

氯霉素类药物的高效液相色谱手性分离研究

何红梅¹ 徐秀珠^{*1} 潘春秀¹ 沈报春^{1,2} 张雪君¹

¹ (浙江大学化学系, 杭州 310027) ² (昆明医学院药学院, 昆明 650031)

摘 要 利用 Pirkle 型 (S, S)-Whelk-O1 手性柱对合霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素进行了对映体分离研究。考察了在正己烷流动相中醇类添加剂种类及浓度对其手性分离的影响, 并采用液相色谱/质谱联用法对甲矾霉素的两个异构体峰进行了确证。结果表明: 当异丙醇和叔丁醇为醇类添加剂时, 合霉素和甲矾霉素获得较大分离因子, 而使得氟甲矾霉素获得较大分离因子的是乙醇。合霉素在流动相为正己烷/乙醇 = 97/3 时获得最大分离度是 1.89; 在正己烷/乙醇 = 90/10 时, 甲矾霉素、氟甲矾霉素都获得了很好的分离, 最佳分离度 R_s 分别达到 1.84 和 3.94。

关键词 高效液相色谱, 质谱, 手性分离, 氯霉素, 甲矾霉素, 氟甲矾霉素

1 引言

合霉素是早期广泛使用的一种抗菌性药物。后研究发现只有 *RR* 异构体 (即氯霉素) 有抗菌活性, 而 *SS* 构型无药效^[1]。甲矾霉素和氟甲矾霉素是新型氯霉素类广谱抗菌药物, 其结构与氯霉素类似, 药理活性也类似^[2]。其中甲矾霉素是氯霉素苯环上对位的硝基被甲磺酰基取代的产物, 氟甲矾霉素是甲矾霉素的 3 羟基被氟取代的产物。样品合霉素是 *RR* 和 *SS* 构型的外消旋混合物, 甲矾霉素是大量 *RR*-和少量 *SS* 构型体混合物, 而氟甲矾霉素则是大量 *RS* 和少量 *SR* 构型体混合物。

在手性分离领域里, 高效液相色谱法是一种有效的对映体分离方法^[3~5]。目前报道的检测氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素含量的方法有液相色谱/质谱联用法^[6]、电动毛细管电泳法^[7]和 C_{18} 柱高效液相色谱法^[8]等, 工业生产中则采用旋光度法测定其光学异构体的纯度。尚未见对合霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素的高效液相色谱手性分离的研究报道。本实验利用 (S, S)-Whelk-O1 手性固定相, 以正己烷/醇为流动相对三者进行了对映体分离研究。考察了不同种类、不同浓度的醇类添加剂对溶质分离的影响, 并采用液相色谱/质谱联用法对甲矾霉素的分离峰进行了确证, 初步探讨了固定相对溶质的手性分离机理, 为该类药物光学异构体的分离提供了一种可行的方法, 并可痕量检测单光学异构体中混杂的约 0.5% 的另一种光学异构体。

2 实验部分

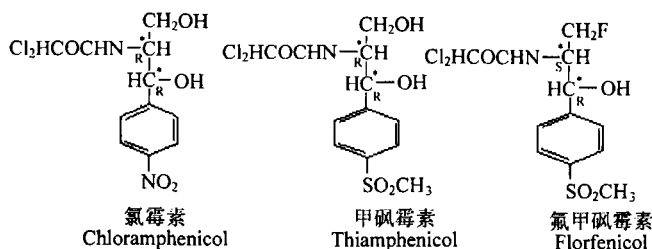
2.1 仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪 (美国 Water 公司); Waters 996 光电二极管阵列检测器; Waters Millennium 3 软件系统; Agilent 1000 高效液相色谱仪; Bruker esquire 3000 plus 质谱仪, ESI 离子源, 离子阱检测器。色谱条件: 流动相为正己烷及不同比例的醇类添加剂; 手性柱为 (S, S)-Whelk-O1 (12 μ m, 250 mm $\times$ 4.0 mm i.d.) 手性柱 (德国 DEORG-SMON-OHM University of Applied Science 公司); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 20 $^{\circ}$ C; 进样体积: 20 μ L。

氯霉素 (1*R*, 2*R*-1 对硝基苯基-2-二氯乙酰胺基-1, 3 丙二醇, chloramphenicol, CAP) 和合霉素 (synthomycin) (浙江大学化学系); 甲矾霉素^[9] (1*R*, 2*R*-1 对甲磺基苯基-2-二氯乙酰胺基-1, 3 丙二醇, thiamphenicol, THA) 和氟甲矾霉素 ([*R*-(*R*^{*}, *S*^{*})]-2, 2-二氯-N-[1-(氟甲基)-2-羟基-2-[4-(甲磺基)苯基]]乙酰胺^[10], florfenicol, FLR) (浙江海翔医药化工有限公司); 正己烷 (分析纯, 杭州炼油厂); 乙醇 (分析纯, 杭州长征化工厂); 异丙醇 (分析纯, 上海陆都化学试剂厂); 叔丁醇 (分析纯, 上海试剂一厂);

