

托非索泮对映异构体和构象异构体的分离

在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统上应用 Daicel 固定化多糖衍生型手性柱

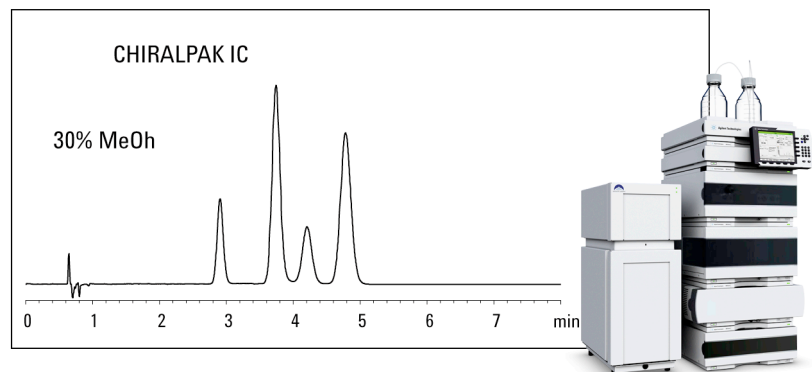
应用简报

制药

作者

Tong Zhang, Dung Nguyen,
Pilar Franco
Chiral Technologies, Europe
Parc d'Innovation
Bd. Gonthier d'Andernach B.P. 80140
67404 Illkirch Cedex
France

Martin Vollmer
Agilent Technologies GmbH
Hewlett-Packard Str. 8
76337 Waldbronn, Germany



摘要

由于对映体具有不同的生理活性，因此对其进行色谱分离是药物研发的一个重要任务。通常采用超临界流体色谱 (SFC) 结合手性固定相，测定对映异构体过量值 (ee)。由于很难预测哪种固定相最适合用于分离待测对映异构体，因此，最好对不同固定相和流动相进行自动化筛选。本应用简报将介绍 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 和 Daicel 固定化多糖衍生型手性柱用于分离托非索泮对映异构体和构象异构体时对流动相和固定相进行的筛选。



Agilent Technologies

前言

托非索泮 [1-(3,4-二甲氧基苯基)-4-甲基-5-乙基-7,8-二甲氧基-5H-2,3-苯二氮卓] 属于 2,3-苯二氮卓类化合物。它是一种治疗焦虑症和用于戒酒的药物^{1,2}。

由于其立体中心在 C(5) 原子上，托非索泮有两种对映异构体 (R(+) 和 S(-))。溶解后，其二氮杂环结构将存在两种船式构象，因而每个对映体各有两种构象异构体 (图 1)。构象异构体跃迁的驱动力归因于 C(4)-甲基和 C(5)-乙基之间出现的空间排斥效应。

托非索泮³ 的药理作用已引起人们的关注，为了分别评价各同分异构体的不同生物活性、理解其动力学和热力学的特性以及控制该药物的质量，需要一种简便耐用的方法来分离这四种异构体。

在本应用简报中，我们用固定化多糖衍生型手性固定相 (CSP) 填充色谱柱，并结合 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的先进 SFC 技术，通过一种简便、耐用且快速的色谱方法，对托非索泮所有的对映异构体和构象异构体的分离作了评价。

实验部分

化学品

本研究使用的手性柱 CHIRALPAK IA、CHIRALPAK IB、CHIRALPAK IC 和 CHIRALPAK ID 由大赛璐 (Daicel) 化学工业株式会社生产，规格为 4.6 × 150 mm 内径，填充有 5 μm 的固定化直链淀粉或纤维素所衍生的 CSP 颗粒。

