

杜鹃素对映体的分离及其在中药材中的含量测定

晏堂, 楼丽, 张苏霞, 余丽双, 刘永静^{*}(福建中医药大学药学院, 福州 350000)

摘要: 目的 建立杜鹃素对映体分离的 HPLC 方法, 并应用于满山红和照山白药材中的对映体含量测定。方法 用 HPLC 对杜鹃素对映体进行拆分, 优化手性柱种类、流动相比例、流速和柱温的色谱条件。对手性热力学拆分进行探讨, 计算杜鹃素对映体在色谱柱分离的焓变、熵变、焓变差值和熵变差值等热力学参数。并在最佳分离条件测定了满山红和照山白 2 种药材中 2 个对映体的含量。结果 确定了杜鹃素的 2 个对映体的最佳分离条件: 色谱柱为 Chiralcel OJ-RH(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 乙腈-水 (40:60) 为流动相等度洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 检测波长为 295 nm。在最佳分离条件下, 杜鹃素对映体的分离度达到 1.5, 表明杜鹃素的 2 个对映体能够完全分离。当柱温为 20~35 °C 时, 分离因子随着温度的升高呈降低趋势, 2 个对映体的 $\ln\alpha$ 与 $1/T$ 呈良好的线性关系, 手性拆分过程受焓的控制。将所建立的杜鹃素对映体分离方法应用于中药材满山红、照山白中的杜鹃素对映体含量测定, 杜鹃素的 2 个对映体线性范围分别为 0.718~57.44 μg·mL⁻¹ 和 1.28~102.24 μg·mL⁻¹, 在 3 个批次的满山红中杜鹃素的 2 个对映体的平均含量分别为 0.228 2 和 0.466 2 mg·g⁻¹; 3 个批次的照山白中杜鹃素的 2 个对映体的平均含量分别为 0.416 8 和 0.707 3 mg·g⁻¹。结论 该方法简便高效, 适用于中药中杜鹃素对映体的含量测定。

关键词: 杜鹃素; 对映体; 高效液相色谱法; 满山红; 照山白; 含量测定; 手性分离

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)01-0080-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20224177

引用本文: 晏堂, 楼丽, 张苏霞, 等. 杜鹃素对映体的分离及其在中药材中的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 80-87.

Separation of Farrerol Enantiomers and Its Content Determination in Chinese Materia Medica

YAN Tang, LOU Li, ZHANG Suxia, YU Lishuang, LIU Yongjing^{*}(School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the separation of enantiomers of farrerol, and apply it to the determination of the content of enantiomers in *Rhododendri Daurici Folium* and *Rhododendron Micranthum*. **METHODS** HPLC was used to separate the farrerol enantiomers, and the chromatographic conditions of chiral column type, mobile phase ratio, flow rate, and column temperature were optimized. The thermodynamic separation of farrerol enantiomers was discussed. Thermodynamic parameters such as enthalpy change, entropy change, enthalpy change and entropy change were calculated. And the contents of two enantiomers in *Rhododendri Daurici Folium* and *Rhododendron Micranthum* were determined under the optimum resolution conditions. **RESULTS** The optimum separation conditions for two enantiomers of farrerol were determined as follows: Chiralcel OJ-RH(4.6 mm×150 mm, 5 μm), equilibrium elution of acetonitrile-water(40:60), the flow rate of 0.5 mL·min⁻¹, the column temperature of 25 °C, and the detection wavelength of 295 nm. Under the optimum separation conditions, the resolution of farrerol enantiomers reached 1.5, indicating that the two enantiomers of the farrerol could be completely separated. When the column temperature was between 20 °C and 35 °C, the separation factor decreased with the increase of temperature. The $\ln\alpha$ of the two enantiomers of farrerol showed a good linear relationship with $1/T$, and the chiral resolution process was controlled by enthalpy. The enantiomer separation method of farrerol was applied to the determination of farrerol enantiomer in Chinese medicinal materials of *Rhododendri Daurici Folium* and *Rhododendron Micranthum*. The linear relationship between the two enantiomers of farrerol were good in the range of 0.718~57.44 μg·mL⁻¹ and 1.28~102.24 μg·mL⁻¹, respectively. And the contents of the two enantiomers of farrerol in *Rhododendri Daurici Folium* were 0.228 2 and 0.466 2 mg·g⁻¹, respectively. And the contents of the two enantiomers of farrerol in *Rhododendron Micranthum* were 0.416 8 and 0.707 3 mg·g⁻¹, respectively. **CONCLUSION** This method is simple, efficient and suitable for the determination of farrerol enantiomers in traditional Chinese medicine.