2004-03-09 收稿; 2004-06-25 接受
本文系浙江省分析测试基金资助项目 (Na 03111)

其它试剂均为国产分析纯。3种氯霉素药物结构如下。



2 2 样品和流动相的制备

样品用乙醇配成 1 g/L,经 0.1 μm 微孔膜过滤。将醇和正己烷配成所需比例并经 0.5 μm 微孔膜过滤并超声脱气。

3 结果与讨论

3 1 醇类添加剂对手性分离的影响

在正己烷/醇体积比为 80/20 的正相体系中,考察了不同醇类添加剂对合霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素手性分离的影响,其结果列于表 1。从表 1 可见:(1)由乙醇到异丙醇、叔丁醇时,醇的体积逐渐增大,空间位阻增大以及极性的减弱导致醇与手性固定相的作用减弱,对溶质在手性固定相上的吸附点的竞争减弱,故 3 种溶质在手性固定相上的保留逐渐增强, k' 值增大;(2)在这 3 种醇类添加剂中,异丙醇和叔丁醇使得合霉素和甲砒霉素获得了较大的分离因子;而使得氟甲砒霉素获得最大的分离因子的是乙醇。可见 3 种溶质获得最大分离因子所要求的醇的种类不同;(3)3 种溶质在乙醇为添加剂时获得最好的分离度,可能是因为乙醇形成氢键的能力最弱,对溶质与手性固定相的氢键作用点的竞争较弱,故氢键作用是溶质手性识别一个重要因素。

表 1 不同醇类添加剂对合霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素手性分离的影响

Table 1 Influence of different alcohol modifiers in mobile phase on chiral separation of synthomycin, thiamphenicol (THA) and florfenicol (FLR)

溶质 Solute	乙醇 (20%, V/V) Ethanol			异丙醇 (20%, V/V) Iso-propanol			叔丁醇 (20%, V/V) tert-Butanol		
	k'	α	R_s	k'	α	R_s	k'	α	R_s
合霉素 Synthomycin	1.77	1.15	1.01	2.39	1.19	1.02	3.80	1.18	0.81
甲砒霉素 Thiamphenicol	6.22	1.16	1.19	13.88	1.30	1.00	31.63	1.30	0.83
氟甲砒霉素 Florfenicol	4.95	1.26	1.89	12.06	1.15	0.92	43.12	1.19	0.87

k' 为先洗脱对映体的保留因子 (the capacity factor of the first eluted enantiomer); 死时间 (t_0) 由 1,3,5-三叔丁基苯测定 (the dead time was determined using 1,3,5-tri-tert-butyl benzene); 流速 (flow rate), 1.0 mL/min; $T=20$

3 2 乙醇的浓度对手性分离的影响

由实验可知,乙醇作为添加剂时,合霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素分离较好,故考察了不同浓度的乙醇对手性分离的影响,结果列于表 2。随着乙醇含量的减少,流动相的洗脱能力减弱,溶质与固定相的作用力增强,保留增强,分离因子变化不大,分离度增大,在不同比例条件下,三者都达到了很好的分离,最大分离度 R_s 分别是 1.89、1.84 和 3.94。

从表 2 可见,当体积比正己烷/乙醇为 90/10 时,(1)合霉素、氟甲砒霉素、甲砒霉素在手性固定相上的保留依次增强, k' 值增大。可能是因为甲砒霉素的甲磺酰基比合霉素的硝基与手性固定相的偶极-偶极作用强,其与手性固定相的 π - π 作用也强,且甲砒霉素与固定相的氢键作用点比氟甲砒霉素多,故它是保留最强的;(2)氟甲砒霉素分离因子最大,另两种溶质分离因子相近。这可能是由于氟甲砒霉素的氟原子与固定相的氢键作用点的作用力强,使得固定相对它的手性识别能力增强。3 种溶质手性分离的主要因素除了 π - π 作用,还有偶极-偶极作用和氢键作用,特别是苯环上对位的取代基团和支链上的取代基对溶质手性分离有较大的影响。

表 2 乙醇的浓度对合霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素手性分离的影响
Table 2 Influence of mobile phase composition on chiral separation of synthomycin, THA and FLR

