

高效液相色谱法制备分离外消旋雷诺嗪

张红丽, 赵亮, 明永飞, 葛晋, 李永民, 陈立仁

(中国科学院兰州化学物理研究所 甘肃 兰州 730000)

摘要: 涂覆纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)于自制的球形氨基丙基硅胶上,制备了手性固定相。用高效液相色谱法(HPLC)在正相条件下,用该固定相直接拆分了抗心绞痛药物雷诺嗪消旋体(Ranolazine)。然后,将分析色谱方法扩展到半制备色谱,进行了该药物的半制备分离,考察了不同进样量对半制备色谱参数的影响。在104小时内,可制备约1g的雷诺嗪单一对映体。

关键词: 手性分离; 半制备高效液相色谱固定相; 雷诺嗪; 纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯);

随着生命科学的发展,人们对不同旋光活性的药物具有不同的生理活性认识越来越深刻,使得对光学纯单一对映体的需要不断增加,尤其在医药、农药方面,获得光学纯的、毒副作用小的单一对映体药物已成为现代药物研究的重要内容。目前美国食品和药品管理局及许多西方国家的有关部门都已作出了禁止外消旋体药物在市场上销售的决定,必须把它拆分成单一的左旋或右旋体才能作为产品上市。获取光学纯单一对映体的方法有两种:一是对所需要单一对映体利用不对称合成方法来获取;另一种方法是将在外消旋的对映体拆分成单一对映体。不对称合成在大规模生产单一对映体时具有实用价值,但是发展不对称合成所耗时间较长,尤其是在药物筛选过程中,不对称合成只能获得一种单一对映体。而外消旋化合物的拆分可以同时获得两种单一对映体用于进一步测试。外消旋化合物拆分的方法包括重结晶、酶催化、直接色谱拆分和间接色谱拆分,其中高效液相色谱手性固定相直接制备分离手性化合物被认为是同时获得两种光学纯的单一对映体十分有效的方法,该方法适用于各种结构的手性化合物的拆分,省去了间接色谱分离需要衍生的麻烦^[1]。

盐酸雷诺嗪是1999年美国开发的新型心血管系统药物,临床上用于治疗慢性稳定型心绞痛以及充血性心力衰竭^[2-7]。2002年刚完成临床研究批准上市。雷诺嗪是 β -氨基醇,它具有一个手性中心,但目前以外消旋体形式上市。E. Delee^[8]等人用高效液相色谱法在 α_1 -酸性糖蛋白手性固定相上对雷诺嗪进行手性拆分,但是所测得结果较差,保留时间较长,没有达到基线分离,不能满足临床手性检测方法要求以及色谱制备的要求,本文涂敷纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)在氨基丙基硅胶上,制备成手性固定相,在此手性固定相上首次制备雷诺嗪,得到了满意的结果,为进一步实现色谱制备旋光活性的雷诺嗪提供了实验基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

球形硅胶系本实验室合成,粒径 $5\mu\text{m}$;比表面积 $120\text{m}^2/\text{g}$;平均孔径 10nm ;2-氨基丙基三乙氧基硅烷(KH550)购自辽宁盖县化工厂;微晶纤维素购自上海试剂厂;3,5-二甲基苯基异氰酸酯购自Aldrich公司。所用正己烷、异丙醇均是天津化学试剂二厂产品。雷诺嗪外消旋体由南京泽众医药有限公司,其结构图如图1所示:

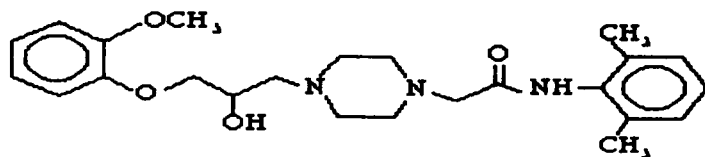


图1 雷诺嗪的分子式结构

* 通讯联系人: 陈立仁(1937年出生),男,研究员,博士生导师,从事高效液相色谱基础和应用研究。E-mail: chenlr@ns.lzb.ac.cn
作者简介: 张红丽,女,1979年出生,研究员,现从事高效液相色谱的手性分离工作

手性填料纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)的合成参照文献^[8,9] $5\mu\text{m}$,涂敷于硅胶上,在70MPa压力下,匀浆装入不锈钢柱中(半制备柱 $15\text{cm}\times 1\text{mm}$)。

