

## 高效液相色谱手性流动相添加法拆分奥昔布宁对映体

郭 娜, 高新星, 徐国防, 郭兴杰

(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要** :采用  $C_{18}$  固定相,以羟丙基- $\beta$ -环糊精为手性流动相添加剂,建立了奥昔布宁对映体的高效液相色谱拆分方法。考察了手性添加剂、有机极性调节剂、缓冲盐的种类和浓度以及流动相的 pH 值和流速及柱温等因素对对映体分离的影响。在最佳分离条件下,奥昔布宁对映体的分离度为 1.54,检测限为 1.0 ng。该方法简便,重复性好,比手性固定相法更加经济。

**关键词** :高效液相色谱法;奥昔布宁;对映体;羟丙基- $\beta$ -环糊精;流动相添加剂

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)02-0259-03 栏目类别 :技术与应用

## High performance liquid chromatographic separation of oxybutynin enantiomers using chiral mobile phase additive

GUO Na, GAO Xinxing, XU Guofang, GUO Xingjie

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract** : A simple and effective method for the separation of oxybutynin enantiomers was developed using high performance liquid chromatography with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) as the chiral mobile phase additive and a  $C_{18}$  reversed-phase column as the stationary phase.  $\beta$ -CD and HP- $\beta$ -CD were investigated as chiral mobile phase additives separately. The results showed that oxybutynin enantiomers could not be separated when adding  $\beta$ -CD in the mobile phase, but optimal resolution was obtained when using HP- $\beta$ -CD as the chiral mobile phase additive. Excellent enantioseparation was achieved with the mobile phase composed of 30 mmol/L  $KH_2PO_4$ -acetonitrile (80:20, v/v) mixed with 60 mmol/L HP- $\beta$ -CD at pH 4.0. The detection wavelength was set at 223 nm and the column temperature was set at 28 °C with a flow rate of 0.8 mL/min. Under the optimized conditions, the resolution of enantiomers was 1.54 and the limit of quantitation was 1.0 ng. Comparing with chiral stationary phase chromatography, the method was simple, economic and considerably reproducible.

**Key words** : high performance liquid chromatography (HPLC); oxybutynin; enantiomers; hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD); mobile phase additive

盐酸奥昔布宁 (oxybutynin chloride; Ditropan) 为第三代治疗尿失禁首选药物<sup>[1-2]</sup>,其分子中含有一个手性碳原子(见图 1),临床上以外消旋体的形式使用。但临床前体外组织和体内活性研究证实,其两种对映体具有不同的药理活性<sup>[3-5]</sup>。因此,研究奥昔布宁对映体的手性分离分析方法对于研究其药理和药效作用具有重要意义。

已有用 Chiralpak AD 手性固定相分离拆分奥昔布宁对映体的报道<sup>[6-8]</sup>。本文以羟丙基- $\beta$ -环糊

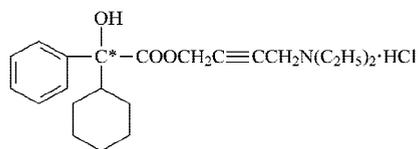


图 1 盐酸奥昔布宁的结构

精(HP- $\beta$ -CD)为手性流动相添加剂,采用高效液相色谱法拆分奥昔布宁对映体,考察了手性流动相添加剂、有机极性调节剂、缓冲盐的种类和浓度、流动相的 pH 值和流速及柱温等因素对分离的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-10A 型高效液相色谱仪、SPD-10A 型紫外可见光检测器(日本岛津公司);Anastar 色谱工作站(Scientific System Inc.)。

盐酸奥昔布宁(外消旋体,沈阳药科大学药化实验室提供);HP- $\beta$ -CD(宁波保税区正佳化学有限公司); $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD,天津市博迪化工有限公司)。乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为二次重蒸水。

### 1.2 色谱条件

色谱柱:Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 柱(200 mm × 4.6 mm 5  $\mu$ m,迪马公司);保护柱:Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 柱(20 mm × 4.6 mm 5  $\mu$ m)。流动相:30 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 4.0)-乙腈(体积比为 80:20),含 60 mmol/L HP- $\beta$ -CD;流速:0.8 mL/min。检测波长 223 nm;进样量 20  $\mu$ L;柱温 28  $^{\circ}$ C。

### 1.3 供试品溶液的配制

精密称取盐酸奥昔布宁适量,用甲醇溶解并制成质量浓度约为 1 g/L 的贮备液,于 4  $^{\circ}$ C 条件下保存。临用前加流动相稀释制成 0.1 g/L 的溶液,并用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相体系的选择

