

手性化学药物的液相色谱法分离探究

张敏

广州药博化学研究有限公司, 广东广州, 510890;

摘要: 手性药物在化学药物总量中占有较大比例, 该类型药物的药理作用是进入到生物体之后与体内大分子之间进行手性匹配或分子识别, 且手性药物的不同对映体成分在相同个体内具有不同药理作用和副作用, 由此可见, 开展针对手性药物的研究具有重要价值。文章以手性药物为研究对象, 先介绍了采用液相色谱法的优势, 随后, 围绕药物常用的液相色谱分离法展开了讨论, 分别说明了手性化合物的间接分离、直接分离的原理、优点和不足, 并对直接分离使用的流动相添加剂、固定相, 以及手性药物规模制备新发展趋势进行了详细介绍, 以供参考。

关键词: 液相色谱; 手性药物; 手性拆分; 手性分离; 色谱分离

DOI: 10.69979/3041-0673.24.11.046

前言

手性药物(chiral drug), 是指药物分子结构中引入手性中心后, 得到的一对互为实物与镜像的对映异构体。这些对映异构体的理化性质基本相似, 仅仅是旋光性有所差别。目前, 手性药物是医药行业的前沿领域, 行业有关人员多利用液相色谱法分离测定药物, 并且分析药物代谢物对映体组成和光学纯度产生的具体影响。液相色谱分离法的合理应用, 既能够帮助相关人员获得药理实验所需要的对映体, 同时也可以提供制备纯对映体的科学方案。大量的研究表明, 采取液相色谱法研究手性药物对映体, 有一定几率会受到固定相污染或谱带增宽的影响, 导致实验结果的灵敏度降低, 鉴于此, 本文探究合适的液相色谱法分离手段措施, 期望为手性药物的研究和质量管控提供有价值参考。

1 液相色谱法的优势

手性是指化学分子的实物与其镜像不能重叠的现象, 在自然界中普遍存在^[1]。手性药物的分离方法有三大类, 分别是物理拆分、化学拆分及生物拆分, 其中, 物理拆分以色谱法为典型代表^[2]。液相色谱法是分离、测定手性药物的一种常用方法, 与传统方法相比, 该方法具有以下优势: 一是可以有效地分离手性化合物, 特别适用于分离手性对映异构体。二是灵敏度高, 能够测定低浓度的手性药物, 保证测定结果准确、具有实际意义。三是可以通过选用不同手性固定相以及流动相, 实现对多数手性药物的高效分离。四是分析速度快, 通常只需花费较短时间, 便能完成手性药物的分离、定量测定和制备, 对药物研发还有质量控制十分重要, 可以极

大程度缩短手性混旋体拆分的时间, 提高工作效率。其中高效液相色谱仪(HPLC)在手性拆分方面具有显著的优势, 操作自动化, 成为手性化合物研究和生产中不可或缺的工具。

1.1 间接分离法

间接法是指先将化学试剂、对映体混合物相结合, 生成非对映体, 再用色谱试剂方法和固定相将非对映体进行分离的方法。反应条件如下: 手性试剂、反应生成物质具有稳定的手性、化学性, 即使长时间贮存, 其光学性也不会受到影响。手性药物、试剂及产物不会由于色谱条件、衍生化反应影响, 而出现消旋化情况。试剂对荧光、UV敏感, 可保证产物有可检测性。分离机制是: 手性结构、中心基团、色谱分离效率均会影响色谱系统非对映体的差速迁移, 科学选用手性试剂, 不仅能够保证产物分离度, 还可以提高衍生化反应具有的选择性。

该方法优点是价格低, 无需使用手性柱, 只用衍生化试剂便能够实现分离, 多用于无法直接分离或无紫外吸收等检测器信号的样品, 适合用于特殊手性化合物的分析。当然, 该方法同样存在不足, 一是对分离用试剂的纯度有严格要求, 要保证试剂有理想的稳定性、光学纯度, 不会受到色谱条件、衍生化反应影响。二是衍生化条件相对复杂, 要投入大量精力和时间, 分离试剂、反应生成单一对映体的难度大。三是反应产物不易转化为原手性单体, 难用于手性药物的规模制备。

1.2 直接分离法

直接法的特点是省略了柱前衍生化的步骤, 直接用手性流动相或是手性固定相来分离。

1.2.1 手性流动相添加剂法

已有文献报道采用手性固定相法、流动相添加剂法、毛细管电泳法对抗真菌药物的对映体进行拆分^[3]。其中，流动相添加剂法是将手性试剂加入流动相，充分利用试剂结合不同对映体的常数不同、结合物固定相/药物固定相对应分配系数不同的特性，实现分离手性药物的目标。其优点在于操作难度低，无需使用手性柱，并且可以酌情更换不同的添加剂。实际操作时，可以视情况使用以下添加剂：