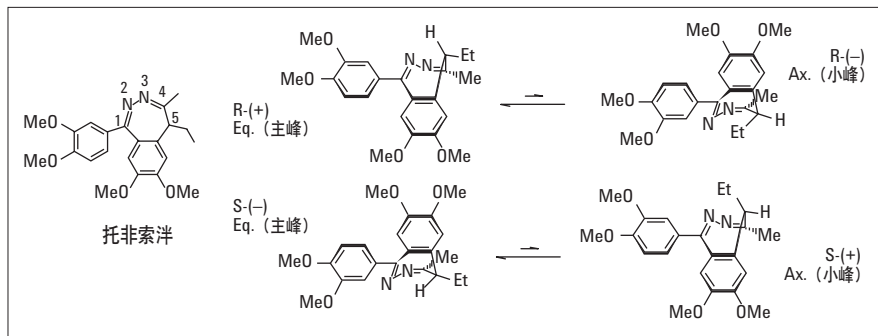


图 1
托非索泮对映体的构象平衡

本研究使用超临界 CO₂ (工业质量 4.8) 作为主要流动相成分。对不同流动相改性剂，如甲醇 (MeOH)、异丙醇 (2-PrOH) 和乙腈 (ACN) 在不同浓度下进行筛选。所有试剂均为 HPLC 级。由于托非索泮分子具有碱性，所有流动相中均加入了二乙胺 (DEA) (0.1% v/v)。

仪器

所有 SFC 实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统上完成。该系统包括用于 CO₂ 预处理和后处理的 A5 fusion 模块以及经改进的 Agilent 1260 二元泵液相色谱系统，可以精确、恒定地对流动相进行计量。该系统 (G4309A) 包括如下模块：

- SFC Fusion A5 模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 标准型脱气机
- Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，配置高压 SFC 流通池

另外，所用的安捷伦 SFC 方法开发工具包包括：

- 两个内置阀驱动的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent ZORBAX 方法开发的阀工具包，600 bar

色谱条件

在整个实验中，流速均设置为 3.0 mL/min，柱温箱温度为 35 °C，CO₂ 超临界流体的反压为 150 bar。

结果与讨论

基于多糖衍生物的 CSP 具有卓越的对映选择性和多功能性, 因此被广泛用于各种对映异构体或立体异构体的液相色谱和 SFC 分离。自 2004 年以来, 先进的固定化多糖 CSP 已成为一种有效的手性分离工具。这种新型色谱柱的优点包括通用的溶剂兼容性、全新的选择性以及耐用的填料⁴⁻⁶。另外, 由于 SFC 的扩散性和传质性更佳并且有较低的流动相粘度, 有利于提高分离速度, 因此被认为是一种比液相色谱更具优势的技术。我们实验室将 SFC 与下列四种固定化手性柱, 即 CHIRALPAK IA、CHIRALPAK IB、CHIRALPAK IC 和 CHIRALPAK ID 相结合, 对托非索泮对映异构体和构象异构体的同时分离进行了评价。对包括 MeOH、2-PrOH 和 ACN 在内的各种流动相改性剂也进行了系统的检查。

如图 1 所示, R(+)- 和 S(-)- 是托非索泮的主要构象异构体, 其中连接 C(5) 原子的乙基具有近乎平伏的取向 (Eq.)。根据溶解该产物的溶剂不同, 构象平衡向利于形成 R(-)- 或 S(+)- 构象异构体方向移动, 此时连接 C(5) 原子的乙基将改变为直立取向 (Ax.)。我们对各种样品介质中 (MeOH、EtOH、2-PrOH、甲基叔丁基醚/MeOH 90/10 和 ACN) 托非索泮的构象异构体的跃迁研究, 表明了 MeOH 能最快地诱导出 R(-)- 或 S(+)- 构象异构体的最大形成比例 (高达 26%), 而 ACN 形成同样分子的动力学过程最慢且比例最低 (最高仅为 16.5%)⁷。在任何情况下, 样品混合物中

的 R(-)- 和 S(+)- 构象异构体都不会超过 R(+)- 和 S(-)- 对映异构体。因此, R(+)- 和 S(-)- 对映异构体 (Eq.) 总是作为色谱主峰被洗脱, 而 R(-)- 或 S(+)- 构象异构体 (Ax.) 则总是小峰。但由于缺乏标准品, 我们的研究还不能确定 R(+)- 和 S(-)-, 以及 R(-)- 和 S(+)- 异构体之间的相对洗脱顺序。为便于讨论, 在此我们将小峰标记为 $P_{(Ax.)}$, 主峰标记为 $P_{(Eq.)}$, 而没有指认每对对映异构体-构象异构体中的分子绝对构型。

MeOH 似乎是用于溶解托非索泮异构体的最通用的共溶剂。如表 1 所示, 用 CHIRALPAK IA 和 CHIRALPAK ID 可使四个峰得到最佳分离, 分析时间分别短至 3 分钟 (图 2 (a)) 或 5 分钟 (图 2 (b))。有趣的是, 在 CHIRALPAK IA、CHIRALPAK IC 和 CHIRALPAK ID 柱上的洗脱顺序也相同, 即, $P_{(Ax.)}$ - $P_{(Eq.)}$ - $P_{(Ax.)}$ - $P_{(Eq.)}$ 。两个 $P_{(Ax.)}$ 和 1 个 $P_{(Eq.)}$ 在 CHIRALPAK IB 上共洗脱。

