

HPLC—直链淀粉手性固定相拆分卡维地洛对映体

卢定强^{1,2}, 陈佳¹, 贾静¹, 凌岫泉¹, 赵鹏¹, 常亚军¹, 王加力¹

(1 南京工业大学 药学院, 江苏 南京 210009; 2 江苏省药物研究所, 江苏 南京 210009)

摘要:建立了卡维地洛对映体的高效液相色谱分析方法。使用 Chiralpak AD-H 手性色谱柱, 考察了流动相中极性调节剂的种类和体积分数、流动相中二乙胺的体积分数、柱温以及流速对卡维地洛对映体拆分的影响。确定了最佳拆分条件: 流动相为正己烷—异丙醇—二乙胺 (体积比 70: 30: 0.05); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 243 nm; 柱温 30 ℃。卡维地洛与固定相相互作用的焓变差值 $\Delta(\Delta H^\circ)$ 和熵变差值 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 分别为 -505.6 J/mol 和 $-1.055 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$ 。研究手性合成了 (*S*)-卡维地洛, 对映体过量值 (*e.e.*) 达 99.0% 以上。在优化实验条件下, 通过考察峰面积的显著差异, 得到卡维地洛对映体的出峰顺序为: 先 *S* 体, 后 *R* 体。所建立的方法简单快捷、重复性好, 可用于卡维地洛的质量研究和控制。

关键词: 高效液相色谱; 卡维地洛; 对映体拆分; Chiralpak AD-H

中图分类号: O657.72 TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)09-0923-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.09.010

Enantiomeric Separation of Carvedilol on Amylose Chiral Stationary Phase by High Performance Liquid Chromatography

LU Ding-qiang^{1,2}, CHEN Jia¹, JIA Jing¹, LING Xiu-quan¹,
ZHAO Peng¹, CHANG Ya-jun¹, WANG Jia-li¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China)

Abstract A method of HPLC with Chiralpak AD-H Chiral column for enantiomeric separation of carvedilol was developed. The influences of concentration of organic solvent, proportion of diethylamine, column temperature and flow rate on the enantiomeric separation were investigated. The optimal chromatographic conditions were as follows: mobile phase: hexane— isopropanol— diethylamine (70: 30: 0.05 by volume); flow rate 1.0 mL/min; detection wavelength 243 nm; column temperature 30 ℃. The differences of enthalpy change and entropy change for the interaction of carvedilol and stationary phase were calculated to be -505.6 J/mol and $-1.055 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$, respectively. The enantiomeric excess (*e.e.*) of the synthesized (*S*)-carvedilol was beyond 99.0%. Under the optimal conditions, according to the significant difference of peak area, the elution order of two enantiomers was obtained to be *S*-carvedilol followed by *R*-carvedilol. The developed HPLC method was simple, rapid and reproducible, and could be used for the quality study and control of carvedilol.

Key words HPLC; carvedilol; enantiomeric separation; Chiralpak AD-H

手性药物与生命体中的药物靶点发生作用时具有显著的立体选择性, 其对映体通常表现出不同甚至相反的药理或毒理作用, 它们在体内的吸收、分布和代谢等存在显著差异^[1]。因此, 建立快速、准确、灵敏、简便的药物对映体分离分析方法具有十分重要的意义^[2-4]。卡维地洛 (Carvedilol) 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$, 相对分子质量 406.47, 化学名为 1-(9H-吡啶-4-氧基)-3-[2-(2-甲氧基苯氧基)乙基氨基]-2-丙醇。由德国 Boehringer Mannheim 公司开发, 1991 年以商品名 Kredex 在美国上市^[5], 为 β -受体和 α_1 -受体的竞争性拮抗剂, 且在高浓度时可作为钙通道阻滞剂^[6]。卡维地洛作为新一代治疗充血性心力衰竭的药物, 目前临床上多用其外消旋体治疗高血压、心脏衰竭、心肌梗死^[7], 且具有抗氧化自由基

收稿日期: 2010-01-21; 修回日期: 2010-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20876076); 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2009CB724700)

第一作者: 卢定强 (1968-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士, Tel: 025-83285202, E-mail: ludingqiang@njut.edu.cn

作用。由于人类基因的多态性,使得卡维地洛对映体在药代动力学方面存在显著差异^[8-11]。文献[12]表明,当人体服用消旋体卡维地洛后,*S*体的 β -阻断效应比*R*体的强 200 倍,但当与胺碘酮同时服用后,*S*体卡维地洛的代谢会被强烈抑制^[13]。而市场上暂时还没有其相关的手性对映体的产品上市,因此建立一种高效、准确的卡维地洛对映体的拆分方法显得尤为必要。