正己烷/乙醇 (V/V) <i>n</i> -Hexane/Ethanol	合霉素 Synthomycin			甲矾霉素 Thiamphenicol			氟甲矾霉素 Florfenicol		
	<i>k'</i>	α	<i>R</i> _s	<i>k'</i>	α	<i>R</i> _s	<i>k'</i>	α	<i>R</i> _s
70/30	0.88	1.15	0.76	2.75	1.15	0.97	2.25	1.21	1.40
80/20	1.77	1.15	1.01	6.22	1.16	1.19	4.95	1.26	1.89
85/15	2.81	1.15	1.19	10.75	1.16	1.39	8.08	1.30	2.95
90/10	5.03	1.15	1.41	23.45	1.17	1.84	17.93	1.38	3.94
95/5	15.14	1.14	1.82						
97/3	35.25	1.14	1.89						

色谱条件见表 1 (chromatographic conditions are shown in Table 1)

3.3 液相色谱/质谱联用法对色谱分离峰的确证

图 1 是甲矾霉素和氟甲矾霉素在相同色谱条件下分离的色谱图及其紫外光谱吸收图;从光谱图可判断前后两个峰为它们各自的光学异构体峰,并采用液相色谱/质谱联用法对甲矾霉素的两个峰进行进一步确证。图 2 是甲矾霉素在正己烷/乙醇体积比为 85/15 的条件下液相色谱/质谱联用的质谱图,从图可见溶质的两个峰的质谱图相同,说明前后两个峰确实是甲矾霉素的两个异构体的峰。其中 354 为样品的分子离子峰,389.9 及 390.0 可能为样品分子离子再结合一个氯和一个质子,而 468 有可能是杂质或样品分子离子与某个物质的结合物。

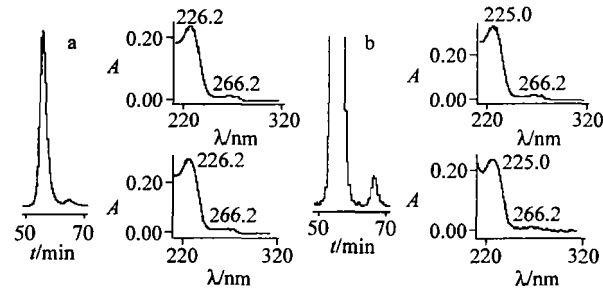


图 1 甲矾霉素 (a)、氟甲矾霉素 (b) 对映体分离色谱图及紫外光谱图

Fig 1 The enantioseparation chromatogram and ultraviolet absorbing spectrums of THA (a) and FLR (b)
流动相 (mobile phase): 正己烷/乙醇 (*n*-hexane/ethanol) (V/V, 90/10), 其它色谱条件见表 1 (other chromatographic conditions are shown in Table 1)。

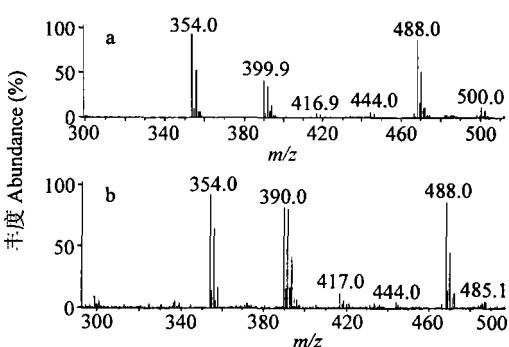


图 2 甲矾霉素对映体的质谱图
Fig 2 The enantioseparation mass spectrums of THA
a *RR*-异构体 (*RR*-isomer), b *SS*-异构体 (*SS*-isomer)。流动相 (mobile phase): 正己烷/乙醇 (*n*-hexane/ethanol) (V/V, 85/15), 其它色谱条件见表 1 (other chromatographic conditions are shown in Table 1)。

3.4 对映异构体出峰顺序的确定

用氯霉素标样来确定合霉素对映体出峰顺序,从图 3 可见合霉素的 *RR* 构型体先出峰, *SS* 构型体后出峰。这可能是由于 *RR* 构型的异构体不如 *SS* 构型的异构体与 (*S,S*)-Whelk-O1 手性固定相作用力强。样品甲矾霉素主要是 *RR* 构型,从图 1 (a) 也可看到是 *RR* 构型体先出峰。而氟甲矾霉素是甲矾霉素羟基被氟取代,改变了构型,其主要是 *RS* 构型体,从图 1 (b) 可见, *RS* 构型体先出峰。

