine and 1% β -cyclodextrin)(20:80). The detection wavelength was set at 275 nm and the temperature was 40 $^{\circ}$ C. **RESULTS** With this method, alvimopan and its enantiomers were well

separated, the resolution met the requirement. **CONCLUSION** The method is simple, specific, sensitive, repeatable accurate and inexpensive.

KEY WORDS: β -cyclodextrin; chiral mobile phase additive; enantiomeric resolution; alvimopan

爱维莫潘是一种新型的外周 μ 型阿片受体拮抗剂, 临床上用于肠道切除术后患者的胃肠道功能早期恢复, 其化学名为[[2(S)-[[4(R)-(3-羟基苯基)-3(R),4-二甲基-1-哌啶基]甲基]-1-氧代-3-苯基丙基]氨基]乙酸二水合物。该化合物有 3 个手性碳, 理论上有 7 个异构体, 由于合成工艺的特殊性和中间体的控制, 在实际合成中最可能产生 2 对对映异构体, 爱维莫潘的构型为 2S,3R,4R。其 3 个异构体的构型分别为 2R,3S,4S、2S,3S,4S、2R,3R,4R(结构式见图 1)。

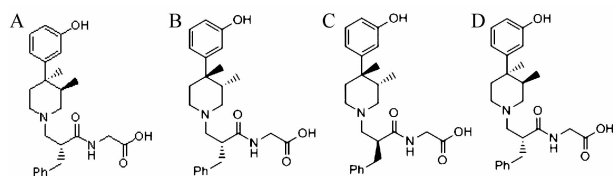


图 1 爱维莫潘及其 3 个异构体的结构式

A-爱维莫潘; B-异构体 2R,3S,4S; C-异构体 2S,3S,4S; D-异构体 2R,3R,4R。

Fig. 1 Alvimopan and its enantiomers

A-alvimopan; B-enantiomer(2R,3S,4S); C-enantiomer(2S,3S,4S); D-enantiomer(2R,3R,4R)。

常规的手性异构体分离多采用手性柱(AD-H、OD-H、AGP 等)进行分析, 但手性柱一般存在价格较昂贵、稳定性较差、不适合长期大进样量使用的缺点。故本实验采用 β -环糊精为手性流动相添加剂, 以 C_{18} 柱为固定相, 用反相高效液相色谱(HPLC)对爱维莫潘异构体进行拆分, 并进行方法学研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 20AD 高效液相色谱仪, 紫外检测器(岛津公司), 色谱柱为 Phenomenex Luna C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); MS105DU 型电子天平(梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂

爱维莫潘及其 3 个异构体由杭州新博思生物医药有限公司合成研究室提供; β -环糊精(分析纯); 甲醇(色谱纯, 默克公司); 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

经试验, 确定色谱条件为 Phenomenex Luna

C_{18} 100A 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相为水溶液(含 0.5%冰醋酸, 0.5%三乙胺, 1% β -环糊精)-甲醇(80 : 20), 柱温为 40 $^{\circ}$ C, 检测波长为 275 nm。流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 进样量为 20 μ L。

2.2 测定方法^[1-3]

取本品适量, 每 10 mg 加甲醇 3 mL, 超声溶解, 用流动相稀释成 1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的供试品溶液; 精密量取供试品溶液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为对照品溶液。分别取爱维莫潘、(2R,3S,4S)、(2R,3R,4R)、(2S,3S,4S)异构体适量, 每 10 mg 加甲醇 3 mL, 超声溶解, 用流动相稀释成 1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 爱维莫潘和 5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 异构体的混合溶液作为系统适用性溶液。按“2.1”项下色谱条件, 取对照品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10%; 取系统适用性溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 出峰顺序依次为爱维莫潘、(2S,3S,4S)、(2R,3R,4R)、(2R,3S,4S)异构体, 爱维莫潘与 3 个异构体的分离度均 >1.5 ; 再精密量取供试品溶液、对照溶液各 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 供试品溶液的色谱图中如有与 3 个异构体保留时间相应的色谱峰, 各个异构体的峰面积均不得大于对照溶液主峰面积的 0.1。色谱图见图 2。

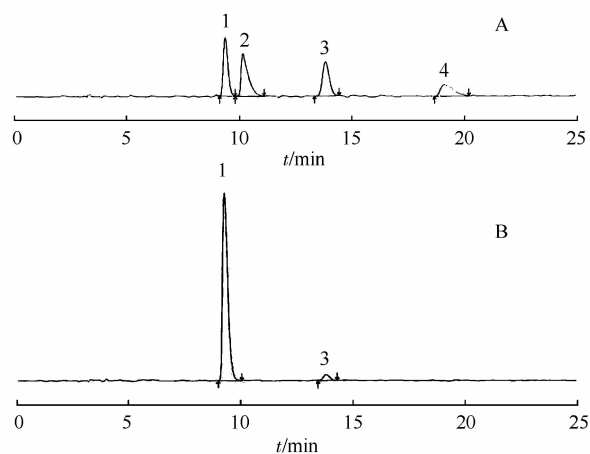


图 2 高效液相色谱图

A-系统适用性溶液; B-供试品溶液; 1-爱维莫潘; 2-异构体(2S,3S,4S); 3-异构体(2R,3R,4R); 4-异构体(2R,3S,4S)。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-system suitability solution; B-sample solution; 1-alvimopan; 2-enantiomer(2S,3S,4S); 3-enantiomer(2R,3R,4R); 4-enantiomer(2R,3S,4S)。