目前卡维地洛对映体的拆分方法主要有毛细管电泳法与 HPLC 法^[13],常用的手性固定相有 β -环糊精、衍生化环糊精、多糖类(纤维素、淀粉)等^[13-14]。其中衍生化环糊精较昂贵, β -环糊精毛细管电泳精密度不高,分离效果不如 HPLC。多糖类衍生物是目前应用比较广泛的手性固定相之一,具有分离能力强、稳定性好等特点。本文建立了在 Chiralpak AD-H 直链淀粉手性固定相上分离卡维地洛(结构式见图 1)对映体的 HPLC 方法,考察了流动相中有机改性剂的种类和体积分数、酸碱体积分、流速及柱温等因素对对映体分离的影响,并对两对映体的出峰顺序进行了讨论。本方法可用于外消旋卡维地洛拆分过程的控制和手性卡维地洛药物的质量检查。

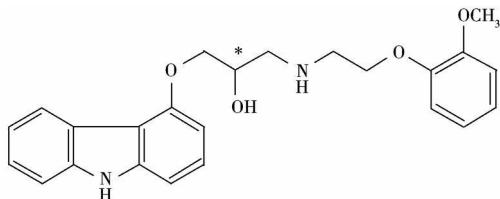


图 1 卡维地洛的化学结构式
Fig. 1 Chemical structure of carvedilol

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),含 SPD-M 20A 型紫外可见光检测器、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱及 LC Solution 色谱工作站。

卡维地洛(外消旋体,中国药品生物制品检定所);正己烷、异丙醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);乙醇(色谱纯)、二乙胺(分析纯)均购自上海凌峰化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

1.2 溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取 1.0 mg 消旋体卡维地洛标准品于 10 mL 棕色容量瓶中,加异丙醇定容至刻度,制成 0.1 g/L 的卡维地洛对照品溶液,密封,铝箔包裹容量瓶,4℃保存,备用。

供试品溶液的制备:精密称取手性合成得到的*S*-卡维地洛 0.5 mg 加入少量异丙醇使其完全溶解,置 10 mL 棕色容量瓶中,用异丙醇定容,铝箔包裹容量瓶,4℃保存,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后使用。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Chiralpak AD-H (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m);流动相为正己烷-异丙醇-二乙胺(体积比 70:30:0.05);流速 1.0 mL/min;进样量 20 μ L;检测波长 243 nm;柱温 30℃。

2 结果与讨论

2.1 有机改性剂的种类与体积分数对分离的影响

Chiralpak AD-H 手性柱是在 5 μ m 硅胶表面涂布直链淀粉——三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯),样品经过该固定相时,会与其产生氢键、 π - π 相互作用和空间位置的作用。

本文选用正己烷为流动相主体,结果显示以乙醇和异丙醇为极性调节剂时,卡维地洛对映体均能很好分离。以乙醇作为有机改性剂时的分离度(*R*)和分离因子(α)高于异丙醇,但保留时间几乎为异丙醇的 2 倍,据文献[15]报道,异丙醇比乙醇有更强的选择性,故选择异丙醇为极性调节剂。

在 30℃,流速 1.0 mL/min 的条件下,考察了异丙醇的体积分数(φ)小于 15%、大于 35%,以及为 15%、25%、30%、35% 时,两对映体的分离效率。结果表明,流动相中异丙醇的 $\varphi < 15\%$ 或 $\varphi \geq 35\%$ 时,两对映体不能分开, $\varphi = 15\%$ 时虽然能基线分离,但保留时间太长。随着极性成分的增加,分离度、分离因子下降,保留时间和容量因子(*k*)明显减少(结果见表 1)。这是由于极性成分的加入起到了竞争作用,从而降低了手性柱的识别能力,故各异构体的保留减弱,分离度随之下降。 $\varphi = 30\%$ 时,

保留时间和容量因子均较为理想, 故选择流动相为正己烷 – 异丙醇 (70 : 30)。

表 1 流动相中异丙醇体积分数对分离的影响
Table 1 Effect of volume fraction of isopropanol in the mobile phase on separation efficiency

