

沙丁胺醇在 3, 4 - 二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱上的对映体分离

于萍¹⁾, 苏蕾²⁾, 刘光³⁾, 李丽⁴⁾

(1) 云南省食品药品监督管理局不良反应中心, 云南昆明 650041; 2) 普洱市第一人民医院药剂科, 云南普洱 665000; 3) 昆明医科大学药学院, 云南昆明 650500; 4) 云南省肿瘤医院药剂科, 云南昆明 650052)

[摘要] **目的** 建立一种在自制手性柱上对沙丁胺醇进行了对映体分离的方法. **方法** 利用极性流动相中不同浓度的酸、碱添加剂在自制的 3, 4 - 二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱对沙丁胺醇对映体分离的研究, 初步探讨了手性识别机理. **结果** 流动相中酸、碱添加剂的比例为 0.01%: 0.01% (V/V), 流速为 1 mL/min, 柱温为 25 °C 时, 沙丁胺醇获得了最好的对映体分离, 选择因子为 1.16, 分离度达到 1.41. **结论** 自制的 3, 4 - 二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱对沙丁胺醇有一定的分离效果, 可以此为参考, 开发其他类似的手性固定相.

[关键词] 对映体分离; 沙丁胺醇; 极性流动相; 手性识别机理

[中图分类号] R962 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 10 - 0039 - 03

Enantioseparation of Salbutamol on the 3, 4-Dichlorophenyl Isocyanate Vancomycin Chiral Stationary Phase

YU Ping¹⁾, SU Lei²⁾, LIU Guang³⁾, LI Li⁴⁾

(1) Drug Adverse Reaction Center, Yunnan Provincial Food and Drug Administration, Kunming Yunnan 650041; 2) Dept. of Pharmacy, The First People's Hospital of Pu'er, Pu'er Yunnan 665000; 3) School of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 4) Dept. of Pharmacy, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming Yunnan 650052, China)

[Abstract] **Objective** To establish a self-made chiral column for enantiomeric separation of salbutamol. **Methods** We used different concentrations of acid, alkali additives in the polar phase flow for enantiomers separation of salbutamol by using 3, 4-dichlorophenyl isocyanate vancomycin chiral column, and discussed the chiral recognition mechanism. **Results** The ratio of acid to alkali additive in the mobile phase was 0.01%:0.01% (V/V), the flow rate was 1ml/min, the column temperature was 25 °C, and the best separation of enantiomers of salbutamol was obtained, the selective factor was 1.16, the separation degree reached 1.41. **Conclusion** Self-made 3, 4 - two chlorophenyl isocyanate vancomycin chiral column is effective for salbutamol separation, and it can be as a reference for developing other similar chiral stationary phase

[Key words] Enantioseparation; Salbutamol; Polar mobile phase; Chiral recognition mechanism

沙丁胺醇 (Salbutamol) 化学结构与异丙肾上腺素近似 (见图 1), 是一种选择性 β_2 -受体激动剂. 临床上主要用于治疗喘息型支气管炎、支气管哮喘、肺气肿所致的支气管痉挛^[1]. 沙丁胺醇有一个手性碳原子, 存在一对旋光异构体, 但目前药用的均为其外消旋体. 左旋沙丁胺醇是从消旋沙丁胺

醇分离提纯得到的单一对映体, 作为一种强效选择性受体兴奋药, 选择性松弛支气管平滑肌, 具有支气管扩张作用, 治疗哮喘并不比外消旋体差, 且副作用比外消旋体小、具有更高的治疗指数^[2]. 美国 FDA1999 年批准了 Sepracor 公司的新药左旋沙丁胺醇盐酸盐替代沙丁胺醇用于治疗哮喘. 因此对其

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (09Z0036)

[作者简介] 于萍 (1964~), 女, 云南昆明市人, 大学本科, 主管药师, 主要从事药理学研究工作.

[通讯作者] 李丽. E-mail:jiaojianlin66@163.com

进行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具有重要意义。

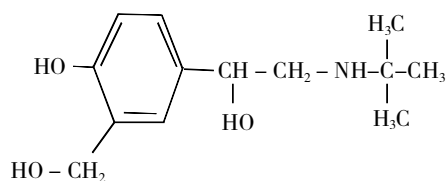


图 1 沙丁胺醇

Fig. 1 Salbutamol

高效液相色谱 (HPLC) 手性固定相 (CSP) 法是达到手性药物对映体分离的有效手段, 使用大环抗生素制备 CSP, 在正相和反相模式下拆分了一系列对映体, 开辟了手性分离科学领域一个新的研究热点. 随着分离机理的研究的逐步深入^[3], 大环抗生素手性固定相显示出了高效、高选择性和大载样量等独特的优势, 成为目前最具发展潜力的一类新型手性固定相. 万古霉素是最早作为 HPLC 手性固定相的大环抗生素, 万古霉素分子中既含有羟基又含有肽键, 对天然药物及手性氨基酸、醚等表现出良好的立体选择性^[3-5].

