

反相高效液相色谱法测定 Fmoc-L-His (Trt) -OH 中 光学异构体 Fmoc-D-His (Trt) -OH 的含量

杨欣茹, 李铁健, 王金迪, 张贵民* (国家手性制药工程技术研究中心, 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要: **目的** 结合外标法和面积归一化法, 建立反相高效液相色谱法测定 Fmoc-L-His (Trt) -OH 中的光学异构体 Fmoc-D-His (Trt) -OH 的含量。**方法** 采用 Chiral MX (2) -RH 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈-水-乙酸 (500:500:1) 为流动相, 等度洗脱; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 紫外检测器检测, 波长为 220 nm; 柱温为 30 °C; 进样体积为 10 μL。**结果** Fmoc-L-His (Trt) -OH 和 Fmoc-D-His (Trt) -OH 分离良好; Fmoc-D-His (Trt) -OH 在 0.15 ~ 2.93 mg·mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系 (相关系数为 0.9999); 定量限为 0.15 μg·mL⁻¹, 检测限为 0.049 μg·mL⁻¹。回收率在 95% ~ 100% 内, RSD 为 0.96%。**结论** 本方法操作简单, 专属性强, 灵敏度高, 为 Fmoc-L-His (Trt) -OH 中光学异构体 Fmoc-D-His (Trt) -OH 研究提供参考。

关键词: Fmoc-L-His (Trt) -OH; Fmoc-D-His (Trt) -OH; 反相高效液相色谱法; 等度洗脱; 光学异构体

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)08-2170-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.08.033

Determination of optical isomer Fmoc-D-His (Trt)-OH in Fmoc-L-His (Trt)-OH by RP-HPLC

YANG Xin-ru, LI Tie-jian, WANG Jin-di, ZHANG Gui-min* (*National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceuticals, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi Shandong 273400*)

Abstract: Objective To establish a reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) to determine Fmoc-D-His (Trt)-OH in Fmoc-L-His (Trt)-OH by the external standard method and area normalization method. **Methods** The separation was performed on a Chiral MX (2)-RH column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with mobile phase consisting of acetonitrile-water-acetic acid (500:500:1). Isocratic elution was used and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. Ultraviolet detector was used with the detection wavelength at 220 nm. The column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** Fmoc-L-His (Trt)-OH and Fmoc-D-His (Trt)-OH were well separated. Fmoc-D-His (Trt)-OH had a good linearity at 0.15 ~ 2.93 mg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$). The limit of quantitative was 0.15 μg·mL⁻¹ and the limit of detection was 0.049 μg·mL⁻¹. The recovery ranged at 95% ~ 100%, RSD was 0.96%. **Conclusion** The method is simple, specific and sensitive, which provides reference for the determination of Fmoc-D-His (Trt)-OH with RP-HPLC in Fmoc-L-His (Trt)-OH.

Key words: Fmoc-L-His (Trt)-OH; Fmoc-D-His (Trt)-OH; RP-HPLC; isocratic elution; optical isomer

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (No.2019JZZY010516)。

作者简介: 杨欣茹, 女, 硕士, 工程师, 主要从事多肽药物研发, email: yangxinru2005@163.com *通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 主要从事药物研究及工程化研究, email: lunanzhangguimin@163.com

多肽药物因其高活性、低毒性、强特异性等优点，成为国内外制药企业研发的热点之一。多肽药物的合成工艺主要为经典的液相合成和固相合成，其中固相合成工艺越来越成熟并逐渐占据了主导地位^[1-2]。保护氨基酸是固相合成多肽的起始物料之一，其质量对多肽的质量有重要的影响。起始物料引入的杂质常常难以分离，给后续的纯化带来不便，必须从源头加强质量控制^[3]。原国家食品药品监督管理局于 2007 年出台的《合成多肽药物药学研究技术指导原则》^[4]中，对氨基酸的质量标准有明确的要求“作为起始原料的氨基酸及其衍生物的质量标准一般应包括性状、熔点、比旋度、化学纯度、色谱纯度、光学纯度、含量等，其中对于起始原料的化学纯度和光学纯度的控制尤为重要”。一个 10 肽的合成中，每个氨基酸发生 1% 的差向异构体，则生成的非对映异构体混合物中只有 90.4% 的肽含有正确的立体构型^[5]；故需关注保护氨基酸的消旋异构体，建立严格的质控标准，以提高目标产物的光学纯度。