V (Hexane) : V (Isopropanol)	Retention time		Capacity factor		Separation factor(α)	Resolution (R)
	t_1 /min	t_2 /min	k_1	k_2		
85 : 15	51. 187	91. 810	12. 997	24. 105	1. 855	4. 207
75 : 25	20. 665	35. 123	6. 213	11. 262	1. 813	3. 192
70 : 30	15. 332	24. 465	4. 260	7. 393	1. 735	2. 630
65 : 35	14. 257	21. 448	3. 821	6. 253	1. 637	0. 927

2.2 酸碱体积分数对分离的影响

卡维地洛为碱性化合物, 在流动相中加入少量有机碱二乙胺后呈弱碱性, 降低了卡维地洛的离子化程度, 使其更易与直链淀粉衍生物固定相发生相互作用, 增加其手性识别能力, 有利于手性分离, 增加柱效。在 φ (异丙醇) = 30%, 柱温 30 ℃, 流速 1. 0 mL/min 的条件下调节二乙胺的加入量以改善分离效果 (见表 2)。实验发现, 当流动相中不添加二乙胺时, 分离度、理论塔板数均不高, 当加入 0. 05% 二乙胺后, 柱效明显增加, 继续增加二乙胺的体积分数, 柱效变化不大, 且分离度和拖尾因子降低。从分离效果和手性柱使用寿命角度考虑, 选择添加 0. 05% 二乙胺作为流动相的碱性调节剂。

表 2 流动相中二乙胺体积分数对分离的影响
Table 2 Effect of volume fraction of diethylamine in the mobile phase on separation efficiency

Diethylamine φ %	Tailing factor		Theoretical plate		Separation factor(α)	Resolution (R)
	T_1	T_2	N_1	N_2		
0	2. 880	2. 859	598. 6	830. 4	1. 735	2. 630
0. 05	2. 262	2. 117	1 780	1 724	1. 848	4. 476
0. 1	2. 178	2. 063	1 795	1 752	1. 837	4. 476
0. 2	2. 078	1. 963	1 768	1 739	1. 844	4. 419
0. 3	2. 024	1. 944	1 755	1 731	1. 846	4. 407

2.3 流速对分离的影响

考察了不同流速对分离度、选择性因子和理论塔板数的影响 (见表 3)。结果表明, 当流速由 0. 4 mL/min 上升至 1. 1 mL/min 时, 卡维地洛对映体的分离度变化不大, 理论塔板数下降, 保留时间随之减少。这是因为对映体在 Chiralpak AD-H 直链淀粉衍生物上的手性识别作用能量差极小, 对映体间的分离完全基于溶质与固定相间的多次相互作用。在 1. 0 mL/min 的流速下, 选择性因子最大, 综合考虑保留时间及分离效果, 选择 1. 0 mL/min 为最佳流速。

表 3 流速对分离度的影响
Table 3 Effect of flow rates on separation efficiency

Flow rate v / (mL • min ⁻¹)	Retention time		Theoretical plate		Separation factor(α)	Resolution (R)
	t_1 /min	t_2 /min	N_1	N_2		
0. 4	33. 532	54. 398	1 985	2 094	1. 796	4. 566
0. 6	22. 532	37. 065	1 910	1 925	1. 826	4. 539
0. 8	17. 023	28. 165	1 876	1 845	1. 828	4. 514
0. 9	15. 173	25. 015	1 822	1 833	1. 823	4. 450
1. 0	14. 132	23. 665	1 780	1 724	1. 848	4. 476
1. 1	12. 565	20. 865	1 727	1 647	1. 838	4. 319

2.4 温度对分离的影响

考察了不同色谱柱温度 (20~ 40 ℃) 对分离度、选择性因子和理论塔板数的影响。在每一温度下, 色谱柱至少平衡 30 min 以上, 结果见表 4。从表 4 可以看出, 随着柱温的升高, 两对映异构体的保留时间均逐渐减少, 这是因为温度升高, 流动相粘度减小, 使得组分在流动相中的扩散速率增大; 分离因子和分离度均随着温度的升高而减小。若在一定温度范围内, $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系: $\ln \alpha = - \Delta(\Delta H^0)/(RT) + \Delta(\Delta S^0)/R$, 式中, R 为气体常数; T 为绝对温度; $\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 为对映体与

