

手性固定相正相高效液相色谱法 拆分普萘洛尔对映体

赵静 邹卫 赵华 靳红卫^①

(重庆医科大学药物工程研究中心 重庆市渝中区医学院路 1 号 400016)

摘要 建立了手性固定相正相高效液相色谱拆分普萘洛尔对映体的方法, 考察普萘洛尔对映体在 4 种多糖类手性色谱柱(Chiralpak AD 柱、Chiralcel OD 柱、Cniralcel OJ 柱和 Chiralpak AS 柱) (Daicel, 250mm × 4.6mm, 10 μ m) 上的分离行为, 同时考察了流动相中醇类以及碱性添加剂二乙胺(DEA) 对普萘洛尔对映体分离行为的影响。结果表明, 普萘洛尔对映体在 Chiralpak AD 柱、Chiralcel OD 柱以及 Cniralcel OJ 柱上能够达到基线分离, 出峰顺序均是 *R*-(+)-普萘洛尔先出峰。在 Chiralpak AS 柱上无分离。

关键词 手性固定相; 正相高效液相色谱法; 普萘洛尔对映体

中图分类号: O657.7⁺ 2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)01-0007-05

1 引言

普萘洛尔(Propranolol)是一种 β 肾上腺素受体阻断药, 临床上主要用于治疗高血压、心律失常和心绞痛等疾病, 具有良好疗效。其结构(图 1)中有一个手性中心, 因此有 2 个光学异构体。动物实验表明, *S*-($-$)-普萘洛尔对 β 受体的阻滞程度比 *R*-($+$)-普萘洛尔约大 100 倍^[1]。目前该药仍以外消旋形式入药, 与用单一异构体入药比较, 不但用药剂量增加, 而且也带来恶心、呕吐、视觉障碍、精神抑郁等副作用, 甚至有一些毒性作用, 因此拆分其对映体有着非常重要的意义。有关普萘洛尔对映体拆分的报道有: 毛细管电泳法^[2-4]; 高效液相色谱法^[5-9]; 手性选择体涂覆薄层色谱^[10]等方法。本文以 4 种常用的多糖类衍生物为手性固定相, 考察了不同的流动相组成对普萘洛尔对映体出峰顺序及分离度的影响, 建立了其最佳的分离方法, 可以为单一异构体的检测提供依据。

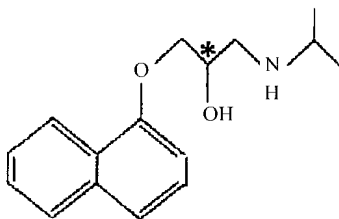


图 1 普萘洛尔的化学结构

* 代表该处碳原子是手性碳。

① 联系人, 手机: (0) 13193036728; E-mail: jhw-eq@163.com

作者简介: 赵静(1985—), 女, 四川省达州市渠县人, 在读研究生, 主要从事药物分析工作。

收稿日期: 2010-04-19; 接受日期: 2010-05-12

2 实验方法

2.1 仪器和试剂

LC-2010 液相色谱仪(日本岛津公司),包括紫外检测器,Classic-VP 色谱工作站。

盐酸普萘洛尔消旋体对照品(山西芮城县虹桥药用中间体有限公司);*R*-右旋普萘洛尔 [*R*-(+)-Propanolol](批号 1A193918, Tocris Bioscience Company); 正己烷、异丙醇、甲醇、乙醇为色谱纯试剂(美国天地公司); 正丙醇为色谱纯(天津市光复精细化工研究所); 二乙胺为分析纯。

2.2 色谱条件

色谱柱: Chiralpak AD 柱(250mm×4.6 mm, 10 μ m, Daicel)、Chiralcel OD 柱(250mm×4.6mm, 10 μ m, Daicel)、Chiralcel OJ 柱(250mm×4.6mm, 10 μ m, Daicel)、Chiralpak AS 柱(250mm×4.6mm, 10 μ m, Daicel), 均为日本大赛璐公司生产, 氰基保护柱(4mm×4mm, 10 μ m, 江苏汉邦科技有限公司), 流动相为: 正己烷-醇(包括乙醇、异丙醇、甲醇、正丙醇)-二乙胺(DEA)。流速为 1.0mL/min, 检测波长为 285nm, 柱温: 30℃。