色谱系统包括515 HPLC泵(Waters公司)、2487型紫外可见波长检测器(Waters公司)、SEPU3000色谱数据处理器(杭州普惠科学仪器公司)和7725 i手动进样阀(配有定量管,分析色谱: $20\mu\text{L}$,半制备色谱: $200\mu\text{L}$) (Waters公司)。TENSOR 27红外光谱仪(Bruker公司); Perkin Elmer 341旋光仪(Perkin Elmer公司); Vario EL II元素分析仪(Element公司)。分析柱: $250\text{mm}\times 4.6\text{mm}$ i. d.,流动相流速为 $2\text{mL}/\text{min}$,检测波长 272nm ;半制备柱相关参数分别为: $250\text{mm}\times 10\text{mm}$ i. d., $6\text{mL}/\text{min}$, 272nm ;匀浆法在 $3.7\times 10^7\text{Pa}$ 压力下填充。柱温:室温。

1.2 色谱计算

色谱柱死体积(t_0)用1,3,5-三叔丁基苯测定,分离因子(α)按 $\alpha = k_2'/k_1'$,容量因子按 $k' = (t_r - t_0)/t_0$,分离度 $R_s = 2(t_2 - t_1)/(m_1 + m_2)$, m_1 和 m_2 分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰之基线峰宽。 t_2 和 t_1 分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰保留时间。

2 结果与讨论

2.1 雷诺嗪最佳色谱制备条件的建立

分析型高效液相色谱手性拆分的良好结果通常是制备分离的先决条件。因此,在进行雷诺嗪的制备雷诺嗪实验之前进行了大量的分析色谱方面的实验,包括考察各种手性固定相,流动相的组成和比例,特别需要注意的是所选用的流动相对分离样品的溶解度要好。所以还另外作了一组溶解度实验见表(1)。通过这些方面的实验,在确定了最优的固定相、流动相组成及比例之后, R_s 至少要达到2以上, k' 也要尽量小($k' < 5$),满足这些条件之后才有可能将分析色谱扩展到制备色谱。本实验已进行了这方面的实验,最终选用的固定相和最优化流动相组成条件是:CDMPC手性固定相;流动相为:正己烷/异丙醇/无水甲醇(V/V/V):60/20/20。图2给出了该条件下,雷诺嗪外消旋体在分析柱上的手性拆分数谱图。

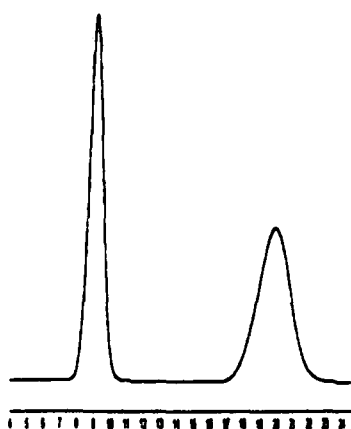


图2 雷诺嗪在分析柱上的手性拆分数谱图

表1 雷诺嗪的溶解度实验

| 溶剂 | 甲醇 | 乙醇 | 正丙醇 | 异丙醇 | 正丁醇 |
|-----------|-------|-----|-----|-----|-----|
| 溶解能力(g/L) | 10~15 | 小于1 | 小于1 | 小于1 | 小于1 |

2.2 雷诺嗪对映体的半制备分离

由于雷诺嗪溶解度条件所限,在进样量上无法作更大的改变。因此在分离度及容量因子相差不大的情况下,进行了流速方面的实验。分别进行了流速在 $2\text{mL}/\text{min}$ 、 $4\text{mL}/\text{min}$ 、 $6\text{mL}/\text{min}$ 方面的实验,

发现当流速等于 6ml/min 时分析结果依然理想。但是考虑到柱子的负载能力以及泵的安全性, 没有进行更大流速的实验。雷诺嗪对映体的半制备分离的色谱条件为: 色谱柱 250mm×10mm i d 的半制备色谱柱, 填充该柱大约需用 13g 的固定相, 这个量大约是相同长度的 4.6mm i d 的 5 倍。与分析柱 2ml/min 流速比较, 半制备柱的线速度显然要低一些, 这是因为半制备柱的柱压所限。

