

# 超临界流体色谱法拆分萘普生对映体

罗英豪\*(重庆市肿瘤医院药剂科,重庆 400030)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4789-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.12

**摘要** 目的:建立拆分萘普生对映体的方法。方法:采用超临界流体色谱法。以萘普生对映体的分离时间、容量因子、分离因子、分离度为考察指标,优选手性色谱柱、流动相中极性添加剂种类及占比、背压和柱温的条件。结果:优选条件为手性色谱柱采用 CHIRALPAK®AD-H,极性添加剂为异丙醇(占比为20%),背压170 bar,柱温20℃,检测波长283 nm。在此条件下萘普生对映体能够达到基线分离,分离度为4.31,分离因子为1.90,且精密度、稳定性和重复性试验中相关指标的RSD均≤2.65%( $n=5$ )。结论:建立的拆分方法简单、重现性好、拆分效果好,可用于萘普生对映体的手性分离。

**关键词** 萘普生;对映体;拆分;超临界流体色谱法

## Chiral Separation of Naproxen Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography

LUO Ying-hao(Dept. of Pharmacy, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the separation of naproxen enantiomers. METHODS: The supercritical fluid chromatography (SFC) method was adopted. The chiral column, type and proportion of polar additive in mobile phase, back pressure and column temperature were optimized using the separation time, capacity factor, separation factor and separation degree as index. RESULTS: The best condition was on the chiral column CHIRALPAK®AD-H, with polar additive of isopropanol (20%), back pressure of 170 bar, column temperature of 20℃ and the detection wavelength of 283 nm. Under this condition, baseline separation of naproxen enantiomers can be achieved; separation degree was 4.31 and separation factor was 1.90; RSD of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.65% ( $n=5$ ). CONCLUSIONS: Established method is simple, reproducible and well-separated, and can be used for chiral separation of naproxen enantiomers.

**KEYWORDS** Naproxen; Enantiomer; Separation; Supercritical fluid chromatography

萘普生(Naproxen)是临床广泛应用的一种非甾体解热镇痛抗炎药,其主要适应证是风湿性和类风湿性关节炎、各种中度疼痛和宫腔手术、检查镇痛等<sup>[1]</sup>。其化学名为2-(6-甲氧基-2-萘基)丙酸,结构式见图1。

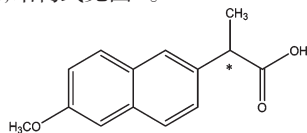


图1 萘普生化学结构式

Fig1 Chemical structure of naproxen

由萘普生结构式可见,其 $\alpha$ 位含有一个手性中心,因此有一对光学异构体存在。已有研究表明 $S$ -(+)-构型萘普生的药理活性是 $R$ -(-)-的28倍<sup>[1]</sup>,目前临床应用的萘普生均是 $S$ -(+)-构型。从以前的研究来看,萘普生的拆分方法有诱导析晶法、生物酶法、色谱法等<sup>[2]</sup>,其中以高效液相色谱法(HPLC)为主<sup>[3-4]</sup>。超临界流体色谱法具有分析速度快、选择性好、分离效率高、分析条件温和、环境污染小等特点,故在手性药物分离和制备中应用广泛<sup>[5-6]</sup>。为了提高萘普生对映体的手性分离效率和分离纯度,减少拆分萘普生对映体可能带来的环境污染,笔者采用超临界流体色谱法考察了手性固定相、流动相中极性添加剂种类及占比、背压和柱温对萘普生对映体拆分的影响,建立了萘普生对映体的超临界流体色谱拆分方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器与色谱柱

\*主管药师。研究方向:药物分析。E-mail:49363064@qq.com

超临界流体色谱仪(美国Thar Technologies公司);天平(瑞士Mettler-Toledo公司,精度:0.01/0.1 mg)。

手性色谱柱CHIRALCEL®OD-H(简称OD-H)、CHIRALCEL®OJ-H(简称OJ-H)及CHIRALPAK®AD-H(简称AD-H)、CHIRALPAK®AS-H(简称AS-H),均购于日本Daicel公司,规格皆为250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m。