3 结果与讨论

3.1 手性固定相的选择

为了得到普萘洛尔对映体最好的分离条件, 实验同时考察了 4 种常用的多糖类手性色谱柱对普萘洛尔对映体分离行为的影响。结果发现, 普萘洛尔对映体在 Chiralpak AD 柱、Chiralcel OD 柱上能够得到很好的分离, 在 Chiralcel OJ 柱上可以达到基线分离, 普萘洛尔异构体在上述 3 种色谱柱上的出峰顺序均是 *R*-(+)-普萘洛尔先出峰。在本实验条件下, 普萘洛尔异构体在 Chiralpak AS 柱上无分离(色谱图见图 2)。

Chiralpak AD 柱和 Chiralcel OD 柱分别是由纤维素和直链淀粉三取代的 3,5-二甲苯基氨基甲酸酯衍生物涂覆在硅胶上制成的。实验发现 Chiralpak AD 柱、Chiralcel OD 柱对普萘洛尔对映体有较好的立体选择性。普萘洛尔分子中含有羟基、羰基、氨基以及萘环可以与 Chiralpak AD 柱或者 Chiralcel OD 柱固定相上的氨基、羰基以及苯环通过氢键^[11]、偶极-偶极、 π - π 相互作用形成非对映体络合物, 由于对映体构型不同, 形成络合物的稳定性不同, 从而达到分离。Chiralpak AD 柱上 2 个异构体的分离度(*R_s*) 最大为 8.97, Chiralcel OD 柱为 9.24。

相对于 Chiralpak AD、Chiralcel OD 柱, Chiralcel OJ 柱对普萘洛尔对映体分离效果较差, 分离度最大为 1.76。原因可能是结构中没有氨基, 能与异构体发生作用的位点变少, 因此手性识别能力降低。普萘洛尔对映体在 Chiralpak AS 柱上无分离。

3.2 流动相组成对分离的影响

3.2.1 醇类调节剂对洗脱顺序的影响

正相色谱的基本流动相是正己烷-醇体系, 本实验主要考察了异丙醇、乙醇、甲醇以及正丙醇作为醇类调节剂对普萘洛尔对映体分离的影响。Wainer I W^[12]、Tao W^[13] 等人曾报道改变流动相中醇类调节剂的极性导致异构体洗脱顺序发生改变, 本实验分别以正己烷-异丙醇、正己烷-乙醇、正己烷-甲醇和正己烷-正丙醇作流动相, 发现普萘洛尔的 2 个异构体在 Chiralpak AD、Chiralcel OD、Chiralcel OJ 柱上的洗脱顺序并没发生改变, 总是 *R*-(+)-普萘洛尔先被洗脱出来。这与文献[7, 8]中报道的出峰顺序一致。结果表明 *S*-(−)-普萘洛尔的空间结构更利于三点作用模式, 形成短暂的较稳定的非对映体络合物, 保留较强。

