

萘普生对映体的手性分离和纯度检查

薛娜¹, 张恺^{2*}, 李丽娟¹, 杜玉民², 李林²

(1. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050026; 2. 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

摘要 目的: 建立萘普生手性分离和光学纯度检查的高效液相色谱方法。方法: 采用 Chiralpak AD-H (4.6 mm × 250 mm 5 μm, Daicel 公司) 手性色谱柱在正相条件下拆分萘普生对映体, 考察了固定相种类、流动相组成、柱温及流速等对萘普生对映体分离的影响, 流动相为正己烷-异丙醇(30:70, v/v) 检测波长 272 nm 流速 0.5 mL · min⁻¹ 柱温 20℃。结果: 在此条件下, 萘普生及其(R)-(-)-构型体达到基线分离, 分离度为 3.3。结论: 该法简单快速, 重现性好, 能够用于萘普生对映体的分离和纯度考察。

关键词: 萘普生; 高效液相色谱法; 手性分离; 手性固定相; 拆分; 对映体

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1326-04

Chiral separation and purity test of Naproxen

XUE Na¹, ZHANG Kai^{2*}, LI Li-juan¹, DU Yu-min², LI Lin²

(1. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China;

2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Objective: To develop a high performance liquid chromatographic method for chiral separation of the undesired enantiomer from naproxen and quantitative determination of bulk drugs. **Methods:** Baseline chiral separation of naproxen was achieved under normal-phase chromatographic mode by the Chiralpak AD-H (4.6 mm × 250 mm 5 μm, Daicel) chiral stationary phase. The influences of the kind of chiral stationary phase and form of the mobile phase, column temperature and flowrate on the enantiomeric separation were studied. The optimized chromatographic conditions were hexane-isopropyl alcohol (30:70, v/v) as the mobile phase with a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹ and detection at the wavelength of 272nm. The column temperature was set at 20℃. **Results:** A baseline separation of naproxen enantiomers was achieved, and the resolution was 3.3 between the enantiomers under the above chromatographic conditions. **Conclusion:** The method is simple, rapid and with good reproducibility, and it can be used for separation and purity of naproxen.

Key words: naproxen; high performance liquid chromatography (HPLC); chiral separation; chiral stationary phase (CSP); resolution; enantiomer

萘普生(Naproxen), 化学名称为: (+) α-甲基-6-甲氧基-2-萘乙酸, 系重要的芳基烷酸类非甾体抗炎药, 临床上广泛用于治疗类风湿性关节炎、风湿性脊柱炎及产后、术后止痛^[1]。其结构式中羧酸 α 位为一个手性碳原子, 存在一对光学异构体(图 1) 即: (S)-(+)-萘普生和(R)-(-)-萘普生, 其中(S)-(+)-萘普生药效为(R)-(-)-萘普生的 28 倍^[2]。目前, 萘普生为光学纯单一体上市, 确保了疗效, 减少了胃部刺激, 保证了用药

安全。国内合成萘普生的方法主要包括: 拆分法^[3]、不对称合成法^[4]和酶催化水解法^[5], 而 2005 年版中国药典只规定对本品进行比旋光度检查, 其杂质检查方法也未涉及光学杂质 [(R)-(-)-萘普生] 的检查。

萘普生对映体的拆分方法已有文献报道: 宁凤容等采用手性流动相 HPLC 法, 以羟丙基-β-环糊精为手性添加剂拆分了萘普生对映体^[6]; 陈德妙等采用纤维素衍生化手性固定相色谱柱, 以

通讯作者 Tel: (0311) 86265624; E-mail: ZHK810728@163.com

正己烷/异丙醇/冰醋酸(97:3:1, V/V)为流动相成功拆分了萘普生对映体^[7]。但上述方法均存在保留时间长、分离度低、拆分峰峰形差等诸多问题。本研究采用改良淀粉衍生物为手性固定,正相条件下对萘普生光学异构体进行了分离测定并且分离度良好,为此药物的光学纯度检查提供了简便、高效的检测方法。

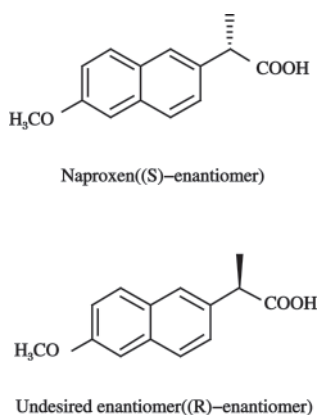


图1 萘普生及其光学杂质的结构
Fig 1 The structures of Naproxen and the undesired enantiomer

1 仪器及试剂

Agilent1200 高效液相色谱系统(包括自动进样器、VWD 检测器、Agilent 色谱工作站)

