

## 高效液相色谱法拆分阿雷地平对映异构体

董淑波<sup>1,2</sup>, 杨汉跃<sup>2</sup>, 陈学民<sup>2</sup>, 严拯宇<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学理学院, 南京 210000; 2. 江苏德源药业股份有限公司, 连云港 222000)

**摘要 目的:** 建立阿雷地平对映异构体高效液相色谱手性拆分方法, 用于 *S* 构型阿雷地平光学纯度的分析测定。**方法:** 采用硅胶表面涂敷有纤维素-三(4-甲基苯甲酸酯) 填料(Chiralcel OJ-H) 为固定相, 以正己烷-乙醇(75:25) 为流动相, 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 238 nm, 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。**结果:** *S*-阿雷地平与 *R*-阿雷地平之间的分离度为 3.5; *R*-阿雷地平质量浓度在  $0.04 \sim 2.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好, 线性方程为  $A=61\ 971C-0.321\ 4$ ,  $r=0.999\ 9$ ; *R*-阿雷地平的定量限和检测限分别为 0.8 ng 和 0.3 ng; 低、中、高 3 个浓度的 *R*-阿雷地平回收率 ( $n=3$ ) 分别为 97.5%、98.5%、99.8%, RSD ( $n=9$ ) 为 1.5%; 供试品溶液在避光条件下室温放置 12 h 内稳定性良好。经检测, *S*-阿雷地平中 *R*-阿雷地平的含量为 0.08%。**结论:** 所建立的方法经方法验证可用于分离和测定 *S*-阿雷地平中的 *R*-阿雷地平。

**关键词:** 阿雷地平; 二氢吡啶类化合物; 抗高血压钙拮抗剂; 对映异构体; 光学纯度; 手性分离; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 06-1113-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.25

## Chiral separation of aranidipine enantiomers by HPLC

DONG Shu-bo<sup>1,2</sup>, YANG Han-yue<sup>2</sup>, CHEN Xue-min<sup>2</sup>, YAN Zheng-yu<sup>1\*</sup>

(1. College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China;

2. Jiangsu Deyuan Pharm.Co., Ltd., Lianyungang 222000, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method to separate aranidipine enantiomers for optical purity detection of *S*-aranidipine. **Methods:** The method was performed on a Chiralcel OJ-H column [cellulose tri (4-methylbenzoate) chiral stationary phase]. The mobile phase was *n*-hexane-ethanol (75:25) at a flow rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The column temperature was  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and the detection wavelength was 238 nm. **Results:** The resolution between the peaks of *S*-aranidipine and *R*-aranidipine was 3.5. The method was found to show good linearity over the concentration range of  $0.04 \sim 2.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The linear equation was  $A=61\ 971C-0.321\ 4$ , and the regression coefficient was 0.999 9. The limit of quantification and limit of detection of *R*-aranidipine were 0.8 ng and 0.3 ng, respectively. The recoveries of *R*-aranidipine ( $n=3$ ) were 97.5%, 98.5%, and 99.8% respectively at the concentration level of low, medium and high, with the RSD ( $n=9$ ) of 1.5%. The test solution was stable for at least 12 h at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  away from light. The *R*-aranidipine content in *S*-aranidipine sample was 0.08%. **Conclusion:** With good resolution and

\* 通信作者 Tel: (025) 86185150; E-mail: yanzhengyujiang@hotmail.com

第一作者 董淑波 Tel: 13776491940; E-mail: 456shu@163.com

杨汉跃 Tel: 13851291085; E-mail: yanghanyue01@163.com

repeatability, the method can be reliably used for chiral separation of aranidipine, and for determination of the optical purity of *S*-aranidipine.