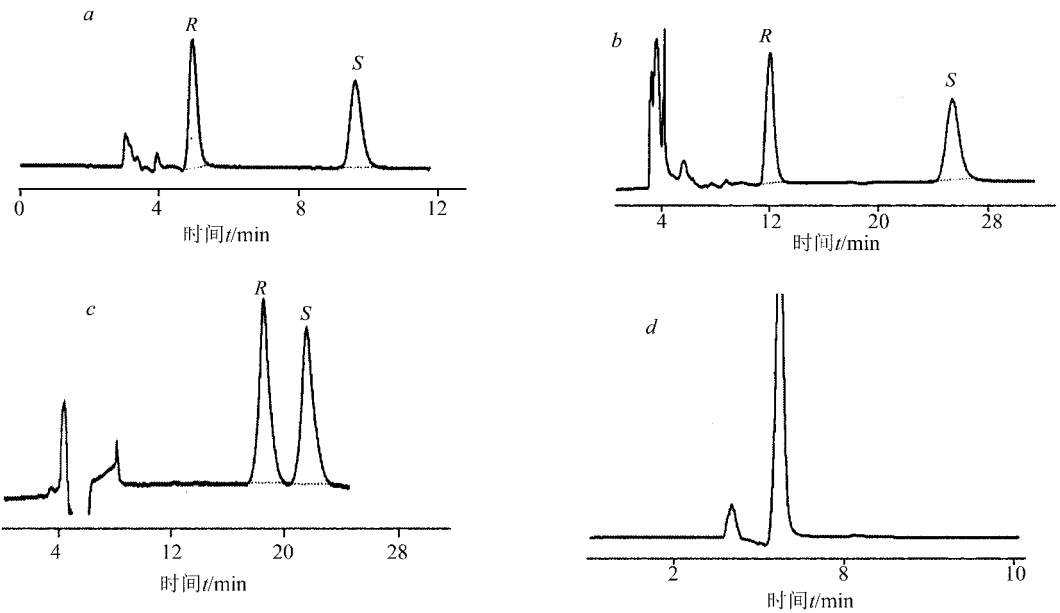


图 2 普萘洛尔对映体分离的色谱图

a——Chiralpak AD 柱, 流动相: 正己烷-异丙醇-甲醇-二乙胺(80 : 10 : 10 : 0.02, V/V/V/V);
b——Chiralcel OD 柱, 流动相: 正己烷-异丙醇-二乙胺(90 : 10 : 0.05, V/V/V/V);
c——Chiralcel OJ 柱, 流动相: 正己烷-甲醇-二乙胺(97 : 3 : 0.05, V/V/V/V);
d——Chiralpak AS 柱, 流动相: 正己烷-乙醇-甲醇-二乙胺(90 : 5 : 5 : 0.1, V/V/V/V/V);
流速为 1.0mL/min, 检测波长为 285nm, 柱温: 30℃。

3. 2. 2 醇类调节剂对分离度的影响

3. 2. 2. 1 Chiralpak AD 柱上醇类调节剂对分离度影响

Chiralpak AD 柱上乙醇比异丙醇更有利于普萘洛尔对映体的分离, 4 种醇洗脱能力比较, 随着甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇极性的降低, 对 R-(+) -普萘洛尔的洗脱能力依次降低, 但甲醇对 S-(-) -普萘洛尔的洗脱能力最差, 因此分离度最好, 异丙醇分离度最差(保留行为和分离情况见表 1)。在正己烷-异丙醇-二乙胺体系中, 固定正己烷和二乙胺的浓度, 用适当甲醇取代部分异丙醇, 可使 R-(+) -普萘洛尔的保留时间缩短同时使 S-(-) -普萘洛尔的保留时间延长, 因此提高对映体的分离度。采用正己烷-异丙醇-甲醇-二乙胺(80 : 10 : 10 : 0.02, V/V/V/V) 为流动相, 对映体的分离度可达 8.97(见图 2a)。

表 1 Chiralpak AD 柱上 4 种醇对普萘洛尔对映体分离的影响
(正己烷-醇-二乙胺= 95 5 0.02, V/V/V)

	甲醇	乙醇	异丙醇	正丙醇
k1	1.52	1.97	2.14	2.37
k2	6.52	4.51	2.58	5.45
Rs	7.38	5.32	0.98	5.99

k1——R-(+) -普萘洛尔的容量因子; k2——S-(-) -普萘洛尔的容量因子; Rs——两个异构体的分离度。

3. 2. 2. 2 Chiralcel OD 柱上醇类调节剂对分离度影响

实验条件下, Chiralcel OD 柱上, 普萘洛尔对映体用乙醇或者异丙醇做流动相都能得到很好的分离, 但异丙醇对其分离效果更好(见表 2), 与文献[14]报道一致。洗脱能力比较: 乙醇的洗脱能力显著大于异丙醇。固定正己烷和二乙胺的浓度, 用甲醇替换部分乙醇或异丙醇, 与 Chiralpak AD 柱

上情况刚好相反, 甲醇的加入反而使分离度下降。

表 2 Chiralcel OD 柱上乙醇、异丙醇对普萘洛尔对映体分离的影响

比例	流动相组成(V/V/V) 正己烷-乙醇-二乙胺				正己烷-异丙醇-二乙胺			
	70 : 30 : 0.1	80 : 20 : 0.1	90 : 10 : 0.1	95 : 5 : 0.1	70 : 30 : 0.1	80 : 20 : 0.1	90 : 10 : 0.1	95 : 5 : 0.1
k_1	0.67	0.75	1.71	3.94	1.08	1.42	2.75	5.82
k_2	0.95	1.08	2.61	6.32	2.01	3.02	6.92	16.65
R_s	2.27	2.69	4.17	7.62	5.09	6.36	9.24	15.09