原料药萘普生由河北远征药业集团提供,萘普生消旋体由河北医科大学药学院药物化学教研室提供,正己烷,异丙醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 溶液的制备

供试品溶液:精密称取萘普生 25 mg,置于 50 mL量瓶中,加入正己烷-异丙醇(30:70,溶剂) 25 mL 溶解,流动相定容。量取该溶液适量,用流动相稀释成 0.1 mg · mL⁻¹的溶液,作为供试品溶液。

对照溶液:精密称取萘普生消旋体适量,同上法制成浓度 0.1 mg · mL⁻¹的溶液。

3 色谱条件

手性固定相色谱柱:Daicel Chiralpak AD - H (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Daicel 公司);流动相:正己烷-异丙醇(70:30);流速:0.5 mL · min⁻¹;检测波长:272 nm;柱温:20℃;进样量:10 μL。对映体出峰顺序以(S)-(+) - 萘普生判断。

4 方法学考察

4.1 系统适用性试验 按上述色谱条件进样测定,色谱图见图 2。理论板数按 b 峰计为 11687,

a、b 的保留时间分别为:9.96, 11.29 min, 分离度:3.3。

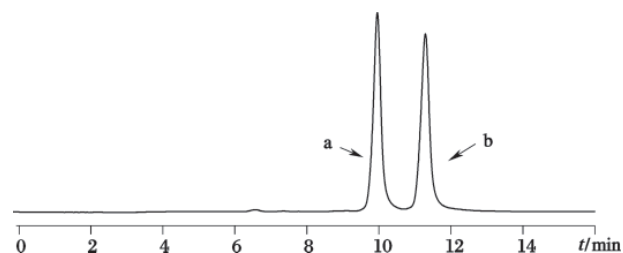


图2 对照溶液色谱图
Fig 2 HPLC chromatogram of racemic naproxen
a. (R) - (-) - 萘普生(R-isomer) b. (S) - (+) - 萘普生(S-isomer)

4.2 检测限及定量限 分别以 S/N 为 3 和 10 为考察指标,测得萘普生的检测限为 10 ng · mL⁻¹,定量限为 30 ng · mL⁻¹。

4.3 线性范围 分别配制浓度为 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg · mL⁻¹的萘普生溶液,分别取各浓度溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积。以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。回归后线性方程为
 $Y = 22252X + 10.203 \quad r = 0.9999$

萘普生的浓度在 0.025 ~ 0.4 mg · mL⁻¹范围内与峰面积呈良好的线性关系。

4.4 重现性实验 在优化的色谱条件下,连续进样对照溶液 6 次,萘普生对映体出峰时间的相对标准偏差(RSD)分别为 0.20% 和 0.37%,峰面积的 RSD 分别为 1.9% 和 1.8%。实验表明:该方法简单、快速、重现性好,可用于萘普生对映体的手性分离。

4.5 样品测定 按“2”项下方法配制萘普生供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,色谱图见图 3。采用上述分离方法,按面积归一化法,分别对 3 批萘普生新样品进行了光学纯度检查,实验结果(表 1)表明:3 批样品光学纯度均不低于 99.0%,符合单一对映体药物的纯度要求。

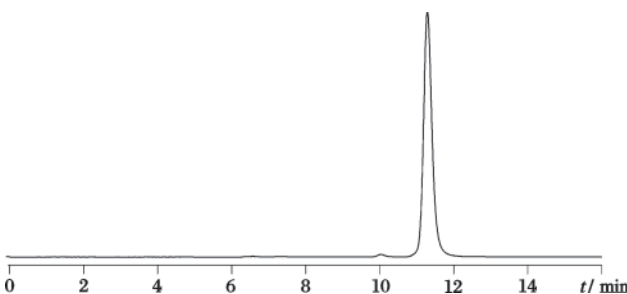


图3 供试品溶液色谱图
Fig 3 HPLC chromatogram of (S) - (+) - naproxen

表 1 3 批样品光学纯度检查结果
Tab 1 Result of the content of inspect
the purity of naproxen

批号(Lot NO)	光学纯度(purity of naproxen) /ee%
090501	99.5
090502	99.5
090503	99.7

5 讨论

5.1 手性固定相的选择 文献^[8]报道了使用 Chiralcel OD 型手性色谱柱,以正己烷-异丙醇-冰醋酸(97:3:1, V/V)为流动相拆分萘普生的方法,此方法保留时间较长,并且分离度较低。本研究曾尝试使用 Chiralcel OD (150 mm × 4.6 mm, Daicel) 型手性色谱柱,以乙腈-水或甲醇-水各种比例为流动相拆分萘普生,但均无法使萘普生对映体达到基线分离。