	CHIRALPAK IA	CHIRALPAK IB	CHIRALPAK IC	CHIRALPAK ID
tr_1 (min)	1.26	2.55	2.90	1.56
tr_2 (min)	1.48	2.55	3.74	1.90
tr_3 (min)	2.03	2.55	4.20	2.50
tr_4 (min)	2.45	2.72	4.77	3.91
$Rs_{(12)}$	2.72		4.21	3.33
$Rs_{(23)}$	4.44		1.90	4.19
$Rs_{(34)}$	2.57	1.25	2.04	5.90

表 1
在 MeOH/CO₂ 中托非索泮对映异构体和构象异构体的分离度
共溶剂: 20% (MeOH/DEA 100/0.5 v/v) 用于 CHIRALPAK IA 和 IC 柱; 10% (MeOH/DEA 100/1.0 v/v) 用于 CHIRALPAK IB; 40% (MeOH/DEA 100/0.25 v/v) 用于 CHIRALPAK ID 柱

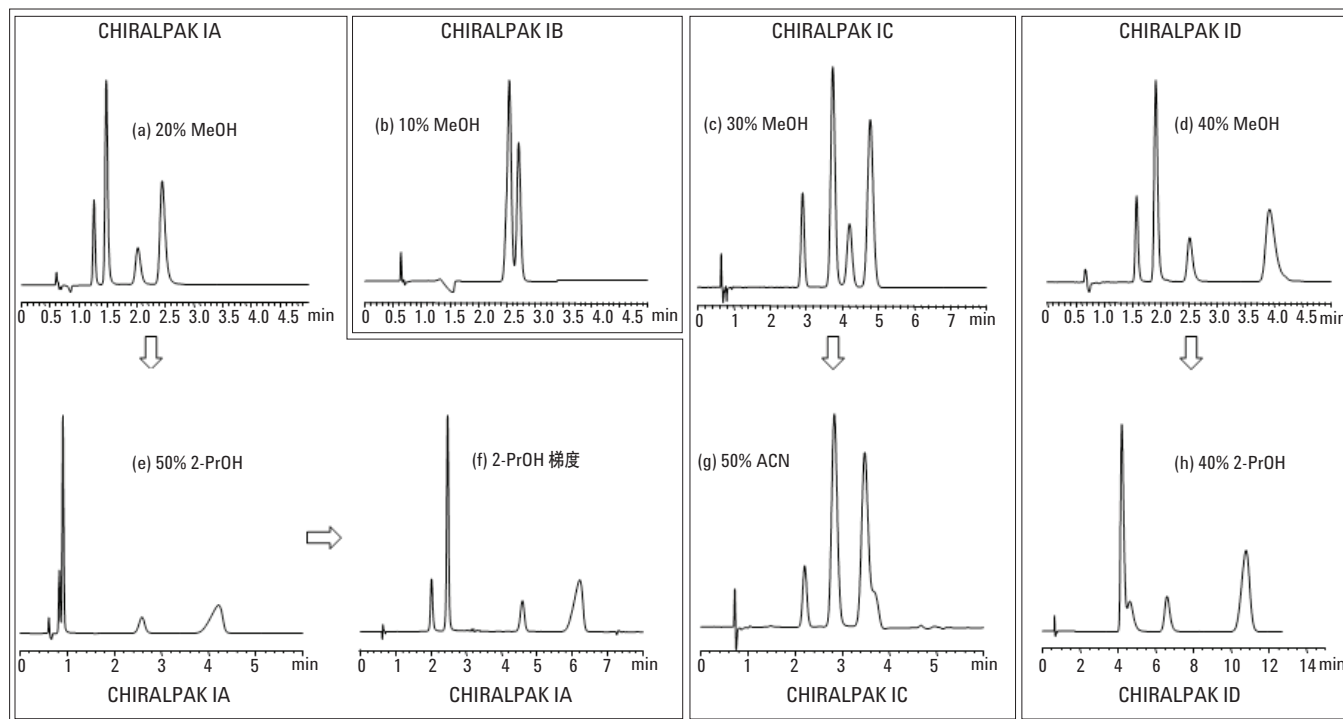


图 2

分离实例。改性剂（溶剂通道 B，按体积划分）：

20% (MeOH/DEA 100/0.5 v/v) 对应于 (a)；10% (MeOH/DEA 100/1.0 v/v) 对应于 (b)；30% (MeOH/DEA 100/0.33 v/v) 对应于 (c)；40% (MeOH/DEA 100/0.25 v/v) 对应于 (d)；50% (2-PrOH/DEA 100/0.2 v/v) 对应于 (e)；梯度 (2-PrOH/DEA 100/0.2 v/v) 对应于 (f)；50% (ACN/DEA 100/0.2 v/v) 对应于 (g)；40% (2-PrOH/DEA 100/0.25 v/v) 对应于 (h)
*梯度程序：0-1.5 分钟 20% B；1.5-2.5 分钟 20%-50% B；2.5-6.5 分钟 50% B；6.5-8.5 分钟 20% B

