

使用基于糖肽的手性色谱柱实现现代化手性分离

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱对马来酸噻吗洛尔进行手性分离

作者

William J. Long
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了马来酸噻吗洛尔手性分离方法的开发和优化。该方法使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱，并与目前的 USP 马来酸噻吗洛尔手性分离方法进行了比较。

前言

加快对映异构体的分离速度对制药行业越来越重要。随着越来越多的光学活性药物化合物的出现以及政府监管的加强，设计出快速、灵敏、可靠的分析方法至关重要。当前正在使用的药物中，有一半以上是手性化合物，其中近 90% 是由两种对映异构体的等摩尔混合物组成的外消旋体。尽管它们具有相同的化学结构，但大多数手性药物的异构体在生物活性方面具有明显差异^[1,2]。

虽然许多手性分离采用基于纤维素或直链淀粉的手性选择固定相 (CSP) 和正相溶剂 (如己烷)，但经常需要寻找其他固定相以便使用更常用的溶剂 (如甲醇) 进行分离，使其更容易引入运行反相方法的实验室中。

InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T (替考拉宁) 色谱柱可用于反相和正相 HPLC 以及 SFC 中。由于它是键合 CSP，与涂覆 CSPs 相比，可使用的溶剂更多，且不存在固定相流失或损失的风险。

已经证明，InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 及其他基于替考拉宁的 CSPs 适用于极性离子模式 (基于甲醇和铵盐的流动相)、反相 (甲醇或乙腈缓冲液) 或极性有机模式 (甲醇、乙醇或另一种纯有机溶剂)。在反相模式下，保留和选择性受有机组分的性质和浓度以及流动相 pH 的控制^[4]。

基于糖肽的手性色谱柱，例如 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T (替考拉宁)，可用于反相和正相 HPLC 以及 SFC 领域的各种溶剂中。糖肽为两性物质，含有可离子化的酸性和碱性官能团。因此，它们可以带正电荷、负电荷或为中性，具体取决于流动相的 pH。这使得在使用这类 CSP 材料进行离子化合物分离时，可以通过离子相互作用进行手性识别。在这类 CSPs 的手性识别中发挥了重要的作用。使用抗生素作为 CSPs 材料进行手性识别时，其他可能的相互作用包括氢键、空间、偶极-偶极和 π - π 相互作用以及疏水相互作用。这些相互作用可能以不同的组合形式出现，具体由各个分析物的特性和所使用的流动相模式决定。每种分离模式同时提供不同的相互作用以实现手性识别。大量手性分离以及通过此类 CSP 成功分离的各种类型的手性化合物都基于此原理。

糖肽替考拉宁与表面多孔二氧化硅颗粒共价键合，形成稳定且耐溶剂的色谱介质。这种共价键合相可耐受常用的 HPLC 流动相和添加剂，例如甲醇、乙醇、IPA、THF、磷酸盐、甲酸盐、乙酸盐、甲酸、TFA、TEA 和 NH_4OH 。替考拉宁键合相的结构如图 1 所示。

在本应用简报中，使用 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 开发并优化了马来酸噻吗洛尔 (S) 的分离方法，并与目前的 USP 方法进行了比较。该化合物的结构如图 2 所示。

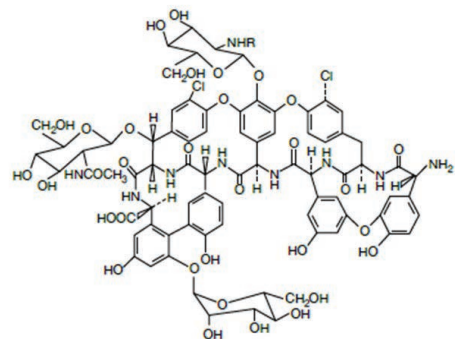


图 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱中替考拉宁键合相的结构

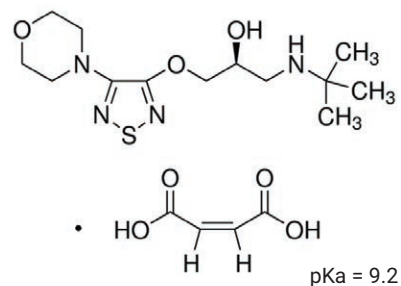


图 2. 马来酸噻吗洛尔 (S) 的结构

实验部分

材料与方

采用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统；其配置如表 1 所示。基本色谱条件列于表 2 中。

