

高效液相色谱手性固定相法拆分克伦特罗对映体

唐 琴^{1,2} 宋 航^{*1} 付 超¹ 雷永诚² 陈先勇²

(四川大学化工学院制药与生物工程系, 成都 610065) (湖北民族学院化学工程系, 恩施 445000)

摘 要 以正己烷、异丙醇为流动相, 用 Whelk-O1 手性固定相成功拆分了药物克伦特罗对映体。出峰时间在 5 min 左右, 峰形对称性好, 完全达到基线分离, 分离因子大于 1.4, 可用于该对映体药物的分析与制备分离。讨论了二元流动相中异丙醇含量及温度的变化对分离的影响, 并对拆分机理进行了探讨。

关键词 高效液相色谱, 手性固定相, 克伦特罗, 拆分机理

1 引 言

含有手性因素的药物, 其不同的对映体在活性、代谢过程及毒性方面往往存在着显著差异。为提高药物活性, 减少副作用以及对药物生产和质量进行控制, 需要对药物对映体进行分离研究。高效液相色谱法特别是手性固定相色谱法是达到这一目的非常有效的手段^[1]。

克伦特罗是一种选择性高、作用性强的 β_2 受体激动剂, 能解除支气管平滑肌痉挛, 而对心血管的影响甚微。它具有起效快、维持时间长、剂量小和毒副作用低的特点, 尚有增强呼吸道纤毛运动, 作用于溶酶体促进粘痰溶解及抗过敏作用, 这有助于提高平喘疗效, 临床主要用于支气管哮喘和喘息性支气管炎的治疗等。临床研究表明, 本品对支气管的扩张作用为沙丁醇胺的 100 倍; 口服平喘作用较特步他林强 170 倍。国内用于无感染的吸入性支气管哮喘, 即刻止喘的显效率高达 83.5 %^[2]。最新的研究表明, 克伦特罗可以作为外源性药物通过口服或注射途径诱导内源性 NGF 的产生并起到对脑的保护作用, 对它的研究为治疗神经退行性疾病和脑卒中开辟了新的广阔前景^[3]。克伦特罗分子中含有一个手性中心, 可分为 (R-) 和 (S-) 两种对映异构体, 目前市售该药物主要以外消旋形式存在。在临床应用中发现, 如果长期或大剂量服用外消旋药物克伦特罗, 其残留部分则会在体内沉积, 直接威胁人类健康。虽然克伦特罗在临床使用中出现的副作用与其服用剂量之间的严格关系尚不太清楚, 但据文献报道, 不同结构对映体将会产生不同的药理活性^[4,5]。所以, 克伦特罗的对映体分离对于进一步研究其药理和开发副作用更小的新药有重要的意义。对该药物的拆分, 目前主要采用气相色谱法和毛细管电泳法, 也有利用酰胺型手性固定相于三元流动相条件下对其进行拆分的报道^[5,6], 但有的结果与外消旋对映体被拆分后应有的色谱图有差别。Whelk-O1 手性固定相已成功用于多种手性药物的拆分, 是当前已商业化的应用最广的手性固定相之一^[1,7]。本实验利用 Whelk-O1 手性固定相于二元流动相条件下, 对药物克伦特罗对映体进行了成功拆分。与其它拆分克伦特罗的方法相比, 分离效果更好。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

Waters 515 型高效液相色谱泵 (美国 Waters 公司); CBL Model 100 型柱温箱 (美国 Photoelectron Technology 公司); Waters 2487 双波长紫外检测器 (美国 Waters 公司); Chrom Station 色谱工作站 (美国 Sage 公司); Hamilton 25 μ L 注射器 (美国 Hamilton 公司)。

正己烷、异丙醇 (A. R.), 在使用前都经过干燥和精馏处理。克伦特罗片剂和克伦特罗对照品分别由江苏林海药业有限公司和中国药品生物制品检定所提供。

2.2 色谱条件

色谱柱: Whelk-O1 (R, R) 250 mm $\times$ 4.6 mm i. d. (5 μ m, 10 nm) (美国 Regis Technologies 公司)。流

2003-09-09 收稿; 2003-12-25 接受

本文系四川省应用基础研究基金资助项目 (No. 02GY029-045)

动相以正己烷为主,以异丙醇为极性调节剂,所有流动相均经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气使用。流速 1.5 mL/min,检测波长 254 nm,柱温 - 10 ~ 30 。死时间以乙酸乙酯测定为 $t_M = 1.4\text{ min}$ 。

