

第五十期 电子期刊
手性药物的色谱制备拆分技术

2013年1月

HIGH QUALITY EXPERT



手性药物的色谱制备拆分技术

摘要：手性拆分是获得手性药物的重要途径。我们将近年来应用于手性药物拆分的色谱技术进行了整理、概括，着重比较了它们在制备规模上的优缺点。尽管各种色谱拆分技术在手性药物的拆分上都有应用，但就工业制备来说，HPLC、SMB、SFC 最有前景。色谱技术在手性药物的制备拆分领域将发挥越来越重要的作用。

手性，是用来表达化合物分子结构不对称性的术语。手性是自然界的本质属性之一，是三维物体的基本属性。人的手是不对称的，左手和右手不能互相叠合，彼此是实物和镜像的关系。这种关系在化学中称为“对映关系”，具有对映关系的两个物体互为“对映体”（Enantiomers）。生命体系就是一个手性环境，生物体的基本组成成分蛋白质、多糖、核酸、酶等几乎都是手性的。

20 世纪 60 年代震惊世人的沙利度胺事件证实了手性药物的不同对映体间往往显示出不同的药理学、毒理学及药代动力学性质。为了保证用药安全，美国食品和药物管理局（FDA）1992 年就发布了手性药物指导原则，要求所有在美国上市的消旋体新药的生产者均需提供有关

报道说明药物中所含对映体的各自药理作用、毒性和临床效果。这意味着申请消旋药物时至少得做 3 组（如果是一个手性中心）药理、临床数据，这无疑加大研究费用和工作量。如果开发光学纯药物，只需做一组实验即可，所以选择光学纯药物开发似乎更经济、合算。近年来，我国食品药品监督管理局（SFDA）也对手性药物的研究与开发做出了相应的规定。据相关统计数据，2002 年全球 500 种畅销药物中手性化学品药物有 289 种，占 59%。手性化合物的获得一般可以通过手性合成和手性拆分两种途径。手性合成不但步骤多，产率不高，至今还未得到广泛的应用。因此，目前大约 65% 非天然对映体药物都是通过手性拆分的方法制造的。因此外消旋体的拆分方法是目前获取单一手性物质的主要办法。

当前用于手性化合物拆分的方法主要有结晶法、化学拆分法、酶法、萃取法、色谱法、膜分离等方法。其中色谱法因其快速、高效、成本相对低等优势而得到广泛的应用。

1. 液相色谱

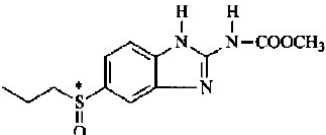
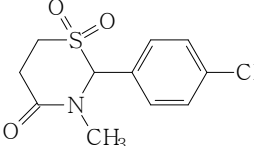
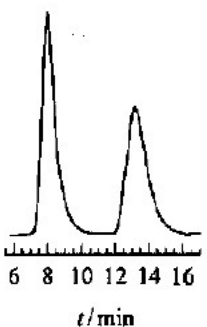
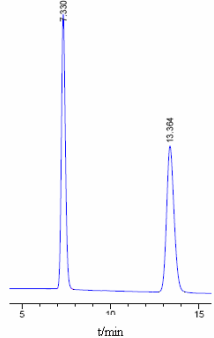
1.1 高效液相色谱 (HPLC)

HPLC 在拆分对映体时通常有三种方法：1) 手性衍生化试剂法 (CDR)，即对映异构体先与一种光学纯的试剂反应生成非对映异构体，然后在非手性环境下分离；2) 在流动相中加入手性添加剂，利用非手性固定相 HPLC 进行拆分；3) 利用手性固定相 (Chiral Stationary Phase, 简称 CSP) 的 HPLC 进行拆分。制备拆分固定相主要有多糖类手性固定相、手性聚合物、基于蛋白质的固定相、“刷型”手性固定相 (又称 Pirkle 型)、配位体交换手性固定相和冠醚类键合固定相等。