我们采用改良的淀粉衍生物固定相 Chiralpak AD-H 色谱柱,通过流动相的选择与优化,能够使萘普生对映体达到良好分离。Chiralpak AD-H 为直链淀粉氨基甲酸酯类手性固定相,直链淀粉是 D-葡萄糖以 $\alpha-1,4$ -糖苷键相连而形成的线形聚合物。Chiralpak AD-H 手性柱是将直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)涂布在硅胶载体上制成的^[9],氨基甲酸酯基围绕主链形成许多沟槽,对映体进入沟槽中,主要通过吸引和包合作用实现对映异构体的拆分。该类手性柱应用广泛,尤其适用于含酰胺基、芳香基、羰基、羟基和羧酸基等基团的化合物的拆分。

5.2 流动相组成对萘普生对映体分离的影响

表 2 异丙醇含量对分离的影响

Tab 2 The effect of isopropyl alcohol content on enantiomeric separation

异丙醇 (isopropyl alcohol) /%	t_{R1}/min	t_{R2}/min	分离因子 (α)	分离度 (R)
60	9.742	10.893	1.11	2.81
65	9.833	10.959	1.12	3.01
70	9.955	11.290	1.13	3.33
75	9.784	11.040	1.13	3.13
80	9.996	11.035	1.13	3.02

5.3 流速对萘普生对映体分离的影响 保持流动相组成正己烷-异丙醇(30:70)不变,改变流速,研究流速对萘普生对映体分离的影响,结果见表 3。由表 3 可以看出,降低流速,理论塔板数增加,分离度增加,分

于 Chiralpak AD-H 柱,生产厂商建议使用的流动相为正己烷和醇类有机改性剂。醇类改性剂不仅可与对映体分子竞争作用于固定相上的手性点,与固定相的氨基甲酸酯基团形成氢键,还可通过手性空穴中或手性空穴附近的非手性点的作用而改变手性空穴的空间环境,使药物对映体分子与手性空穴中苯基氨基甲酸酯之间的作用发生变化^[10]。

本实验选择了正己烷-异丙醇为流动相体系,成功分离了萘普生对映体。并且考察了流动相的比例对分离的影响,结果见表 2。一般来说,随着异丙醇比例的增大,不但使流动相极性增强,而且它与固定相之间的氢键作用抑制了对映体与固定相之间的相互作用,从而使对映体的保留时间明显缩短,分离度也随之下降。另外,异丙醇含量增加,其与对映体分子竞争作用于固定相手性位点的强度也相应增强,从而可能会导致对映体分离因子的降低。本实验中发现随着异丙醇比例的增大,保留时间变化不大,分离因子稍有增大,分离度先增大后减小,异丙醇应以特殊的方式参与了拆分过程,首先,流动相中适当比例的异丙醇通过与固定相手性空穴中或手性空穴附近的非手性点的作用,改变手型空穴的空间结构,增强手性固定相对药物分子(萘普生对映体)的手性识别能力,但随着异丙醇比例的增加,流动相极性增加,异丙醇分子过多参与竞争固定相上的手性点,而且其与固定相之间的氢键作用抑制了对映体与固定相之间的相互作用,从而降低了固定相的手性识别能力。综合考虑分离度和柱压等因素,选择了流动相异丙醇/正己烷比例为 70:30。

离因子无变化,但会延长对映体出峰时间,扩散比较严重,增大流速,会显著降低保留时间,分离度降低,因此在流速允许的范围内,考虑保留时间及柱压的影响,选择流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

表3 流速对分离的影响

Tab 3 The effect of flow rate on enantiomeric separation

流速 (flow rate) / mL · min ⁻¹	t _{R1} /min	t _{R2} /min	分离因子 (α)	理论塔板数(N)	分离度 (R)
0.4	12.212	13.710	1.13	12699	3.35
0.5	9.955	11.290	1.13	11687	3.33
0.6	8.116	9.103	1.12	10540	2.93