3. 2. 2. 3 Chiralcel OJ 柱上醇类调节剂对分离度影响

Chiralcel OJ 柱上甲醇对普萘洛尔对映体的分离效果最好, 其次为乙醇、异丙醇, 正丙醇对普萘洛尔对映体无分离。3 种醇洗脱能力比较: 对 $R-(+)$ -普萘洛尔的洗脱能力甲醇最强, 其次为乙醇、异丙醇; 而异丙醇对 $S-(-)$ -普萘洛尔的洗脱能力最强, 因此分离度最差。分离情况见表 3。

表 3 Chiralpak OJ 柱上 4 种醇对普萘洛尔对映体分离的影响
(正己烷-醇-二乙胺= 97 : 3 : 0.1, V/V/V)

	甲醇	乙醇	异丙醇	正丙醇
k_1	2.55	3.29	2.94	2.29
k_2	3.07	3.91	3.36	2.29
R_s	1.69	1.50	1.07	0.00

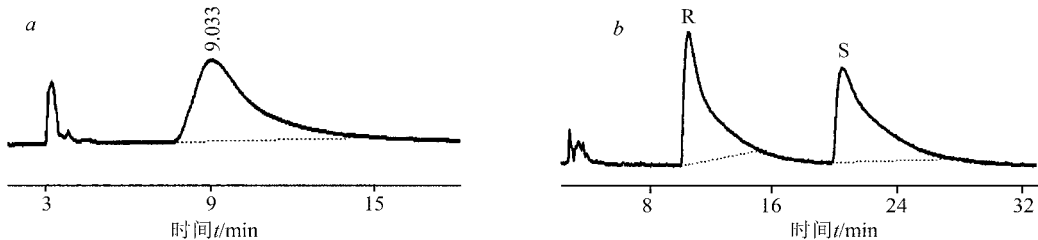


图 3 添加二乙胺时普萘洛尔对映体分离的色谱图

a——Chiralpak AD 柱, 流动相: 正己烷-乙醇(80 : 20, V/V);
b——Chiralcel OD 柱, 流动相: 正己烷-乙醇(80 : 20, V/V);
流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 285nm, 柱温: 30℃。

3. 2. 3 流动相中二乙胺(DEA) 对普萘洛尔 对映体分离的影响

普萘洛尔因含有胺基而显碱性, 流动相中未添加二乙胺时, 普萘洛尔对映体峰型拖尾, 在 Chiralpak AD 柱上不能分离(见图 3a、3b)。当添加 0.01% 二乙胺时对峰型及分离度都有明显改善, 随着二乙胺浓度的增加, 容量因子减小, 分离度增加, 超过一定浓度后, 分离度基本保持不变(不同固定相上二乙胺浓度对普萘洛尔对映体分离度的影响见图 4)。综合考虑分离度、峰型以及柱子安全性等因素, 流动相中添加二乙胺的最优浓度分别为: Chiralpak AD 柱上 0.02%, Chiralcel OD 柱上 0.05%, Chiralcel OJ 柱上 0.05%。

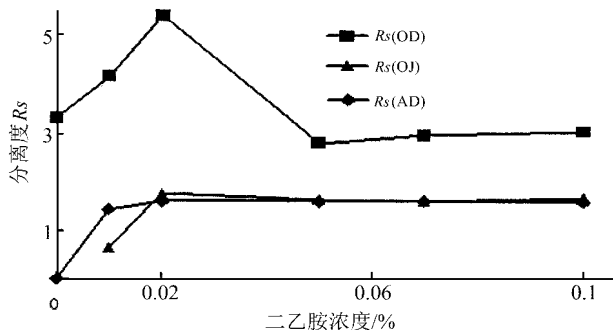


图 4 3 种固定相上二乙胺浓度对普萘洛尔对映体分离度的影响

4 结论

实验条件下, 普萘洛尔对映体在 Chiralpak AD 柱、Chiralcel OD 柱以及 Chiralcel OJ 柱上的最佳分离条件分别是: Chiralpak AD 柱, 流动相: 正己烷-异丙醇-甲醇-二乙胺(80:10:10:0.02, V/V/V/V); Chiralcel OD 柱, 流动相: 正己烷-异丙醇-二乙胺(90:10:0.05, V/V/V/V); Chiralcel OJ 柱, 流动相: 正己烷-甲醇-二乙胺(97:3:0.05, V/V/V/V)。在拆分普萘洛尔对映体时, 醇类添加剂的改变不会影响出峰顺序, 适当二乙胺的添加是必要的。