**Keywords:** aranidipine; dihydropyridines; antihypertensive calcium antagonists; enantiomer; optical purity; chiral separation; HPLC

阿雷地平 (aranidipine) 为 1,4-二氢吡啶类化合物,是从一系列不对称的 4-芳基-1,4-二氢吡啶-2,6-二甲基-3,5-二羧酸化合物中筛选出的长效抗高血压钙拮抗剂。阿雷地平是具有 24 h 持续降压每日口服一次的钙拮抗剂,具有强力长效,降压作用。阿雷地平兼有 L 型和 T 型钙通道阻滞作用,还有开放钾通道的作用,具有生物利用度高,起效慢,作用持久等特点<sup>[1-5]</sup>。阿雷地平的二氢吡啶环上有 1 个不对称碳原子,存在 *S*-型、*R*-型 2 个异构体,阿雷地平为外消旋体 (图 1)。研究显示二氢吡啶类化合物对映体的体内活性差异较大,有的甚至成相反作用<sup>[6-8]</sup>;关于阿雷地平,有研究表明在  $\text{Ca}^{2+}$  引起的离体兔动脉条收缩试验中,*S*-型阿雷地平阻滞  $\text{Ca}^{2+}$  流入的活性比 *R*-型大约高 150 倍,*S*-型和 *R*-型之间并无相互作用。在清醒自发性高血压大鼠中,*S*-型的降血压作用是阿雷地平 (消旋体) 2 倍,而 *R*-型无作用,阿雷地平的药理活性主要是来自于 *S*-型异构体<sup>[9-10]</sup>。因此建立一种 *R*,*S*-构型阿雷地平的分离及异构体检查方法显得尤为重要。目前,国内外仅有阿雷地平及其代谢产物的含量测定方法报道<sup>[11-12]</sup>,或其他二氢吡啶类对映体的拆分方法<sup>[13-14]</sup>,尚未有阿雷地平对映异构体拆分方法的相关文献报道。本文采用高效液相色谱法在正相条件下直接拆分阿雷地平对映异构体,所建立方法具有操作简便,灵敏度高,重复性好的特点。

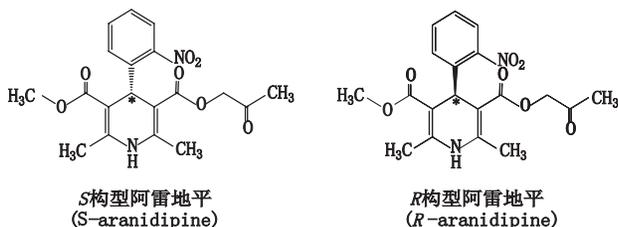


图 1 阿雷地平结构式

Fig. 1 Chemical structure of aranidipine

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱系统 (包括自动进样器、柱温箱、VWD 检测器、Agilent Chemstation

色谱数据工作站; Agilent 公司); Chiralcel OJ-H (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料: 硅胶表面涂敷有纤维素-三(4-甲基苯甲酸酯)); Daicel 公司) 色谱柱; CP-225D 电子天平 (Sartorius 公司)。

正己烷、乙醇为色谱纯。*S*-阿雷地平样品 (批号 20140522) 及阿雷地平外消旋体 (批号 20140113) 由江苏德源药业股份有限公司提供。*S*-阿雷地平及 *R*-阿雷地平对照品 (化学纯度分别为 99.97% 和 99.95%; 光学纯度 ≥ 99.96%) 由实验室自制。