马来酸噻吗洛尔 (S-(-)-1-(叔丁氨基)-3-[(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑-3-基)氧基]-2-丙醇马来酸盐) 欧洲药典 (EP) 参比标样和 R-噻吗洛尔欧洲药典 (EP) 参比标样均购自 Sigma-Aldrich。将每种对映异构体溶于甲醇，浓度为 2 mg/mL。采用由等体积的各种对映异构体溶液组成的样品测定分离度。LC/MS 级甲酸铵也购自 Sigma-Aldrich。HPLC 级甲醇购自 Honeywell。将 2 g 甲酸铵溶于甲醇中，制得浓度为 0.2% w/v 的流动相。使用该储备液的稀释液配制更低浓度的流动相。

结果与讨论

使用四种 InfinityLab Poroshell 120 手性色谱柱和六种流动相进行筛选，初步研究噻吗洛尔的手性分离^[3,4]。检测结果显示了使用含 0.2% w/v 甲酸铵的甲醇流动相时两种噻吗洛尔对映异构体和苹果酸盐的分离情况。该分离结果如图 3 所示。

极性离子分离通常需要使用有机溶剂（例如甲醇或乙腈），并添加少量酸或碱。或者，如本文所述，也可以使用铵盐。研究发现，降低甲酸铵的浓度可以改善后两个峰的分离度和保留情况。通过比较紫外谱图，鉴定这两个峰为两种噻吗洛尔对映异构体。这一行为是使用极性离子分离模式进行分离时的典型行为。当应用于替考拉宁或万古霉素固定相时，只有不含可离子化的基团的分子才能在仅由甲醇、乙醇、

表 1. 仪器配置

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统	
Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112B)	能够提供最高 600 bar 的压力，0–5 mL/min 的流速
Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)	<ul style="list-style-type: none"> 自动进样器和加热器：毛细管，不锈钢，0.075 × 220 mm (部件号 5067-4784) 样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL，100/包 (部件号 5182-0716) 瓶盖，螺口，蓝色，PTFE/红色硅橡胶隔垫，100/包 (部件号 5182-0717)
Agilent Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)	<ul style="list-style-type: none"> 超低扩散加热器 (G7116-60021) 加热器和色谱柱：Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接组件，105 mm，0.075 mm (部件号 5067-5961) 色谱柱和 ELSD 毛细管，不锈钢，0.075 × 220 mm，SV/SLV (部件号 5067-4784)
Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，光程 10 mm	<ul style="list-style-type: none"> G4212-6008，10 mm 流通池，1.0 μL V(d) 40 Hz
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	

表 2. 液相色谱方法条件

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T, 4.6 × 100 mm, 2.7 μ m (部件号 685775-603)
流动相	含甲酸铵 (0%–0.2%) 的甲醇
流速	1 mL/min
温度 (色谱柱)	30 °C
紫外波长	260 nm
进样量	1 μ L
样品浓度	2 mg/mL 水溶液