目前使用不同的手性固定相拆分沙丁胺醇对映体已有报道. 蔡梅等^[6]采用 Chiral-AGP 手性柱和毛细管电泳法分离了硫酸沙丁胺醇的两种对映体, 李凌云等^[7]在万古霉素手性固定相上, 对沙丁胺醇进行了手性分离. 沙丁胺醇在 3,4-二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱上的对映体分离未见报道.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

岛津 LC-2010A 高效相色谱仪, 岛津 SPD-M10AVP 检测器; 硫酸沙丁胺醇片 (常州康普药业有限公司), 甲醇 (天津市光复精细化工研究所, 色谱纯), 乙醇 (天津市风船化学试剂科技有限公司, 分析纯), 三乙胺 (中国医药集团上海化学试剂公司), 冰乙酸 (北京五二九五二化工厂, 分析纯).

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 3, 4-二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱 (250 mm × 4.6 mm) 由本实验室自制; 流动相为加入酸、碱添加剂的甲醇体系; 温度为 25℃; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长 225 nm; 进样量 10 μL.

1.2.2 样品和流动相的配制 硫酸沙丁胺醇片用乙醇溶解, 配成适合浓度, 经 0.2 μm 微孔膜过

滤. 流动相为甲醇加入不同比例的酸碱, 经 0.45 μm 微孔膜过滤并超声脱气后使用.

1.2.3 手性拆分参数 采用 3 项参数对手性拆分能力进行评价: (1) k'_1 (容量因子) = $\frac{t_1 - t_0}{t_0}$, t_0 为死时间, 由甲醇测得, t_1 为第 1 个对映体的保留时间; (2) α (选择因子) = $\frac{k'_2}{k'_1}$; (3) R (分离度) = $\frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$, 此处 t_1, t_2 为对映体的保留时间, w_1 和 w_2 为对映体峰宽.

2 结果

流动相中三乙胺和冰乙酸浓度及比例对分离的影响. 采用甲醇作为流动相, 添加冰乙酸和三乙胺进行对映体分离研究. 极性有机相中酸/碱的浓度和比例决定了溶质在手性固定相上的保留和对映体选择性. 固定极性有机相甲醇中冰乙酸和三乙胺的体积比为 1:1, 考察流动相中冰乙酸/三乙胺浓度对手性分离的影响; 固定冰乙酸的量, 改变三乙胺的量, 考察三乙胺浓度对手性分离的影响; 固定三乙胺的量, 改变冰乙酸的量, 考察冰乙酸浓度对手性分离的影响, 结果见表 1.

固定极性有机相甲醇中冰乙酸和三乙胺的体积比为 1:1 时, 随着三乙胺/冰乙酸从 0.40%:0.40% (V/V) 减少至 0.01%:0.01% (V/V), 手性溶质沙丁胺醇的保留因子随着流动相中冰乙酸/三乙胺含量增加而减弱, 选择因子基本不变, 分离度增大. 当流动相中酸碱添加剂为 0.01%:0.01% (V/V) 时, 得到较好的分离效果 (见图 2).

在极性有机相模式下, 手性物质与固定相之间主要存在着氢键作用、 $\pi - \pi$ 电荷转移作用和偶极叠加作用等^[4,5]. 由于密度不同, 当流动相中冰醋酸和三乙胺的比例为 1:1 时, 冰醋酸的摩尔数已经是三乙胺的 2 倍. 流动相中过量的酸会质子化固定相和溶质, 调节溶质和手性固定相表面所带电荷, 进而影响手性固定相与溶质之间的氢键作用. 随着流动相中酸碱的减少, 流动相和溶质及固定相之间的作用减弱, 溶质和固定相之间的作用增强, 分离效果变好^[8].

固定极性有机相甲醇中冰乙酸的浓度为 0.05, 改变三乙胺的浓度从 0.00 到 0.05, 0.10 再到 0.15, 研究三乙胺的变化对手性分离的影响. 再固定三乙胺的浓度为 0.05, 改变冰乙酸的浓度 0.00 到 0.05, 0.10 再到 0.15, 研究冰乙酸的浓度变化对手性分离的影响, 数据见表 1.