KEYWORDS: farrerol; enantiomers; HPLC; *Rhododendri Daurici Folium*; *Rhododendron Micranthum*; content determination; chiral resolution

杜鹃素 (Farrerol) 是从满山红 (*Rhododendron dauricum* L.) 及照山白 (*Rhododendron micranthum*

Turcz.) 等杜鹃属植物中提取的一种重要的活性成分, 其结构中含有一个手性中心, 具有一对对映

作者简介: 晏堂, 女, 硕士生 E-mail: 1621145481@qq.com

^{*}通信作者: 刘永静, 女, 博士, 副教授 E-mail: 24168245@qq.com

体, 结构式见图 1。作为二氢黄酮类化合物, 杜鹃素具有止咳祛痰等作用, 在临床上常用于治疗慢性气管炎所致的痰多黏稠等疾病^[1]。现代药理研究表明, 杜鹃素具有抗氧化、抑制肺腺癌细胞、改善慢性肾脏疾病和抗肝毒性^[2-6]等多种功效。

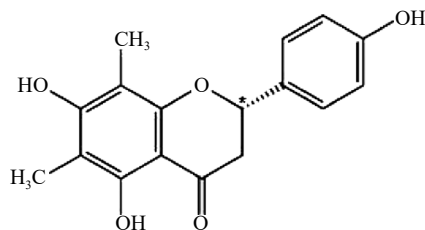


图 1 杜鹃素的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of farrerol

手性药物是指分子结构中存在手性中心的药物, 其在空间立体结构上的巨大差异导致对映异构体的药动学和药效学特征各不相同, 并且 2 个对映体在治疗疾病时具有不同的药理学特征^[7]。手性药物的分离对于临床用药安全和药物开发都具有重大的意义。

由于手性药物结构相同, 对其进行手性分离难度也较大, 但随着近年来手性药物的发展, 手性分离技术也发展迅速, 目前常用于手性分离的方法有 HPLC、毛细管电泳法和高速逆流色谱法等。文献报道了使用高速逆流色谱法对杜鹃素对映体进行分离^[8], 但是存在难于寻找合适的手性选择剂等缺点, 而 HPLC 可以避免这些缺点。HPLC 分为直接法和间接法, 直接法是将不对称中心引入分子间, 包括手性固定相法和手性流动相添加剂法^[9-11]; 间接法又称手性试剂衍生法, 它与直接法所不同的地方在于它是将不对称中心引入到分子内部。而手性固定相法相比手性流动相添加剂法, 具有前处理简单和可选择的固定相种类多等优点。纤维素键合型^[12-15]和直链淀粉衍生物型^[16-17]都属于多糖类手性固定相, 是应用最为广泛的一类手性固定相, 其空间结构高度有序, 具有光学活性和螺旋空穴结构的天然高分子, 存在大量的手性识别位点。大环糖肽类抗菌药物^[18-19]是目前较为成功的大环抗生素类手性选择剂, 包括瑞斯托菌素 A、替考拉宁、万古霉素及其衍生物等, 可与手性药物产生离子相互作用, 适用于中性、极性和可电离化合物的分离。

目前杜鹃素以外消旋体形式在市面上使用, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 对手性新药的研制和开发的指导原则中指出, 以外消旋体使用的

新药必须要进行单一对映体的体内过程、药理学活性和毒性的研究, 而进行对映体体内过程研究的基础是建立高效的对映体分离分析方法。因此本研究采用手性固定相—HPLC 对杜鹃素对映体分离分析方法进行研究, 为进一步制备单一对映体、深入探究杜鹃素对映体的疗效、药理和毒性差异提供理论实验支持。

本实验考察多种手性固定相对杜鹃素对映体的拆分能力, 优化流动相比比例、流速和柱温等分离条件, 提高分离效率; 进一步对手性拆分热力学研究进行探讨, 探究柱温对分离的影响, 并尝试将建立的分离方法应用于中药材满山红和照山白中的杜鹃素对映体含量测定, 为中药材的质量标准提供理论依据。

1 仪器与试剂

LC-2030 高效液相色谱仪、Shimadzu UV-2700i 紫外可见分光光度计 (日本岛津); XS205 十万分之一电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 手性 Chiralcel O、Chiralpak A 系列色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm, 大赛璐药物手性技术上海有限公司); 手性 Astec Chirobiotic™TAG 色谱柱 (美国 Supelco 公司)。

杜鹃素对照品 (外消旋体, 成都普思生物有限公司, 批号: PS010613; 纯度 ≥99.0%); 满山红和照山白药材购于江苏南京, 每种药材各 3 个批次 (满山红批号为 PY20220505、PY20220510 和 PY20220515, 照山白批号为 PY20220705、PY20220710 和 PY20220715), 经福建中医药大学药学院黄泽豪教授鉴定为杜鹃花科杜鹃花属植物满山红 (*Rhododendron dauricum* L.) 和照山白 (*Rhododendron micranthum* Turcz.) 的叶; 乙腈与甲醇 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取杜鹃素对照品 10.08 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制备得浓度为 1.008 mg·mL⁻¹ 的储备液。精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 分别取满山红和照山白药材, 粉碎, 过 5 号筛, 即得药材细粉。精密

称取各药材细粉约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 15 min, 放冷, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加 60% 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

采用 Chiralcel OJ-RH 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 用水-乙腈 (60 : 40) 作为流动相洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长为 295 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取对照品溶液、满山红和照山白供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定。结果显示, 以杜鹃素对照品计算理论板数 ≥ 2 500, 供试品溶液与混合对照品溶液在相同保留时间处有相应色谱峰, 空白溶剂无明显干扰, 表明该方法专属性良好。结果见图 2。

