

克伦特罗和马布特罗在替考拉宁手性柱上的对映体分离

韩亚琼, 余小燕, 谷晓娟, 沈报春

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究自制的替考拉宁手性色谱柱上对克伦特罗和马布特罗进行对映体分离, 探讨其手性识别机理. **方法** 在流动相组成的甲醇/乙醇/冰醋酸/三乙胺 = 50/50/0.05/0.05 (V/V/V/V), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25℃下, 应用了极性流动相中不同浓度的酸碱添加剂, 不同浓度的乙醇, 柱温和流速对克伦特罗和马布特罗对映体进行分离. **结果** 在上述条件下, 克伦特罗对映体和马布特罗对映体的选择因子分别达到 1.37 和 1.51. **结论** 自制的替考拉宁手性柱对克伦特罗和马布特罗的对映体具有一定的分离效果.

[关键词] 对映体分离; 克伦特罗; 马布特罗; 手性识别机理

[中图分类号] TQ460.7*2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2013) 06 - 0012 - 05

Enantioseparation of Clenbuterol and Mabuterol on the Teicoplanin Chiral Stationary Phase

HAN Ya - qiong, YU Xiao - yan, GU Xiao - juan, SHEN Bao - chun

(School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** Using the polar mobile phase, the enantioseparation of clenbuterol and mabuterol on the self-made teicoplanin chiral stationary phase were studied. **Methods** The mobile phase consisted of methanol : ethanol:acetic acid:triethylamine = 50:50:0.05:0.05 (V/V/V) with a flow rate of 1.0 mL/min and column temperature of 25 °C . The influences of the proportion of acetic acid and triethylamine, ethanol concentration, column temperature and flow rate on the enantioseparation were investigated. The chiral recognition mechanism was also discussed. **Results** Under the optimal conditions, the separation factor for clenbuterol and mabuterol was 1.37 and 1.51, respectively. **Conclusion** The result showed that the isomers of clenbuterol and mabuterol could be separated on the self-made teicoplanin chiral stationary phase in the polar mobile phase.

[Key words] Enantioseparation; Clenbuterol; Mabuterol; Chiral recognition mechanism

克伦特罗 (Clenbuterol) 和马布特罗 (Mabuterol) 均是具有选择性的 β_2 肾上腺素受体激动剂, 此类药物因为能够促进瘦肉生长、抑制动物脂肪生长, 所以统称“瘦肉精”。在临床上作为支气管解痉药物, 口服或肌注后能选择性的松弛支气管平滑肌, 具有扩张支气管的作用, 常用来防治哮喘、肺气肿等肺部疾病^[1]。从化学结构 (图 1, 2) 来看, 克伦特罗和马布特罗均只有一个手性碳原子, 存在一对旋光异构体, 但目前药用的均

为其外消旋体, 如果长期或大剂量服用外消旋药物, 其残留部分则会在体内沉积, 直接威胁人类健康。瘦肉精在上海曾经引发了几百人的中毒事件。研究表明, 在临床上有效的一般为其 (-) - 异构体, 而 (+) - 异构体则对疗效没有贡献^[2]。其对映体之间存在着明显不同的药理活性和较大的动力学差异, 因此其拆分工作尤为重要。

克伦特罗和马布特罗的高效液相色谱手性拆分目前已有报道, 唐琴等人用 Whelk-O1 手性固定相

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81102408); 昆明医科大学本科试验药理学示范中心资助项目 (2012)

