

毛细管电泳法测定(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中 *R* 异构体

潘文燕, 闫玉刚, 侯 准, 杨新颖, 方 浩*

山东大学 药学院, 山东 济南 250012

摘 要: **目的** 建立毛细管电泳法测定(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中 *R* 异构体的方法。**方法** 采用毛细管电泳法。以磺酸-β-环糊精(S-β-CD)为选择剂; 25 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.9, 含 S-β-CD 1.8%)为运行缓冲液; 运行电压为 25 kV; 柱温为 15 °C; 检测波长: 214 nm; 3.4 kPa 压力进样 10 s。**结果** (S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯与 *R* 异构体的分离度为 2.9。*R* 异构体在 2~30 μg/mL 与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 5$), 平均回收率为 96.6%, RSD 值为 4.9% ($n=6$)。**结论** 建立的毛细管电泳法操作简便, 结果准确可靠, 可用于(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中 *R* 异构体的控制。

关键词: (S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯; *R* 异构体; 毛细管电泳

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)05-0776-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.05.005

Determination of *R* isomer in (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate by capillary electrophoresis

PAN Wen-yan, YAN Yu-gang, HOU Zhun, YANG Xin-ying, FANG Hao

School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To establish a capillary electrophoresis method for the determination of *R*-optical isomer in (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate. **Methods** Capillary electrophoresis method was adopted. Sulfate-β-cyclodextrin (S-β-CD) was used as selector. The background buffer was 25 mmol/L borate buffer solution (pH 8.9, containing 1.8% S-β-CD). The separation was performed at 15 °C with the voltage of 25 kV and the wavelength was 214 nm. Pressure was 3.4 kPa and injected for 10 s. **Results** (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate and its *R*-enantiomer were basely resolved with resolution of 2.9. The calibration curve of *R*-enantiomer was linear in the concentration range of 2 — 30 μg/mL ($r = 0.999\ 5$). The average recovery was 96.6% with RSD 4.9% ($n = 6$). **Conclusion** The method is convenient, rapid, accurate, and can be used for the determination of (*R*)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate in (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate.

Key words: (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate; *R* isomer; capillary electrophoresis

GPR40 是一种主要分布于胰腺 β 细胞、肠道 K 和 L 细胞的 G 蛋白偶联受体, 能被游离长链脂肪酸激活, 使细胞内钙离子浓度升高, 促进胰岛素的释放, 从而被认为是治疗 2 型糖尿病的新药物靶点^[1]。GPR40 激动剂的结构较多, 其中活性较好且研究较多的结构类型是(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)-乙酸衍生物, 部分活性药物的结构式见图 1。2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯是合成

该类化合物的前体^[2-5], 其分子结构中含有一个手性中心(图 2)。控制(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯的质量分数对控制终产物的手性质量分数有非常重要的作用。因此本实验建立毛细管电泳法测定(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中 *R* 异构体的方法, 可快速检测 *R* 异构体, 控制(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯的质量分数, 从而间接控制终产物的质量。

收稿日期: 2017-02-26

基金项目: 山东省自然科学基金杰出青年基金资助项目(JQ201319); 山东大学自主创新基金资助项目(2016JC018)

作者简介: 潘文燕(1990—), 女, 硕士研究生。Tel: (0531)88382019 E-mail: panwenyandcy@sina.com

*通信作者 方 浩(1974—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事基于靶点结构的药物合理设计、合成及生物活性研究。

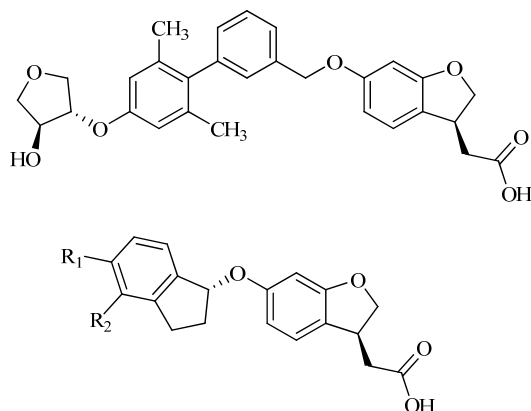


图 1 (S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)-乙酸衍生物
Fig. 1 (S)-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetic acid derivatives

