

高效液相色谱法拆分生物碱类手性药物对映体^{*}

何建峰¹, 朱全红², 刘 岚¹, 邓芹英¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 第一军医大学中医系, 广东 广州 510515)

摘 要: 用3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -环糊精(β -CD)/硅胶手性固定相, 结合正己烷-异丙醇, 甲醇- $\varphi=1\%$ 乙酸三乙胺(TEAA, pH 4.1), 乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA 3种流动相系统和紫外检测器, 高效液相色谱拆分了11对生物碱类手性药物对映体, 取得了良好的分离效果, 相对保留值 ≥ 1.29 , 分离度 ≥ 1.41 。对手性拆分机理、色谱条件的优化和影响拆分效果的因素进行了较深入的研究和讨论。

关键词: 手性固定相; 高效液相色谱; 生物碱; 手性药物

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579(2002)01-0035-04

手性药物的对映异构体常表现出不同的药效学和药动学特征。目前临床使用的药物中, 手性药物已超过50%, 然而有近85%~90%的手性药物仍以外消旋体生产出售和使用^[1], 因此研究高分离效能、高灵敏度的手性药物拆分和测定方法对提高药效和控制医药质量具有重要的现实意义。高效液相色谱法(HPLC)是拆分对映体的有效手段, 将手性选择器以共价键形式结合到基质上, 制成手性固定相, 直接用于对映体的拆分, 具有操作简单, 对映体不用衍生化、定量分析准确、手性色谱柱可长期使用等优点, 因而近年来得到迅速发展。

本研究根据手性分离的原理, 用3, 5-二硝基苯甲酰氯对 β -CD键合固定相进行改性, 得到3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD/硅胶 HPLC 手性固定相, 结合流动相的优化, 用正己烷-异丙醇、甲醇- $\varphi=1\%$ 乙酸三乙胺(TEAA, pH=4.1)、乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA 流动相系统分离了11种生物碱类手性药物的对映体, 取得良好的分离效果, 对映异构体的相对保留值 α 达1.29以上, 分离度 R_s 达1.41以上。对手性拆分机理、流动相的组成及样品的结构等因素对手性拆分效果的影响进行了研究和讨论。

1 实验部分

1.1 试剂、药品和仪器

试剂: β -环糊精, 陕西佳县生物化学工业公司产品, 用蒸馏水重结晶后, 于110℃真空干燥12 h

备用; YQG-80 球形硅胶, $d=5\mu\text{m}$, 比表面积为 $250\text{m}^2/\text{g}$, 青岛海洋化工厂, 用3 mol/L 的稀盐酸浸泡过夜, 再用蒸馏水洗至中性, 110℃真空干燥(P_2O_5 为干燥剂)12 h; 3, 5-二硝基苯甲酰氯, CP, 上海名鹤农药化工厂产品; 吡啶, AR, 天津精细化学品有限公司产品; 甲苯, AR, 广州化学试剂二厂产品; N, N-二甲基甲酰胺(DMF), AR, 广州化学试剂厂产品, 经无水硫酸镁干燥, 减压蒸馏收集38~40℃/0.0 kPa的馏分备用; 3-缩水甘油基三甲氧基硅烷(GPTS), CP, 南京曙光化工厂产品, 经减压蒸馏收集144~148℃/0.0 kPa的馏分备用; HPLC 用的甲醇(AR), 乙腈(AR), 己烷(AR), 异丙醇(AR)均经过滤和超声脱气后使用; $\varphi=1\%$ 的TEAA 缓冲液: 用乙酸将 $\varphi=1\%$ 三乙胺水溶液调至pH 4.1; 水为二次蒸馏水。

