DOI:10.19789/j.1004-9398.2019.02.008

手性药物分离方法的研究进展*

石 磊 颜雪明**

(南华大学化学化工学院,湖南 衡阳 421001)

摘 要

手性药物的分离方法主要有3大类,分别是物理拆分法、化学拆分法和生物拆分法. 物理拆分法主要以色谱法为典型代表;化学拆分法主要以结晶法进行手性拆分;生物拆分法分离手性药物还涉及到对生物酶的综合应用. 本文就目前国内外对手性药物分离的主要方法进行了论述,对比各种分离方法和技术的特点,分析各种分离方法的优劣性,并对手性药物的分离技术进行了展望.

关键词: 手性药物;分离方法;手性拆分

中图分类号: TQ46

0 引 言

手性药物是指药物分子中引入手性源后,得到的一对对映异构体. 对映异构体在物理化学性质上存在一定的差异,其中最显著的差异是旋光性不同. 在化学药物、天然药物、生化药物这3大药源中,手性药物占据相当大的比例. 药物在人体内药理作用的发挥主要是依靠与人体内的生物大分子的特异性结合,不同的立体异构体药物在人体内的药效学、药代动力学、毒理学等性质存在较大差别,因而表现出不同的治疗效果和不良反应. 自20世纪50年代席卷全球的反应停事件起[1],手性药物的研究引起了人们的极大兴趣,手性药物的分离也因此得到重视. 研究还表明,对手性药物的对映异构体的分离也有助于提高药物的生理活性,例如,茚达利酮的2个对映异构体都具有促利尿作用,但其R型的对映导构体作用效果是S型的近20倍[2]. 对R型对映异构体的分离纯化可以提高其药效,减小用药量. 正因为光学纯药物具有更好的药效、用药也更安全,手性分离技术的研究也因此得到了广泛的重视,而今已成为药物研究的热点领域. 手性药物的分离方法主要有3种,分别是物理拆分法、化学拆分法和生物拆分法。本研究围绕这3种方法展开综述。

1 物理拆分法

物理拆分法是利用对映异构体在物理性质上的差异,如溶解度、熔沸点、密度等,通过物理手段将对映异构体拆分的一种方法. 但由于对映体的化学性质极为相似,单纯的利用物理性质的差异很难达到较好的分离效果,而往往需要借助一些现代化仪器才能实现对映体的高分离纯度. 现代色谱分离技术在对映异构体分离方面有巨大的优越性. 常用的手性药物分离技术有:超临界流体色谱(SFC)、高效液相色谱(HPLC)、高速逆流色谱(HSCCC)等.

1.1 色谱分离法

1.1.1 超临界流体色谱

超临界流体色谱是以超临界流体做流动相,依靠流动相的溶剂化能力来进行分离、分析的一种色谱过程,是20世纪80年代发展和完善起来的新型分离技术. 超临界流体色谱兼具有气相色谱和液相色谱的特点,可以分析沸点高、挥发性低的样品,这是气相色谱所做不到的,而它的分析速度又比液相色谱快,常用的流体有超临界二氧化碳和氧化亚氮. 相比于一般的色谱分离,手性色谱法的特点在于固定相或流动相中必须有一相是手性相,从而使得手性药物在不同的固定相中有不同的吸附能力,

收稿日期:2018-06-07

* 湖南省教育厅科学研究资助项目(14C0157)

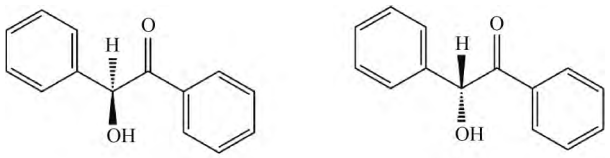
** 通信作者:yanxueming88@126.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在不同的流动相中有不同的溶解度,进而实现手性药物对映异构体的分离.

常用的手性固定相有 Pirkle 刷型手性固定相、π-酸手性固定相、π-碱手性固定相、环糊精手性固定相、大环抗生素类手性固定相、冠醚类手性固定相、天然的多糖衍生物手性固定相等,不同的固定相应用于不同手性药物的分离,如 Pirkle 刷型手性固定相是以 3,5-二硝基苯甲酰为母体,再接上苯基甘氨酸或亮氨酸形成的手性配体,可直接分离内酰胺、安息香类镇静剂[3]; π-酸、π-碱手性固定相是利用 π-酸、π-碱的手性特异性识别,对内酰胺类药物具有很好的分离效果[4]; 环糊精类手性固定相是利用环糊精葡萄糖基转化酶对淀粉进行水解得到的具有 6 ~ 12 个葡萄糖单元的手性环状低聚糖,水解程度的不同可得到不同的环糊精,此类手性固定相可用来分离巴比妥类、胺类等极性较大的药物[5]; 大环抗生素类手性固定相可用来分离甲苯巴比妥对映体[6].

手性色谱的流动相往往需要根据特定的固定相来选择,超临界流体所用的溶剂是 CO_2,分离不同的手性药物时,需要添加一些夹带剂以改善其溶解性能,夹带剂可以是极性溶剂(如甲醇、乙醇等) ,也可以是酸碱. Svensson 等[7] 用 N,N-二甲基正辛烷、乙酸和 20% 的甲醇改性的超临界 CO_2 做流动相分离了美托洛尔等相似的手性药物; 陈海等[8] 用乙腈作为改性剂,在 CO_2: 乙腈 = 90 : (2 ~ 15) ,CO_2 流速为 1. 8 mL/min 的条件下,分离安息香和反式-二苯乙烯氧化物(TSO) ,其结构式如图 1 所示.



