

用 α_1 - 酸性糖蛋白柱分离克仑特罗光学对映体*

李亚, 傅强**, 黄萍, 常春

(西安交通大学医学院药理学系, 西安 710061)

摘要 目的: 建立以 α_1 - 酸性糖蛋白 (α_1 - AGP) 为手性固定相的高效液相色谱法直接拆分克仑特罗光学对映体。方法: 优化色谱条件, 研究了流动相中有机改性剂的种类、含量、流动相的 pH、缓冲盐溶液的浓度和流速等因素对拆分的影响。结果: 最佳色谱条件: 流动相为异丙醇 - 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 5.0) (1:99), 流速为 0.8 mL · min⁻¹, 紫外检测波长为 213 nm, 柱温为 25 °C。结论: 用 α_1 - 酸性糖蛋白柱可有效地分离克仑特罗光学对映体, 所建立的方法具有简便、快速的优点, 可用于制剂中克仑特罗光学对映体的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 酸性糖蛋白; 手性固定相; 光学对映体拆分; 克仑特罗

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011) 11 - 2099 - 04

Direct enantiomeric separation of clenbuterol on α_1 - acid glycoprotein chiral column*

LI Ya, FU Qiang**, HUANG Ping, CHANG Chun

(Faculty of Pharmacy, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method to directly separate clenbuterol enantiomers on α_1 - acid glycoprotein chiral column. **Methods:** The effects of chromatographic conditions including pH of mobile phase, ionic strength, type and concentration of organic modifiers, flow rate on chiral separation were studied. **Results:** The optimized chromatographic conditions were as follows: admixture of isopropanol - 0.01 mol · L⁻¹ phosphate buffer (pH 5.0) (1:99) as the mobile phase, flow rate 0.8 mL · min⁻¹, detection wavelength 213 nm, column temperature 25 °C. **Conclusions:** The established method is proved to be fast and convenient. Clenbuterol enantiomers can be separated with high resolution factor by using α_1 - acid glycoprotein column.

Key words: HPLC; acid glycoprotein chiral stationary phase (CSP); optical antimer; resolution clenbuterol

克仑特罗 (clenbuterol), 化学名 4 - 氨基 - 3, 5 - 二氯 - α - [(叔丁基氨) - 甲基] - 苯甲醇, 分子式为 C₁₂H₁₈Cl₂N₂O, 化学结构见图 1。克仑特罗是一种强效选择性 β_2 - 受体兴奋剂, 临床上常用其盐酸盐, 在治疗剂量下 (口服治疗剂量仅为 30 ~ 40 μ g · d⁻¹) 能够持久地松弛支气管平滑肌, 可较长时间地增加肺的最高呼气量, 对支气管哮喘有良好的治疗效果, 其用药剂量仅为舒喘宁片的 1%, 并且对心血管系统的副作用不明显^[1]。

克仑特罗分子结构中含有 1 个手性中心, 因此存在 1 对光学活性对映体。研究表明, 在临床上有疗效的是 (-) 异构体, 而 (+) - 异构体对治疗没有贡献, 所以有必要对其进行拆分^[2, 3]。目前对克

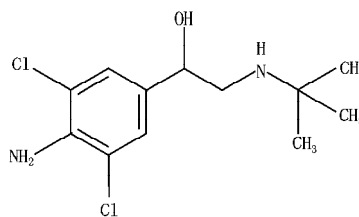


图 1 克仑特罗化学结构图

Fig 1 The structure of clenbuterol

仑特罗对映体的拆分方法有高效毛细管电泳法^[4]、 β - 环糊精流动相添加剂拆分法^[5]、酰胺型手性固定相高效液相色谱法^[6]、Whelk - O1 手性固定相高效液相色谱法、组合手性萃取拆分法^[7]。但以上方法各有缺点, 毛细管电泳法稳定性相对较差; 手性流

* β_2 - 受体激动剂特异性固相微萃取方法的研究 (NO. 30873193)