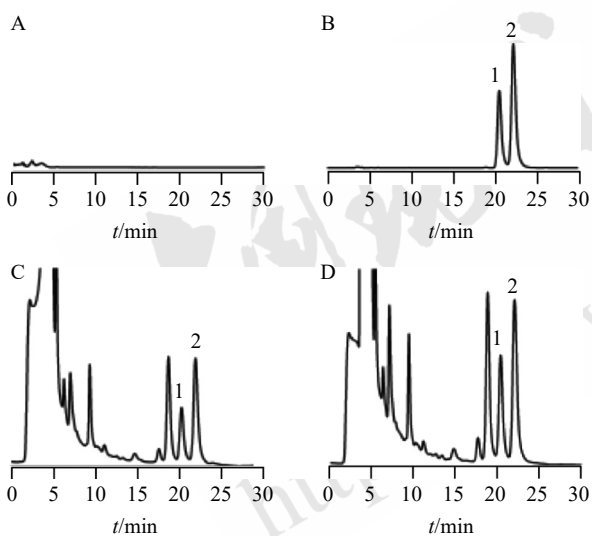


图 2 专属性试验的 HPLC 色谱图

A-空白; B-杜鹃素对照品溶液; C-满山红供试品溶液; D-照山白供试品溶液; 1-杜鹃素对映体第 1 个流出峰, 以杜鹃素构型 1 表示; 2-杜鹃素对映体第 2 个流出峰, 以杜鹃素构型 2 表示。

Fig. 2 HPLC chromatogram of specific test

A-blank; B-farrerol reference substance; C-Rhododendri Daurici Folium test solution; D-Rhododendron Micranthum test solution. 1 was the first outflow peak of the rhododendron enantiomer, represented by rhododendron configuration 1; 2 was the second outflow peak of the rhododendron enantiomer, denoted by rhododendron configuration 2.

2.3.2 线性与范围 精密称取杜鹃素对照品 4.99 mg 于 25 mL 量瓶中, 用甲醇适量溶解并稀释到刻度, 即得浓度为 0.199 6 mg·mL⁻¹ 的储备液。

精密吸取 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL 对照品储备液, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度分别为 2.00, 9.98, 19.96, 39.92, 79.84, 119.76, 159.68 μg·mL⁻¹ 的旋体杜鹃素溶液, 相当于杜鹃素构型 1 的系列浓度为 0.72, 3.59, 7.18, 14.36, 28.72, 43.08, 57.44 μg·mL⁻¹, 杜鹃素构型 2 的系列浓度为 1.28, 6.39, 12.78, 25.56, 51.12, 76.68, 102.24 μg·mL⁻¹ (杜鹃素构型 1 和构型 2 的浓度以峰面积归一化法按其外消旋体的 35.97% 和 64.03% 计)。精密吸取系列浓度对照品溶液各 10 μL, 按“2.2”项下条件下进样, 测得杜鹃素构型 1 和构型 2 的峰面积。以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。得构型 1 和构型 2 的线性回归方程为 $y=35\ 443x-30\ 845(r=0.999\ 9)$ 和 $y=55\ 374x-57\ 738(r=0.999\ 8)$, 所得结果表明杜鹃素构型 1 与构型 2 在质量浓度为 0.718~57.44 μg·mL⁻¹ 和 1.28~102.24 μg·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.3.3 仪器精密度试验 取杜鹃素对照品溶液, 连续进样 6 次, 构型 1 和构型 2 峰面积的 RSD 均为 1.02%; 迁移时间的 RSD 分别为 0.078% 和 0.077%; 分离度的 RSD 为 0.13%。说明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取新配制的满山红和照山白供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 测得满山红中构型 1 和构型 2 的 RSD 值分别为 1.78% 和 0.61%。照山白中构型 1 和构型 2 的 RSD 值分别为 0.60% 和 0.24%。说明所配制的满山红和照山白供试品溶液在 0~24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 按“2.1.2”项下方法分别制备满山红和照山白供试品各 6 份, 结果显示, 满山红中构型 1 和构型 2 含量的 RSD 分别为 1.44% 和 2.39%。照山白中构型 1 和构型 2 含量的 RSD 分别为 1.92% 和 0.97%, 说明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 称取 0.5 g 满山红和照山白药材各 6 份, 精密称定, 精密量取质量浓度为 0.376 mg·mL⁻¹ 和 0.562 mg·mL⁻¹ 的杜鹃素对照品溶液 1 mL, 使样品中杜鹃素构型 1 和构型 2 的含量与加入的对照品量相同, 按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液, 分别进样测定, 结果见表 1。满山红中杜鹃素构型 1 和构型 2 的回收率分别为 98.56% 和 98.11%, RSD 分别为 2.43% 和 1.29%。

表 1 满山红和照山白的加样回收试验结果 (n=6)

Tab. 1 Samples recovery test results of Rhododendri Daurici Folium and Rhododendron Micranthum(n=6)