2.3 空白溶剂干扰

取 3 mL 甲醇置 10 mL 量瓶,用流动相稀释至刻度,作为空白溶剂。取空白溶剂 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明,空白溶剂对爱维莫潘的异构体检查无干扰。

2.4 检测限

分别取(2*R*,3*S*,4*S*)、(2*S*,3*S*,4*S*)、(2*R*,3*R*,4*R*)异构体适量,精密称定,按“2.2”项下配制方法配制,再用流动相稀释制成一系列浓度的溶液,分别进样,记录色谱图。按信噪比 3:1 计算,3 个异构体的最低检测限均为 5.0 ng。

2.5 仪器精密度试验

分别取爱维莫潘对照品、爱维莫潘(2*R*,3*S*,4*S*)异构体、(2*S*,3*S*,4*S*)异构体和(2*R*,3*R*,4*R*)异构体适量,加甲醇适量超声溶解,用流动相稀释成每 1 mL 中约含爱维莫潘 1 mg 和约含 3 个异构体各 5 μ g 的混合溶液,精密吸取 20 μ L,连续进样 6 次,记录爱维莫潘及异构体的峰面积和分离度,结果峰面积的 RSD 均 $\leq$ 2.0%,分离度符合要求。说明该异构体检查法的精密度良好,方法可行。

2.6 溶液的稳定性

分别取爱维莫潘、爱维莫潘(2*R*,3*S*,4*S*)异构体、(2*S*,3*S*,4*S*)异构体和(2*R*,3*R*,4*R*)异构体适量,加甲醇适量超声溶解,用流动相稀释配制成 1 mg·mL⁻¹爱维莫潘和 5 μ g·mL⁻¹各异构体的混合溶液作为系统适用性溶液,精密吸取 20 μ L,分别在 0, 2, 4, 5, 6 h 注入高效液相色谱仪进行分析,记录爱维莫潘及异构体的峰面积。结果表明,爱维莫潘异构体在流动相中,室温下放置 6 h 内稳定。

2.7 异构体的测定

按“2.2”项下测定方法测定 4 批爱维莫潘原料药中的异构体,结果见表 2。

表 2 样品异构体含量测定结果

Tab. 2 Results of sample enantiomer determination

异构体	含量/%			
	20100501	20100502	20100503	20100504
2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	未检出	0.03	0.07	0.05
2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>	0.05	未检出	0.04	未检出
2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	0.07	0.05	0.05	未检出

3 讨论

3.1 测定法的选择

采用 β -环糊精手性流动相添加剂法测定爱维莫潘的异构体,该法适用于 ODS 色谱柱,检测方、

灵敏、经济,与手性色谱柱的拆分方法比较具有明显的优势,故选择该法测定。

3.2 β -环糊精对手性拆分的影响

采用不加 β -环糊精为流动相,以水溶液(含 0.1%三乙胺,磷酸调 pH 6.0)-乙腈(23:77)为流动相,爱维莫潘与 3 个异构体出峰时间一致,不能分离。参考文献[4]的色谱条件,以乙腈-水溶液(含 0.2%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0,2% β -环糊精)15:85 为流动相;爱维莫潘与 3 个异构体能达到分离;以乙腈-水溶液(含 0.2%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0,1% β -环糊精)15:85 为流动相,爱维莫潘与(2*R*,3*S*,4*S*)异构体分离度为 0.9。结果显示, β -环糊精的浓度对爱维莫潘的异构体分离有影响。考虑 β -环糊精的浓度太大而产生对色谱柱的影响,将流动相中 β -环糊精的量定为 1%。

3.3 色谱条件的选择

爱维莫潘、爱维莫潘(2*R*,3*S*,4*S*)异构体、(2*S*,3*S*,4*S*)异构体和(2*R*,3*R*,4*R*)异构体均在 275 nm 处有较大吸收,故选择 275 nm 作为测定波长。