** 通讯作者 Tel: (029) 82655382; E-mail: fuqiang@mail.xjtu.edu.cn

动相添加剂分离效果不如手性固定相,而且容易污染检测器;酰胺型手性固定相分离得出的色谱图峰形对称性差等。Yok K. Tan 等^[8]曾采用 α_1 -AGP 为手性固定相拆分了 β_2 -受体激动剂中的沙丁胺醇光学对映体,但所采用的柱温为 0 °C,色谱条件较极端。目前尚无用 α_1 -AGP 柱分离克仑特罗光学对映体的报道。本实验采用 α_1 -酸性糖蛋白柱,以常规的色谱条件可有效地拆分 β_2 -受体激动剂中的克仑特罗光学对映体,所建立的方法具有简便、快速、分离效果好的优点。

1 仪器与试剂

LC-10AT 型高效液相色谱泵(岛津公司,日本),SPD-10AT 紫外检测器(岛津公司,日本),LC solution Lite 色谱工作站(岛津公司,日本),FE20/EL20 计(梅特勒-托利多集团,德国),KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AUY220 型电子天平(岛津公司,日本)。克仑特罗消旋体(淮南佳盟药业有限公司,原料药,纯度符合中国药典 2005 年版二部检验标准),盐酸克仑特罗片(南京立业制药有限公司)。异丙醇(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司,重蒸后使用),乙腈、甲醇(色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司),磷酸二氢钾(分析纯,西安化学试剂厂)。

2 色谱条件

采用瑞典 Chrom Tech Chiral-AGP 色谱柱(5 μm , 150 mm \times 4.0 mm),以磷酸盐缓冲液(浓度为 0.01 ~ 0.04 mol \cdot L⁻¹, pH 4.0 ~ 6.0)为流动相主体,选择异丙醇、甲醇和乙腈为有机改性剂,流动相流速为 0.8 mL \cdot min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 5 μL ,检测波长 213 nm。

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 精密称取克仑特罗原料药(消旋体)约 10 mg,加 1 mL 甲醇溶解,用流动相稀释成 0.2 mg \cdot mL⁻¹的溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为对照品溶液。

3.2 供试品溶液 分别取不同批号的盐酸克仑特罗样品 60 片,精密称定,在研钵中研磨成细粉,精密称取约 3.4 g(约相当于盐酸克仑特罗 2 mg),置 10 mL 量瓶中,加入适量流动相,超声(功率 120 W,40 kHz)45 min 使溶解,加流动相定容至刻度,静置,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液即为供试品溶液,浓度约为 0.2 mg \cdot mL⁻¹。

4 结果与讨论

4.1 流动相中缓冲液 pH 对拆分的影响 在室温下,以异丙醇-0.01 mol \cdot L⁻¹磷酸盐缓冲液(1:99)作为流动相,用磷酸调节流动相 pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0,流动相流速为 0.8 mL \cdot min⁻¹,考察了 pH 变化对对映体拆分的影响,结果见表 1。结果表明: pH 为 4.0 时,克仑特罗对映体的色谱峰未能达到基线分离; pH 增至 5.0 时,保留时间稍增大,但对映体的色谱峰已达到基线分离; pH 增至 6.0 时,对映体的保留时间、分离度、分离因子和容量因子都显著的增大。 α_1 -AGP 的等电点为 2.7^[9],当流动相 pH 大于 2.7 时,AGP 带负电荷,克仑特罗的 pK_a 为 8.86,在 pH 5.0 时带正电荷,其保留机制可能是由正负电荷的静电作用而产生。随着 pH 的增大,AGP 所带的负电荷增多,与克仑特罗所带正电荷之间的静电力增大,从而导致保留时间延长。

表 1 流动相中缓冲液 pH 对拆分的影响

Tab 1 Influence of pH of phosphate buffer on the separation of clenbuterol enantiomers

pH	K_1	k_2	α	R
4.0	1.70	2.60	1.54	1.30
5.0	2.10	3.37	1.60	1.95
6.0	19.23	30.93	1.61	2.16