#### 2.1.1 手性添加剂的选择

分别考察了以  $\beta$ -CD 或 HP- $\beta$ -CD 作为手性流动相添加剂时对奥昔布宁对映体的拆分情况。奥昔布宁对映体在  $\beta$ -CD 体系中不能分离,而在以 HP- $\beta$ -CD 为手性添加剂的流动相体系中能到达较好的分离。HP- $\beta$ -CD 是  $\beta$ -CD 的羟丙基化衍生物,羟丙基对  $\beta$ -CD 分子结构中羟基的取代不仅能增加环糊精在流动相中的溶解性,而且增大了其与奥昔布宁的疏水相互作用、立体排阻效应,从而增大了与奥昔布宁对映体的立体选择性作用差异,使奥昔布宁对映体得到了分离。

HP- $\beta$ -CD 的浓度对药物对映体分离的影响见表 1。当 HP- $\beta$ -CD 的浓度为 60 mmol/L 时分离度为 1.54,两对映体达到了完全分离。手性添加剂的浓度的增加增强了其与对映体之间的相互作用,使得对映体之间的色谱行为差异扩大,因此增大了分离度。Armstrong 等<sup>[9]</sup>报道了环糊精浓度与  $1/k$  ( $k$  为保留因子)之间存在线性关系。在本文中,分别以两对映体的  $1/k$  对 HP- $\beta$ -CD 浓度( $c$ )作图,得线性回归方程依次为: $1/k_1 = 0.000178c + 0.0166$

( $r_1 = 0.9942$ ); $1/k_2 = 0.000139c + 0.0165$ ( $r_2 = 0.9867$ )。

表 1 HP- $\beta$ -CD 浓度对保留因子( $k$ )及分离度( $R_s$ )的影响

$\alpha$ HP- $\beta$ -CD/ (mmol/L)	$k_1$	$k_2$	$R_s$
20	48.63	50.39	0.638
40	43.15	46.67	0.92
60	37.19	40.82	1.54
80	32.06	35.62	1.78

#### 2.1.2 有机极性调节剂的选择

用 HP- $\beta$ -CD 为流动相添加剂分离极性小的手性化合物时<sup>[10]</sup>,可以通过加入有机极性调节剂增加其溶解度,降低其在固定相上的吸附,从而扩大对映体与环糊精之间的相互作用差异,提高分离度。本文分别考察了采用甲醇或乙腈作调节剂对分离的影响。结果表明,采用甲醇时,奥昔布宁的保留时间长,峰展宽;采用乙腈时,两对映体可以获得完全分离,且峰形好。

乙腈的含量(体积分数)对分离度的影响见表 2。从表 2 可见,乙腈含量为 30%~20% 时,随着乙腈含量的减小,流动相的洗脱能力减小,药物的保留时间增加,对映体与 HP- $\beta$ -CD 之间的作用时间延长,手性识别作用加强,对映体的分离度增加。当乙腈含量降到 15% 时,分离度开始下降,可能是由于流动相的洗脱能力减小,扩散作用使色谱峰变宽,从而影响了分离效果。

表 2 流动相中乙腈含量对保留时间( $t_R$ )和分离度( $R_s$ )的影响

$\alpha$ (乙腈)/%	$t_{R1}/\text{min}$	$t_{R2}/\text{min}$	$R_s$
30	22.2	23.63	0.78
25	26.9	29.0	1.02
20	32.5	35.5	1.54
15	40.3	41.4	0.69

#### 2.1.3 缓冲盐的选择

当流动相中未添加缓冲盐时,色谱峰矮且宽,柱效低,分离效果差。分别试验使用磷酸盐和三乙胺-冰醋酸两种缓冲溶液拆分药物对映体,发现使用前者时的色谱峰形和分离效果均优于后者。磷酸盐缓冲溶液浓度在 10~40 mmol/L 范围内时,随着磷酸盐浓度的增大,分离度逐渐增加(见图 2)。无机盐的存在,不仅可以增加 HP- $\beta$ -CD 的溶解度,还能稳定药物与 HP- $\beta$ -CD 所形成的包容物,增强手性识别能力<sup>[11]</sup>。由于磷酸盐浓度过高对色谱柱和色谱仪都有损害,在保证分离度的前提下,本文选择磷酸二氢钾的浓度为 30 mmol/L。