1.1.1 多糖类手性固定相

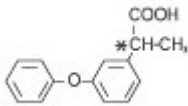
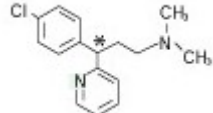
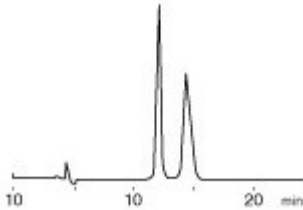
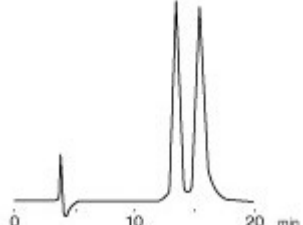
Okamoto 等发展的多糖类固定相是非常有用的分离工具，它们种类繁多、耐用而且负荷量大。此类手性固定相在 HPLC 中的应用相当广泛，据报道有 84% 的小分子外消旋化合物可用 OD、AD、OJ、AS 分离，适用于各种化学结构的手性物质的拆分。例如骨骼肌松弛药氯美扎酮 (chlortalidone) 以 OD 为固定相，每批量可拆分 250mg；抗炎药羟吲达酸 (oxindanac) 有批量可达 20g。最近，翟宗德等用自制的直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) [Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), ADMPC] 手性固定相，对广谱驱虫药物阿苯达唑亚砜外消旋对映体进行了半制备拆分。

表 1 多糖类手性固定相拆分实例

阿苯达唑亚砜 Albendazole sulfoxide	氯美扎酮 chlortalidone
	
	
AD 4.6×250 mm	OD 4.6×250 mm
正己烷 / 异丙醇 / 甲醇 =75/15/15	正己烷/乙醇=50/50
2.0ml/min	1.0ml/min
25°C	25°C
UV at 254nm	UV at 254nm

除常见的纤维素类、淀粉类外，多糖类手性固定相还可以用环糊精作成。环糊精 (cyclodextrin, CD) 是一类环形寡聚糖，为手性高分子物质。环糊精可分为 α -、 β -、 γ -三类，分别由 6, 7, 8 个 D-吡喃葡萄糖单元组成，将 CD 分别通过硅烷链连接在硅胶表面就构成环糊精手性固定相。环糊精分子成锥桶状，构成一个洞穴，洞穴的孔径由组成环糊精的吡喃葡萄糖的个数决定。如常用的 β -环糊精由七个葡萄糖分子组成，洞穴孔径为 0.6~0.8nm。用环糊精手性固定相进行分离时要求被拆分物的疏水部分能嵌入洞穴，形成包合物。优化手性分离条件时通常要考虑 pH 值、流速、柱温、有机相比、缓冲溶液等方面。最近，通过将不同的基团键合到环糊精洞穴表面上的羟基对环

表 2 β -环糊精类手性固定相拆分实例

非诺洛芬 Fenoprofen	氯苯吡胺 Chlorpheniramine
	
	
YMC CHIRAL β -CD BR	
4.6×250 mm	
0.5 M triethylamineacetic acid (pH4.0)/acetonitrile(10/90)	0.5 M triethylamineacetic acid (pH5.4)/acetonitrile(95/5)
1.0ml/min	
25°C	
UV at 254nm	

糊精的修饰使此类手性固定相可以分离更多的化合物，并可用于气相色谱。另外，价格和手性识别能力上的优势也使其更适用于制备色谱。

慧德易公司自制的 Chiral-Tech OD 和 AD 系列手性色谱柱，选用进口高纯硅胶做基质材料，采用独特的涂敷技术，在硅胶表面均匀涂敷纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)和

直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)。本系列色谱柱属于高通用型手性色谱柱,性能出众,适合分离各种类型的手性化合物,如心得舒(阿普洛尔)、心得平(氧烯洛尔)、心得安(普萘洛尔)、氯酰心胺、黄烷酮、美托洛尔、吲哚洛尔,延胡索乙素、酮洛芬等。如需拆分的色谱图和色谱条件,请致电或者发邮件向我公司索取。