注(note): k_1, k_2 : 容量因子(capacity factor) $k = (t_R - t_0)/t_0$; α : 分离因子(separation factor) $\alpha = k_2/k_1$; R : 分离度(resolution) $Rs = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2)$

4.2 磷酸盐缓冲液浓度对拆分的影响 在室温下,流动相流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,分别以 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mol \cdot L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 5.0)为流动相,以异丙醇作为有机改性剂为例,考察缓冲液浓度变化对对映体拆分的影响。结果表明,缓冲盐浓度对分离度影响较小;在缓冲盐浓度为 0.01 mol \cdot L⁻¹时,分离度出现最大值。

4.3 流动相流速对拆分的影响 在室温下,以 0.01 mol \cdot L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 5.0)为流动相,以异丙醇作为有机改性剂为例,考察不同流速(0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mL \cdot min⁻¹)对对映体拆分的影响,结果见表 2。由表可知,流速增加,分离因子几乎没有变化,而分离度随之降低,与文献报道^[10]相符,蛋白质类固定相对溶质的识别是 1 个相对较慢的动力学过程。另外,流速增大会导致柱压增大,降低色谱柱的寿命,所以在分离效果符合要求的情况下,特别是流动相中有机改性剂比例较高时,应尽量采用低流速。

表 2 流动相流速对拆分的影响

Tab 2 Influence of flow rates on the separation of clenbuterol enantiomers

流速(flow rate) / mL · min ⁻¹	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	α	<i>R</i>
0.5	2.11	3.37	1.60	2.10
0.6	2.16	3.49	1.60	2.07
0.7	2.15	3.49	1.61	1.99
0.8	2.11	3.37	1.60	1.95
0.9	2.10	3.35	1.60	1.93

4.4 流动相中有机改性剂的种类及比例对拆分的影响在室温下,流动相流速 0.8 mL · min⁻¹,流动相以 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 5.0) 为主体,分别选择异丙醇、甲醇和乙腈作为流动相中有机改性剂,并以不同比例与缓冲液混合,考察流动相中有机改性剂的种类及比例对拆分的影响,结果见表 3 和表 4。结果表明,以异丙醇、甲醇、乙腈为有机改性剂均能实现对克仑特罗光学对映体的分离。对映体在 AGP 柱上的保留与有机改性剂的关系是^[11]:有机改性剂的极性越大,对映体的保留时间越长,分离度和选择因子相应地增大;有机改性剂的比例越大,对映体的保留时间越短,分离度和选择因子也相应地减小。这是由于不同的有机改性剂有着不同的氢键结合特性和疏水特性,与蛋白类固定相形成不一样的立体环境,从而达到了不同的分离效果。

表 3 不同种类有机改性剂对拆分的影响

Tab 3 Influence of different kinds of organic modifier on the separation of clenbuterol enantiomers

有机相种类(kinds of organic solvent)	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	α	<i>R</i>
甲醇(menthanol)	2.12	3.30	1.56	1.76
乙腈(acetonitrile)	1.10	1.52	1.39	1.53
异丙醇(isopropanol)	2.11	3.37	1.60	1.95

表 4 不同比例的有机改性剂对拆分的影响

Tab 4 Influence of different proportion of organic modifier on the separation of clenbuterol enantiomers

有机相比例(proportion of organic solvent)	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	α	<i>R</i>
1:99	2.11	3.37	1.60	1.95
2:98	1.40	2.10	1.50	1.84
3:97	1.07	1.48	1.38	1.33
5:95	0.59	0.73	1.25	0.65

4.5 柱温对拆分的影响随着柱温升高,克仑特罗光学对映体的保留时间和分离因子都随之降低。这是因为当柱温升高时,溶质在固定相和流动相之间的传质速度变快,保留时间变短。因此在克仑特罗的拆分实验中,降低温度可以使分离效果得到改善,本实验采用柱温 25 ℃ 可得到良好的分离效果。