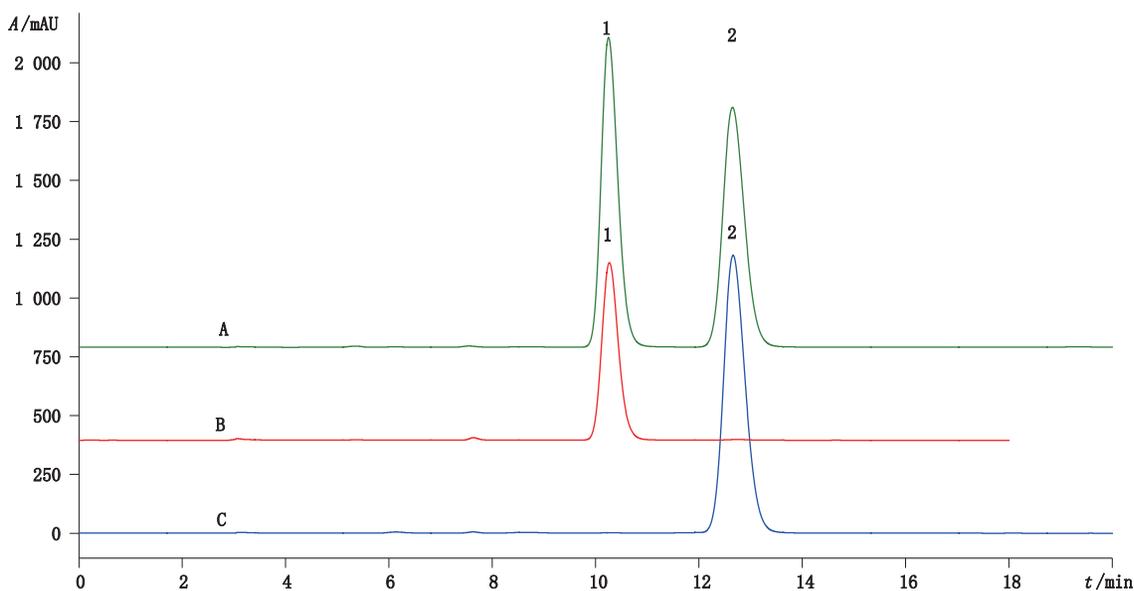
## 2 方法与结果

**2.1 溶液配制** 对照品溶液: 取 *R*-阿雷地平或 *S*-阿雷地平的对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品储备液; 精密移取对照品储备液适量, 加无水乙醇稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 μg 的溶液, 作为对照品溶液。分离度测试溶液: 取阿雷地平外消旋体约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇适量, 超声溶解, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。供试品溶液: 精密称取 *S*-阿雷地平样品约 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2 色谱条件** 色谱柱: Chiralcel OJ-H (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 正己烷-乙醇 (75:25); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 238 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

**2.3 分离度试验** 精密量取分离度测试溶液和对照品储备液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。典型色谱图见图 2。结果表明, 在选定的色谱条件下, *S*-阿雷地平峰与 *R*-阿雷地平峰能较好地分离, 分离度为 3.50; 理论板数分别为 4727 和 4277。

**2.4 检测限及定量限** 取 *S*-阿雷地平对照品及 *R*-阿雷地平对照品溶液用无水乙醇逐级稀释, 分别以基线噪声的 10 倍 ( $S/N \approx 10$ ) 和基线噪声的 3 倍 ( $S/N \approx 3$ ) 作为定量限和检测限。在选定的色谱条件下, *S*-阿雷地平的定量限为 0.8 ng, 检测限为 0.4 ng; *R*-阿雷地平的定量限为 0.8 ng, 检测限为 0.3 ng。



1. *R*-阿雷地平 (*R*-enantiomer of aranidipine,  $t_R=10.252$  min) 2. *S*-阿雷地平 (*S*-enantiomer of aranidipine,  $t_R=12.653$  min)

A. 阿雷地平消旋体溶液 (aranidipine racemate solution) B. *R*-阿雷地平对照品储备液 (*R*-aranidipine reference substance stock solution) C. *S*-阿雷地平对照品储备液 (*S*-aranidipine reference substance stock solution)

图2 阿雷地平对映体的拆分色谱图

Fig.2 Chromatograms of aranidipine enantiomeric separation

**2.5 线性关系考察** 分别精密称取 *S*-阿雷地平和 *R*-阿雷地平的对照品适量, 分别配制成 0.04、0.2、0.5、1.0、1.5 和 2.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 以质量浓度  $C$  为横坐标, 峰面积  $A$  为纵坐标绘制标准曲线, 得 *S*-阿雷地平和 *R*-阿雷地平的回归方程分别为:

$$A=59\,204C+2.154\,8 \quad r=0.999\,8$$

$$A=61\,971C-0.321\,4 \quad r=0.999\,9$$

结果表明, *R*-阿雷地平及 *S*-阿雷地平质量浓度均在 0.04~2.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内, 均呈良好的线性关系。 *R*-阿雷地平相对于 *S*-阿雷地平的校正因子为 1.05。