1.1.2 手性聚合物

聚酰胺类、聚氨酯类及聚甲基丙烯酸酯等都是常用的色谱拆分试剂,其中交联的聚丙烯酰胺是最有用的手性固定相,可用于手性药物分子的制备。外消旋的利尿降压药氯噻酮(chlortalidone)就可以通过聚丙烯酰胺柱来进行制备拆分,每批量可得400mg。

1.1.3 基于蛋白质的固定相

基于蛋白质的固定相是将蛋白质固定于硅胶表面作为固定相。分离依赖于疏水相互作用和极性相互作用。常用的有 α 1-酸性糖蛋白(AGP)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)和卵类粘蛋白(OV)。常用流动相是磷酸盐缓冲溶液(pH 4~7)和很小比例的有机改性剂(一般不得超过5%)。例如,最近报道了质子泵抑制剂雷贝拉唑(rabeprazole)在AGP柱上得到了良好的拆分。这类固定相应用最广,但效果并不是最好。由于该类固定相的载样量较小,影响了它在制备拆分上的应用。

1.1.4 “刷型”手性固定相(又称Pirkle型)

此类手性固定相的出现和发展源于美国学者Pirkle及其同事的卓越贡献。 π -酸性固定相可以分离许多可提供电子的芳香族化合物,或用氯化萘酚等对化合物进行衍生后再进行手性分离。最常见的 π -酸性固定相是由(R)-N-3,5-二硝基苯甲酰苯基甘氨酸键合到 γ -氨丙基硅胶上制成的。如镇静催眠药奥沙西洋(oxazepam)在此固定相上拆分,每批可获得单一对映体5mg。 π -碱固定相常见的是共价结合到硅胶上的萘基氨基酸衍生物,可以分离许多具有可接受电子基团的化合物,或用氯化二硝基苯甲酰、二硝基苯胺等对化合物进行衍生后再进行手性分离。此类固定相的优势在于其易于合成、高的容量因子和选择因子。但它的不足之处在于它仅对芳香族化合物有效,有时不得不进行非手性衍生。由于流动相基本是极性弱的有机溶剂,这对于手性制备色谱来讲也是个优势。

1.1.5 配体交换手性固定相

1961年, Helfferich 创立了配体交换色谱(LEC)的技术,通过 Rogozhin 和 Davankov 的进一步发展,成为了一种非常用的手性色谱方法,主要拆分氨基醇、氨基酸及其类手性药物。流动相中必须含有中心金属离子(通常是铜离子)以保证固定相上的金属离子不至流失,这就增加了样品处理的困难,但因其负载量大,可用于制备拆分。

1.1.6 冠醚类键合固定相

冠醚源化合物有亲水性内腔和亲脂性外壳,可键合在硅胶或聚苯乙烯基质上制成手性固定相。它主要用于分离一级胺,尤其是氨基酸及其衍生物的分离,但一级胺必须质子化方能达到分离。因此,流动相必须是酸性的,多采用高氯酸水溶液中加入一定比例($\leq 5\%$)甲醇。最常用的冠醚类键合固定相是 18-冠-6。

1.2 薄层色谱(TLC)和快速柱色谱(Flash Chromatography)

薄层色谱是最简便的色谱技术之一,具有操作方便、设备简单、色谱参数易调整等特点。快速柱色谱是基于通过泵产生压力(低压),加速流动相通过预填充柱子的洗脱速度的一种快速制备柱层析形式。这是接近制备液相色谱的一种简单和节约的方法。但是,效率低,手性固定相价格昂贵限制了它们在制备规模上应用。

1.3 模拟移动床色谱(Simulated moving bed Chromatography, SMB)

模拟移动床技术起于 20 世纪 60 年代 UOP(Universal Oil Products, Des Plaines, IL, USA)从 C8 中分离对二甲苯,后来该技术被广泛用于制药工业,以获得光学纯药物。至今批次处理色谱在应用中仍占主导地位,但大规模制备需要大量 CSP。CSP 价格昂贵,而且产品的浓度低,洗脱液消耗量大,难以回收。