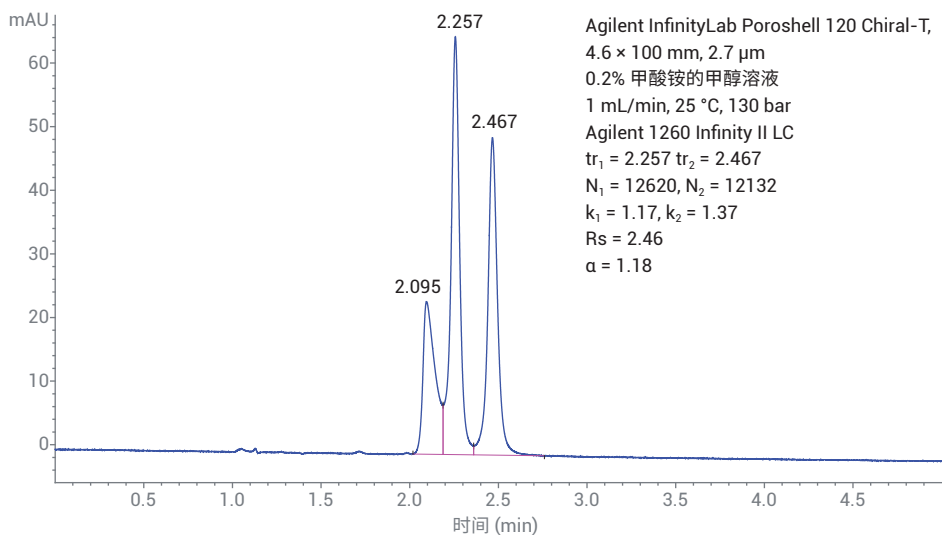


图 3. 使用含 0.2% 甲酸铵的甲醇分离马来酸噻吗洛尔

乙腈或这些无水溶剂的组合组成的流动相中快速分离。参考文献（手性应用文集）中所示的 5-甲基-5-苯基乙内酰脲或沙利度胺的分离是极性有机分离的一个很好的示例。

但是，当化合物具有可离子化的基团时，有时需要添加少量的酸和碱或挥发性盐。这是由于大环糖肽本身存在可离子化的基团。后一种流动相条件称为极性离子模式，以区别于极性有机模式。

为了实现极性离子模式选择性，化合物通常具有至少两个官能团，其中一个官能团必须可离子化。这些官能团可能包括醇、卤素、各种形式的氮（伯、仲、叔）、羰

基、羧基、氧化形式的硫或磷。许多酸和碱以及挥发性盐可以用于糖肽固定相。乙酸铵通常用于酸性分子，三氟乙酸铵和甲酸铵则用于碱性分子。噻吗洛尔的 pKa 约为 9.2，因此首选与质谱兼容的甲酸铵。

第一个峰被鉴定为马来酸盐，为共存盐 (co-salt)。图 4 展示了甲酸铵浓度分别为 0.2%、0.15% 和 0.1% 时的分离结果。进样分析欧洲药典标准品，鉴定出第一个噻吗洛尔峰为“S”对映异构体。表 3 列出了甲酸铵的浓度、两种噻吗洛尔对映异构体的保留时间以及六种甲酸铵浓度下噻吗洛尔对映异构体的分离度。将这些数据绘

制在图 5A 和 5B 中。该数据集的叠加色谱图如图 6 所示。这些数据表明，随着甲酸铵浓度降低，噻吗洛尔对映异构体的分离度有所增加；但是，峰的保留时间延长。通过降低甲酸铵浓度，可实现更高的分离度。当甲酸铵浓度为 0.025% w/v 时，分离度达到 4.12。在甲酸铵含量为 0% 时，未出现噻吗洛尔的峰。

表 3. 不同甲酸铵浓度下，马来酸噻吗洛尔在 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 上的分离情况

甲酸铵浓度 (%)	Rs	t1	t2
0.0	-	-	-
0.025	4.12	8.585	9.917
0.05	3.71	5.073	5.798
0.1	3.17	3.204	3.597
0.15	2.78	2.577	2.848
0.20	2.46	2.257	2.467