[作者简介] 韩亚琼 (1988 ~), 女, 河南登封市人, 在读硕士研究生, 主要从事药物分析工作。

[通讯作者] 沈报春. E-mail:shen_baochun@126.com

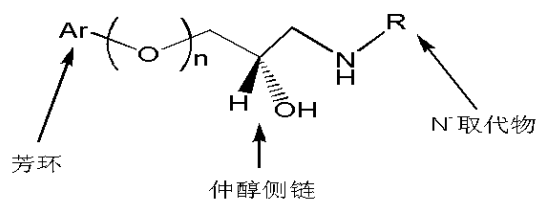


图1 盐酸克伦特罗的结构式

Fig. 1 Structural formula of clenbuterol

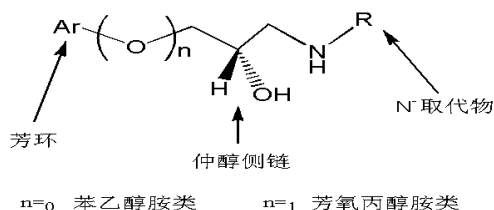


图2 盐酸马布特罗的结构式

Fig. 2 Structural formula of mabuterol

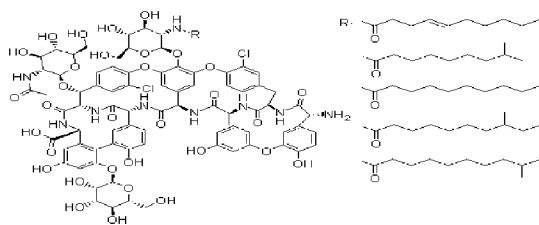


图3 替考拉宁的结构式

Fig. 3 Structural formula of teicoplanin

对克伦特罗对映体进行了对映体拆分^[3], 于金刚等人曾经用酒石酸酯固载薄层色谱法成功拆分了克伦特罗对映体^[4], 黄可龙等人用毛细管电泳法以羟丙基-B-环糊精为手性添加剂对克伦特罗进行了对映体分离^[5], 黄可龙等人以D-二苯甲酰酒石酸(D-DBTA)和D-二对甲苯甲酰酒石酸(D-DTTA)的组合作为手性选择剂萃取拆分克伦特罗外消旋体^[6]等。

自1994年Armstrong等^[7]首次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自此以后, 短短几年的时间, 大环抗生素应用于高效液相色谱(HPLC)薄层色谱(TLC)毛细管电泳(CE)毛细管电泳-质谱(CE-MS)和毛细管电色谱(CEC), 已成功分离了多类光学异构体, 分离机理的研究也逐步深入^[8]。替考拉宁是由Actinoplanes teichomyceticus菌产生的大环糖肽类抗生素^[9], 结构式见图3。它是继万古霉素之后被成功用于HPLC的大环抗生素手性固定相, 它作为商品化手性柱在很多手性分离中获得了成功的应用。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

岛津LC-2010A高效液相色谱仪, 岛津SPD-M10AVP检测器。盐酸克伦特罗(Dr.EhrentorferGmbH-bgm, -schlosser-str. 6A-86199Augstburg-Germany); 盐酸马布特罗(Dr.EhrentorferGmbH-bgm, -schlosser-str.6A-86199Augstburg-Germany); 甲醇(天津市光复精细化工研究所, 色谱醇); 乙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司, 分析纯); 异丙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司, 分析纯); 正丙醇(天津市风船化学试剂科技有限公司, 分析纯); 叔丁醇(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, 分析纯); 冰乙酸(北京五二九五二化工厂; 分析纯); 娃哈哈矿泉水。

1.2 色谱条件

替考拉宁手性柱(实验室自制, 250 mm × 4.6 mm); 流动相为加入酸碱添加剂的甲醇体系; 温度25℃; 流速1.0 mL/min; 检测波长225 nm; 进样量10 μL。

1.3 样品和流动相的配制

克伦特罗和马布特罗2种氨基醇类药物用乙醇溶解, 配成适合浓度, 经0.22 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。

1.4 手性拆分参数

以下项参数用于手性拆分能力的评价: t' (容量因子) = $(t_1 - t_0)/t_0$, t_0 为固定时间, 由甲醇测得, t_1 为第1个对映体的保留时间:

$$\alpha(\text{选择因子}) = K_2 / K_1$$

$R(\text{分离度}) = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ 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

2.1 克伦特罗和马布特罗的结构对分离选择性的影响

在自制的替考拉宁手性柱上采用极性有机相体系对克伦特罗和马布特罗2种药物进行对映体分离实验, 结果见表1。

2.2 流动相中冰醋酸/三乙胺浓度对马布特罗和克伦特罗对映体分离的影响

固定极性有机相甲醇中冰醋酸和三乙胺的比例为1:1, 考察流动相中冰醋酸/三乙胺浓度对2个

手性药物分离的影响. 保持冰醋酸 / 三乙胺的比例为 1:1, 改变流动相冰醋酸 / 三乙胺从 0.005% : 0.05% 到 0.20% : 0.20% (V/V/V) 的范围内, 两种手性溶质的保留因子均随着流动相中冰醋酸 / 三乙胺含量的增加而减小 (见表 1) .

2.3 流动相中乙醇的浓度对克伦特罗和马布特罗对映体分离的影响

在添加乙醇的极性模式下, 固定冰醋酸 / 三乙胺的含量为 0.05% : 0.05% (V:V), 改变流动相中乙醇的浓度, 考察流动相中乙醇的浓度对克伦特罗和马布特罗在替考拉宁手性柱上分离的影响, 结果见表 2.