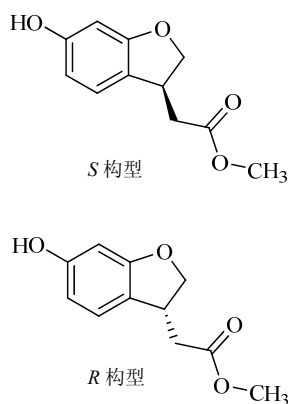


图 2 2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯构型
Fig. 2 Structure of isomer of methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate

1 仪器与试剂

Beckman PA800 plus 毛细管电泳仪, 包括光电二极管阵列检测器、32 Karat Software 工作站 (美国贝克曼公司)。石英毛细管 (河北永年县锐沅色谱器件有限公司)。S 异构体对照品 (批号 20141015, 质量分数为 99.93%)、2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯消旋体对照品 (批号 20141025, 质量分数为 99.99%)、S 异构体样品 (质量分数 > 99%, 批号 20150201、20150204、20150205) 均由山东大学药物化学实验室提供。磺酸 β 环糊精 (S-β-CD)、磺酸 α 环糊精 (S-α-CD) (Sigma 试剂公司), β 环糊精 (天津科密欧化学试剂有限公司)。硼砂、硼酸和氢氧化钠为分析纯。

2 方法与结果

2.1 电泳条件

石英毛细管柱 (75 μm × 60.2 cm, 有效长度 50

cm), 运行电压为 25 kV, 柱温为 15 °C; 压力进样 3.4 kPa, 进样时间 10 s; 检测波长 214 nm; 运行缓冲液为 25 mmol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 8.9, 含 S-β-CD 1.8%)。每日进样前依次用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 三蒸水, 缓冲液 172 kPa 各冲洗 2 min; 进样之间用缓冲液 172 kPa 冲洗 2 min。

2.2 消旋体对照品溶液的配制

精密称取 2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯消旋体对照品适量, 加乙腈溶解, 配制成 S 异构体、R 异构体为 0.4 mg/mL 的贮备液, 进一步用缓冲液稀释制备含 S 异构体、R 异构体质量浓度为 20 μg/mL 的消旋体对照品溶液。

2.3 S 异构体对照品溶液的配制

精密称取 S 异构体对照品适量, 加乙腈溶解, 配制成质量浓度为 0.4 mg/mL 对照品贮备液。精密量取 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加缓冲液至刻度, 摇匀, 配制成 4 μg/mL 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的配制

精密称取 S 异构体样品适量, 加乙腈溶解, 用缓冲液稀释制成 0.4 mg/mL 的供试品溶液。

2.5 系统适用性溶液的配制

精密量取 2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯消旋体对照品贮备液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 再精密称取 S 异构体对照品 4 mg, 加乙腈 2 mL 溶解, 并用缓冲液稀释至刻度, 配制成含 S 异构体和 R 异构体质量浓度分别为 0.4 mg/mL、4 μg/mL 的系统适用性溶液。

2.6 系统适用性试验

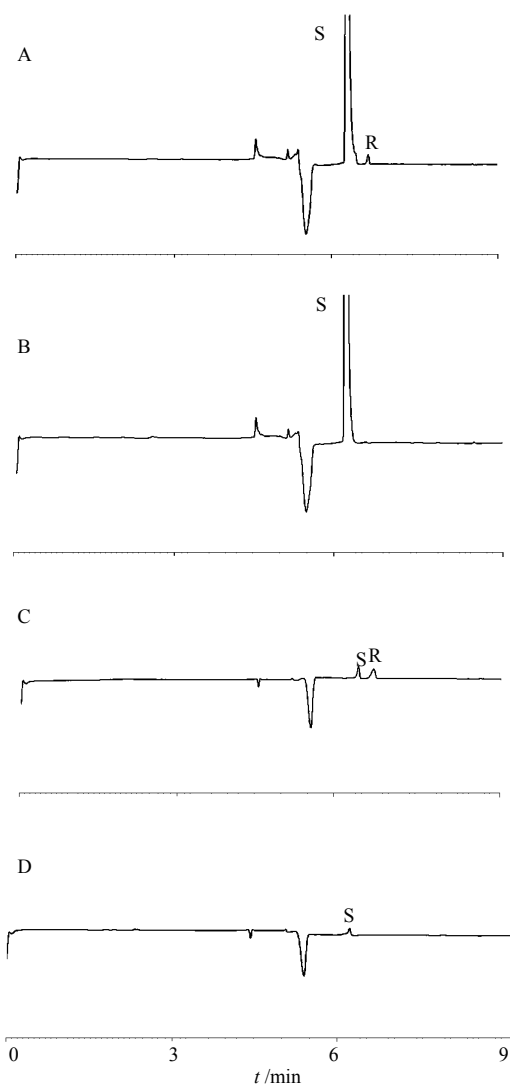
取系统适用性溶液、供试品溶液、消旋体对照品溶液和 S 异构体对照品溶液, 分别进样分析, 记录色谱图。S 异构体和 R 异构体的迁移时间为 6.1、6.4 min, 两者的分离度为 2.9, 理论塔板数以 R 异构体计大于 5 000。色谱图见图 3。