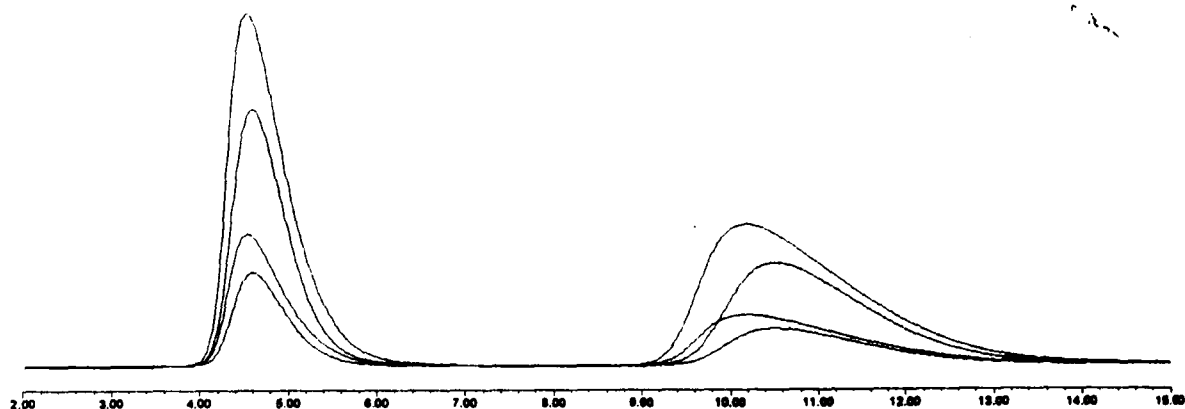


图 4 不同进样量下雷诺嗪的半制备色谱图

进样量 injection volume (per injection): 200 μ l. A. 0.7mg B. 1.1mg C. 2mg D. 3mg

从色谱图 4 可以看出收集率为 100%, 第二洗脱峰收集范围为 9.5.min—12.5min, 收集率仍为 100%, 收集的溶液经蒸发除去溶剂, 分别在高效液相色谱纤维素-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相分析柱上测试, 测试结果良好。测试结果表明: 第一洗脱峰的纯度为 99.2%, 第二洗脱峰的制备纯度为 98.5%。获得了高纯度的单一雷诺嗪对映体。如果采用上述的制备模式, 每隔 15 分钟进样一次, 1h 可制备分离 12 mg 雷诺嗪, 8h 可制备分离 96mg 雷诺嗪。

高效液相色谱手性固定相制备分离手性化合物由于手性填料的价格、化学稳定性、手性识别机理等因素应用受到限制。但是由于该法可以同时获得两个光学纯的单一对映体, 而且所制备的单一对映体纯度很高, 因此该制备方法越来越受到重视, 尤其是在制药业的新药临床研究方面具有非常广泛的应用。手性制备分离要解决的关键问题是产率和所获得物质的光学纯度, 我们用自制的纤维素-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)涂敷于 5 μ m 的硅胶上, 成功地制备分离了手性药物雷诺嗪, 同时获得了高纯度的左旋、右旋雷诺嗪。

参考文献:

- 1 Francotte E. Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena[J]. J. Chromatogr, 1994, 666(1-2): 565-601.
2. Wang, Jin-xia; et al: Antianginal effects of ranolazine in various experiment models of angina. *Arzneim-Forsch* 1999; 49(3) 193-199
3. Jain, P. Desgupta; et al: Ranolazine (RS-43285): A preliminary study of a new anti-anginal agent with effect on ischaemic myocardium. *J. Clin. Pharmacol.* 1990; 38 111-114
4. Wyatt, Katrina M; et al: The antianginal agent ranolazine is a weak inhibitor of the respiratory complex I, but with greater potency in broken or uncoupled than in coupled mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 50(10) 1599-1606
5. G. Wcco; et al: Effects of a new metabolic modulator, ranolazine, on exercise tolerance in angina pectoris patients treated with b-blocker or diltiazem. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992; 20 131-138
6. Pepine, Carl. J.; et al: A controlled trial with a novel anti-ischemic agent, ranolazine, in chronic stable angina pectoris that is responsive to conventional antianginal agents. *Am. J. Cardiol.* 1999; 84(1) 46-50
7. Herron, W.J.; et al: Estimation of ranolazine and eleven phase I metabolites in human plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. *J. Chromatogr. A* 1995, 712(1), 55-60
8. Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel[J]. *J. Chromatogr*, 1986, 363: 173-186.
9. Okamoto Y, Aburatani R, Hatada K. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography[J]. *J. chromatogr*, 1987, 389: 95-102.
10. 霍斯泰特曼 K, 马斯顿 A, 霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术[M]. 赵维民等译. 北京: 科学出版社, 2000, 66-67.