目前，有许多文献报道了多肽药物中异构体的控制方法^[6-10]，而国内注册申请人通常在起始物料的内控标准中仅对比旋度进行控制，鉴于比旋度检查方法在专属性、灵敏度方面的限制，此项指标并不能有效地控制氨基酸的光学纯度，对于比旋度数值较小的保护氨基酸更是如此，因此，建议采用专属性强的手性 HPLC 对起始原料的光学纯度进行控制^[11]。起始物料保护氨基酸中控制异构体的 HPLC 方法鲜有报道^[12-14]，本研究建立了一种用反相液相色谱测定苄氧羰基-三苯甲基-L-组氨酸 [Fmoc-L-His (Trt)-OH] 中光学异构体苄氧羰基-三苯甲基-D-组氨酸 [Fmoc-D-His (Trt)-OH] 的方法 (结构式见图 1)，为 Fmoc-L-His (Trt)-OH 光学异构体的测定提供参考。

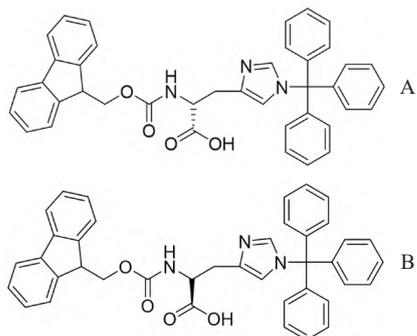


图 1 Fmoc-L-His (Trt)-OH (A) 和 Fmoc-D-His (Trt)-OH (B) 的结构式

Fig 1 Structural formula of Fmoc-L-His (Trt)-OH (A) and Fmoc-D-His (Trt)-OH (B)

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e-2695 高效液相色谱仪 (Waters 公司, 紫外检测器, Empower 工作站); Mettler Toledo 电子天平 (十万分之一, MS205DU); 超纯水机 (赛多利斯)。

1.2 试剂

Fmoc-D-His (Trt)-OH 对照品 (含量: 96.52%, 批号: GLS200813-36705)、Fmoc-L-His (Trt)-OH [批号: GLS201225-36701、GLS200426-36701、GLS200507-36701] [吉尔生化 (上海) 有限公司]; 乙腈 (色谱纯, Merck); 乙酸 (分析纯, 国药集团); 水 (超纯水, 自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Chiral MX (2)-RH (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 以乙腈-水-乙酸 (500:500:1) 为流动相, 流速为 0.8 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C; 检测波长为 220 nm; 进样体积为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶剂 空白溶剂为乙腈-水 (50:50)。

2.2.2 Fmoc-D-His (Trt)-OH 对照品溶液 精密称取 Fmoc-D-His (Trt)-OH 对照品约 1.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 Fmoc-D-His (Trt)-OH 储备液; 精密量取储备液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 即得 Fmoc-D-His (Trt)-OH 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 先加 2 mL 乙腈溶解, 再加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.4 混合溶液 取本品约 10 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 先加 2 mL 乙腈和适量溶剂溶解, 再加入 Fmoc-D-His (Trt)-OH 储备液 1 mL, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为混合溶液。

2.3 方法学评价

2.3.1 系统适用性试验 取“2.2”项下混合溶液进行分析。结果 Fmoc-D-His (Trt)-OH 保留时间为 8.013 min, Fmoc-L-His (Trt)-OH 保留时间为 9.678 min, 两者分离度为 2.95, 理论板数按 Fmoc-L-His (Trt)-OH 计为 3618, 拖尾因子为 1.01。连续进样 6 次, Fmoc-D-His (Trt)-OH 峰面积和保留时间的 RSD 分别为 0.63%、0.040%, Fmoc-L-His (Trt)-OH 峰面积和保留时间的 RSD 分别为 0.29%、0.020%, 均符合规定。

2.3.2 专属性试验 取空白溶剂、对照品溶液、

供试品溶液、混合溶液进样测定, 记录色谱图, 见图 2, 结果表明空白溶剂对 Fmoc-D-His (Trt) -OH 测定无干扰; Fmoc-D-His (Trt) -OH 保留时

间为 7.990 min; Fmoc-L-His (Trt) -OH 保留时间为 9.660 min, 无其他杂质干扰 Fmoc-D-His (Trt) -OH 测定; 两者分离度为 2.95。专属性良好。

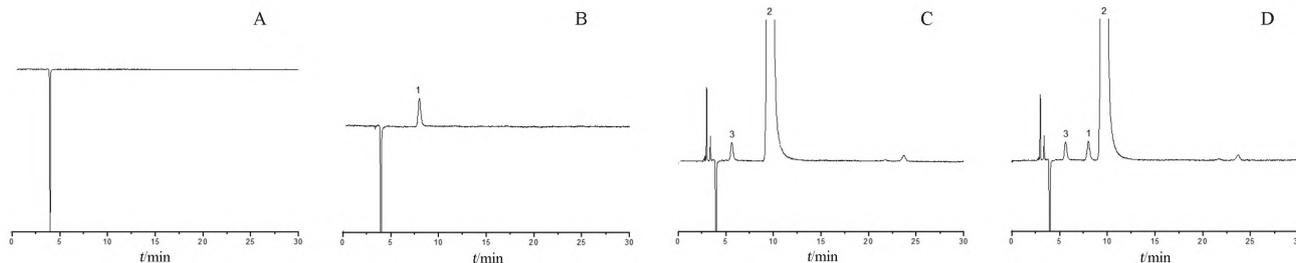


图 2 专属性试验色谱图

Fig 2 Chromatograms of specificity test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 对照品溶液 (reference solution); C. 供试品溶液 (sample solution); D. 混合溶液 (mixed solution); 1. Fmoc-D-His (Trt) -OH; 2. Fmoc-L-His (Trt) -OH; 3. 未知杂质 (unknown impurity)