供试品	取样量/g	含量/ μg		对照品加入量/ μg		测得量/ μg		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
		构型1	构型2	构型1	构型2	构型1	构型2	构型1	构型2	构型1	构型2	构型1	构型2
满山红	0.502 6	114.7	234.3	181.0	195.0	290.7	425.4	97.22	98.00	98.56	98.11	2.43	1.29
	0.504 8	115.2	235.3	181.0	195.0	293.1	424.0	98.26	96.73				
	0.505 0	115.2	235.4	181.0	195.0	292.0	424.5	97.67	96.98				
	0.500 9	114.3	233.5	181.0	195.0	294.2	429.0	99.40	100.24				
	0.509 6	116.3	237.6	181.0	195.0	290.0	428.8	95.95	98.06				
	0.501 1	114.4	233.6	181.0	195.0	300.5	425.9	102.86	98.62				
照山白	0.501 0	208.8	354.4	271.1	290.9	470.0	629.3	96.34	94.52	98.31	96.71	2.48	1.50
	0.501 8	209.2	354.9	271.1	290.9	478.5	633.8	99.34	95.87				
	0.501 2	208.9	354.5	271.1	290.9	473.6	634.6	97.65	96.28				
	0.502 2	209.3	355.2	271.1	290.9	481.8	641.7	100.52	98.47				
	0.501 0	208.8	354.4	271.1	290.9	482.9	639.5	101.10	98.01				
	0.501 3	208.9	354.6	271.1	290.9	466.2	637.0	94.90	97.08				

照山白中构型 1 和构型 2 的回收率分别为 98.31% 和 96.71%，RSD 分别为 2.48% 和 1.50%，说明加样回收率结果良好。

2.4 样品测定

分别取 3 个不同批次的满山红和照山白药材，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.2”项下色谱条件测定峰面积，计算样品中构型 1 和构型 2 的含量。结果显示，满山红药材所得 3 个批次的构型 1 的平均含量为 $0.228 2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，RSD 为 2.20%；构型 2 的平均含量为 $0.466 2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，RSD 为 2.03%。照山白药材所得 3 个批次构型 1 的平均含量为 $0.416 8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，RSD 为 0.67%；构型 2 的平均含量为 $0.707 3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ，RSD 为 0.52%。结果见表 2。

2.5 手性拆分热力学研究

根据柱温对杜鹃素对映体拆分效果的影响结果，进一步建立色谱数据与柱温之间的关系，探究在拆分过程中对映体与固定相间手性识别过程中产生的微观相互作用。化合物保留时间、分离

因子的自然对数与绝对温度倒数 $1/T$ 三者之间的关系可用于描述分离温度对手性拆分的影响。焓变是一种重要的物理量，可以用来衡量热力学过程的变化，并反映化学反应的程度，如果对映体拆分过程受焓变控制，则温度的降低有利于对映体的拆分；如果对映体拆分过程受熵变控制，则温度的升高有利于对映体的拆分。可用范特霍夫 (Van't Hoff) 方程和吉布斯-亥姆霍兹 (Gibbs-Helmholtz) 方程表示色谱数据与热力学参数之间的关系，即：

$$\ln k = -\Delta H/RT + \Delta S/R + \ln \varnothing$$

$$\ln \alpha = -\Delta \Delta G/RT = -\Delta \Delta H/RT + \Delta \Delta S/R。$$

其中， k 为容量因子； α 为分离因子； R 为气体常数； T 为绝对温度； \varnothing 为流动相中乙腈与水间的体积比值； ΔH 、 ΔS 分别为杜鹃素 2 个对映体在流动相与固定相间分配过程中的焓变和熵变， ΔH 越负表明溶质与固定相的作用力越强，固定相的结合在能量上更有利； ΔS 值越负，说明自由度降低越

表 2 满山红和照山白的样品测定结果 (n=3)

Tab. 2 Determination results of Rhododendri Daurici Folium and Rhododendron Micranthum(n=3)

样品	批号	取样量/g	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		RSD/%	
			构型1	构型2	构型1	构型2	构型1	构型2
满山红	PY20220505	1.002 1	0.227 3	0.477 1	0.228 2	0.466 2	2.20	2.03
	PY20220510	1.028 9	0.233 6	0.460 3				
	PY20220515	1.004 3	0.223 7	0.461 2				
照山白	PY20220705	1.003 7	0.413 6	0.711 2	0.416 8	0.707 3	0.67	0.52
	PY20220710	1.004 8	0.418 8	0.704 3				
	PY20220715	1.001 7	0.418 0	0.705 4				

多, 分子总体变得更有序。 $\Delta\Delta H$ 、 $\Delta\Delta S$ 为杜鹃素2个对映体在流动相与固定相间分配过程中的焓变与熵变之差, 即自由能($-\Delta\Delta G$)差异, 表现了2个对映体的分离能力, 有助于解释2个对映体间的手性识别作用。