4.6 优化的色谱条件综合以上实验结果,确定克仑特罗对映体在 α₁ - AGP 手性柱上拆分,流动相为异丙醇 - 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 5.0) (1:99),流速: 0.8 mL · min⁻¹,柱温 25 ℃,浓度 0.2 mg · mL⁻¹,进样量: 5 μL。色谱图见图 2。

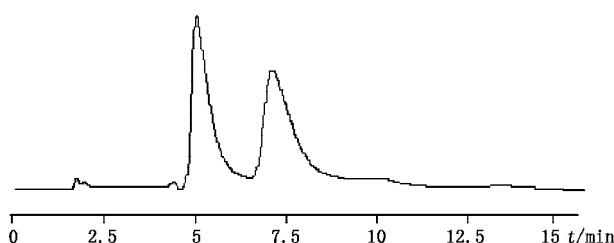


图 2 克仑特罗对照品色谱图

Fig 2 Chromatogram of clenbuterol standard

4.7 样品的测定利用所建立的分析方法,拆分了盐酸克仑特罗片样品,结果见图 3 和表 5。结果表明,在优化的色谱条件下,制剂中的克仑特罗光学对映体可达到基线分离,峰形较为理想,并且辅料对克仑特罗光学对映体的拆分没有影响。

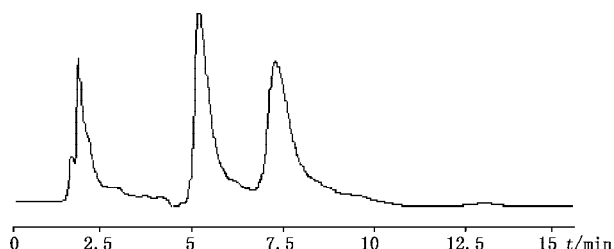


图 3 克仑特罗供试品批号 1002162 色谱图

Fig 3 Chromatogram of clenbuterol sample 1002162

表 5 克仑特罗样品的拆分结果

Tab 5 Enantiomeric separation of clenbuterol samples

样品批号(Lot No.)	<i>k</i> ₁	<i>k</i> ₂	α	<i>R</i>
1002161	1.90	3.02	1.59	1.93
1002162	1.95	3.12	1.60	2.12
1002163	1.91	3.06	1.60	1.96

4.8 讨论 α₁ - AGP 为含有 181 个氨基酸残基和 40 个唾液酸残基的多肽,具有酸性,等电点为 2.7,结构中含有 2 个二硫键桥,因此比较稳定。可分离

胺类化合物(伯胺、仲胺、叔胺和季胺)、酸(强酸和弱酸)、非质子传递体(酯类、磺化物、酰胺、醇类化合物)等^[12]。与普通非手性柱相比,柱容量较低,柱寿命相对较短,连续使用(如6~10 h)分析样品,会使其分离能力降低,常出现峰变宽、峰形变差的情况,但本研究在使用 α_1 -AGP柱拆分克仑特罗光学对映体时,分离度并无明显下降,柱效较好。与其他手性固定相比, α_1 -AGP可拆分不同类型的光学对映体。一般认为可用 α_1 -AGP柱分离的溶质分子应具有以下结构特征^[13]:①具有与手性中心相邻的芳环基团;②至少含有1个氢键结合点;③芳环基团和氢键结合点间的间隔不得超过3个原子。克仑特罗分子结构中含有苯环和氢键结合点(羟基和氨基基团等),并且芳环基团和氢键结合点间的间隔不超过3个原子,因此推测克仑特罗光学对映体与 α_1 -AGP柱的相互作用可能包括氢键作用、疏水作用、静电作用等,因此流动相中有机改性剂的种类和比例、缓冲溶液的浓度和pH及流动相流速等都对拆分有影响^[14]。

5 结论

本实验建立了以 α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -AGP)为手性固定相直接拆分克仑特罗光学对映体的高效液相色谱法。优化了色谱条件,研究了流动相中有机改性剂的种类、含量、流动相的pH、缓冲盐溶液的浓度和流速等因素对拆分的影响,此方法可用于制剂中克仑特罗光学对映体的拆分。