2.3.3 精密度试验 不同试验人员分别于不同日期按“2.2”项下方法配制对照品溶液、供试品加标溶液, 每人平行配制 6 份。按“2.1”项下色谱条件于不同仪器中测定, 按外标法及面积归一化法分别计算, 结果 Fmoc-D-His (Trt) -OH 的含量分别为 0.296%、0.318%, RSD 分别为 1.1%、0.95%, 说明方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 按“2.2”项下方法配制对照品溶液、供试品溶液、混合溶液, 分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 对照品溶液以峰面积为考察指标, 供试品溶液、混合溶液均以 Fmoc-D-His (Trt) -OH 含量 (%) 为考察指标, 结果对照品溶液、混合溶液的 RSD 均小于 2%, 供试品溶液均未检出 Fmoc-D-His (Trt) -OH, 对照品溶液、混合溶液及供试品溶液在 24 h 内均稳定。

2.3.5 定量限 (LOQ) 与检测限 (LOD) 取 Fmoc-D-His (Trt) -OH 储备液, 加溶剂进行逐步稀释。以 $S/N \approx 10$ 时的浓度作为定量限, 以 $S/N \approx 3$ 时的浓度作为检测限, Fmoc-D-His (Trt) -OH 的定量限和检测限分别为 0.15 、 $0.049 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明方法灵敏度较高。

2.3.6 线性关系考察 精密量取 Fmoc-D-His (Trt) -OH 储备液适量, 用溶剂稀释成从定量限 ($0.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 至约相当于限度质量浓度 ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 40% ($0.59 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、80% ($1.17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、100% ($1.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、120% ($1.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、150% ($2.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、200% ($2.93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的溶液, 进样测定, 记录色谱图。以质量浓度 (x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $y = 4.05 \times 10^4 x - 317.22$, $r = 0.9999$ 。表明 Fmoc-D-

His (Trt) -OH 在 $0.15 \sim 2.93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.7 回收试验 取本品 9 份, 各约 10 mg, 精密称定, 分别置 20 mL 量瓶中, 先加 2 mL 乙腈及适量溶剂溶解, 分别加入 0.8、1.0、1.2 mL Fmoc-D-His (Trt) -OH 储备液, 各 3 份, 分别用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为 80%、100%、120% 的准确度溶液。依法测定, 记录色谱图。按外标法计算得各准确度溶液中 Fmoc-D-His (Trt) -OH 的回收率均在 95% ~ 100%, RSD 为 0.96%, 本法的准确度较高。外标法计算结果分别为 0.233%、0.296%、0.355%; 面积归一化法计算结果分别为 0.251%、0.320%、0.386%。两种计算方法结果基本一致, 表明面积归一化法可准确用于 Fmoc-D-His (Trt) -OH 的含量测定。

2.3.8 耐用性 通过改变流速 (0.7 、 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、柱温 (28 、 $32 \text{ }^\circ\text{C}$)、流动相 [乙腈 - 水 - 甲酸 ($480 : 520 : 1$)、乙腈 - 水 - 甲酸 ($520 : 480 : 1$)、乙腈 - 水 - 甲酸 ($500 : 500 : 0.9$)、乙腈 - 水 - 甲酸 ($500 : 500 : 1.1$)], 分别取空白溶剂、溶液考察本法的耐用性, 结果混合改变柱温、流速、流动相比例后, 测得混合溶液中 Fmoc-D-His (Trt) -OH 含量的 RSD 均 $< 2.5\%$, 且分离度均符合要求, 说明本法耐用性良好。

3 样品含量检测

取 Fmoc-L-His (Trt) -OH (批号: GLS200426-36701、GLS200507-36701、GLS201225-36701), 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 记录色谱图。结果 3 批样品中均未检出 Fmoc-D-His (Trt) -OH。