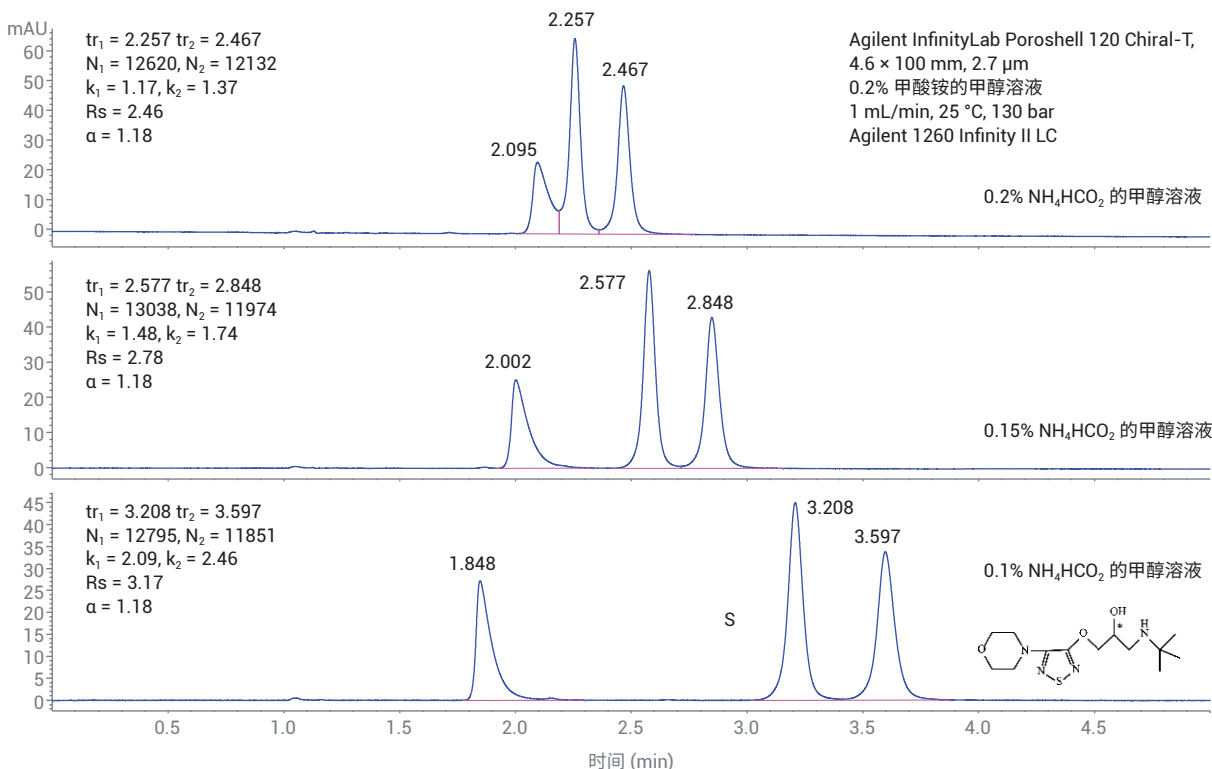


图 4. 使用含 0.2%、0.15% 和 0.1% 甲酸铵的甲醇分离马来酸噻吗洛尔

用于马来酸噻吗洛尔分析的 USP 方法为 5 μm , 4.6 \times 250 mm 正相方法, 其使用 USP 分类的 L40 (涂覆有纤维素-三-3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯的多孔硅胶) 色谱柱以及己烷/异丙醇/二甲基胺 (960:40:2) 流动相。该方法也列于欧洲药典中。由于存在二甲基胺, 该流动相与 MS 不兼容^[5,6,7]。USP/EP 方法的另一个问题在于使用带涂层的手性色谱柱。与固定化手性色谱柱相比, 涂层色谱柱的使用寿命相对较短, 某些情况下可能只能进行 200 次进样。HPLC 洗脱液中常用的许多溶剂, 例如丙酮、氯仿、DMF、二甲基亚砜、乙酸乙酯、二氯甲烷和 THF, 即使以残留量存在于系统中, 也可能破坏手性固定相。使用该正相溶剂的系统通常专用于正相应用^[8]。InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 是一款全键合色谱柱, 能够耐受常用色谱溶剂。

参考文献显示, 使用欧洲药典方法在 4.6 \times 250 mm 色谱柱上进行分离, 两种噻吗洛尔对映异构体的保留时间在 9 分钟至 14 分钟之间, 并且满足分离度的要求 (4.8)。将该方法与在同一色谱柱上进行 SFC 分析的新方法进行比较。尽管新方法的分离速度快得多, 但其分离度较低^[9]。