3.5 结论

本实验在 (*S,S*)-Whelk-O1 手性固定相上成功地分离了合霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素的对映体,获得了很高的分离度。三者各自的光学异构体含量分别为: 49.21/50.79、96.53/3.47 和 99.40/0.60, 为该类药物光学异构体的分离提供了一种可行的方法,并可痕量检测单光学异构体中混杂的约 0.5% 的另一种光学异构体。

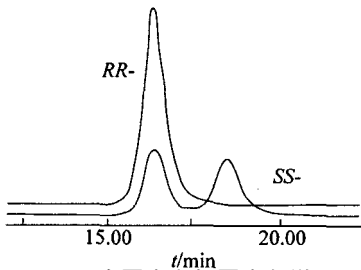


图 3 合霉素和氯霉素色谱图
Fig 3 The chromatograms of synthomycin and chloramphenicol
色谱条件见图 1 (chromatographic conditions are shown in Fig 1)

从合霉素到甲矾霉素、氟甲矾霉素,它们化学结构的差异导致分离情况不同,不同醇类添加剂对同一溶质的手性分离影响也不同,说明手性固定相对溶质的手性识别不但与流动相中添加剂的种类有关,而且与溶质的空间结构以及官能团有关。

致 谢 Pirkle 型 (S, S)-Whelk-O 1 手性柱由德国 J. N. Kinkel 教授提供,特此致谢!

References

- 1 Foye W O. *Principles of Medicinal Chemistry*. Philadelphia: Lea and Febiger, PA, 1981
- 2 Fukui H, Fujihara Y, Kano T. *Fish Pathol*, 1987, 22 (4): 201 ~ 207
- 3 Cai Xiaojun (蔡小军), Xu Xiuzhu (徐秀珠), Zhang Datong (张大同), He Hongnei (何红梅), Pan Chunxiu (潘春秀). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2004, 32 (2): 134 ~ 138
- 4 Zhang Datong (张大同), Xu Xiuzhu (徐秀珠), Cai Xiaojun (蔡小军), He Hongnei (何红梅), Pan Chunxiu (潘春秀). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2004, 32 (2): 191 ~ 194
- 5 Machida Y, Nishi H, Nakamura K, Nakai H, Sato T. *J. Chromatogr A*, 1998, 805: 85
- 6 Mottier P, Parisod V, Gremaud E, Guy P, Stadler R. *J. Chromatogr A*, 2003, 994: 75 ~ 84
- 7 Song J Z, Wu X J, Sun Z P, Tian S J, Wang M L, Wang R L. *J. Chromatogr B*, 1997, 692: 445 ~ 451
- 8 Chue Vue, Larry J, Guy R, William H. *J. Chromatogr B*, 2002, 780: 111 ~ 117
- 9 Yan Guohe (颜国和), Hu Zhongkan (胡仲侃). *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 1992, 23 (10): 433 ~ 436
- 10 Chen Shuhong (陈树红), Cheng Wancheng (程万成), Li Juanjuan (李娟娟), Bai Qiong (白启荣). *ShanXi Chemical Industry* (山西化工), 2001, 21 (4): 15 ~ 17

Study of Chiral Separation of Chloramphenicol Analogs by High Performance Liquid Chromatography

He Hongnei¹, Xu Xiuzhu^{*1}, Pan Chunxiu¹, Shen Baochun^{1,2}, Zhang Xuejun¹

¹ (Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

² (Faculty of Pharmacy, Kunming Medical College, Kunming 650031)

Abstract The Whelk-O1 chiral stationary phase (CSP) is a valuable column for the high performance liquid chromatography (HPLC) resolution of the enantiomers of a wide variety of compounds. So the resolution of enantiomers of three compounds, which are the synthomycin and the thiamphenicol (THA) and the florfenicol (FLR), were studied on (S, S)-Whelk-O1 CSP using HPLC using *n*-hexane and alcohol additives as mobile phase. And the influence of the type and concentration of alcohol additives on chiral separation of solutes was investigated. Then the enantiomers of THA were confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry. The results showed that three compounds were separated successfully. When iso-propanol and tert-butanol as mobile-phase additives, the separation factor (α) of synthomycin and THA was higher in contrast to ethanol. However, ethanol was more favorable for chiral separation of FLR. Furthermore, the best resolution of synthomycin was 1.89 using a mobile-phase of *n*-hexane/ethanol (97/3), and that of THA and FLR was separately 1.84 and 3.94 when a mobile-phase of *n*-hexane/ethanol (90/10) was used. So the method which was used to separate the enantiomers of this type of drugs was got and was also used to determine the single isomer content which was about 0.5% in the drug as an impurity.

Keywords High performance liquid chromatography, mass spectrum, chiral separation, chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol

(Received 9 March 2004; accepted 25 June 2004)