**2.6 回收率试验** 取 *S*-阿雷地平样品约 25 mg 共 9 份, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密加入 *R*-阿雷地平对照品溶液 (25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 0.5、1、2 mL 各 3 份, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试溶液; 另精密称取 *R*-阿雷地平对照品适量, 加无水乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.25、0.5 和 0.75  $\mu\text{g}$  的溶液, 作为对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件分析, 按外标法以峰面积计算, *R*-阿雷地平低、中、高 3 个浓度的回收率 ( $n=3$ ) 分别为 97.5%、98.5%、99.8%, RSD ( $n=9$ ) 为 1.5%。

**2.7 精密度试验** 精密称取 *S*-阿雷地平样品约 25 mg 共 6 份, 分别置 50 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并

稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。按“2.2”项下色谱条件分析, 以外标法以峰面积计算 *S*-阿雷地平中 *R*-阿雷地平浓度的 RSD ( $n=6$ ) 为 4.4%。按上述方法, 于次日、以另外一个分析人员在另一台 Agilent 1260 高效液相色谱仪器上重复操作, 计算 *S*-阿雷地平中 *R*-阿雷地平浓度的 RSD ( $n=12$ ) 为 4.6%。

**2.8 溶液稳定性考察** 取“回收率试验”项下 1 份中浓度供试溶液于室温下避光放置 0、2、4、8、12 h 后分别进样, 考察溶液稳定性。结果 12 h 内 *S*-阿雷地平和 *R*-阿雷地平峰面积的 RSD 分别为 0.041% 和 0.41%, 保留时间的 RSD 分别为 0.30% 和 0.23%, 表明供试溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.9 *S*-阿雷地平中 *R*-阿雷地平含量的测定** 取供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分析, 按外标法以峰面积计算 *R*-阿雷地平的含量, *S*-阿雷地平样品中 *R*-阿雷地平的含量为 0.08%。

### 3 讨论及结论

**3.1 溶剂的选择** 阿雷地平在正己烷中几乎不溶, 在无水乙醇中略溶<sup>[15]</sup>, 所以选择无水乙醇为溶剂。

**3.2 波长的选择** 取 *R*-阿雷地平用无水乙醇溶解并稀释制成 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 在 200~400 nm 波长范围内扫描, 最大吸收波长为 238 nm, 故选择 238 nm 为检测波长。

**3.3 流动相比对分离的影响** 将流动相中正己烷-乙醇的比例分别调整为 80:20、75:25 以及 70:30。结果显示,随着流动相中乙醇比例的增加,*R*-阿雷地平 和 *S*-阿雷地平的保留时间明显缩短,但两者的分离度由 3.50 变为 2.53。随着流动相中乙醇比例的降低,*R*-阿雷地平、*S*-阿雷地平的保留时间明显延长(分别为 13.234 min 和 16.812 min),造成有机溶剂的浪费。所以最终选择正己烷-乙醇(75:25)作为流动相。

**3.3 流速对分离的影响** 以正己烷-乙醇(75:25)为流动相,柱温 35 °C,调节流速为 0.8、1.0 和 1.2 mL·min<sup>-1</sup>,考察不同流速对阿雷地平对映异构体分离的影响时发现,随着流速降低,*R*-阿雷地平、*S*-阿雷地平的理论板数明显增加,保留时间明显延长(分别为 12.404 min 和 15.232 min),两者之间的分离度无明显变化;流速增加,分离度由 3.50 降低至 3.27,色谱系统压力由 4.43 MPa 增加至 5.24 MPa,不利于色谱柱的使用。因此选择 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 流速作为试验色谱条件。

**3.4 柱温对分离的影响** 以正己烷-乙醇(75:25)为流动相,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,调节柱温为 30、35 和 40 °C,结果发现温度的升高或降低对 *R*-阿雷地平 和 *S*-阿雷地平之间的分离度没有明显影响,但随着温度的升高,各成分色谱峰的理论板数会有所提高。从色谱柱使用寿命角度考虑,选择 35 °C 柱温作为试验色谱条件。