2.7 线性关系试验

精密量取消旋体对照品贮备液适量, 以缓冲液稀释制成含 R 异构体质量浓度分别为 2、2.5、4、10、20、30 μg/mL 的系列溶液。分别进样分析, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得线性方程 $A = 1\,519.99 C - 1181.88$, $r = 0.999\,5$ 。结果表明, R 异构体在 2~30 μg/mL 线性关系良好。

2.8 检测限和定量限的确定

用稀释法将消旋体对照品溶液稀释成含 R 异构



A-系统适用性溶液 B-供试品溶液 C-消旋体对照品溶液 D-S 异构体对照品溶液

A-system adaptive solution B-testing solution C-racemic of reference solution D-S isomer reference solution

图3 典型的色谱图

Fig. 3 Typical chromatograms

体一定质量浓度的溶液,进样测定,当信噪比(S/N)为3时,该质量浓度为最低检测限浓度,当信噪比(S/N)为10时,该质量浓度为最低定量限浓度。结果得R异构体的检测限(LOD)为0.5 $\mu\text{g/mL}$,定量限(LOQ)为2 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.9 重复性试验

取批号20150201的S异构体样品6份,制备供试品溶液,分别进样测定,计算得R异构体的峰面积的RSD值为1.6%。

2.10 稳定性试验

取批号20150201的S异构体样品,制备供试品

溶液,分别精密加入消旋体贮备液0.1 mL,分别于室温放置0、2、4、6、8 h后,分别进样测定,记录色谱图。结果表明R异构体的峰面积的RSD值为1.6%,说明上述溶液在8 h内测定是稳定的。

2.11 回收率试验

取批号20150201的S异构体样品4 mg于10 mL量瓶中,精密称取6份,分别精密加入消旋体贮备液0.1 mL,进样测定,按峰面积以外标法计算回收率。计算得R异构体的平均回收率为96.6%,RSD值为4.9%。

2.12 样品的测定

分别精密称取批号20150201、20150204、20150205的S异构体样品适量,制备供试品溶液。分别进样,记录色谱图,按外标法计算得S异构体样品中R异构体质量分数,结果见表1。色谱图见图4。

表1 (S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中R异构体的测定结果

Table 1 Determination of R isomer in (S)-methyl-2-(6-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetate

批号	R 异构体/%
20150201	0.071
20150204	0.072
20150205	0.119

3 讨论

3.1 选择剂的种类及浓度的选择

分别以 β -CD、S- α -CD、S- β -CD作为手性选择剂,考察其对S异构体、R异构体分离选择性的影响。结果发现, β -CD、S- α -CD为选择剂时,对S异构体、R异构体不具有分离选择性。而S- β -CD则可使S异构体、R异构体达到完全分离。本实验选择硼酸盐浓度为25 mmol/L, pH值为8.9时,考察了S- β -CD浓度(0.1%、0.6%、1.2%、1.8%、3.7%)对分离的影响。随着选择剂浓度的增加,S异构体、R异构体之间的分离度逐渐增加,分离时间逐渐延长。S- β -CD浓度为1.8%时,分离效果最好。S- β -CD浓度为3.7%时色谱峰变形,这可能是由于高浓度的S- β -CD所带电荷高,电场力较大,使电流增加,同时也使焦耳热增加,造成基线漂移和峰的变形^[6]。另一方面,选择剂浓度的升高也易于增强其与手性分子的相互作用,从而导致迁移时间延长^[7]。综合考虑峰形、分离时间与分离度,最终选择剂的浓度