2.3 样品处理

取几片药物样品放在玻璃器皿中研磨成粉状,加入乙酸乙酯和适量氨水溶解,摇匀后静置 20 min,然后加入适量无水硫酸镁干燥。取上层清液,精确称取去除溶剂后所得的晶体并用流动相溶解备用。药物对照品用流动相溶解,配成质量浓度为 1 g/L 的溶液备用。实验时每次取 10 μL 进样。

3 结果与讨论

3.1 流动相中异丙醇含量对分离的影响

固定流速为 1.5 mL/min,柱温为 30 ,改变流动相中异丙醇的体积分数,测定克伦特罗对映异构体的保留时间 t_R 。经数据处理得分离因子 α ,结果见表 1。由表 1 可知,在所有给定的流动相条件下,克伦特罗对映体出峰均很快,较其它方法分析时间明显缩短。而且随着流动相极性的增强(异丙醇含量增加),对映体保留时间缩短,分离因子 α 逐渐减小。药物克伦特罗样品及化学对照品对映体在 Whelk-O1 手性固定相上分离的色谱图如图 1 和图 2 所示。

表 1 流动相组成对对映体选择性的影响

Table 1 Effect of composition of mobile phase on the enantioselectivity

流动相 (V 正己烷 V 异丙醇) Mobile phase (V _{hexane}) V _{isopropanol}	保留时间 (min) Retention time (min)		容量因子 Capacity factor		分离因子 Separation factor (α)
	$t_{R,S}$	$t_{R,R}$	k_1	k_2	
7030	2.742	3.018	0.662	0.829	1.25
8020	2.912	3.292	0.823	1.058	1.28
9010	3.400	3.940	0.960	1.272	1.32
955	3.725	4.425	1.087	1.479	1.36
991	5.990	7.730	2.265	3.214	1.42

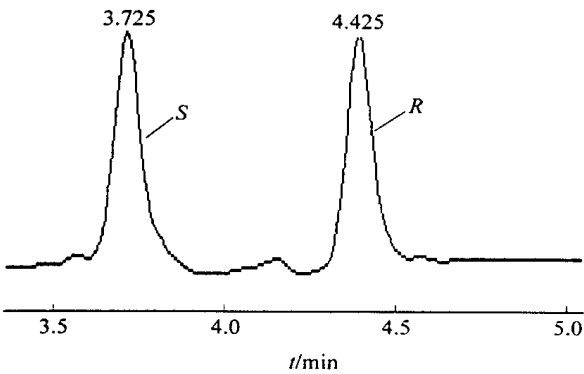


图 1 药物克伦特罗样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of clenbuterol sample

流动相 (mobile phase) : V_{hexane} V_{isopropanol} = 955; 柱温 (column temperature) : 30 ; 流速 (flow rate) : 1.5 mL/min。

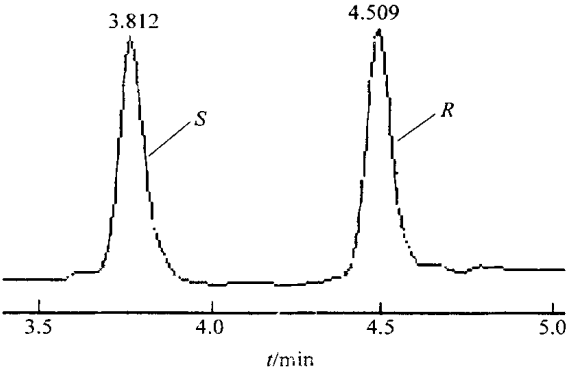


图 2 克伦特罗化学对照品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of clenbuterol standard

流动相 (mobile phase) : V_{hexane} V_{isopropanol} = 955; 柱温 (column temperature) : 30 ; 流速 (flow rate) : 1.5 mL/min。

一般来说,对于正相二元流动相体系,液固吸附色谱保留因子 k 与流动相中的极性调节剂的含量有如下关系: $\ln k = a + c C_b + b \ln C_b$, 其中 C_b 为二元冲洗剂中极性冲洗剂组分 b 的浓度^[8]。经检验,本实验中克伦特罗对映体在 Whelk-O1 手性固定相上的分离基本符合这一公式。如图 3 所示,流动相中异丙醇含量在不同的范围内对克伦特罗在固定相上拆分的保留因子 k 的影响不同,当异丙醇含量较低时, $\ln k$ 与 $\ln C_b$ 之间呈很好的线性关系,而当异丙醇含量相对较高时, $\ln k$ 与 $\ln C_b$ 之间线性不明显,这与克伦特罗同类药物丙卡特罗在酰胺型手性固定相上的拆分情况不同^[9]。这可能表示,对于该分离过程而言,不同的流动相条件下拆分的机理有所差异,这与对其吸附的热力学参数研究所得的结果一致。