柱温的改变, 不仅会影响杜鹃素的2个对映体在固定相上吸附、解吸的速率, 还会影响保留因子、分离因子和分离度, 甚至还可能导致手性固定相的构型发生变化, 从而影响对映体溶质与固定相之间的相互作用。分别以 $\ln k$ 和 $\ln\alpha$ 对绝对温度的倒数 $1/T$ 作图, 所得的曲线均应呈直线, 其斜率分别为 $-\Delta H/R$ 和 $-\Delta\Delta H/R$ 。在实验温度下, 以 $1/T \times 10^3$ 为横坐标(x), $\ln\alpha$ 和 $\ln k$ 为纵坐标(y)作Van't Hoff线性回归图, 结果见图3。杜鹃素对映体在手性柱上拆分的Van't Hoff图线性关系较好, 线性方程分别为 $y=0.106 2x-0.263 1$ 和 $y=1.368 1x- 2.159 1$, 线性系数 R^2 分别为0.994 0和0.998 8, 均 >0.95 , 说明根据Van't Hoff图求得的热力学参数的数值在本实验温度范围内为定值, 在拆分过程中固定相的构型未发生改变, 杜鹃素对映体的保留机制和选择作用也未发生变化。

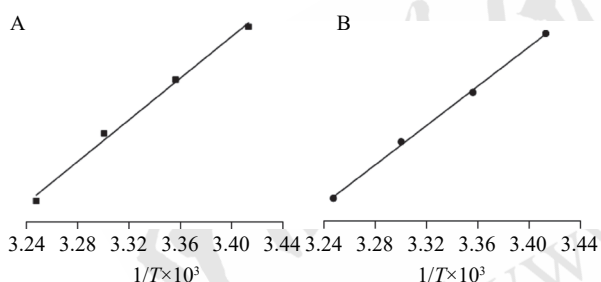


图3 杜鹃素对映体拆分的Van't Hoff图
A- $\ln\alpha$ 对温度作图; B- $\ln k$ 对温度作图。

Fig. 3 Van't Hoff diagram of farrerol enantiomer resolution
A- $\ln\alpha$ plot the temperature; B- $\ln k$ plot the temperature.

根据公式与图3计算对映体的焓变之差 $\Delta\Delta H$ 为 $-806.24 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, 熵变之差 $\Delta\Delta S$ 为 $-1.93 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta\Delta H$ 与 $\Delta\Delta S$ 均为负值, 则说明杜鹃素的对映体拆分过程受焓变控制, 温度的降低利于对映体的拆分, 这与杜鹃素的分离中柱温的考察结果一致, 杜鹃素对映体的分离度随着温度的降低而逐渐增加。

由于熵焓相互抵消的性质而存在一个转折温度点 T_{iso} , 即 $\Delta\Delta G=0$, $T_{iso}=\Delta\Delta H/\Delta\Delta S$, 计算得 $T_{iso}=417.74 \text{ K}$, 说明当温度 $>417.74 \text{ K}$ ($\approx 145 \text{ }^\circ\text{C}$)时, 对映体将不能被拆分。而本实验的温度考察

范围为 $20\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$, $<145 \text{ }^\circ\text{C}$, 此范围内杜鹃素均能够被拆分, 与计算结果相符合。

一般认为当 $\Delta\Delta H$ 差值 $>500 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 对映体间即能实现基线分离, 杜鹃素对映体间实际焓差 $\Delta\Delta H$ 为 $-806.24 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, 因此杜鹃素对映体能够在 $20\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 实现基线分离。从杜鹃素对映体的分离过程来看, 能够实现较好的分离是由于杜鹃素对映体与手性固定相间的微观相互作用, 手性固定相中的氨基甲酸酯基, 作为分离过程中最重要的手性吸附点, 结构中含有 $\text{C}=\text{O}$ 、 NH 等基团, 可以与对映体中的羟基产生强烈的氢键作用。并且 $\text{C}=\text{O}$ 还可与对映体间发生偶极-偶极作用, 从而对杜鹃素的2个对映体产生了不同的手性识别能力。从热力学的角度来看, 杜鹃素的对映体与固定相间可生成非对映络合物, 2个对映体分别形成的非对映体络合物具有不同的能焓, 能焓越大, 则络合物在固定相上的保留作用越强, 进一步影响2个对映体在固定相上的洗脱顺序, 并最终实现分离。 $\Delta\Delta S$ 的值表现了对映体与固定相相互作用过程中的熵变情况, 熵变能反映对映体与固定相之间的络合作用, 熵变越大, 说明杜鹃素对映体与固定相间的络合作用越强, 固定相中存在的有序结构可以被对映体结合得更加充分, 在这种情况下对映体越能被拆分完全。 $\Delta S/R$ 的值为 -2.1578 , 说明分离过程中2个对映体的自由度较低, 在低温下对映体的分离可自发进行。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

3.1.1 检测波长的选择 使用紫外可见分光光度计对杜鹃素对映体溶液进行扫描得到 $200\sim 400 \text{ nm}$ 的紫外光谱图。结果显示, 在 295 nm 处有较明显的吸收峰, 345 nm 和 352 nm 处具有较平缓的吸收。其中 345 nm 和 352 nm 吸收较弱, 295 nm 处的吸收最强, 灵敏度相对较高, 且在该波长下杜鹃素对映体出峰处干扰较少, 因此选择 295 nm 作为实验的检测波长。