5.4 柱温对分离的影响 温度对高效液相色谱分离不同手性化合物的影响不尽相同。一般而言,对映体分离的 Van't Hoff 曲线呈线性。低温条件下,对映体与手性固定相形成的络合物较高温时稳定,有利于提高分离因子^[11]。柱温升高,使得溶质与固定相之间的结合能力减弱,保留时间变短,分离度变差。本实验在上述色谱条件下,通过改变柱温箱的温度,考

察了柱温在 20 ~ 35℃ 范围内对分离的影响,结果见表 4。由表 4 可以看出,随着分离温度的升高,容量因子减少,样品保留时间减少,分离因子和分离度大体上也是减少的, Van't Hoff 曲线基本呈线性,这说明萘普生对映体在该手性固定相上的保留机制不随色谱分离温度的变化而改变,手性分离过程受吸附反应热控制。因此 20℃ 为最佳柱温。

表4 柱温对分离的影响

Tab 4 The effect of column temperature on enantiomeric separation

℃	t _{R1} /min	t _{R2} /min	分离因子(α)	分离度(R)
20	9.955	11.290	1.13	3.33
25	9.519	10.516	1.10	2.71
30	9.304	10.147	1.09	2.40

6 结论

本文采用 Chiralpak AD-H 手性色谱柱,在正相条件下成功地拆分了萘普生对映体,分离度达 3.3,方法方便快捷,为萘普生对映体的光学纯度考察提供了有效的手段。

参考文献

- Medvedovici A, Sandra P, Toribio L, et al. Module performance of anion-exchange porous hollow-fiber membranes for high-speed protein recovery. *J Chromatogr A*, 1997, 785(1-2): 159
- Margolin A L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb Technol*, 1993, 15(3): 266
- CAI Liu(蔡凌), JIANG Ji-zhang(江济章). Resolution and racemization of naproxen(萘普生拆分及消旋). *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 1987, 18(2): 51
- ZHOU Qi-yi(周琦奕). Synthesis of (S)-(+) - naproxen((S)-(+) - 萘普生的合成). *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2003 34(3): 113
- XIN Jia-ying(辛嘉英), LI Shu-ben(李树本), XU Yi(徐毅) et al. Synthesis of S(+) Naproxen by lipase asymmetric hydrolysis in an aqueous organic solvent biphasic system(有机溶剂-水双液相体系脂肪酶不对称水解合成 S-(+) - 萘普生). *Chin J Mol Catal(分子催化)*, 1998, 12(6): 412
- NING Feng-rong(宁凤容), HUANG Ke-long(黄可龙), LIU Su-qin(刘素琴) et al. Study on resolution of racemic naproxen with chiral additive as mobile phase by RP-HPLC(手性流动相 HPLC

- 法拆分萘普生对映体的研究). *Chin J Anal Lab(分析实验室)*, 2006 25(6): 1
- CHEN De-miao(陈德妙), FU Qiang(傅强), LI Na(李娜) et al. Enantiomeric separation of naproxen by high performance liquid chromatography using CHIRALCEL OD as stationary phase(CHIRALCEL OD 手性柱直接拆分萘普生对映体). *Chin J Anal Chem(分析化学)* 2007 37(1): 75
- DING Li(丁黎). *Drug Chromatogram Analytical(药物色谱分析)*. Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社) 2008. 193
- YU Zhao-wen(于兆文), LIU Xia(刘霞), JIANG Sheng-xiang(蒋生祥) et al. Chiral separation of glycerin monosulfides and bisulfides with a stationary phase of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) [单硫代和双硫代甘油醚在直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)固定相上的手性拆分]. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2000, 18(1): 39
- LI Fang(李芳), LI Jia-yang(李佳杨), ZHANG Hua-yan(张华燕) et al. Chiral separation of bisoprolol using high performance liquid chromatography with amylose chiral stationary phase(直链淀粉手性固定相高效液相色谱法拆分比索洛尔对映体). *Chin J Chromatogr(色谱)* 2008 26(6): 66
- BAO Zong-bi(鲍宗必), SU Bao-gen(苏宝根), WEI Zuo-jun(魏作君) et al. Enantiomeric separation of the key intermediate of paroxetine by HPLC with chiral stationary phase(手性固定相高效液相色谱法拆分帕罗西汀中间体). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2006 26(10): 1445

(本文于 2010 年 10 月 7 日收到)