考察乙腈与甲醇的洗脱能力对本品异构体的分离影响,分别以①乙腈-水溶液(含 0.2%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0,1% β -环糊精)15:85、②甲醇-水溶液(含 0.2%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0,1% β -环糊精)15:85、③甲醇-水溶液(含 0.5%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0,1% β -环糊精)20:80、④甲醇-水溶液(含 0.5%冰醋酸,0.5%三乙胺,1% β -环糊精)20:80 为流动相。结果表明:以甲醇作为流动相,爱维莫潘与(2*R*,3*S*,4*S*)异构体的分离度为 1.5,但是(2*S*,3*S*,4*S*)异构体出峰太晚,提高甲醇比例,能使异构体出峰变快,故初步选择③为流动相。经 pH 值测定,水溶液(含 0.5%冰醋酸,三乙胺调 pH 6.0)与水溶液(含 0.5%冰醋酸,0.5%三乙胺)的 pH 值基本一致;流动相③与④对本品异构体的分离影响无明显差异,爱维莫潘与(2*R*,3*S*,4*S*)异构体的分离度均为 1.5。以 0.5%三乙胺加入流动相的方式可以提高效率,减少用三乙胺调 pH 6.0 的时间。故确定以④甲醇-水溶液(含 0.5%冰醋酸,0.5%三乙胺,1% β -环糊精)20:80 为流动相。

3.4 柱温对手性拆分的影响

选择柱温 30 $^{\circ}$ C 时,爱维莫潘与(2*R*,3*S*,4*S*)异构体的分离度为 1.5;选择柱温 40 $^{\circ}$ C 时,爱维莫潘与(2*R*,3*S*,4*S*)异构体的分离度为 2.0;故选择柱温为 40 $^{\circ}$ C。

3.5 色谱柱对手性拆分的影响

选用 Phenomenex Luna C₁₈ 100A 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)和依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)时, 爱维莫潘与 3 个异构体的分离度良好, 柱效好, 主峰峰对称性好, 故选择十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。

4 结论

本研究以 β-环糊精为手性流动相添加剂拆分爱维莫潘与其异构体, 通过优化色谱条件, 建立爱维莫潘的 HPLC 手性拆分分析法。经过方法学验证, 该法专属性强, 灵敏度高, 重复性良好, 耐用性好, 且方法简便快捷, 使用成本低廉, 与

使用手性色谱柱分析方法相比具有明显优势。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 5, 19-22, 29, 194, 204.
- [2] Manual of National Drug Standard Operating(国家药品标准工作手册)[S]. 2013: 157-161.
- [3] 〈ICH〉 Quality Management Compilation(《ICH》质量管理文件汇编) [S]. 2010: 50-59.
- [4] LU T G, YANG M J. Separation of paroxetine and its intermediate enantiomers by High Performance Liquid Chromatography using carboxymethyl-β-cyclodextrin as chiral mobile phase additive [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2007(6): 830-833.

收稿日期: 2014-02-12

HPLC 同时测定雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的含量

邓毅¹, 宁红霞¹, 沈薇², 石晓峰^{1,2*}, 李师¹, 雷艳萍¹(1.甘肃中医学院药学院, 兰州 730030; 2.甘肃省医学科学研究院药物研究所, 兰州 730050)

摘要: 目的 建立同时测定雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素含量的高效液相色谱法。方法 采用 TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 10%A, 8~45 min, 10%→30%A), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 柱温: 25 ℃。结果 雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素依次在 0.4~4.0, 4~40 和 2~20 μg·mL⁻¹ 内呈良好线性关系, 相关系数 *r* 分别为 0.999 8, 0.999 9, 0.999 9, 加样回收率(*n*=9)分别为 104.7%, 99.5% 和 105.8%。结论 该方法适用于雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的含量测定, 方法简单、快速、高效。

关键词: 雪松松针; 没食子酸; 原儿茶酸; 儿茶素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)09-1104-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.018

Simultaneous Determination of Gallic Acid, Protocatechuic Acid and Catechin in Pine Needles of *Cedrus Deodara* by HPLC

DENG Yi¹, NING Hongxia¹, SHEN Wei², SHI Xiaofeng^{1,2*}, LI Shi¹, LEI Yanping¹(1. Pharmacy School of Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China; 2. Institute of Materia Medica, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid and catechin components in pine needles of *Cedrus deodara*. **METHODS** Agilent TC-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was methanol (A)-0.2% phosphoric acid (B) with gradient elution (0~8 min, 10%A; 8~45 min, 10%→30%A) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 25 ℃ and the detection wavelength was 280 nm. **RESULTS** Calibration curves were found to be linear in the ranges of 0.4~4.0 μg·mL⁻¹ for gallic acid, 4~40 μg·mL⁻¹ for protocatechuic acid and 2~20 μg·mL⁻¹ for catechin. The correlation coefficients were 0.999 8, 0.999 9, 0.999 9. The average recoveries(*n*=9) of gallic acid, protocatechuic acid and catechin were 104.7%, 99.5% and 105.8%. **CONCLUSION** The

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(1204FKCA152); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2011-05); 甘肃省卫生厅中医药科研项目(GZK-2012-29)

作者简介: 邓毅, 男, 硕士, 教授, 博导 Tel: (0931)8765350
Tel: (0931)2615440 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

E-mail: dengyi@gszy.edu.cn *通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师