3.2 温度对分离的影响

固定流速为 1.5 mL/min,于异丙醇体积含量为 5 %的流动相条件下,测定不同温度下克伦特罗对映异构体的保留时间 t_R 。经数据处理得分离因子 α ,结果见表 2。从表 2 可以看出,温度对克伦特罗在

表 2 温度对对映体选择性的影响

Table 2 Effect of temperature on the enantioselectivity

柱温 ()	保留时间 (min)		分离因子
Column temperature	Retention time (min)		Separation factor
()	$t_{R,S}$	$t_{R,R}$	(α)
30	3.725	4.425	1.36
20	3.958	4.792	1.38
10	4.358	5.450	1.42
0	4.958	6.425	1.46
-10	5.842	7.788	1.48

Whelk-O1 手性固定相上的分离具有明显的影响。随着温度的降低,溶质在固定相和流动相之间传质速度变慢,两对映体保留时间延长,分离因子 α 增大。

根据 Van t Hoff 方程 $\ln \alpha = -\Delta(\Delta H)/RT + \Delta(\Delta S)/R$ ^[10]可知,若温度升高,分离因子 α 增大,则分离过程为熵控,反之则为焓控。在本实验中,随温度降低,分离因子 α 增大,这说明克伦特罗在 Whelk-O1 手性固定相上的分离过程属吸附焓控制。

3.3 拆分机理探讨

克伦特罗在固定相上能够较好的拆分,并且容量因子都较小,这与 Whelk-O1 手性固定相与克伦特罗分子的相互作用相关。克伦特罗对映体在 Whelk-O1 手性固定相上的分离符合“三点作用”^[11]机理,其与固定相之间相互作用情况为:(1)克伦特罗对映体分子上的羟基 —OH 与手性固定相分子中酰胺部分的羰基 —C=O 之间形成氢键作用;(2)克伦特罗对映体分子上呈弱 π -性的苯环与固定相分子中呈较强 π -酸性的苯环之间的 π - π 电子转移相互作用;(3)克伦特罗对映体分子中苯环上的氨基 —NH₂ 与固定相分子中苯环上的硝基 —NO₂ 之间较弱的氢键作用。对于 (R, R) 构型的 Whelk-O1 手性固定相而言,被拆分的手性化合物的 R-对映异构体在该固定相上保留较强^[12],克伦特罗对映体在此固定相上的拆分也满足这一规律。由于克伦特罗的 S-构型对映体分子中的直链氨基烷基与 Whelk-O1 手性固定相分子中的位阻基团产生了强烈的位阻作用,阻碍了手性识别所需的分子间作用力的形成,减弱了其手性固定相上的有效吸附,从而被流动相优先洗脱而先出峰;而对于 R-构型对映体分子,由于适宜的空间构型无明显的位阻效应,对映体分子中的羟基 —OH 与手性固定相分子中的羰基 —C=O 间的氢键作用力容易发生,从而有利于“三点相互作用”的形成,在色谱柱上的保留时间亦相对较长,后出峰。克伦特罗对映体分子与 Whelk-O1 手性固定相分子间的相互作用如图 4 所示。

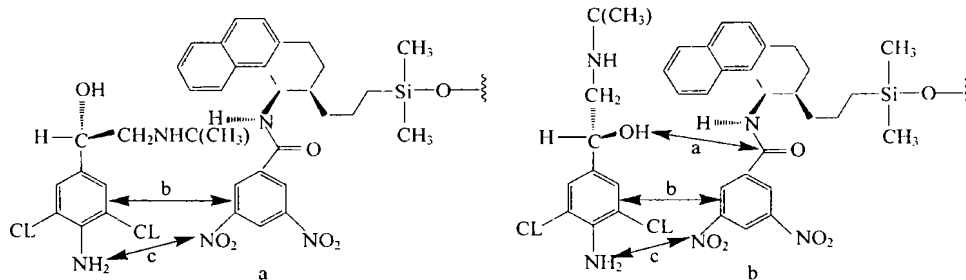


图 4 Whelk-O1 手性固定相与克伦特罗对映体相互作用

Fig. 4 Interaction between Whelk-O1 chiral stationary phase (CSP) and clenbuterol enantiomers

a. Whelk-O1 手性固定相与 (+)-S-克伦特罗的相互作用 (interaction between Whelk-O1 CSP and (+)-S-clenbuterol); b. Whelk-O1 手性固定相与 (+)-R-克伦特罗的相互作用 (interaction between Whelk-O1 CSP and (+)-R-clenbuterol)。