2.4 温度对克伦特罗和马布特罗对映体分离的影响

固定流速为 1.0 mL/min, 流动相组成为 MeOH/HOAc/TEA (V/V/V) 100:0.05:0.05, 测定不同温度下克伦特罗和马布特罗对映异构体的保留时间 t_R . 经处理数据得分离因子 α 和分离度 (RS), 结果见表 3.

2.5 流速对马布特罗和克伦特罗对映体分离的影响

流速对对映体分离度和保留时间有着重要的影响. 固定柱温为 25 °C, 流动相组成为 MeOH/HOAc/TEA (V/V/V) 100:0.05:0.05, 考察了克伦特罗和马布特罗对映体在 0.4 mL/min, 0.8 mL/min, 1.0 mL/min, 1.2 mL/min 和 1.5 mL/min 下的分离情况, 结果见表 4.

表 1 极性流动相中马布特罗和克伦特罗在替考拉宁手性固定相拆分的结果

Tab. 1 The retention capacity factor (k'_1), separation factor (α) and resolution factor (R_s) of clenbuterol and mabuterol on teicoplanin-based chiral stationary phase in the polar

化合物	流动相 MeOH/HOAc/TEA (V/V/V)	TE-CSP		
		k'_1	α	R_s
盐酸克伦特罗	100:0.20:0.20	0.66	1.25	1.11
	100:0.05:0.05	1.27	1.26	1.56
	100:0.005:0.005	4.48	1.24	2.16
盐酸马布特罗	100:0.20:0.20	0.41	1.34	1.07
	100:0.05:0.05	0.87	1.32	1.60
	100:0.005:0.005	3.16	1.32	2.28

手性柱: 替考拉宁; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 225 nm; 流动相: MeOH/HOAc/TEA (V/V/V) .

表 2 极性流动相中乙醇浓度对对映体分离的影响

Tab. 2 The influence of ethanol concentration on enantioseparation

化合物	流动相 MeOH/EtOH(V/V)	TE-CSP		
		k'_1	α	RS
盐酸克伦特罗	70:30	1.34	1.34	1.48
	50:50	1.56	1.37	1.64
	30:70	1.82	1.41	1.61
盐酸马布特罗	70:30	0.88	1.44	1.51
	50:50	0.98	1.51	1.78
	30:70	1.15	1.55	1.75

表 3 温度对对映体选择性的影响

Tab. 3 The influence of temperature on enantioseparation

化合物	开氏温度 (T)	保留时间(min)		分离因子 (α)	分离度 (RS)
		t_1	t_2		
盐酸克伦特罗	293.15	7.076	8.204	1.29	1.60
	298.15	7.243	8.351	1.27	1.51
	303.15	7.084	8.08	1.26	1.50
	308.15	7.114	8.081	1.25	1.48
	293.15	5.895	6.802	1.34	1.58
盐酸马布特罗	298.15	5.962	6.868	1.33	1.52
	303.15	5.855	6.686	1.32	1.50
	308.15	5.91	6.72	1.30	1.50

表 4 流速对对映体选择性的影响

Tab. 4 The influence of flow rate on enantioseparation

化合物	流速(mL/min)	保留时间(min)		分离因子 (α)	分离度 (R_s)
		t_1	t_2		
盐酸克伦特罗	0.4	17.185	19.823	1.20	2.01
	0.8	8.787	10.106	1.24	1.69
	1.0	7.376	8.443	1.26	1.56
	1.2	6.675	7.669	1.30	1.55
	1.5	5.954	6.862	1.34	1.52
盐酸马布特罗	0.4	13.821	16.081	1.21	2.07
	0.8	7.225	8.359	1.30	1.83
	1.0	6.044	6.948	1.32	1.60
	1.2	5.385	6.232	1.40	1.60
	1.5	4.918	5.667	1.45	1.57

3 讨论

从表 1 中的数据可以看出, 克伦特罗和马布特罗这 2 种药物的化学结构有一定的相似之处, 2 种药物都只有 1 个碳手性中心, 因此有 2 个光学异构体. 手性中心的一边均连接一个仲胺, 另一端的芳香环是 1 个苯环, 且都含有亚氨基和羟基. 因此溶质能够与固定相之间形成氢键作用和 $\pi-\pi$ 作用. 2 种药物的不同点为两者芳环上的取代基种类不相同, 马布特罗的取代基为氯原子, 克伦特罗取代基为 $-\text{CF}_3$. 因此, 克伦特罗与手性固定相之间的氢键或离子键作用更强些, 所以在替考拉宁手性柱上保留也比马布特罗强.