### 1.2 药品与试剂

萘普生消旋体(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号:100330-201401,纯度:>98%);CO<sub>2</sub>(重庆海格气体有限公司,批号:201307,纯度:≥99.99%);异丙醇、乙醇均为色谱纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品溶液制备

精密称定萘普生消旋体5 mg,置于10 ml量瓶中,用异丙醇溶解定容,制成0.5 g/L的样品溶液,低温避光保存。

### 2.2 色谱条件

流动相:不同体积比的异丙醇-超临界CO<sub>2</sub>(异丙醇含量10%~30%);背压(柱前CO<sub>2</sub>的压力):120~200 bar;进样量:5  $\mu$ l;柱温:15~40℃;检测波长:283 nm。

### 2.3 手性固定相(色谱柱)对分离的影响

在柱温25℃、流动相为异丙醇-CO<sub>2</sub>(20:80, V/V)、背压170 bar、检测波长283 nm的条件下,分别在4种手性色谱柱(OD-H、OJ-H、AD-H和AS-H)上对萘普生消旋体进行拆分试验,以分离时间( $t_R$ )、容量因子( $k$ )、分离因子( $\alpha$ )和分离度( $R_s$ )为指标考察这4种手性固定相对萘普生对映体的手性识别能力,结果见表1。

表1 不同的手性固定相对萘普生对映体分离的影响

Tab 1 Effect of different chiral stationary phases on the separation of naproxen enantiomers

手性固定相	$t_{R1}, \text{min}$	$t_{R2}, \text{min}$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
OD-H	37.14	53.56	7.40	11.12	1.50	2.44
AS-H	7.46		4.66			
AD-H	11.00	16.51	1.63	2.95	1.81	4.28
OJ-H	71.60		16.90			

由表1可见,AD-H和OD-H手性色谱柱可分离萘普生对映体,  $R_s$ 分别为4.28、2.44;萘普生对映体在AD-H手性色谱柱的保留时间分别为11.00、16.51 min,在OD-H手性柱的保留时间分别为37.14、53.56 min;AD-H和OD-H手性色谱柱对萘普生对映体的 $\alpha$ 分别为1.81、1.50;而OJ-H和AS-H手性色谱柱对萘普生对映体不具有手性识别能力,且在OJ-H柱上的保留时间特别长,为71.60 min。此试验结果表明,AD-H手性色谱柱对萘普生对映体的手性识别能力最强,因此选择其为分离萘普生对映体的手性固定相。

2.4 流动相极性添加剂对分离的影响

在设定柱温25℃、背压170 bar、手性色谱柱为AD-H、检测波长283 nm、流动相中CO<sub>2</sub>的比例为80%的条件下,考察了流动相中异丙醇和乙醇两种不同的极性添加剂对分离效果的影响,结果见表2。

表2 不同的极性添加剂对萘普生对映体分离的影响

Tab 2 Effect of different polar additives on the separation of naproxen enantiomers

流动相	$t_{R1}, \text{min}$	$t_{R2}, \text{min}$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
乙醇	15.95		2.79			
异丙醇	11.00	16.51	1.63	2.95	1.81	4.28

由表2可见,在使用乙醇为极性添加剂的情况下,萘普生对映体达不到手性分离的效果;而使用异丙醇为极性添加剂后保留时间分别为11.00、16.51 min,  $R_s$ 为4.28,达到良好的分离效果。故本试验选用异丙醇为极性添加剂。

2.5 流动相中异丙醇占比对分离的影响

在设定柱温25℃、背压170 bar、手性色谱柱为AD-H、检测波长283 nm的条件下,考察流动相中异丙醇不同占比对分离效果的影响,结果见表3。

表3 流动相中异丙醇不同占比对萘普生对映体分离的影响

Tab 3 Effect of different proportion of isopropanol in mobile phase on the separation of naproxen enantiomers