手性药物对映体: D66 (1, 具有抗炎活性的化合物), 沈阳药科大学药物合成系提供; 阿替洛尔 (2, Atenolol), 上海三维制药有限公司产品; 普洛帕酮 (3, Propafenone) 与酮康唑 (6, Ketoconazole), 广州南方医院提供; 阿托品 (4, Atropine), 成都制药一厂产品; 异戊巴比妥 (5, Amobarbitalum), 山东新华制药厂产品; 美托洛尔 (7, Metoprolol) 与博利康尼 (10, Terbutaline), 无锡阿斯特拉制药有限公司产品; 卡维地洛 (8, Carvedilol), 第一军医大学药物研究所提供; 沙丁胺醇 (9, Salbutamol), 江苏丹阳药业公司产品; 普洛萘尔 (11,

* 收稿日期: 2001-06-19;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672054)

作者简介: 何建峰 (1978—), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 邓芹英; E-mail: hejianfeng-hjf@263.net

Propranolol), 汕头金石制药总厂产品。以上各种手性药物用甲醇配成 1 mg/mL 溶液, 在硅胶薄层板上用不同极性的溶剂展开, 未见其它斑点, 说明都是纯度较高的药物。手性药物的化学结构式见图 1。

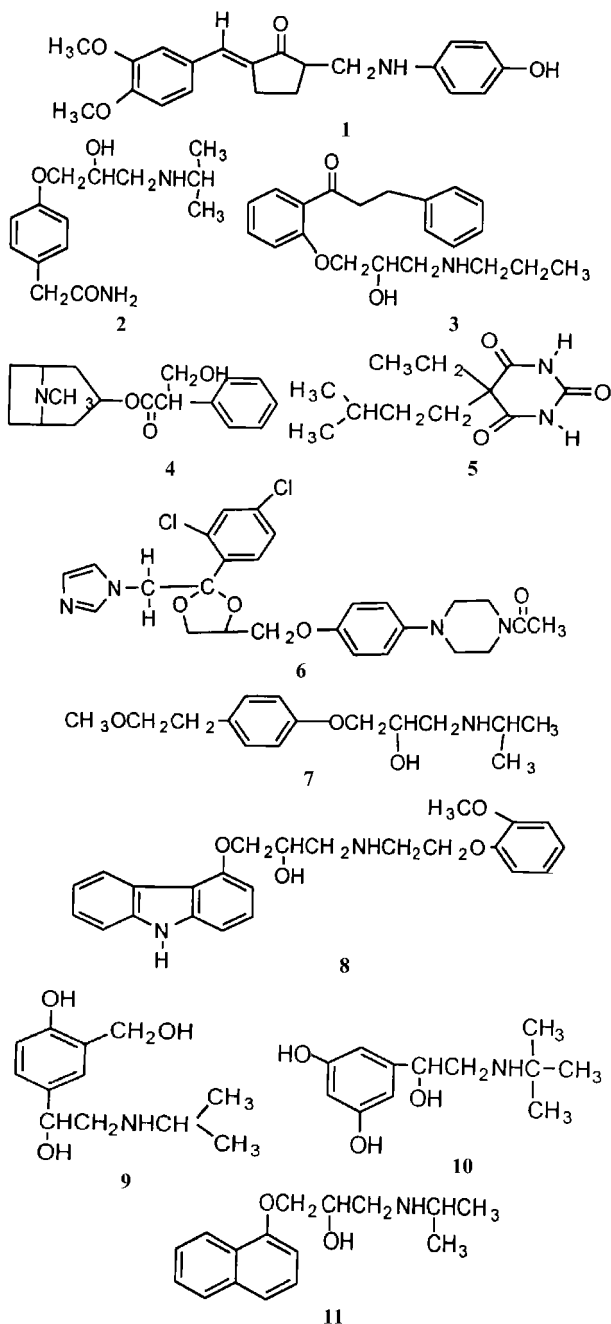


图 1 手性药物的化学结构式

Fig 1 The chemical structures of the chiral drugs

仪器: 日本 Shimadzu LC-4A 高效液相色谱仪, 色谱柱 (填充 3, 5-二硝基苯甲酰化 β -CD 手性固定相, 5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm ID), 记录仪: Shimadzu R-112M, 检测器: Shimadzu SPD-10AVP。