固定相之间相互作用的焓变差和熵变差。其中 $\Delta(\Delta H^0)$ 若为负值，则表示溶质在固定相上的吸附作用是放热过程。以分离因子的对数 $\ln\alpha$ 为纵坐标、 $1/T$ 为横坐标作图得一条直线，其斜率为 $-\Delta(\Delta H^0)/R$ ，截距为 $\Delta(\Delta S^0)/R$ ，由此可以算出对映体的焓变差 $\Delta(\Delta H^0)$ 和熵变差 $\Delta(\Delta S^0)$ 。根据表 4 结果， $\ln\alpha(y)$ 与 $1/T(x)$ 呈良好的线性关系， $y = 493.4x - 1.014 (r = 0.9992)$ 。计算拆分过程的热力学函数 $\Delta(\Delta H^0) = -505.6 \text{ J/mol}$ ， $\Delta(\Delta S^0) = -1.055 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$ ，均为负值，说明溶质在固定相上的吸附为放热反应。

表 4 色谱柱温度对分离的影响
Table 4 Effect of column temperature on separation

Temperature $\theta/^{\circ}\text{C}$	Retention time		Theoretical plate		Separation factor(α)	Resolution(R)
	t_1/min	t_2/min	N_1	N_2		
20	14.365	25.198	1757	1745	1.953	4.865
25	14.257	24.515	1752	1663	1.901	4.628
30	14.132	23.665	1780	1724	1.848	4.476
35	13.065	21.137	1816	1791	1.795	4.103
40	12.565	19.867	1811	1755	1.757	3.803

卡维地洛对映体在 Chiralpak AD-H 手性柱上的分离与焓有关，温度降低时有利于两对映体的分离，温度升高时保留时间变短但不利于色谱柱的使用寿命。综合以上因素，本文采用柱温 30℃。

2.5 卡维地洛对映体的洗脱顺序

由于没有 (S)-卡维地洛或 (R)-卡维地洛的标准品，本实验室以 (S)-4-(2,3-环氧丙氧基)吡唑和邻甲氧基苯氧基乙胺为原料不对称合成法合成 S-(-)-卡维地洛对映体，mp. 110~112℃ (文献值：mp. 110~111.5℃^[16])，通过 HPLC 检测两个对映体峰面积的差异，确定两对映体在 Chiralpak AD-H 手性柱上的洗脱顺序。实验结果显示，在“1.3”色谱条件下，(S)-卡维地洛在直链淀粉——三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)涂敷型手性柱 (Chiralpak AD-H) 上先被洗脱 (见图 2)，二者的分离度达到 4.0 以上。温度在 20~40℃ 间变化时，对两对映体的洗脱顺序无影响。

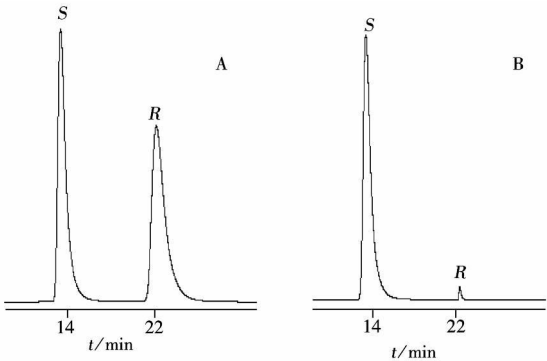


图 2 卡维地洛对映体的高效液相色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of carvedilol enantiomer
A: standard sample B: real sample

2.6 方法的评价与应用

在“1.3”色谱条件下连续进样 6 次，考察合成产物的重复性。结果发现，对映体保留时间的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.6% 和 0.8%，峰面积的相对标准偏差均为 1.5%，由此可见，本方法精密度良好。

在“1.3”色谱条件下，测量了手性合成产物的对映体过量百分率 *e.e.* 值，结果显示其值在 99.0% 以上，说明产物的手性纯度较好。

参考文献:

[1] 姜艳红, 张淑珍, 谢剑炜, 刘河, 仲伯华. 手性固定相高效液相色谱法拆分系列抗胆碱能药物对映体的研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1685-1688
[2] 叶金星, 章飞芳, 张青, 陈吉平, 梁鑫淼. β -受体阻滞剂类药物的 RP-HPLC 手性拆分 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 80-82
[3] 杨丽萍, 王立新, 徐艳丽, 钱宝英, 高如瑜. 纤维素类手性固定相高效液相色谱法拆分三唑类手性化合物 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 25-28
[4] CHANKVETADZE B, BLASCHKE G. Enantioseparation in capillary electrophoresis: recent developments and future trends [J]. J Chromatogr A, 2001, 906(1/2): 309-363
[5] 王豫辉, 于书海, 杨苑键, 田世雄, 戴华成. 卡维地洛的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28(11): 491-493
[6] NICHOLS A J, GELLAIM, RUFFOLO R R J. Studies on the mechanism of arterial vasodilation produced by the novel antihypertensive agent carvedilol [J]. Fundam Clin Pharmacol, 1991, 5(1): 25-38