异丙醇占比, %	$t_{R1}, \text{min}$	$t_{R2}, \text{min}$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
10	20.91	34.18	3.37	6.15	1.82	5.10
15	14.32	22.41	2.17	3.96	1.82	4.66
20	11.00	16.51	1.63	2.95	1.81	4.52
25	8.92	12.98	1.29	2.33	1.81	3.83
30	7.86	11.14	1.09	1.96	1.80	3.58

由表3可见,随着异丙醇占比的增加,萘普生对映体的 $t_R$ 和 $k$ 大幅减小,  $R_s$ 逐渐减小,且在异丙醇占比为15%~20%之间的下降幅度最小,而 $\alpha$ 几乎不变。综合考虑对映体萘普生在固定相中的 $t_R$ 与 $R_s$ ,本试验选择流动相组成为异丙醇-CO<sub>2</sub>(20:80, V/V)。

2.6 背压对分离的影响

在设定柱温25℃、手性色谱柱为AD-H、检测波长283 nm、流动相组成为异丙醇-CO<sub>2</sub>(20:80, V/V)的条件下,考察不

同背压对分离效果的影响,结果见表4。

表4 不同背压对萘普生对映体分离的影响

Tab 4 Effect of different back pressure on the separation of naproxen enantiomers

背压, bar	$t_{R1}, \text{min}$	$t_{R2}, \text{min}$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
120	21.79	33.05	1.80	3.24	1.80	5.23
130	18.12	27.38	1.65	3.01	1.82	5.23
140	15.39	23.09	1.63	2.94	1.80	4.67
150	13.46	20.22	1.64	2.96	1.81	4.52
160	11.96	17.94	1.64	2.96	1.81	4.34
170	11.00	16.51	1.63	2.95	1.81	4.28
180	9.60	14.42	1.62	2.94	1.81	4.05
190	8.72	13.05	1.61	2.91	1.81	3.90
200	8.02	12.10	1.62	2.95	1.82	3.79

由表4可见,随着背压的增加,萘普生对映体的 $t_R$ 缩短,  $R_s$ 下降,  $\alpha$ 基本不变。根据色谱法速率理论<sup>[7]</sup>,从 $t_R$ 、 $R_s$ 等因素进行考虑,本试验选择背压为170 bar。

2.7 柱温对分离的影响

在流动相组成为异丙醇-CO<sub>2</sub>(20:80, V/V)、手性色谱柱为AD-H、检测波长283 nm、背压170 bar的条件下,考察不同柱温对分离效果的影响,结果见表5。

表5 不同柱温对萘普生对映体分离的影响

Tab 5 Effects of different column temperature on the separation of naproxen enantiomers

柱温, °C	$t_{R1}, \text{min}$	$t_{R2}, \text{min}$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
15	11.25	17.72	1.76	3.34	1.90	4.28
20	11.10	17.35	1.72	3.25	1.89	4.31
25	10.92	16.82	1.67	3.11	1.86	4.28
30	10.75	16.39	1.63	3.01	1.85	4.26
35	10.53	15.79	1.59	2.88	1.81	4.23
40	10.32	15.24	1.54	2.74	1.80	4.15

由表5可见,随着柱温的升高,对映体 $t_R$ 逐渐缩短,  $k$ 逐渐降低,  $R_s$ 呈下降趋势,  $\alpha$ 逐渐降低。这是因为柱温升高使得流动相黏度降低,并且溶质在流动相与固定相之间传质速度加快所致<sup>[8]</sup>,使得以上4项参数降低。值得注意的是,在柱温20℃时分离度出现了拐点,达到 $R_s$ 考察范围的最高值( $R_s=4.31$ )。而温度对手性分离的影响由以下因素决定:(1)改变手性溶质的振动能和旋转能;(2)使溶质-溶剂平衡发生位移;(3)使构象平衡发生位移<sup>[9]</sup>。通过以上因素使其对两种对映体产生不同的保留行为和手性识别过程。