1.2 3,5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 键合固定相的制备

β -CD 键合固定相是按文献 [2] 的方法制备的, 经 70 $^{\circ}$ C 真空干燥 12 h 后置于 100 mL 圆底瓶中, 在吡啶存在下, 以甲苯为介质, 电磁搅拌下加入 3, 5-二硝基苯甲酰氯, 于 80 $^{\circ}$ C 反应 4 ~ 5 h, 产物冷却后, 抽滤, 固体物依次用吡啶、甲醇、水、甲醇充分洗涤, 得到浅棕黄色固体, 产物真空干燥后进行元素分析、热重分析及红外光谱的测定。

1.3 手性药物对映体的拆分

用上述方法制备的 3, 5-二硝基苯甲酰氯衍生化的 β -CD 手性固定相 [w(C) 为 16.20%] 填充的色谱柱, 结合流动相的优化, 进行手性药物对映体的拆分研究。检测器的检测波长为 254 nm, 流动相的流速为 1.0 mL/min。

2 结果和讨论

2.1 对映体的拆分结果

经过流动相组成的优化研究, 11 种手性药物对映体分别在流动相系统 I, 己烷+异丙醇; II, 甲醇+ φ =1% TEAA; III, 乙腈+ φ =1% TEAA 的实验条件下得到良好的分离, 结果列于表 1。

表 1 手性药物在 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 键合相上的 HPLC 的拆分结果¹⁾

Tab 1 The HPLC data of the chiral drugs on 3, 5-dinitrobenzoyl derivatized β -CD bonded phase

手性药物	流动相组成 ²⁾	k'_1	k'_2	α	R_s
1	I (90+10)	8.60	13.20	1.53	2.26
2	II (30+70)	1.76	4.20	2.39	3.19
3	II (30+70)	4.80	7.92	1.65	2.83
4	II (30+70)	2.20	3.12	1.42	1.41
5	II (50+50)	1.40	2.80	2.00	2.17
6	II (30+70)	3.68	6.88	1.87	3.14
7	II (30+70)	4.20	6.00	1.43	2.65
8	II (60+40)	3.20	6.00	1.88	2.17
9	III (80+20)	4.20	5.40	1.29	1.43
10	III (80+20)	4.40	6.20	1.41	2.36
11	II (35+65)	2.60	3.60	1.38	6.09

$$1) k'_1 = (t_{r1} - t_0)/t_0, k'_2 = (t_{r2} - t_0)/t_0, \alpha = k'_2/k'_1, R_s = 2(t_{r2} - t_{r1})/(w_1 + w_2);$$

$$2) \varphi_1/\% + \varphi_2/\%$$

2.2 β -环糊精结构特点与拆分机理

β -CD 是由 7 个葡萄糖分子组成, 每个葡萄糖分子都以椅式构象存在, 外形好像中空去顶的圆锥, 7 个伯羟基处于圆锥较小的一面 (小口端), 14

个仲羟基, 有一定刚性, 处于圆锥较大的一面 (大口端), 其中 2 羟基靠近外侧, 呈顺时针排列, 3-羟基靠近空腔的内侧, 呈反时针排列。 β -CD 空腔内部则由 2 圈 C—H 键中间夹一圈糖苷氧原子组成, 因此 β -CD 具有外部相对亲水、内部相对疏水的特性, 这一特性使它能与许多化合物形成包埋络合物。 β -CD 键合相用 3, 5-二硝基苯甲酰氯衍生化后, 与样品分子之间的手性识别因素增多。用正相系统 (己烷/异丙醇) 拆分手性药物对映体时, 由于 β -CD 空腔被流动相中非极性溶剂占据, 手性识别主要由 β -CD 羟基以及腔口端的衍生化基团与手性药物分子中的极性功能团之间形成的氢键决定。用反相系统甲醇/ φ =1%TEAA、乙腈/ φ =1%TEAA 时, 衍生化的 β -环糊精手性固定相不但能包含样品分子, 而且溶质与 β -CD 取代基之间存在额外的作用, 如氢键、偶极作用、 π - π 电荷转移、位阻排斥及疏水吸引等, 这些都对手性识别有影响。如图 2 出示了 3, 5-二硝基苯甲酰化 β -CD 键合相与普洛萘尔的相互作用, 图中表明: 固定相中的苯环和样品分子的萘环之间的 π - π 作用, 固定相中的硝基与样品分子的羟基和胺基之间的氢键作用及环糊精分子中的糖环的空间位阻作用都对普洛萘尔对映体的分离起重要的影响。