(1) 离子对。对极性较低的流动相进行分析可知，在该流动相内，离子对试剂、对映体分子间存在由于氢键或静电反应而生成的非对映体，由于不同非对映体的稳定性不同、对吸附固定相/有机相的分配不同，因此，通常只需较短的时间，便能够实现分离^[2]。常用的离子对试剂有磷酸盐类、烷基磷酸盐类、季铵盐类。

(2) 氢键试剂。原理是将氢键作用于分子间，分离药物对映体，通常要搭配使用极性较低的流动相。如果添加剂分子所含氢键功能团的数量超过2个，则能够对互补结构的对映体进行有效分离。

(3) 配合交换。向色谱流动相内加入此类添加剂，可以生成结构稳定的三元非对映体，在能量差异的作用下，有选择性地吸附或是排斥固定相，达到分离不同对映体的目的。

(4) 蛋白质复合物。将蛋白质作为添加剂，可以在氢键、电荷转移、疏水性还有静电的共同作用下，生成能够有效分离对映体的复合物。

目前，行业中使用率较高的固定相为粒度适中的硅胶，该固定相的分离对象包括但不限于疏水胺类、氨基酸。

1.2.2 手性固定相分离法

该方法的原理是利用固定相对映体有不同吸附能力、解吸附能力这一特性，对手性药物进行分离^[3]。其优点和不足均十分突出，优点是可以省略衍生化试剂，增大光学纯度，可用于定量制备，降低分析的时间和成本，不足是通用性、普适性不理想，部分样品需要先进行柱前流动相衍生化，才能被分离。

常用的固定相有以下几种：

(1) 天然高分子化合物

常见以多糖衍生物为主，通过对天然多糖高分子（如纤维素和直链淀粉等）进行功能化分子结构设计，

应用一系列区域选择性方法对多糖类糖单元2-、3-及6-位的羟基进行活化并引入不同结构官能团加以修饰，合成2-、3-、6-位分别具有不同结构区域选择性官能团的涂覆型和键合型多糖类手性固定相，该固定相具有手性识别能力强、稳定性好及工艺简单等优点，是目前应用最广泛和最有效的手性固定相之一。

(2) 超分子大环化合物

该固定相可以细分为冠醚、环糊精CD等几类。实验发现，冠醚化合物的外壳、内腔十分亲水，因此，将其与聚苯乙烯或是硅胶键合，可以得到手性固定相。该固定相适合分离含伯胺功能团的手性药物，例如氨基酸、手性识别与环内腔脂肪烃侧键/对芳烃侧键所具有包容性、环外壳药物/羟基氢键作用密切相关，该固定相可以为反应包合物提供大小适配的内腔，这也是其得到广泛应用的原因。对于手性固定相，如环糊精衍生物有研究表明，环糊精孔内外都存在手性识别，并提出了“对映体的多重保留机理”，即至少有两种不同的分离机理，一种与包合物的形成有关，另一种则通过表面作用实现分子识别。

(3) 合成手性聚合物

该固定相多用于不对称聚合，只需将所制备的支持手性识别的产物与硅胶键合，便能够实现有效分离，例如，在遇到外消旋体含大量芳香基团的情况时，可以使用聚氨酯进行分离。优点在于柱效、柱容量理想，但要保证分离手性药物立体构型符合要求。

(4) 配体交换

该固定相是由氯甲基苯乙烯等聚合物、手性氨基酸、金属离子共同构成。拆分对象在金属络合物的作用下，和固定相配位基交换，通过配体交换的方式，与固定相络合。此种络合具有可逆性，这也决定了该方法能够取得较为理想的分离效果，在分离氨基酸的领域发挥着重要作用。

(5) 蛋白质类

作为含有大量手性亚基团的聚合物，蛋白质能够快速识别对映体结合点位，由此实现分离。目前，以下两种固定相均已得到推广：第一种，将BSA与硅胶键合，分离氨基酸、衍生物的对映体。第二种，基于共价键/离子键将酸性蛋白质与硅胶键合，优点在于柱效高、性能稳定，可以在立体选择性的帮助下，对手性药物进行直接分离。

2 手性分离的液相色谱法的新发展趋势

2.1 超临界流体色谱法 (SFC)