参考文献

- 1 TANG Qin(唐琴), SONG Hang(宋航), FU Chao(付超) *et al.* Enantioseparation of clenbuterol enantiomers by high performance liquid chromatography on chiral stationary phase(高效液相色谱手性固定相法拆分克仑特罗对映体). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2004 32(6):755
- 2 WU Yin-liang(吴银良), YANG Ting(杨挺), SHAN Ji-hao(单吉浩) *et al.* Determination of residual clenbuterol enantiomers in swine urine by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定猪尿中克仑特罗对映异构体残留量). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2010 38(6):833
- 3 Carsten Culmsee, Vera Junker, Serge Thal *et al.* Enantio-selective effects of clenbuterol in cultured neurons and astrocytes, and in a mouse model of cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 2007 57:575
- 4 HUANG Ke-long(黄可龙), HU Wei-guo(胡卫国), WANG Wei-ling(王蔚玲) *et al.* Separation and quantitative determination of clenbuterol enantiomers by capillary electrophoresis(高效毛细管电泳对克仑特罗对映体的分离及定量检测). *J Anal Sci*(分析科学学报) 2007 23(1):9
- 5 YU Jin-gang(于金刚), HUANG Ke-long(黄可龙), JIAO Fei-peng(焦飞鹏) *et al.* Resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers by thin-layer chromatography on silica gel impregnated with β -cyclodextrin(β -环糊精固载硅胶薄层色谱法拆分盐酸克仑特罗对映体). *Chin J Chromatogr*(色谱) 2005 23(4):431
- 6 Song Yaru, Wang Defa, Yang Yiping *et al.* Direct separation and quantitative determination of clenbuterol enantiomers by high performance liquid chromatography using an amide type chiral stationary phase. *J Pharm Biomed Anal* 2003 31:311
- 7 HUANG Ke-long(黄可龙), HU Wei-guo(胡卫国), SU Jing(苏静) *et al.* Resolution of racemic clenbuterol by chiral extraction using combinatorial chiral selectors(组合手性萃取拆分克仑特罗外消旋体). *J Anal Sci*(分析科学学报) 2007 23(3):283
- 8 Yok K. Tan, Steven J. Soldin. Analysis of salbutamol enantiomers in human urine by chiral high performance liquid chromatography and preliminary studies related to the stereoselective disposition kinetics in man. *J Chromatogr Biomed Appl* 1987 422:187
- 9 WANG Ke-yi(王克夷). Alpha-1-acid glycoprotein(α_1 -酸性糖蛋白). *J Med Mol Biol*(国外医学分子生物学分册) 1991, 13(4):167
- 10 Hermansson J. Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with α_1 -acid glycoprotein. *Trends Anal Chem* 1989 8:251
- 11 YANG Ling(杨凌), RAN Gui-mei(冉桂梅), ZHANG Cai-hua(张才华) *et al.* Enantiomeric separation of trimebutine maleate by high performance liquid chromatography using α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase(α_1 -酸性糖蛋白柱拆分马来酸曲美布汀对映体). *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2005 33(5):668
- 12 XIE Zhi-hong(谢志红), LI Huan-de(李焕德). The influencing factors of drug by high performance liquid chromatography on α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase(用Chiral-AGP拆分手性药物的影响因素). *Cent South Pharm*(中南药学) 2008 6(1):76
- 13 Dalgliesh CE. The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms. *J Chem Soc* 1952 5:3940
- 14 JIN Wei(金薇), YANG Yong-jian(杨永健), PENG Xing-sheng(彭兴盛) *et al.* Direct enantiomeric separation of rabeprazole on α_1 -acid glycoprotein chiral column(雷贝拉唑对映体在 α_1 -酸性糖蛋白柱上的手性拆分). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006 26(12):1715

(本文于2011年8月29日修改回)