3.1.2 不同手性柱的考察 选择了3种不同的反相涂敷型手性柱, 即直链淀粉衍生物型手性固定相(Chiralpak AS-RH、Chiralpak AD-RH)、纤维素衍生物型手性固定相(Chiralcel OJ-RH、Chiralcel OZ-RH)和大环糖肽键合固定相(ChirobioticTM TAG), 考察杜鹃素2个对映体的分离情况, 结果见图4。对映体分离情况显示, 杜鹃素对映体在不

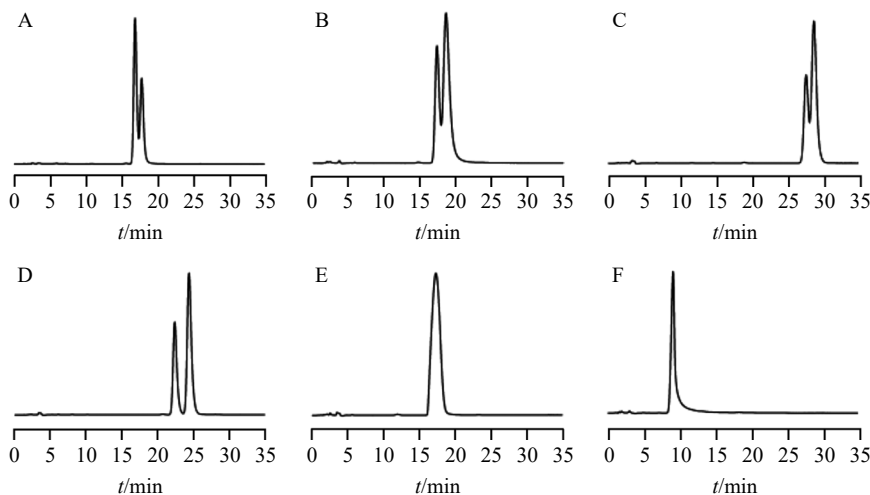


图4 不同手性柱的高效液相色谱图

A-Chiralpak AS-RH; B-Chiralpak AD-RH; C-Chiralcel OD-RH; D-Chiralcel OJ-RH; E-Chiralcel OZ-RH; F-Chirobiotic™TAG。

Fig. 4 HPLC chromatograms with different chiral columns

A-Chiralpak AS-RH; B-Chiralpak AD-RH; C-Chiralcel OD-RH; D-Chiralcel OJ-RH; E-Chiralcel OZ-RH; F-Chirobiotic™TAG.

同手性固定相柱子上的分离有较大差异，其中在纤维素衍生物型手性柱上分离度最好；在直链淀粉衍生物型手性柱上分离度次之；而在大环糖肽键合固定相手性柱上无法将杜鹃素的2个对映体分离，见表3。由结果可知，杜鹃素对映体在手性柱 Chiralcel OJ-RH 上分离度最大，峰形尖锐，因此选择 Chiralcel OJ-RH 为杜鹃素对映体分离的固定相。

表3 固定性种类对杜鹃素对映体拆分的影响

Tab. 3 Effect of fixed species on resolution of farrerol enantiomers

固定相种类	保留时间(t_R)/min		容量因子(k')		分离因子(α)	分离度(R_s)
	t_1	t_2	k'_1	k'_2		
Chiralpak AS-RH	16.892	17.812	11.031	11.686	1.059	1.079
Chiralpak AD-RH	17.311	18.584	10.250	11.078	1.081	0.938
Chiralcel OD-RH	27.669	28.770	18.743	19.529	1.042	0.875
Chiralcel OJ-RH	22.363	24.365	10.196	11.198	1.098	1.972
Chiralcel OZ-RH	17.286		13.334		-	0
Chirobiotic™TAG	9.150		6.856		-	0

实验结果表明，在手性柱内径和填料粒径一致时，直链淀粉型和纤维素型手性固定相色谱柱对杜鹃素对映体具有手性拆分作用，但是在大环糖肽键合型手性固定相色谱柱上无分离作用。其拆分机制可能为杜鹃素对映体的官能团能与固定相上的手性空腔相互作用，通过“三点作用”方式进行手性识别。前两者手性柱中的填料和杜鹃素可能更好地吸附与解吸，而硅胶表面涂敷大环糖肽键合固定相型类的手性柱与杜鹃素的结合作

用较弱，在此条件下对杜鹃素对映体的分离作用较弱。在分离条件一致的情况下，杜鹃素结构中的羟基与硅胶表面涂敷纤维素型的固定相相对于直链淀粉型固定相更容易形成氢键作用力，利于产生“三点作用”，导致2个对映体在 Chiralcel O 系列手性柱上比 Chiralpak A 系列手性柱保留时间更加长，拆分效果也更好。