超临界色谱中柱温对分离的影响可用范特霍夫方程推导表示: $\ln\alpha = \ln(k_2/k_1) = -\Delta(\Delta G) = \Delta(\Delta H)/RT + \Delta(\Delta S)/R$ 。其中 $R$ 为摩尔气体常数,  $T$ 为绝对温度,  $\Delta(\Delta G)$ 为两种对映体间的自由能差异,  $\Delta(\Delta H)$ 为其相应的焓变差异,  $\Delta(\Delta S)$ 为其相应的熵变差异。以萘普生对映体的 $\ln\alpha$ 对 $1/T$ 进行线性回归,得线性方程为 $\ln\alpha = 0.1609/T + 0.078$  ( $r=0.95$ ),结果见图2。

由此可知,在研究的温度变化范围内,对映体的 $\Delta(\Delta H)$ 为负值,因此认为此对映体的色谱分离受热力学控制,其手性识别过程为焓控过程。综合分析时间、 $\alpha$ 、 $R_s$ 以及对柱寿命的影响,试验选择20℃为最优柱温。

2.8 系统适用性考察

综合并分析上述试验结果,确立了萘普生对映体的最优分离条件为:AD-H柱为手性色谱柱,流动相组成为异丙醇/超临界CO<sub>2</sub>(20:80, V/V),背压为170 bar,柱温为20℃,样品质量

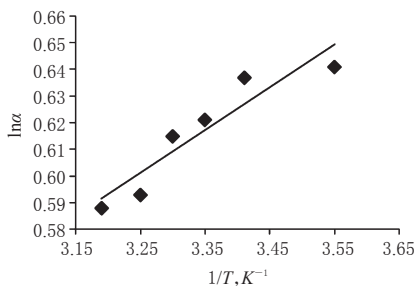


图2 萘普生对映体的 $\ln\alpha$ - $1/T$ 关系图

Fig 2  $\ln\alpha$ - $1/T$  relation diagram of naproxen enantiomers

浓度 0.5 g/L, 进样量为 5  $\mu$ l, 检测波长为 283 nm。在该条件下对样品进行分离, 结果分离情况良好,  $R_s$  为 4.31,  $\alpha$  为 1.90, 理论板数分别为 21 050、23 024, 详见图 3。

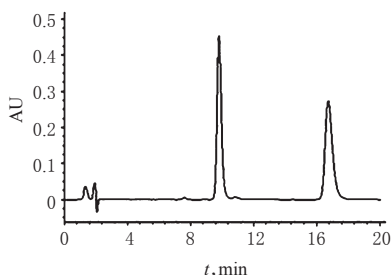


图3 萘普生对映体色谱分离图

Fig 3 Separation chromatography of naproxen enantiomers

### 2.9 精密度试验

取 0.5 g/L 的样品溶液在优化后的色谱条件下连续进样 5 次, 得萘普生对映体保留时间的 RSD 分别为 0.26%、0.43%, 峰面积的 RSD 分别为 0.78%、0.95% ( $n=5$ )。这表明该色谱分离方法精密度好。

### 2.10 稳定性试验

取 0.5 g/L 的样品溶液分别于制备后 0、4、8、12、24 h 在优化后的色谱条件下进样测定, 结果萘普生对映体保留时间的 RSD 分别为 1.32%、1.74%, 峰面积的 RSD 分别为 2.65%、3.14% ( $n=5$ )。这表明样品溶液在 24 h 内测定稳定性较好。

### 2.11 重复性试验

精密称取萘普生消旋体等量 5 份, 制备成 0.5 g/L 的样品溶液, 在优化后的色谱条件下各测定 5 次, 得萘普生对映体保留时间的 RSD 分别为 0.57%、0.78%, 峰面积的 RSD 分别为 1.27%、1.44% ( $n=5$ )。这表明该色谱分离方法重复性良好。