4 结论

4.1 色谱方法的确定

光学异构体的检测方法通常为正相色谱法, 采用手性色谱柱, 以毒性比较大的有机溶剂作为流动相。而本方法中采用以纤维素-三-(4-氯-3-甲基苯基氨基甲酸酯)为固定相的 Chiral MX (2)-RH 反相手性色谱柱, 以乙腈-水-乙酸为流动相, 等度洗脱, 即能实现 Fmoc-L-His (Trt)-OH 和 Fmoc-D-His (Trt)-OH 的分离, 参考此方法, 调整乙腈-水的比例, 成功分离了 Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH 和 Fmoc-D-Tyr (tBu)-OH, 为其他保护氨基酸中异构体的分离提供了参考。取混合溶液在 200 ~ 400 nm 内进行全波长扫描, Fmoc-L-His (Trt)-OH 和 Fmoc-D-His (Trt)-OH 在 220 nm 处有最大吸收, 因此选择 220 nm 作为检测波长。

4.2 色谱条件的优化

本方法采用反相高效液相色谱法, 流动相先采用乙酸-甲醇-水(1:600:400)溶液, 在该色谱条件下, Fmoc-D-His (Trt)-OH 不能与 Fmoc-L-His (Trt)-OH 完全分离。将流动相中甲醇换为乙腈, 并调整乙腈和水的比例, 乙酸含量不变, Fmoc-D-His (Trt)-OH 与 Fmoc-L-His (Trt)-OH 可以良好分离。

4.3 外标法与面积归一化法对比

本试验中主要采用了外标法和面积归一化法进行方法学验证, 在精密度试验、准确度试验及耐用性试验中对外标法和面积归一化法进行了对比, 从结果可以看出, 外标法和面积归一化法均可以较准确地测定 Fmoc-L-His (Trt)-OH 中 Fmoc-D-His (Trt)-OH 的含量, 外标法和面积归一化法测定结果无明显差异。因外标法需用到杂质对照品, 杂质对照品较难获得, 而面积归一化法不需要杂质对照品, 操作简单, 因此, 可用面积归一化法对 Fmoc-L-His (Trt)-OH 中的 Fmoc-D-His (Trt)-OH 进行检测。

4.4 小结

本研究建立了面积归一化法检测 Fmoc-L-His (Trt)-OH 中异构体 Fmoc-D-His (Trt)-OH 的含量, 该方法简单, 灵敏度高, 专属性强, 准确度

好, 适用于 Fmoc-L-His (Trt)-OH 中异构体的检测, 为多肽药物起始物料保护氨基酸质量研究提供了依据。

参考文献

- [1] 林龙, 姜素云, 汤新强. 多肽类药物体外合成方法的研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2014, 36 (2): 177-181.
- [2] 胡玉玺, 蒋煜, 韩天娇. 制备工艺和过程控制对合成多肽药物有关物质的影响 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26 (18): 2143-2148.
- [3] 吴一凡, 刘福利. 多肽固相合成中起始物料的控制策略 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31 (10): 937-941.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 合成多肽药物药学研究技术指导原则 [S]. 2007.
- [5] 王鹏. 合成多肽药物的合成工艺中关键问题分析 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19 (2): 102-105.
- [6] 张若蘅, 王宏, 徐筱杰. 应用反相高效液相色谱法分离 L, D-多肽非对映异构体 [J]. 色谱, 1996, 14 (3): 202-204.
- [7] 邵炎龙, 吴超柱, 徐凡, 等. 多肽药物固相合成中的水解杂质和非对映异构体杂质的研究 [J]. 重庆理工大学学报 (自然科学), 2014, 28 (3): 69-76.
- [8] 何刚, 唐洋明, 陶安进, 等. 多肽药物中氨基酸消旋和非对映异构体杂质的检测方法: CN106290601B [P]. 2019-03-22.
- [9] 邵红霞, 邢亚军, 钱志琴, 等. 一种用高效液相色谱法分离测定含多个手性中心的多肽手性异构体的方法: CN110702819B [P]. 2022-09-06.
- [10] 林洁虹, 汪泓, 邵泓, 等. 基于质谱技术的手性氨基酸分析以控制消旋肽杂质的研究进展 [J]. 药学学报, 2019, 54 (11): 1958-1964.
- [11] 康建磊, 徐冰珠, 李建宇. 关于合成多肽药物中非对映异构体杂质的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27 (5): 387-389.
- [12] 郭晓蓉, 张松, 邱霞, 等. 一种保护氨基酸对映异构体检测方法: CN111505161A [P]. 2020-08-07.
- [13] 孙宝丹, 周灵祺, 柳宏巧. HPLC 法测定 2 种保护组氨酸衍生物中的对映体 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52 (10): 1366-1370.
- [14] 林琳, 夏立钧, 许旭. 大环糖肽抗生素键合相高效液相色谱法拆分 7 种氨基带保护基的氨基酸对映体 [J]. 色谱, 2006, 24 (2): 144-147.

(收稿日期: 2022-11-09; 修回日期: 2022-12-13)