3.1.3 流动相比比例考察 本实验选择流动相为乙腈和水，分别考察了乙腈比例为35%~50%的条件下对杜鹃素对映体的分离情况。实验结果表明，随着乙腈比例的增加，杜鹃素对映体的保留时间逐渐变短，而药物与手性柱中固定相进行相互作用的时间变短，因此分离度和分离因子均逐渐降低。综合考虑保留时间与分离度，选择乙腈-水(40:60)为最佳流动相比比例，见表4。

表4 流动相比比例对杜鹃素对映体拆分的影响

Tab. 4 Effect of mobile phase ratio on resolution of farrerol enantiomer

乙腈比例/%	保留时间(t_R)/min		容量因子(k')		分离因子(α)	分离度(R_s)
	t_1	t_2	k'_1	k'_2		
35	41.459	45.655	36.957	40.799	1.104	2.288
40	22.363	24.365	10.332	11.347	1.098	1.972
45	14.087	15.176	5.879	6.411	1.090	1.664
50	9.947	10.590	3.326	3.605	1.084	1.332

3.1.4 流速的考察 优化了流动相流速为0.4, 0.5, 0.6 mL·min⁻¹时对杜鹃素对映体分离的影响。结果显示，随着流动相流速的增加，保留时间逐渐缩短，分离度也呈现下降的趋势，当流速为

0.4 mL·min⁻¹ 时分离度最大, 但是保留时间相对较长, 3 种流速的分离因子相近, 说明流速的变化对于分离因子的影响不大。由此可见, 减少流速虽然能够增加分离度, 但是也会造成出峰时间延长和色谱峰拖尾等不利影响。综合考虑, 选择流速 0.5 mL·min⁻¹ 为最佳流速。结果见表 5。

表 5 流速对杜鹃素对映体拆分的影响

Tab. 5 Effect of flow rate on resolution of farrerol enantiomers

流速/ mL·min ⁻¹	保留时间(<i>t_R</i>)/min		容量因子(<i>k'</i>)		分离因子(α)	分离度(<i>R_s</i>)
	<i>t</i> 1	<i>t</i> 2	<i>k'</i> 1	<i>k'</i> 2		
0.4	28.152	30.669	10.156	11.154	1.098	2.054
0.5	22.642	24.670	10.332	11.347	1.096	1.982
0.6	18.635	20.301	10.177	11.176	1.098	1.871

3.1.5 柱温的考察 本实验考察了色谱柱温分别为 20, 25, 30, 35 °C 对杜鹃素对映体分离的影响。结果显示, 随着柱温的增加, 保留时间缩短, 分离度逐渐减小, 分离因子逐渐降低。因此, 综合考虑选择柱温为 25 °C 作为拆分杜鹃素对映体的最佳分离条件, 见表 6。

表 6 柱温对杜鹃素对映体拆分的影响

Tab. 6 Effect of column temperature on resolution of farrerol enantiomers

柱温/ °C	保留时间(<i>t_R</i>)/min		容量因子(<i>k'</i>)		分离因子(α)	分离度(<i>R_s</i>)
	<i>t</i> 1	<i>t</i> 2	<i>k'</i> 1	<i>k'</i> 2		
20	24.107	26.413	11.160	12.323	1.104	2.033
25	22.642	24.670	10.332	11.347	1.098	1.932
30	21.104	22.864	9.705	10.598	1.092	1.799
35	19.745	21.169	8.843	9.790	1.081	1.649

综上所述, 杜鹃素对映体分离的最佳条件为 Chiralcel OJ-RH 色谱柱, 流动相为乙腈-水 (40 : 60) 等度洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 检测波长为 295 nm。在此条件下, 杜鹃素对映体的分离度为 1.902, 达到完全分离, 色谱图见图 5。在最佳色谱条件下分离杜鹃素对映体, 重复进样 3 次测定峰面积, 杜鹃素的 2 个对映体的保留时间和峰面积的 RSD 均 < 1.5%, 说明该方法的重复性良好, 结果见表 7。

4 小结

本研究首次使用手性色谱柱在 HPLC 下成功拆分了杜鹃素对映体, 同时考察了不同色谱柱、流动相比比例、流速和柱温对杜鹃素对映体拆分的影响。固定相为氨基甲酸酯基的 Chiralcel OJ-RH

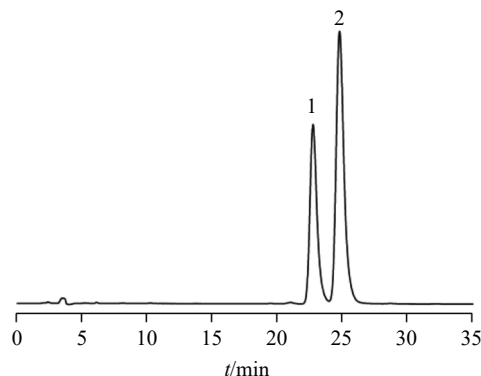


图 5 杜鹃素对照品的 HPLC 色谱图

1-杜鹃素构型 1; 2-杜鹃素构型 2。

Fig. 5 HPLC chromatogram of farrerol reference substance

1-farrerol enantiomer 1; 2-farrerol enantiomer 2.