SFC 改性剂的性质对四个色谱峰的分度有很大影响。例如，当从 MeOH（图 2 (a)）变为 2-PrOH（图 2 (e)）时，前两个峰在 CHIRALPAK IA 柱上从完全分离变为不完全分离。实验表明，为了让前两个峰在使用这种改性剂时得到完全分离，梯度洗脱不失为一种好方法（图 2(e)， $Rs_{(12)} = 1.27$ ；图 2(f)， $Rs_{(12)} = 4.18$ ）。

改性剂对托非索洋峰的洗脱图谱也有影响。以在 CHIRALPAK IC 和 CHIRALPAK ID 柱上的分离为例，在 CHIRALPAK IC 柱上，使用 20% MeOH 洗脱时，洗脱顺序为 $P_{(Ax)}-P_{(Eq)}-P_{(Ax)}-P_{(Eq)}$ （图 2 (c)），但使用 50% ACN 洗脱时，洗脱顺序则变成 $P_{(Ax)}-P_{(Eq)}-P_{(Eq)}-P_{(Ax)}$ （图 2 (g)）。在 CHIRALPAK ID 柱上，用 40% MeOH 洗脱时，四个峰的洗脱顺序为 $P_{(Ax)}-P_{(Eq)}-P_{(Ax)}-P_{(Eq)}$ （图 2 (d)），但改用 40% 2-PrOH 时，洗脱顺序则变为 $P_{(Eq)}-P_{(Ax)}-P_{(Ax)}-P_{(Eq)}$ （图 2 (h)）。

托非索泮异构体的 SFC 分离重现性非常好, 在给定的色谱条件下, 在 CHIRALPAK IC 柱上连续 20 小时进样托非索泮 120 次的结果可以证明这一点 (图 3)。这也归功于 Agilent 1260 Infinity SFC 系统的高性能, 与精确的流动相计量相结合, 能提供卓越的前后 CO₂ 调节。图 4 显示了通过 CO₂ 反压 (或出口压力) (a) 和 Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵的压力 (b) 来说明该系统的性能。

结论

填充固定化多糖衍生型手性固定相的 Daicel 柱具有极高的耐用性, 适用于托非索泮对映异构体和构象异构体的多种分离解决方案。

使用 SFC 和 HPLC 对托非索泮异构体进行分析时, 在同一组手性柱⁷上, 只需运行一次色谱分析即可使该异构体完全分离。SFC 是实现托非索泮更快速分离的最佳选择。Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的高仪器性能使得托非索泮的分析分离更为耐用和重现。