**3.5 小结** 本文建立了高效液相色谱法拆分测定 *S*-阿雷地平的 对映异构体,选定的 色谱分析方法灵敏度高、分离度好、操作简便,可有效分离 *R* 和 *S* 构型的阿雷地平,为进一步了解 *S* 构型的阿雷地平奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] OHNO S, KOMATSU O, MIZUKOSH IK, *et al.* Synthesis of asymmetric 4-aryl-1, 4-dihydro-2, 6-dimethyl-3, 5-pyridinedicar-boxylates with vasodilating and antihypertensive activities[J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(4): 1589
- [2] KANDA A, HARUNO A, MIYAKE H, *et al.* Antihypertensive effects of MPC-1304, a novel calcium antagonist, in experimental hypertensive rats and dogs[J]. *J Cardiovasc Pharm*, 1992, 20(5): 723
- [3] MIYOSHI K, KANDA A, MIYAKE H, *et al.* MPC-1304, another type of dihydropyridine, possessing highly potent vasodilating action [J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 238(2): 139
- [4] MASUMIYA H, TANAKA Y, TANAKA H, *et al.* Inhibition of T-type and L-type Ca<sup>2+</sup> currents by aranidipine, a novel dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> antagonist[J]. *Pharmacology*, 2000, 61(2): 57
- [5] IOAN P, CAROSATI E, MICUCCI M, *et al.* 1, 4-Dihydropyridine scaffold in medicinal chemistry, the story so far and perspectives (part 1): action in ion channels and GPCRs[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(32): 4901
- [6] WANG S, HE L, YUN B. The difference between nicardipine and its enantiomers on inhibiting vasoconstriction of isolated rabbit thoracic artery[J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(3): 319
- [7] JABOR VA, COELHO EB, LANCHOTE VL. Enantioselective pharmacokinetics of lercanidipine in healthy volunteers[J]. *J Chromatogr B*, 2004, 813(1): 343
- [8] ZHANG XP, LOKE KE, MITAL S, *et al.* Paradoxical release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R+ enantiomer of amlodipine[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(2): 208
- [9] OKUMURA K, ICHIHARA K, NAGASAKA M, *et al.* Calcium entry blocking activities of MPC-1304 and of its enantiomers and metabolites[J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 235(1): 69
- [10] 郭鹏程, 黄红林. 二氢吡啶类钙通道阻滞剂及其药物手性研究[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(1): 181
- [11] GUO PC, HUANG HL. Dihydropyridines calcium channel blockers and chiral drugs research[J]. *Prog Mod Biomed*, 2009, 9(1): 181
- [12] TIAN L, JIANG J, HUANG Y, *et al.* Determination of aranidipine and its active metabolite in human plasma by liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(19): 2871
- [13] HIDA Y, KINOUCI Y, TAKEICHI Y, *et al.* Simultaneous determination of a new dihydropyridine calcium antagonist (MPC-1304) and its metabolite in dog plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *J Chromatogr A*, 1991, 571(1-2): 277
- [14] 李成平, 曾怀超, 鲁琳, 等. 二氢吡啶钙拮抗剂马尼地平和西尼地平对映体的手性拆分研究[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(4): 661
- [15] LI CP, ZENG HC, LU L, *et al.* Study on the chiral resolution of dihydropyridine calcium antagonists manidipine and cilnidipine enantiomers[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(4): 661
- [16] 方应国, 丁潇潇, 严小平, 等. 非洛地平 和 尼莫地平 对映体的手性拆分研究[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(10): 1762
- [17] FANG YG, DING XX, YAN XP, *et al.* Study on chiral resolution of felodipine and nimodipine enantiomers[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(10): 1762
- [18] 赵蕊. 阿雷地平的合成研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2011
- [19] ZHAO R. Synthesis of Aranidipine [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2011

(本文于 2016 年 7 月 4 日收到)