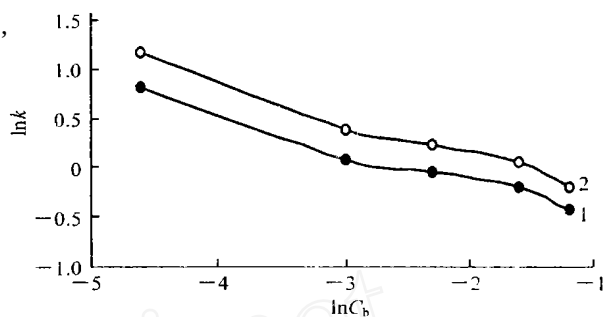


图 3 流动相中异丙醇浓度对克伦特罗容量因子 k' 的影响

Fig. 3 Effect of isopropyl alcohol concentration in mobile phase on the k' of clenbuterol

4 结 论

在 Whelk-O1 手性固定相上成功拆分了药物克伦特罗对映体。与其它方法相比,本方法简单、快速、准确。在已给出的流动相条件下,出峰时间在 8 min 内,峰形对称性好,完全达到基线分离,分离效果良好,可用于该对映体药物的分析与制备分离。克伦特罗对映体在该手性固定相上的分离符合“三点作用”机理,氢键在该手性识别的“三点作用”机理中起主导作用。

References

- 1 Song Hang(宋 航), Liang Yanming(梁彦明), Fu Chao(付 超), Zheng Wenli(郑文丽). *Proceedings of the First National Symposium on the Science and Technology and Education of Pharmaceutical Engineering*(第一届全国制药工程科技与教育研讨会论文集). Tianjin(天津), 2002: 10
- 2 Sun Dingren(孙定人), Zhang Shige(张石革), Liang Zhijiang(梁之江). *The National Clinical New Drugs*(国家临床新药集). Beijing(北京): Chinese Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 2001, 9: 358 ~ 359
- 3 Gao Jinxi(高进喜), Lu Yicheng(卢亦成). *Foreign Medical Sciences, Neurology and Neurosurgery Fascicle*(国外医学: 神经病学、神经外科学分册), 2002, 29(4): 379 ~ 381
- 4 Gausepopl C, Blaschke G. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1998, 713(2): 443 ~ 446
- 5 Abou-Basha L I, Aboul-Enein H Y. *Biomed. Chromatogr.*, 1996, 10(2): 69 ~ 71
- 6 Song Yaru(宋雅如), Wang Defa(王德发), Yang Yiping(杨亦平), Wu Hong(吴 红), Niu Liping(牛丽萍), Hou Dongyan(侯冬岩). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), 2002, 20(2): 118 ~ 120
- 7 Liang Yanming(梁彦明), Song Hang(宋 航), Fu Chao(付 超), Zheng Wenli(郑文丽). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2003, 31(10): 1253 ~ 1255
- 8 Chen Nong(陈 农), Zhang Yukui(张玉奎), Lu Peizhang(卢佩章). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), 1991, 9(1): 1 ~ 5
- 9 Zheng Wenli(郑文丽), Song Hang(宋 航), Liang Yanming(梁彦明), Fu Chao(付 超). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), 2003, 21(3): 239 ~ 241
- 10 Wan H, Zhou X, Ou Q Y. *J. Chromatogr. A*, 1994, 673: 107 ~ 111
- 11 William H. Pirkle, Thomas C. Pochapsky. *J. Chem. Rev.*, 1989, 89: 347 ~ 362
- 12 William H. Pirkle, Christopher J. Welch, Bo Lamn. *J. Org. Chem.*, 1992, 57: 3854 ~ 3860

Enantioseparation of Clenbuterol Enantiomers by High Performance Liquid Chromatography on Chiral Stationary Phase

Tang Qin^{1,2}, Song Hang^{*1}, Fu Chao¹, Lei Yongcheng², Chen Xianrong²

¹(Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065)

²(Department of Chemical Engineering, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000)

Abstract The enantiomers of clenbuterol have been originally successfully separated on Whelk-O1 chiral stationary phase in hexane/isopropyl alcohol mobile phase with satisfactory results. The two peaks of enantiomers were very symmetric, and the baseline-separation was obtained. Furthermore, the retention time about 3 ~ 8 min and chiral separation factor α above 1.4 were achieved. The effects of the concentrations of isopropyl alcohol in mobile phase and the temperatures on the chiral separation were investigated experimentally and the mechanism of separation was discussed. The results indicated that the retention time and chiral separation of the analyte varied with the change of mobile phase composition. This method can be used for the analytical and preparative resolution of clenbuterol because of the high value of chiral separation factor α above 1.4.

Keywords High performance liquid chromatography, chiral stationary phase, clenbuterol, chiral separation

(Received 9 September 2003; accepted 25 December 2003)