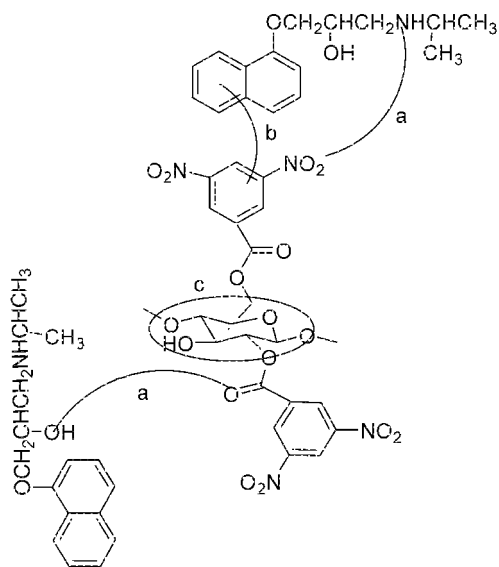


图 2 3, 5-二硝基苯甲酰氯衍生化的 β -CD 键合相与普洛萘尔的相互作用

Fig. 2 The interaction between 3, 5-dinitrobenzoyl β -cyclodextrin chiral bonded phase and propranolol
a: 氢键作用 b: π - π 作用 c: 空间位阻

2.3 流动相的组成对拆分效果的影响

流动相组成对手性药物拆分有重要的影响, 在用流动相己烷/异丙醇系统拆分样品 D66 时发现, 2 个对映体的相对保留值和分离度与流动相系统中的 φ (异丙醇) 有很大关系, 结果如图 3 所示。图中表明当 φ (异丙醇) 为 10% 时拆分效果最好, 当再增大 φ (异丙醇), 化合物的容量因子 k' 减小, 分离效果也变差, 这可能是因为异丙醇能与 β -CD 形成包合物, 当 φ (异丙醇) 较高时, 异丙醇会与手性分子竞争 β -CD 的空腔而影响手性拆分, 另外流动相中 φ (异丙醇) 高, 会增强与 β -CD 间的疏水作用, 而使手性分子与 β -CD 间的疏水作用减弱, 也影响分离。实验中发现, 在用甲醇- φ =1%TEAA 流动相系统时, 甲醇的比例低于 TEAA 时分离较好; 而用乙腈- φ =1%TEAA 系统时, 乙腈的比例高于 TEAA 时分离较好。原因可能是甲醇、乙腈与键合固定相 (CSP)、样品分子之间及样品分子与 CSP 之间的作用力不同, 对于甲醇, 它易与 CSP 形成氢键, 故它们之间的作用力比 CSP 与样品分子之间的作用力强, 因此高含量的甲醇不利于 CSP 与样品分子紧密结合, 从而影响分离; 而乙腈是无质子溶剂, 它不会与样品分子竞争 CSP 上形成氢键的位点, 且它与 CSP 及样品分子之间的作用力明显比 CSP 与样品分子之间的作用力弱, 增大乙腈在流动相的比例能增大样品分子在流动相的溶解度, 使样品分子从 CSP 上更易洗脱分离。