为1.8%。

3.2 缓冲液的 pH 值的选择

实验选择含有1.8%的S- β -CD的的硼酸盐缓冲液(25 mmol/L),考察pH值分别为7.0、7.5、8.0、8.5、8.9、9.2时,不同pH值对S异构体、R异构体的分离度影响。pH值为8.9时,两个色谱峰分离较好,其他pH值条件下色谱峰形较差。因此,选择缓冲液的pH值为8.9。

3.3 缓冲液浓度对分离的影响

在S- β -CD质量浓度为1.8%,pH 8.9时,考察了硼酸缓冲液浓度为12.5、25、50、100 mmol/L时对S异构体、R异构体分离度的影响。当缓冲盐浓度从12.5 mmol/L增加到25 mmol/L时,两者的分离度随之增加,迁移时间延长;这可能是因为电渗流降低和溶液黏度的增加,使分析物的迁移速度降低,分析物与选择剂相互作用时间延长,分离度增加,迁移时间延长。当浓度从25 mmol/L增加到100 mmol/L时,S异构体、R异构体分离度随之降低,色谱峰形变差。这可能是因为高浓度缓冲溶液使溶液离子强度变大,焦耳热升高,导致背景信号噪音增加,峰形变差,不利于手性分离。因此,选择硼酸缓冲盐的浓度为25 mmol/L。

3.4 分离电压的选择

用含有1.8% S- β -CD的25 mmol/L的硼酸盐缓冲液为运行缓冲液,考察了运行电压为15、20、25、30 kV时对S异构体、R异构体分离度的影响。在所有运行电压范围内,S异构体和R异构体都能达到基线分离。当运行电压从25 kV降低到15 kV时,电渗流逐渐减小,S异构体和R异构体的分离度随之增加,迁移时间延长;运行电压为30 kV时,电泳电流太大,焦耳热增加,影响分离效果。因此,综合考虑分离度,迁移时间和电泳电流在最大量程内,选择25 kV为运行电压。

3.5 毛细管柱温的选择

柱温对手性分离有很大的影响,在低温条件下,缓冲液的黏度升高,电渗流降低,使分析物与手性选择剂的作用时间延长,有利于提高手性拆分的分

离度。实验考察了毛细管柱温度为15、20、25℃对S异构体和R异构体分离度的影响。随着柱温升高时,S异构体、R异构体的迁移时间逐渐减小,且分离度逐渐降低。柱温为25℃时,色谱峰变形,基线不平。因此,选择柱温为15℃,以获得最大的分离度。

综上所述,本实验考察了选择剂的种类及浓度,缓冲液的pH值及浓度,不同的运行电压和毛细管柱温对2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯手性拆分的影响。建立了最佳拆分方法,并进行了方法学验证,验证结果表明,该方法专属性高,操作简单,重复性好。适用于(S)-2-(6-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-3-基)乙酸甲酯中R异构体的检查。

参考文献

- [1] Defossa E, Wagner M. Recent developments in the discovery of FFA1 receptor agonists as novel oral treatment for type 2 diabetes mellitus [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(14): 2991-3000.
- [2] Negoro N, Sasaki S, Mikami S, *et al.* Discovery of TAK-875: a potent, selective, and orally bioavailable GPR40 agonist [J]. *Acs Med Chem Lett*, 2010, 1(6): 290-294.
- [3] Lu H, Fei H B, Yang F, *et al.* Discovery of novel orally bioavailable GPR40 agonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(10): 2920-2924.
- [4] Negoro N, Sasaki S, Mikami S, *et al.* Optimization of (2,3-dihydro-1-benzofuran-3-yl)acetic acids: discovery of a non-free fatty acid-like, highly bioavailable G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist as a glucose-dependent insulinotropic agent [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(8): 3960-3974.
- [5] Li Z, Pan M, Su X, *et al.* Discovery of novel pyrrole-based scaffold as potent and orally bioavailable free fatty acid receptor 1 agonists for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(9): 1981-1987.
- [6] 赵卫, 杭太俊. 硫酸化环糊精在毛细管电泳手性拆分中的应用 [J]. *药学进展*, 2004, 28(7): 304-309.
- [7] 崔宏杰, 吉爱国, 李从发. 以磺酰化 β -环糊精为手性选择剂高效毛细管电泳拆分手性药物中间体 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 2004, 21(3): 188-190.