#### 2.1.4 流动相的 pH 值

在其他色谱条件不变时,改变流动相的 pH 值,

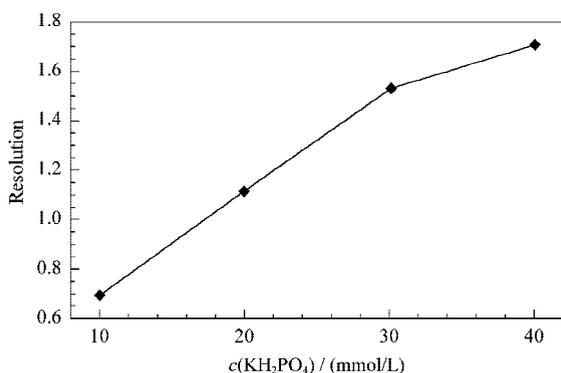


图 2 磷酸二氢钾的浓度对奥昔布宁对映体分离的影响

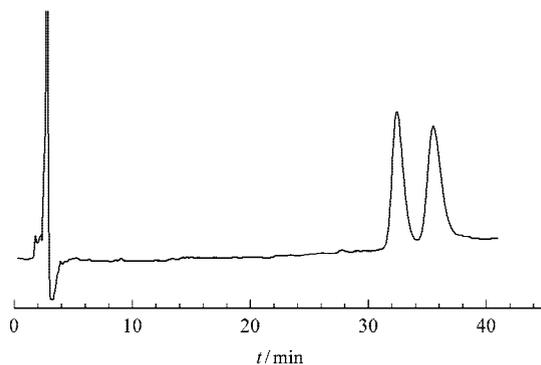


图 3 奥昔布宁对映体的色谱图

流动相: 30 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液( pH 4.0 )-乙腈( 体积比为 80:20 ), 含 60 mmol/L HP- $\beta$ -CD.

考察 pH 值对奥昔布宁对映体分离的影响。当 pH 值为 2.5 ~ 4.0 时,随着 pH 值的增加,分离度明显增加,当 pH 值为 4.0 时分离度达到 1.54。当 pH 值为 5.0 时,由于峰形不好,分离度下降。因此,最佳 pH 值为 4.0。

## 2.2 柱温对分离的影响

温度对奥昔布宁对映体的分离具有显著的影响<sup>[12]</sup>。在本文的研究工作中,随着温度的升高,奥昔布宁对映体的分离度逐渐变小。可能的解释为该对映体在低温时分子的旋转和热动力减弱,使其与 HP- $\beta$ -CD 包含的机会增加;且温度升高会使奥昔布宁对映体与 HP- $\beta$ -CD 包含物的稳定性减小,降低了手性识别作用。较低的柱温有利于对映体的分离,但是过低的柱温会增加流动相的黏度,使色谱系统柱压过高。综合考虑以上因素,本文最终选择柱温为 28  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.3 流速对分离的影响

实验中还考察了流速对奥昔布宁对映体分离的影响。流速减慢,分离度会适当增大,但也会使峰展宽,且保留时间增长。兼顾分离度和色谱峰形,本文选择流动相流速为 0.8 mL/min。

## 2.4 方法的重复性及检测限

在上述最佳色谱条件下分离奥昔布宁对映体(见图 3),进样 6 次,两对映体的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于 1.5%,说明该方法的重复性良好。将供试品溶液进一步稀释,当信噪

比( $S/N$ )为 3 时,测得最低检测限为 1.0 ng。

## 3 结论

本文采用以 HP- $\beta$ -CD 为手性流动相添加剂的高效液相色谱法拆分奥昔布宁对映体,方法简单,灵敏度高,且比手性固定相分离法经济,从而为奥昔布宁对映体的进一步深入研究提供了一种新的方法。

## 参考文献:

- [1] 仲晓燕. 世界临床药物, 1991, 12(3): 153
- [2] 温清, 贺坤, 郭瑞臣. 中国药事, 2004, 18(7): 443
- [3] Zobrist R H, Bernhard S, Alexander F, et al. J Pharm Res, 2001, 18(7): 1 029
- [4] Kachur J F, Peterson J S, Carter J P, et al. J Pharmacol Exp Ther, 1988, 247: 867
- [5] Noronha-Blob L, Kachur J F. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 256: 562
- [6] Miyamoto E, Demizu Y, Murata Y, et al. J Chromatogr A, 1993, 653: 135
- [7] Alebic-Kolbah T, Zavitsanos A P. J Chromatogr A, 1997, 759: 65
- [8] Walker T A. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2000, 23(6): 841
- [9] Armstrong D W, Nome F, Spino L A, et al. J Am Chem Soc, 1986, 108(7): 1 418
- [10] 尤启冬, 林国强. 手性药物——研究与应用. 北京: 化学工业出版社, 2003: 95
- [11] 安登魁. 现代药物分析选论. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 91
- [12] 陈立仁. 液相色谱手性分离. 北京: 科学出版社, 2006: 32