超临界流体色谱 (SFC) 起源于 20 世纪 80 年代, 流动相主要为 CO₂ 和有机溶液。在手性药物分离中, 其具有明显的优势, 主要体现在溶剂特性、适用性、友好性和快速性等几个方面。超临界流体既具有气相的低黏度和高扩散性, 又具有液相的较高溶解力和较高密度。这使得 SFC 可以同时兼顾高分离效率和高样品溶解度。此外 SFC 适用于各种化学性质不同的化合物, 包括极性化合物、非极性化合物、不稳定化合物等。它可用于多种药物分离、天然产物提取等领域。在实践应用中, 超临界流体通常使用二氧化碳作为溶剂, 与传统的有机溶剂相比, CO₂ 是一种无毒、无污染、易于回收的溶剂, 对环境友好。且因流体具有高扩散性和低黏度, 使得 SFC 具有快速分离速度和短分析时间。目前, 我国在手性液相色谱法应用上, 将其与质谱、紫外—可见吸收光谱、氢火焰离子化等检测技术进行在线耦合, 提高分析的定性定量选择性和灵敏度。

目前, 我国对该技术的研究和应用上, 已经进入到了新的领域, 技术人员开发新型的色谱柱, 提高分离效率和分离选择性。进一步提高 SFC 与质谱、光谱等检测技术的联用效果, 提高分析的灵敏度和选择性。开发新型的超临界流体溶剂, 提高溶解力和分离性能。开发更加简便、高效的样品前处理方法, 提高手性化合物的光学纯度和分离效果。

2.2 模拟移动床 (SMB)

模拟移动床 (Simulated Moving Bed, 简称 SMB) 是一种连续流动的分离技术, 通过模拟移动床的运动方式实现多组分混合物的高效分离。比较其他技术而言, 该技术应用具有明显优势。其中, SMB 采用连续流动方式进行分离, 使得各组分在整个系统中保持相对稳定的浓度梯度, 从而实现高效分离。SMB 可以通过循环再利用溶剂, 减少溶剂的消耗量, 降低能源消耗。运行期间, SMB 可实现连续操作, 无需停机换柱, 提高了生产效率。此外, SMB 具有灵活的操作参数调节能力, 可以根据需要调整进料浓度、流速等参数, 适应不同的分离任务。由于在手性药物的分离中, SMB 具有周期短、成本低、分离效率高、固定相利用率高、流动相循环使用、自动

化连续操作等优势的高效分离能力, 用户可以获得高纯度的产品。模拟移动床色谱 (SMB) 已被国际上公认为用于制备规模的手性药物拆分的相对最有效手段之一。

未来发展中, 随着技术的不断发展, SMB 将在分离过程的高效性、灵活性和可持续性方面得到进一步提升。技术人员目前正开发具有更好分离性能和更长使用寿命的填料材料, 提高 SMB 的分离效率和稳定性。并将数字技术与其融合, 通过建立更准确的模型和优化控制策略, 提高 SMB 的分离效果和操作稳定性。部分技术人员也设计了多功能 SMB 系统, 将 SMB 与其他技术 (如反应器、结晶器等) 进行集成, 并通过研究同步和异步模拟移动床过程模拟优化设计, 实现多功能化的分离过程, 提高资源利用效率, 建立了手性化合物大规模拆分的新方法。

3 结论

综上, 随着社会经济发展, 人们对药品质量的要求越来越严格, 手性药物作为药品种类的重要组成部分, 其质量与制备效率值得关注。本文研究了液相色谱分离的价值, 解读直接分离、间接分离对手性药物分离中应用效果。研究结果表明: 间接分离使用成本低、无需使用手性柱, 只需要衍生化剂便可实现对手性药物的分离, 适合用于无紫外吸收等检测信号或无法直接分离的药物分析; 直接分离法的效率更高且性能十分稳定, 可实现对手性药物的直接快速分离, 更适合用于手性药物的大规模制备。引进液相色谱技术和自动化设备, 如 HPLC、SFC、SMB 等等, 不仅丰富了手性药效和药物代谢动力学方面的理论研究成果, 而且也可以解决药物纯光学异构体的供药难题。

参考文献

- [1] 仇小丹, 赵婷, 朱志玲, 等. 超临界流体色谱法在手性药物分离中的应用 [J]. 中国医药生物技术, 2019, 14 (01): 64-68.
- [2] 石磊, 颜雪明. 手性药物分离方法的研究进展 [J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2019, 40 (02): 42-47.
- [3] 滕怀凤, 温晓丽. HPLC 手性固定相法分离 5 个康唑类药物对映体 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40 (03): 436-441.