表 7 杜鹃素 2 个对映体的方法重复性测定结果 (*n*=3)

Tab. 7 Repeatability test results of two enantiomers of rhododendron (*n*=3)

成分	峰面积	RSD/%
杜鹃素构型 1	1 669 195	0.07
	1 667 856	
	1 666 863	
杜鹃素构型 2	2 955 550	0.11
	2 951 499	
	2 949 238	

色谱柱, 其手性固定相上的 C=O、NH 基团可与杜鹃素对映体中的羟基基团和苯环形成偶极-偶极作用和 π - π 共轭作用, 大大增强了手性识别作用, 可以使 2 个对映体完全分离。本研究在最佳优化分离条件下, 建立了满山红和照山白药材中杜鹃素对映体的含量测定方法。结果表明, 该方法分离效果好, 可为今后杜鹃素对映体在生物样品中的检测和药理学立体选择性差异等研究提供分离分析方法。

REFERENCES

- [1] 沈阳部队后勤部卫生部. 东北常用中草药手册[M]. 沈阳: 辽宁省新华书店, 1970: 79
- [2] MA N, YANG X L, QI C, et al. Farrerol enhances Nrf2-mediated defense mechanisms against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human retinal pigment epithelial cells by activating Akt and MAPK[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021(2021): 8847844.
- [3] QIN X J, XU X R, HOU X M, et al. The pharmacological properties and corresponding mechanisms of farrerol: A comprehensive review[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 9-16.
- [4] GUO Y, LI Q, XIA R M, et al. Farrerol exhibits inhibitory effects on lung adenocarcinoma cells by activating the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *J Biochem Mol Toxicol*,

- 2022, 36(10): e23157.
- [5] MA N, WEI Z T, HU J Q, et al. Farrerol ameliorated cisplatin-induced chronic kidney disease through mitophagy induction via Nrf2/PINK1 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021(12): 768700.
- [6] JAYASURIYA R, DHAMODHARAN U, ALI D, et al. Targeting Nrf2/Keap1 signaling pathway by bioactive natural agents: Possible therapeutic strategy to combat liver disease[J]. *Phytomedicine*, 2021(92): 153755.
- [7] GANDHI K, SHAH U, PATEL S. Drug stereochemistry: A prodigy for pharmacology and drug development[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2020, 17(5): 565-573.
- [8] HAN C, WANG W L, XUE G M, et al. Metal ion-improved complexation countercurrent chromatography for enantioseparation of dihydroflavone enantiomers[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1532): 1-9.
- [9] WU X L, JIANG J F, QIN L J, et al. Discussion on the research progress of chiral drug resolution technology[J]. *Strait Pharm J(海峡药学)*, 2014, 26(7): 11-16.
- [10] DAN M J, HE P, ZHAO Y, et al. Concepts, techniques and developments for analysis of chiral drugs by liquid chromatography[J]. *Chin Termino(中国科技术语)*, 2016, 18(3): 62-64.
- [11] ZHAN S Q, YANG Y, ZHANG D M, et al. Separation of pioglitazone enantiomers by HPLC with chiral mobile phase additives[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2010, 21(33): 3156-3157.
- [12] DING Z C, SHI Y W, ZHANG M Y, et al. Enantiomorph of cetirizine hydrochloride by HPLC method with cellulose derivative chiral stationary phase[J]. *Pharm Care Res(药学服务与研究)*, 2018, 18(3): 192-194.
- [13] CANTATORE C, BERTOCCHI P, ORSI D D, et al. Enantioselective HPLC analysis of escitalopram oxalate and its impurities using a cellulose-based chiral stationary phase under normal- and green reversed-phase conditions[J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(5): 1059-1066.
- [14] FERRETTI R, ZANITTI L, CIRILLI R. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of chiral impurities and assay of (S)-clopidogrel using a cellulose-based chiral stationary phase in methanol/water mode[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(6): 1208-1215.
- [15] AMEUR M, SEKKOUM K, GONAZLES F, et al. Enantioseparation and antioxidant activity of novel diarylpyrazoline derivatives[J]. *Chirality*, 2022, 34(10): 1389-1399.
- [16] HUANG Y P, TANG H, MENG X Y, et al. Rapid and simultaneous determination of two immunosuppressants in whole blood by high performance liquid chromatography[J]. *Chin J Chromatogr*, 2023, 41(2): 152-159.
- [17] LI X H, XIE H T, LIANG D H, et al. Determination of dexrabeprazole and levrabeprazole in human plasma by HPLC-MS/MS and its pharmacokinetic study[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2021, 30(1): 43-49.
- [18] XU Z, ZHOU N, XU X, et al. Enantioseparation of rivastigmine by high performance liquid chromatography using vancomycin chiral stationary phase[J]. *Chin J Anal Chem(分析化学)*, 2007, 35(7): 1043-1046.
- [19] FIROOZ S K, PUTMAN J, FULTON B, et al. Liquid chromatography enantiomeric separation of chiral ethanolamine substituted compounds[J]. *Chirality*, 2022, 34(4): 620-629.

收稿日期: 2022-12-14
(本文责编: 李艳芳)