广阔的应用前景和巨大的市场需求，推动了手性分离技术的研究。与手性药物的化学拆分、酶法拆分、固定床制备色谱拆分、不对称合成等方法相比，模拟移动床色谱具有周期短、成本低、风险小、分离效率高、固定相利用率高、流动相循环使用、自动化连续操作等优势，已被国际上公认为制备规模拆分手性药物的最有效手段。目前世界上美、德、法、日等少数几个发达国家已掌握该技术。如 Nagamatsu 等人采用模拟移动床色谱分离公斤级的手性新药中间体 DOLE（一种用于生产降胆固醇药物的中间体）的研究表明：模拟移动床色谱基于单位质量手性固定相的生产能力可以达到固定床制备色谱的 20 倍，而获得单位质量产品的流动相消耗量则只有后者的 1/20。Peter 等利用超临界模拟移动床色谱分离了布洛芬（Ibuprofen）异构体。

模拟移动床色谱的基本工作原理是将多根色谱柱串联在一起，每根色谱柱均设有物料的进出口，并通过操作开关阀组沿着有机溶剂流动相的循环流动方向定时切换，从而周期性改变物料的进出口位置，以此来模拟固定相与流动相之间的逆流移动，实现组分之间的连续分离。图 2 是模拟移动床色谱的工作原理示意图，流动相入口与萃取口之间的区域为 I 区，萃取口与进样口之间的区域为 II 区，进样口与残余口之间的区域为 III 区，残余口与流动相入口之间的区域为 IV 区。

模拟移动床的设备结构图

图 1



图 2 所示的模拟移动床色谱由 8 根色谱柱组成, 各区均配置 2 根色谱柱, 通过选择合理的设计参数与操作参数, 使弱保留组分富集在残余口流出的残余液中, 强保留组分富集在萃取口流出的萃取液中, 从而实现弱保留组分与强保留组分的连续分离。

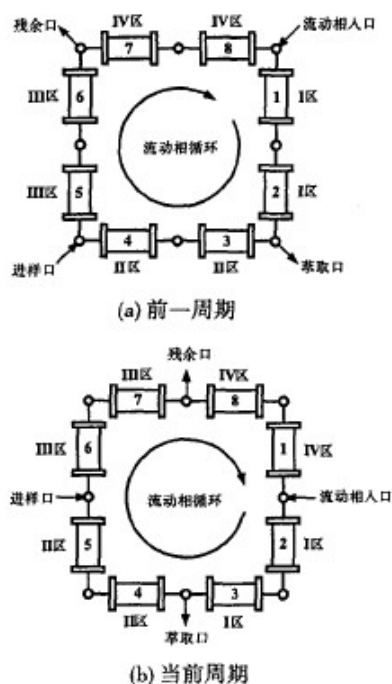
应用于 SMB 的 CSP 约有 70% 是多糖类 CSP。如 Nagamatsu 等用 SMB 方法替代以前的非对映体结晶的方法, 用稍做改性的 Chiralcel OF(cellulose 4-chlorophenylcarbamate) 分离了一种制药工业的中间体喹啉甲瓦龙酸酯。如何在保持较高效率的前提下提高手性药物的分离量, 是 SMB 在手性药物拆分领域所面临的主要问题。

1. 4 逆流色谱 (Countercurrent Chromatography, CCC)

逆流色谱是一种不用固态支撑体或载体的液液分离技术。在分离的过程中完全消除了气、液色谱中常见的不可逆吸附现象, 不会破坏分子, 适用于分离极性大的手性化合物及生物大分子。由于 CCC 独特的液液分离机制, 负载能力强, 一次最大可以分离近 10g 的样品, 可用于制备拆分。它主要分为液滴逆流色谱 (DCCC)、旋转腔逆流色谱 (RLCCC)、离心分离逆向色谱 (CPC)、高速逆流色谱 (HSCCC) 四大类。我国是美国之外最早开发应用此技术的国家, 在 HSCCC 仪器的研制方面处于国际领先地位。制约它的主要因素是分离效果不高和能否找到合适的高选择性手性添加剂。