- [7] LYSKO P G, FEUERSTEN G Z, RUFFOLO R R J. Carvedilol: a novel multiple action antihypertensive drug[J]. *Pharm News*, 1995, 2: 2-16.
- [8] NEUGEBAUER G, AKPAN W, KAUFMANN B, REIFF K. Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1990, 38(2): S108-S111.
- [9] FUJIMAKI M, MURAKOSHI Y, HAKUSU I H. Assay and disposition of carvedilol enantiomers in humans and monkeys: evidence of stereoselective presystemic metabolism[J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79(7): 568-572.
- [10] MEYER C D, BREITHAUER K, SCHLOOS J, NEUGEBAUER G, PAIM D, BELZ G G. Dose effect and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the β_1 -adrenergic receptor blocking properties of various doses of carvedilol in healthy humans[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1994, 55(3): 329-337.
- [11] ZHOU H, WOOD A J J. Stereoselective disposition of carvedilol is determined by CYP2D6[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1995, 57(5): 518-524.
- [12] NICHOLS A J, SULPIZIO A G, ASHTON D J, ASHTON D J, HIEBLE J P, RUFFOLO R R. The interaction of the enantiomers of carvedilol with α_1 - and β_1 -adrenoceptors[J]. *Chirality*, 1989, 1(4): 265-270.
- [13] 陈仲益, 姚彤伟, 曾苏. 卡维地洛对映体的毛细管电泳分离[J]. *分析化学*, 2008, 36(6): 865.
- [14] 纪媛媛, 袁牧, 白宝清. Chiralcel OD-RH 手性柱拆分卡维地洛对映体[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(4): 585-586.
- [15] WANG T, CHEN Y W. Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 855(5): 411-421.
- [16] RATAKIZ, BARKOCZY J, SMIGG, GREGOR T, VERECZKEY G D, NAGY K, CSELENYAK J. Intermediates for preparing the R or S enantiomer of 1-[9'-H-carbazol-4'-yloxy]-3-[2''-(2''-methoxy-phenoxy)-ethylamino]-propan-2-ol [carvedilol]: Hungary, EP 1142874[P]. 1998-11-24.

2011年《色谱》(月刊)征订启事

邮发代号 8-43

《色谱》是中国化学会主办、中国科学院大连化学物理研究所和国家色谱研究分析中心承办、科学出版社出版、国内外公开发行的专业性学术期刊,于1984年创刊。《色谱》主要报道色谱学科的基础性研究成果,色谱及其交叉学科的重要应用科研成果及最新研究进展,包括新方法、新技术、新仪器在轻工食品、环境安全、生命科学、天然产物、生物医学、检验检疫、组学研究、石油工业等各个领域的应用,以及色谱仪器与部件的研制和开发。旨在及时跟踪学科发展前沿,促进国内外学术交流。适于科研院所等从事色谱基础和应用技术研究的科研人员、色谱及其相关学科的硕士及博士研究生、分析测试领域的基层科研人员、色谱仪器开发及经营单位的有关人员阅读。

本刊常设栏目有特别策划、聚焦、专论与综述、研究论文、研究快报、技术与应用等。其中,“聚焦”栏目将由一些知名学者述评或编译他们所关注的国外优秀期刊中刊登的热点文章或主题。

本刊目前已被美国《医学索引》(Medline)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、波兰《哥白尼索引》(IC)、《日本科学技术文献数据库》(JF-CST)和英国皇家化学学会系列数据库中的《分析化学文摘》(AA)、《工业化学灾害》(CH I)、《质谱学报(增补)》(MSB-S)等收录,是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科技精品期刊、中国科协精品科技期刊示范项目中的化学类精品科技期刊。在中国科学技术信息研究所2009年年底公布的《中国科技期刊引证报告(核心版)》中的影响因子为1.093,名列国内化学类期刊前茅。

本刊为大16开本,每月28日出版。单价15元,全年180元。订户可通过邮局或直接与《色谱》编辑部联系订购。详情请浏览《色谱》编辑部网站: www.chrom-China.com。

编辑部联系方式: 电话: (0411) 84379021; 传真: (0411) 84379600; E-mail: sepu@dicp.ac.cn; 网址: www.chrom-China.com; 联系人: 魏桂林。