从表 1 中的数据可以看出, 随着流动相中酸碱浓度的增加, 流动相的极性也在增加. 同时由于冰乙酸和三乙胺分子量和密度的差异, 在 1:1 的条件下, 冰醋酸的摩尔数已是三乙胺的两倍, 过量的酸可以使溶质和固定相质子化. 随着冰醋酸

的增多, 当酸的量超过质子化所需的量时, 酸的主要作用就变成了增加流动相的极性, 使溶质较快地被洗脱. 随着三乙胺 / 冰乙酸从 0.005%:0.005% (V/V) 增加至 0.20%:0.20% (V/V), 克伦特罗和马布特罗 2 种药物的分离因子 (α) 基本不变, 分离度减小. 这也同时说明了流动相极性的改变不影响手性识别的实质和当溶质保留增强时, 溶质与固定相作用得将更完全, 分离效果更好. 当流动相中酸碱添加剂为 0.005%:0.005% (V/V) 时, 2 个药物均得到较佳的分离效果.

由表 2 可知, 在所有给定的流动相条件下, 随着流动相中乙醇的浓度的增加, 2 种药物在 TE-CSP 上的保留因子 (k') 和分离因子 (α) 也随之增加, 同时分离度 (RS) 是先增大后减小. 出现这种现象可能有 2 方面原因: 一方面因为乙醇的极性小于甲醇的极性, 随着流动相中乙醇的浓度增大, 从而使流动相的极性减小, 流动相的洗脱能力减弱, 保留增强; 另一方面乙醇比甲醇更容易与

固定相之间形成氢键,当增加流动相中乙醇的浓度,对映体与固定相之间的氢键作用增强,对映体的分离也会增强.克伦特罗和布特罗在此模式下均在替考拉宁手性上均获得很好的分离,其中分离效果最好的条件为甲醇/乙醇/冰醋酸/三乙胺=50/50/0.05/0.05 (V/V/V/V).

从表 3 中的数据可以看出,温度对克伦特罗和马布特罗在替考拉宁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的传质速度变慢,2 种化合物的对映体保留时间延长,故分离因子 α 增大.根据方程 $\ln \alpha = -\Delta(\Delta H) / RT + \Delta(\Delta S) / R$ 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^[9].在本实验中,随温度降低,分离因子 α 增大,这说明克伦特罗和马布特罗在替考拉宁手性固定相上的分离过程属吸附焓控制.权衡分离度、保留时间、峰形及实际操作性,选取最佳分离温度为 25℃.

从表 4 中的数据可以看出,随着流动相流速的降低,克伦特罗和马布特罗对映体的分离因子几乎不变,符合两相平衡与流速无关的热力学基础.然而流速的变化影响到了色谱峰的峰宽,随着流速的减小使得分离度明显的增加.虽流速低可增加分离度,但分析时间也会随之增加.权衡分离度、保留时间、峰形及实际操作性,故选取最佳流速为 1.0 mL/min.

[参考文献]

- [1] 杨浩峰,严蕾. 盐酸克伦特罗的药理作用、危害及检测 [J]. 地方病通报,2006,21(1):101-104.
- [2] GAUSEPOHL C, BLASCHKE G. Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr B: Biomed Sci Applic, 1998, 713(2):443-446.
- [3] 唐琴,宋航,付超,等. 高效液相色谱手性固定相法拆分克伦特罗对映体 [J]. 分析化学,2004,32(6):755-758.
- [4] 于金刚,刘素琴,黄可龙,等. 酒石酸酯固载薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映异构体 [J]. 色谱,2005,23(6):687.
- [5] 黄可龙,胡卫国,王蔚玲,等. 高效毛细管电泳对克伦特罗对映体的分离及定量检测 [J]. 分析科学学报,2007,23(1):9-12.
- [6] 黄可龙,胡卫国,焦飞鹏,等. 组合手性萃取拆分克伦特罗外消旋体 [J]. 分析科学学报,2007,23(3):283-286.
- [7] ARMSTRONG D W, TANG YUBING, CHEN SHUSHI, et al. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(9):1473-1484.
- [8] 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.
- [9] WARD T J, FAMISL, ALTON B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review [J]. Chromatogr A, 2001, 11(906):73-89.
- [10] ARMSTRONG D W, TANG Y B, CHEN S S, et al. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography [J]. Anal Chem, 1994, 66(9):1473-1484.

(2013-02-14 收稿)