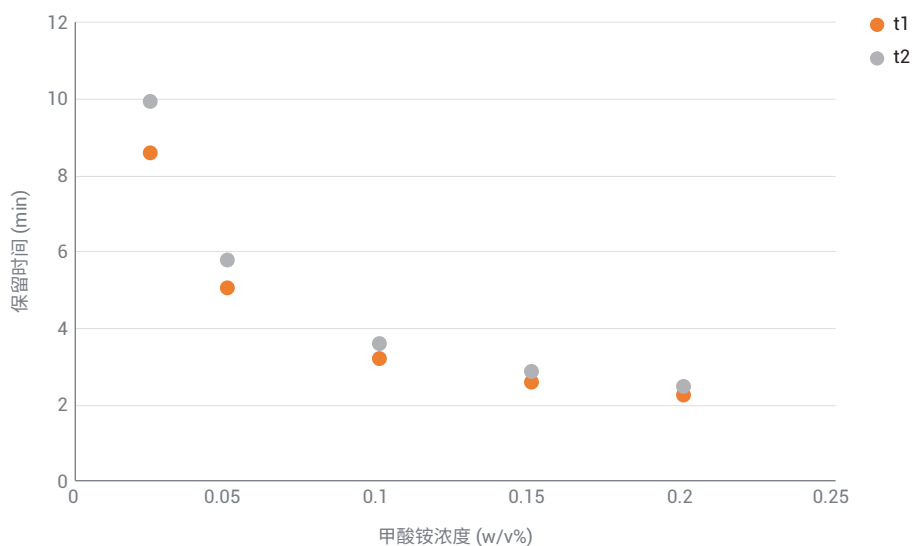


图 5A. 噻吗洛尔对映异构体的保留时间与甲酸铵浓度的关系

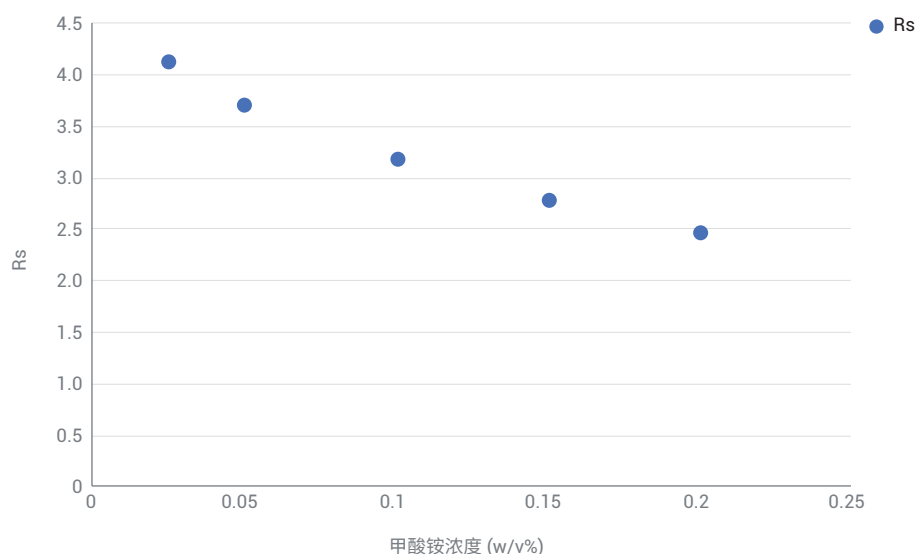


图 5B. 噻吗洛尔对映异构体的分离度与甲酸铵浓度的关系

结论

本研究表明, 使用极性离子流动相 (含甲酸铵的甲醇) 和 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱可以分离噻吗洛尔对映

异构体。本文所述的方法采用 220 nm 紫外检测, 但流动相与 MS 检测完全兼容。这有利于轻松适应故障排除流程方法或法医学分析。此方法可以在任何 HPLC 系统上互换使用。