## 3 讨论

OD-H 的固定相为纤维素-三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯), OJ-H 的固定相为纤维素-三(4-甲基苯甲酸酯), AS-H 的固定相为直链淀粉-三[(*S*)- $\alpha$ -苯乙基氨基甲酸酯], AD-H 的固定相为直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)<sup>[10-11]</sup>。因为直链淀粉苯基氨基甲酸酯具有左手四重螺旋结构<sup>[10]</sup>, 氨基甲酸酯残基围绕主链形成许多沟槽, 能与样品分子间发生氢键相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用和包夹相互作用形成“三点相互作用”<sup>[12]</sup>, 才能对样品进行有效拆分。而萘普生对映体能与 AD-H 固定相发生氢键相互作用, 且萘普生对映体中的萘环能与 AD-H 固定相发生  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 形成了三点相互作用模型, 因此 AD-H 手性色谱柱分离萘普生对映体的效果较好。

在多糖类衍生物固定相上的手性拆分上, 氢键相互作用

起着关键的作用。溶质和极性的流动相添加剂都有可能与固定相形成氢键, 即溶质与极性添加剂之间存在竞争作用。这种竞争作用必然与添加剂的溶剂强度和立体结构有关<sup>[13]</sup>。故使用乙醇为极性添加剂后不能达到手性分离的效果, 而异丙醇则可。

色谱分离中, 已有大量的试验证实流动相的组成对溶质的保留时间和分离中的选择性有很大影响。有许多手性分离就是通过改变流动相的组成, 使溶质的保留时间和分离的立体选择性发生变化才获得了最优的分离效果<sup>[14]</sup>。这表明异丙醇作为极性添加剂与溶质萘普生对映体存在竞争作用, 当异丙醇占比增大, 其竞争性地与固定相形成氢键的能力更强, 故导致对映体萘普生在固定相的保留量减少、分离度降低。

综上所述, 本方法简单、快速, 分离效果好, 可以作为萘普生对映体手性分离的新方法, 其对手性药物萘普生的合成、生产以及分析测定也有一定参考意义。

## 参考文献

- [1] 张昭, 萘普生钠的药理作用及临床应用[J]. 中国药房, 1992, 3(6): 32.
- [2] 薛娜, 张恺, 李丽娟. 萘普生对映体的手性分离和纯度检查[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1 326.
- [3] 宁凤荣, 黄可龙, 刘素琴. 手性流动相 HPLC 法拆分萘普生对映体的研究[J]. 分析实验室, 2006, 25(6): 1.
- [4] 陈德妙, 傅强, 李娜. CHIRALCEL OD 手性柱直接拆分萘普生对映体[J]. 分析化学, 2007, 35(1): 75.
- [5] 夏爽, 袁圆, 潘桂湘. 超临界流体色谱在手性药物拆分中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 217.
- [6] 吴夏青. 超临界流体色谱分离手性药物研究进展[J]. 分析仪器, 2014, 45(3): 1.
- [7] 李发美, 郑虎. 分析化学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 428.
- [8] 程彪平, 李来生, 周仁丹, 等. 衍生化  $\beta$ -环糊精手性固定相液相色谱拆分和测定药片中的阿替洛尔对映体[J]. 色谱, 2014, 32(11): 1 219.
- [9] 金薇, 杨新磊. 超临界流体色谱法手性拆分左乙拉西坦及其右旋异构体[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 822.
- [10] 何永祝, 庞浩, 廖兵. 纤维素衍生物手性固定相研究进展[J]. 化学进展, 2006, 18(7/8): 957.
- [11] 涂鸿盛, 范军, 谭艺, 等. 新型键合纤维素手性固定相的制备及其拆分性能评价[J]. 色谱, 2014, 32(5): 452.
- [12] 罗安, 万强, 范华均, 等. 纤维素-三(4-甲基苯甲酸酯)手性固定相拆分 5 种芳基丙酸类药物对映体及其制剂的含量测定[J]. 色谱, 2014, 32(9): 1 013.
- [13] Gahm KH, Tan H, Liu J. Purification method development for chiral separation in supercritical fluid chromatography with the solubilities in supercritical fluid chromatographic mobile phases[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 46(5): 831.
- [14] 肖容, 张丹, 杜培刚. Chiralpak AD-RH 手性柱直接拆分萘普生对映体[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 1 989.

(收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2015-08-27)

(编辑: 刘萍)