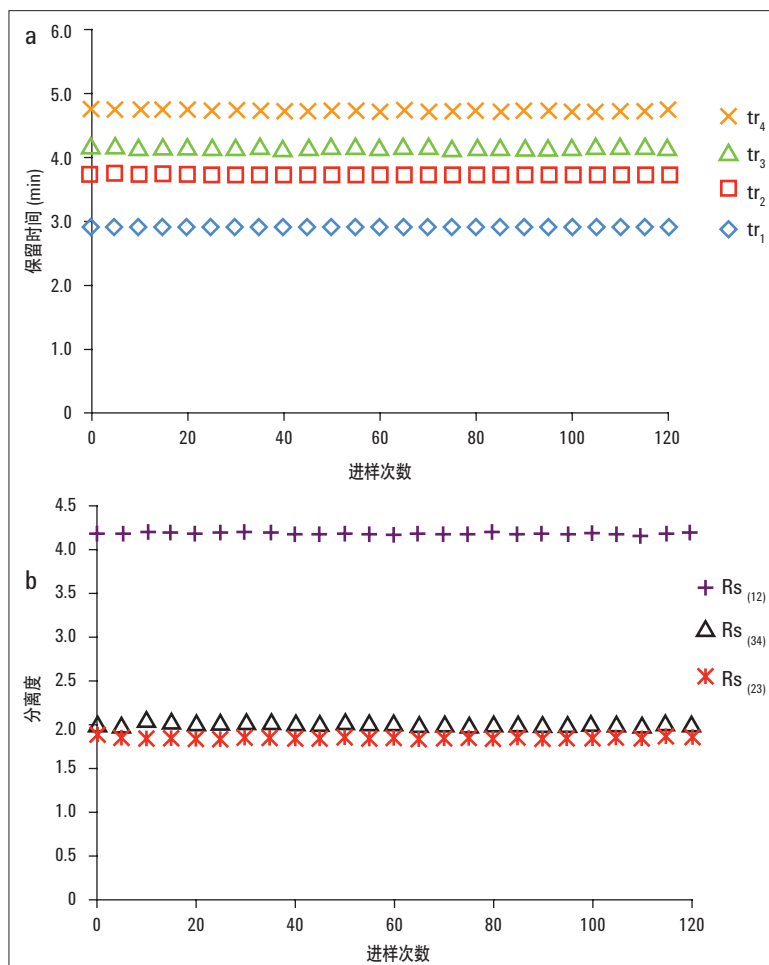


图 3
CHIRALPAK IC 柱上的分离重现性
30% (MeOH/DEA 100/0.33 v/v), 流速: 3 mL/min, 温度: 35 °C
(a) 保留时间; (b) 分离度

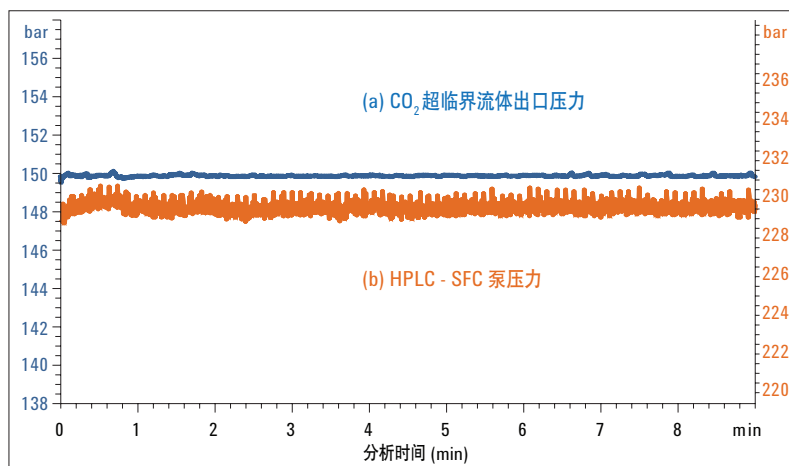


图 4
Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的压力稳定性
改性剂: 30% (MeOH/DEA 100/0.33 v/v), 流速: 3 mL/min, 温度: 35 °C

参考文献

1.
T. Seppala, E. Palva, M.J. Mattila, R.C. Shrotriya, *Psychopharmacology* 69 (1980) 209-218
2.
A. Bond, M. Lader, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 22 (1982) 137-142
3.
M. Hu, P. He, Y. Chen, G. Carr, J. Guo, N. Ye, *Journal of Chromatogr. A*, 1129 (2006) 47-53
4.
T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 214 222
5.
P. Franco, T. Zhang, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 48 56
6.
T. Zhang, P. Franco, *Chiral Separation Techniques: A practical approach (3rd revised and updated Edition, Subramanian, G., ed.)*, VCH, Weinheim, pp. 99 134
7.
T. Zhang, N. Nguyen, P. Franco, M. Vollmer, Posters at *Chirality ISCD* 23, July 2011 (Liverpool, UK) and at SFC 2011, July 2011 (New York, USA)

www.agilent.com/chem/cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011年11月1日，中国印刷
出版号 5990-9315CHCN



Agilent Technologies