模拟移动床色谱的工作原理示意图

图 2



2. 超临界流体色谱 (SFC)

超临界流体色谱 (SFC) 是从 20 世纪 80 年代中期迅速发展起来的一种新型的拆分技术。它利用 CO₂ 等超临界流体的黏度低、密度大、扩散系数大而具有气体动力学优势。其中最具吸引力的流动相是超临界 CO₂ (临界温度 31.05 °C, 临界压力 7.3MPa)。这是因为超临界 CO₂ 的密度、溶解能力和洗脱强度都随压力升高而增大, 可通过简单的压力程序实现梯度洗脱。另外, 低成本、低毒性、工业易得高纯度也是它适合于大量生产的优势。SFC 比 GC 更温和, 热不稳定、难挥发或不易衍生化的中低分子量的非离子手性化合物, 不能用 GC 分析, 可采用 SFC 方法。但是, 这种方法只局限于相对分子量较小 (一般不超过 1500) 和极性不太大的对映体的拆分, 所以应用不是很广泛。SFC 通常与其他手性拆分技术配合应用, 如: 以 Whelk-O-1 为固定相, CO₂/异丙醇/醋酸 = 75/25/0.5 为流动相, 可以对 200mg (+/-)-warfarin 样品快速地进行拆分, 结果比较令人满意。

超临界流体色谱仪的设备结构图。

图 3



3. 气相色谱

手性气相色谱是较早用来进行对映体分离的一种分离色谱方法。它速度快、简单、灵敏, 在分离对映体时, 其分离度重复性和精度都很高, 尤其适于分离可挥发的热稳定手性分子。按照拆分机制 GC 手性固定相可分为三类: 基于氢键的手性固定相; 基于配位作用的手性金属配合物固定相; 基于包含作用的环糊精衍生物固定相。尽管气相色谱是开发较早的一种分离对映体的色谱手段, 但存在着一些固有的局限性, 如要求分析样品具有一定的挥发性和热稳定性。因此, 与液相色谱比较, 气相色谱要实现制备比较困难。

4. 结语

我国是人口大国，随着社会经济的发展和水平的提高，人们对健康愈加重视，医疗保健市场广阔，相应地手性药物的需求也将是极大的。因此，我们应该在手性药物的分析、分离和制备等方面积极探索，以适应社会发展的需要。现代色谱制备拆分技术具有高效、简便的特点，尤其是 HPLC、SMB、SFC 已经在工业化生产中得到广泛地应用，对于一般的手性药物都能制备拆分。随着新填料的开发和新技术的出现，色谱技术在手性药物的制备拆分上将有更广阔的前景。

北京慧德易科技有限责任公司致力于为天然产物、生物制药、手性药物、化学合成药物等相关企业及科研院所提供专业和高品质的分离树脂、纯化介质、高效液相色谱柱及配套试剂和溶剂，以及全套的分析液相、中压和高压制备液相、工业层析操作系统和层析柱，为客户提供从小试、中试及生产全套设备及工艺的完整解决方案。最新推出的手性色谱柱 Chiral-Tech OD 和 AD 系列，性能出众，适合分离各种类型的手性化合物。我们还为客户提供免费试用服务，让您的购买免除后顾之忧。近日，会陆续推出 AS 和 OJ 系列的色谱柱，敬请期待和关注。我们的目标是帮助客户在新药研发和产品精制及质量检测等环节提升质量、提高效率、节省成本，与客户共成长！

如有产品疑问，欢迎来电来邮垂询，北京慧德易全体员工竭诚为您服务！

北京总公司：

地址：北京昌平区回龙观西大街龙冠置业大厦 609 室

热线：(010)-59812370, 59812371, 59812372, 59812373

传真：(010)-59812400

网站：<http://www.prep-hplc.com>

邮箱：sales@prep-hplc.com

邮编：102208