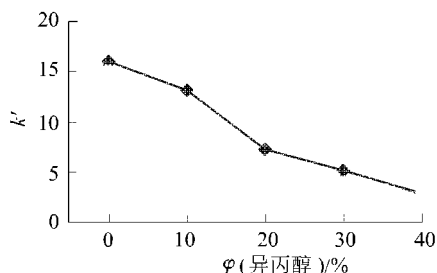


图 3 流动相 (己烷/异丙醇) 中 φ (异丙醇) 对样品 D66 拆分的影响

Fig. 3 The effect of isopropanol concentration in the mobile phase system of hexane-isopropanol on the capacity factors of D66

2.4 样品结构与拆分效果

在对手性药物的拆分中, 发现这些分子的手性中心或附近都含有 1 个羟基、1 个仲胺基及 1 个大的疏水性基团, 手性中心附近的羟基及仲胺基能与 CSP 上羰基或硝基形成两个氢键, 大的疏水性基团

能进入 3, 5-二硝基苯甲酰化的环糊精键合相的疏水性空腔, 它们之间存在强的疏水作用, 按三点作用机理^[3-5], 这些化合物能被拆分。同时含共轭结构的疏水性基团的存在不仅能增强样品分子与 CSP 之间的 $\pi-\pi$ 作用, 还能增大空间位阻, 使手性固定相的手性识别能力增强, 具有较大的手性络合差异, 这样的样品分子的对映体更易得到分离。从分离度来看, **11** 的分离度最大, 从结构上考察, 发现它手性碳附近含 1 个萘基、1 个羟基和 1 个仲氨基, 这可能是萘型芳香基团的大小更能与 β -CD-CSP 的空腔相匹配, 且它与手性固定相之间存在三点作用, 故 **11** 在衍生化的手性固定相上的分离度最大, 分离效果最好。而化合物 **4** 的分离度相对较低, 可能是叔胺基离手性碳太远, 而且连在一个空间位阻比较大的环上, 不利于与 β -CD-CSP 形成氢键, 与 CSP 之间只存在两点作用, 故化合物 **4** 的分离度相对较低。以上这些结果证明在流动相系统为

甲醇/ $\varphi=1\%$ TEAA 时, 样品分子与 CSP 的疏水作用及氢键的形成对手性识别起到很重要的作用。

参考文献:

- [1] 谢剑炜, 杨造萍, 阮金秀. 手性药物对映体的环糊精手性流动相、手性固定相 HPLC 法拆分[J]. 药学学报, 1998, 33(2): 143-147.
- [2] 余品香, 邓芹英, 王鹏, 等. β -环糊精色谱手性固定相的合成及性能表征[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 53-56.
- [3] CURT P. Liquid chromatographic separation of enantiomers using chiral additives in the mobile phase[J]. Trends in analytical chemistry, 1988, 7(6): 209-217.
- [4] DAVID R, KEVIN M. Chiral separations by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr Sci, 1992, 30(3): 67-85.
- [5] HUSAIN N, WARNER I M. Cyclodextrins as mobile phase additive in reversed phase HPLC[J]. Am Lab, 1993: 80.

Resolution of Chiral Drug Enantiomers of Alkaloids by High Performance Liquid Chromatography

HE Jian feng¹, ZHU Quan hong², LIU Nan¹, DENG Qin ying¹

- (1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;
2. Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: The 3, 5-dinitrobenzoyl β -cyclodextrin bonded phase was used for the separation of chiral drug enantiomers by HPLC. Eleven pairs of racemic drugs of alkaloids have been completely separated with the solvent systems of hexane isopropanol, methanol triethylammonium acetate, and acetonitrile triethylammonium acetate (pH 4.1). The relative retention ratios of enantiotopic isomers are more than 1.29. The resolutions of enantiotopic isomers are higher than 1.41. The separation mechanism of chiral drugs on the bonded stationary phase, the influences of the mobile phase composition and the structures of sample on the resolution were studied.

Key words: chiral stationary phase; high performance liquid chromatography; alkaloids; chiral drugs