参考文献

- [1] 功静, 陈志春, 吴起等. 普萘洛尔乙烯酯前药的高效液相色谱对映体的分离[J]. 分析化学, 2006, **34**(S1): 78—82.
- [2] Matchett M W, Branch S K, Jeffries T M. Application of Modified Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis for Enantiomeric Resolution of Propranolol and Analogues[J]. *Chromatography A*, 1995, **705**(2): 351—361.
- [3] Quang C Y, Khaledi M G. Extending the Scope of Chiral Separation of Basic Compounds by Cyclodextrin-Mediated Capillary Zone Electrophoresis[J]. *Chromatography A*, 1995, **692**(1—2): 253—265.
- [4] 王伟, 陈宇云, 杨维平等. 毛细管电泳手性分离-激光诱导荧光检测普萘洛尔对映体[J]. 分析化学, 2005, **33**(8): 1113—1115.
- [5] 李乃, 阎秀芳, 肖如亭. HPLC 手性离子对试剂法拆分普萘洛尔对映体[J]. 应用化工, 2003, **32**(2): 48—50.
- [6] Valentova J, Cizmarikova R, Bui T T T *et al.* Enantiomeric Resolution of Novel Aryloxyaminopropanol Derivatives with β -Adrenoreceptor Antagonist Activity on a Derivatized Amylose Chiral Stationary Phase[J]. *Chromatographia*, 2003, **58**(11—12): 733—740.
- [7] About-Enin H Y, About-Basha L I, Bakr S A. Direct Enantioselective Separation of Some Propranolol Analogs by HPLC on Normal and Reversed Cellulose Chiral Stationary Phases[J]. *Chirality*, 1996, **8**(1): 153—156.
- [8] Haginaka J, Wakai J, Takahashi K *et al.* Chiral Separation of Propranolol and Its Ester Derivatives on an Ovomucoid-Bonded Silica: Influence of pH, Ionic Strength and Organic Modifier on Retention, Enantioselectivity and Enantiomeric Elution Order[J]. *Chromatographia*, 1990, **29**(11/12): 587—592.
- [9] Matchett M W, Branch S K, Jeffries T M. Polar Organic Chiral Separation of Propranolol and Analogues Using a β -Cyclodextrin Bonded Stationary Phase[J]. *Chirality*, 1996, **8**(1): 126—130.
- [10] 于金刚, 黄克可, 刘素琴等人. 手性选择体涂覆薄层色谱拆分普萘洛尔对映体[J]. 分析实验室, 2006, **25**(2): 59—62.
- [11] Oguni K, Oda H, Ichida A. Development of Chiral Stationary Phases Consisting of Polysaccharide Derivatives[J]. *Chromatography A*, 1995, **694**(1): 91—100.
- [12] Gaffney M H, Stiffin Rose M, Wainer I W. The Effect of Alcoholic Mobile Phase Modifiers on Retention and Stereoselectivity on a Commercially Available Cellulose-Based HPLC Chiral Stationary Phase: an Unexpected Reversal in Enantiometric Elution Order[J]. *Chromatographia*, 1989, **27**(1/2): 15—18.
- [13] Tao W, Yandan W C. Application and Comparison of Derivatized Cellulose and Amylose Chiral Stationary Phase for the Separation of Enantiomers of Pharmaceutical Compounds by HPLC[J]. *Chromatography A*, 1999, **855**(2): 443—458.
- [14] 余露山, 姚彤炜, 王向军等. 手性固定相法和手性衍生化法拆分 β -受体阻断剂类药物及其结构类似物[J]. 浙江大学学报, 2002, **31**(6): 415—418.

Resolution of Propranolol Enantiomers by Chiral Solid-Station Phase and NP-HPLC

ZHAO Jing ZOU Wei ZHAO Hua JIN Hong-Wei

(Pharmaceutical Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

Abstract The resolution of propranolol enantiomers was established by normal-phase HPLC using chiral solid-station phase. The influences of four polysaccharide chiral columns (Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralcel OJ, Chiralpak AS) (Daicel, 250mm $\times$ 4.6mm, 10 μ m), alcohol modifier as well as alkaline modifier diethylamine on propranolol were studied. It was found that propranolol enantiomers were achieved baseline separation on Chiralpak AD, Chiralcel OD and Chiralcel OJ columns, and *R*-(+)-propranolol was always first eluted, but there was no separation on Chiralpak AS column.

Key words Chiral Solid-Station Phase; Normal-Phase HPLC; Propranolol Enantiomers