从表 1 中可以看出, 固定流动相中冰乙酸的浓度时, 随着三乙胺含量的增加, 沙丁胺醇的保留减弱, 选择因子基本不变, 分离度在三乙胺浓度为 0.05 时达到最大. 固定流动相中三乙胺的浓度时, 随着冰醋酸含量的增加, 沙丁胺醇的保留减弱, 选

择因子基本不变, 分离度在三乙胺浓度为 0.05 时达到最大. 无论流动相添加剂怎么改变, 沙丁胺醇的选择因子基本不变, 说明添加剂对两个对映体的影响基本一致.

表 1 流动相中酸碱添加剂浓度对沙丁胺醇对映体分离的影响

Tab. 1 The effect of concentrations of acid and basic additives in mobile phase on the separation of salbutamol enantiomers

化合物	流动相 (V/V/V) MeOH/HOAc/TEA	k_1'	k'	α	R
沙丁胺醇	100:0.40:0.40	0.62	0.73	1.18	0.43
	100:0.20:0.20	1.01	1.19	1.18	0.69
	100:0.10:0.10	1.58	1.85	1.17	0.99
	100:0.05:0.05	2.64	3.06	1.16	1.14
	100:0.01:0.01	7.84	8.95	1.16	1.41
	100:0.05:0.00	0.99	1.13	1.15	0.29
	100:0.05:0.10	2.18	2.55	1.17	0.78
	100:0.05:0.15	1.65	1.94	1.18	0
	100:0.00:0.05	4.12	4.53	1.18	0.32
	100:0.10:0.05	1.78	2.07	1.17	0.74
	100:0.15:0.05	1.14	1.35	1.18	0.61

色谱条件: 色谱柱: 3, 4- 二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性柱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 225 nm; 25°C.

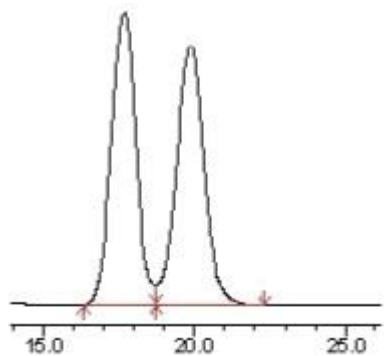


图 2 沙丁胺醇分离色谱图

Fig. 2 Salbutamol separation chromatogram

3 讨论

在极性流动相中, 用自制的 3, 4- 二氯苯基异氰酸酯万古霉素手性固定相对沙丁胺醇对映体进行了分离研究. 改变流动相中添加剂的浓度和比例, 沙丁胺醇的分离效果也有所不同. 随着流动相添加剂浓度的减小, 沙丁胺醇的保留增强, 分离度也相应增加, 选择因子基本不变. 改变流动相添加剂的比例, 沙丁胺醇的保留随着酸 / 碱的增加而减小, 分离度均是在酸 / 碱为 0.05: 0.05 (V/V) 时达到最大. 无论流动相添加剂的浓度和比例如何改变, 沙丁胺醇的选择性几乎不变, 说明流动相添加剂并不会改变分离的实质. 结果表明: 经 3, 4- 二氯衍生的万古霉素手性固定相对沙丁胺醇有一定的分离效

果, 可以此为参考, 开发其他类似的手性固定相.

[参考文献]

- [1] 唐琴, 陈先勇, 宋航. 四种选择性 β_2 受体药物在不同酰胺型固定相上的拆分[J]. 分析化学学报, 2011, 27(3): 326 - 330
- [2] RONALD J, WANG S H, STACEY R. The Impact of Nebulized Levalbuterol on Health Care Payments for Elderly Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients in Medicaid Plans [J]. Disease Management & Health Outcomes, 2007, 15 (1): 41 - 55
- [3] RUNDLETT K L, GASPER M P, ZHOU E Y, et al. Capillary electrophoretic enantiomeric separations using the glycopeptide antibiotic, teicoplanin [J]. Chirality, 1996, 8(1): 88 - 107.
- [4] 惠方民, 陈永雷, 陈兴国. 糖肽大环抗生素作选择试剂的高效液相色谱和毛细管电泳的手性识别机理[J]. 分析化学, 2004, 32(7): 964 - 968.
- [5] SUN Q, OLESIK S V. Chiral separation by simultaneous use of vancomycin as stationary phase chiral selector and-chiral mobile phase additive [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 74(1): 159 - 166.
- [6] 蔡梅, 李忠红, 杨丹. 硫酸沙丁胺醇的手性分离[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 159 - 161.
- [7] 李凌云, 钱宝英, 高如瑜, 等. 万古霉素手性固定相分离几种药物对映体[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 83 - 85.
- [8] 徐贝佳, 张大同, 沈报春, 等. 7种氨基醇类药物在替考拉宁柱上的对映体分离 [J]. 分析化学研究报告, 2007, 35(1): 55 - 60.

(2013 - 07 - 18 收稿)