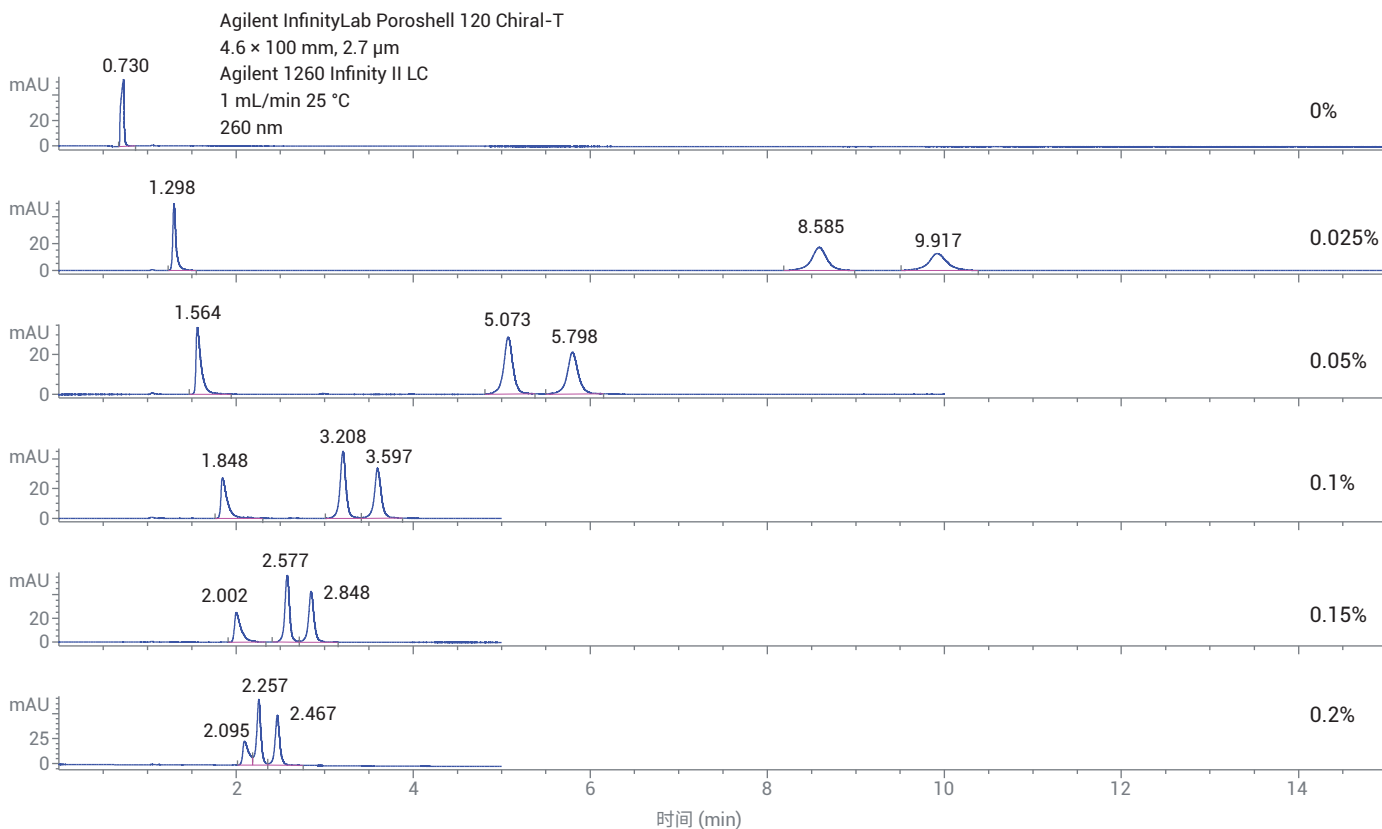


图 6. 马来酸噻吗洛尔分离情况与甲酸铵浓度的关系

参考文献

- Bonner, W. A. Parity Violation and the Evolution of Biomolecular Homochirality. *Chirality* **2000**, *12*, 114–126
- Food and Drug Administration, FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. **1992**, 57 Fed. Reg. 22249
- Long, W. J.; Mack, A. E. Screening Chiral Compounds Using Superficially Porous Based Chiral Columns and a Method Development Solution. *Pittcon* **2018**, CO-1479
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 创新技术应对挑战性的手性分离, *Agilent InfinityLab Poroshell 120 手性应用文集*, 出版号 5991-8450ZHCN, **2017**
- United States Pharmacopeia USP 40 Timolol Maleate Monograph
- European Pharmacopoeia, 4th edition, Addendum 2002, Council of Europe, Strasbourg
- European Pharmacopoeia (Version 7.5): Timolol Maleate Monograph
- Instruction Manual for Chiralcel OD-H and OJ-H Chiral Technologies 07/2013
- Marley, A.; Connolly, D. Determination of (R)-Timolol in (S)-Timolol Maleate Active Pharmaceutical Ingredient: Validation of a New Supercritical Fluid Chromatography Method with an Established Normal Phase Liquid Chromatography Method. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1325*, 213–220

www.agilent.com

DE.0087615741

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020
2020年6月23日, 中国出版
5994-2143ZHCN