(a) S-安息香　　(b) R-安息香

图 1　S-安息香(a) 和 R-安息香(b) 结构式

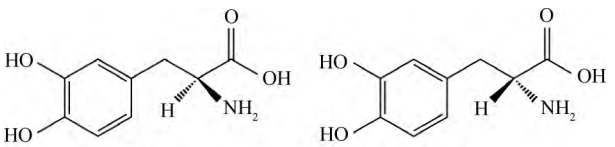
SFC 法正处于迅速发展的阶段,该法分离手性药物具有选择性高,分离效果好,分离速度快等优势,但其可用的固定相和流动相的物质往往较为昂贵,操作条件严格,对设备要求高等因素,导致 SFC 技术分离手性药物的成本较高,经济效益不高等劣势. SFC 技术目前仍有很大的提升空间,在节约成本,寻找低廉、更好的固定相、流动相方面,在未来几年将会是分离手性药物的研究热点.

1. 1. 2　高效液相色谱

高效液相色谱是目前应用最广泛的色谱分析方法,其分离手段主要分为直接法和间接法两种. 直接法又可分为手性固定相法和手性流动相添加剂法; 间接法又称为手性衍生化添加剂法.

手性固定相法,所采用的固定相与超临界流体色谱法的固定相相似,目前所应用的范围主要有冠醚,纤维素衍生物为固定相,用正己醇-异丙醇为流动相分离左旋半托拉唑[9]; Chiralpk DI 手性色谱柱,在流动相为正己烷-乙醇下分离 N-叔丁氧羰基-3-羟基-1-金刚烷甘氨酸对映体[10]; 周敏等[11] 以羧甲基-β-环糊精为手性固定相,拆分了 17 种顺式 β-内酰胺.

手性流动相添加剂法,如王嘉林和王斯坦[12] 以 β-环糊精为手性流动相添加剂,在反向高效液相色谱下分离盐酸帕洛诺司琼对映体; 谢升谷等[13] 用乙酸铜和 N,N-二甲基-L-苯丙氨酸为手性流动相添加剂,拆分多巴异构体,多巴结构如图 2,其分离度为 6. 1. 具有简便、准确性好、灵敏度高等优点.



(a) S-多巴　　(b) R-多巴

图 2　S-多巴(a) 和 R-多巴(b) 结构式

手性衍生化添加剂法,如以 R-4-N,N-二甲基磺酰胺-7-(3-异氰酸吡咯烷) -2,1,3-苯并氧杂咪唑为手性衍生化试剂,利用反相高效液相色谱法拆分甲状腺素对映体 D,L-四碘甲状腺原氨酸(T4) 和 L-三碘甲状腺原氨酸(T3) ,同时该方法也可成功地应用于甲状腺片中 T3 和 T4 的含量测定[14]; 袁明辉等[15] 使用苯甲酰氯对(R,S) -3-奎宁环醇进行柱前衍生化,衍生化方法如下图 3 所示,引入的苯甲酰基团能增强其手性中心对手性色谱柱填料的辨识

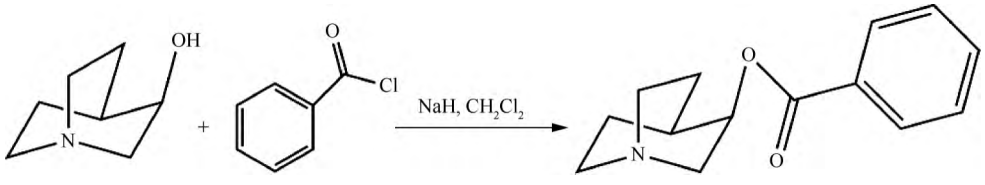


图 3　(R,S) -3-奎宁环醇苯甲酰氯衍生化流程图

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

能力,从而更快的分离奎宁环醇对映体.

高效液相色谱法分离手性对映体具有应用性广,分离纯度高等优势,但也存在所用的固定相同超临界流体固定相相似,对流动相的要求又比较高(流动相试剂纯度等方面)等劣势,同时,由于 HPLC 本身发展时间较长,技术相对成熟,在手性药物的分离中具有非常重要的地位.

1.1.3 高速逆流色谱

高效逆流色谱技术是基于高效液相色谱发展起来的色谱分离技术,不同的是,高效逆流色谱的色谱柱采用的是螺旋柱,可以做高速离心运动. 在螺旋色谱柱中加入互不相容的两相,其中一相为密度较大的固定相,另一相为密度较小的流动相,被分离的对映体在两相之间具有不同的分配系数,利用螺旋柱运动产生的离心力,实现逐一分离.

高效逆流色谱较其他色谱方法有很多优点,如分离有固定相的色谱法更加彻底,不存在样品与固定相之间的吸附、变性等弊端,同时液-液分配体系还有利于节约材料和溶剂,利用螺旋柱的运动,使得分离效率和分离速度具有更进一步的提升.

王小平[16]用羟丙基-β-环糊精为手性试剂,采用高速逆流色谱对芳基羧酸衍生物以及薄荷醇酯进行手性拆分; 吴燕燕[17]在基于高效逆流色谱的条件下,对苦参中的黄酮类成分进行提取和分离. 目前,利用高速逆流色谱分离的药物有大豆异黄酮、黄酮苷类等天然药物.

1.2 毛细管电泳分离法

毛细管电泳法主要是利用样品中各组分的离子淌度或分配系数不同,在电流的作用下,实现样品各组分分离的手段. 毛细管分离方法机理主要是手性药物对映体与固定相形成不同的包合物,对映体之间所形成的包合物稳定性存在差异,在电流作用下,稳定性差的包合物被破坏,稳定性好的包合物在流动相中随流动相流出,从而实现对映体的分离. 包合物的稳定性主要由分子间作用力、氢键等控制. 常用的固定相有环糊精衍生物、冠醚、蛋白质衍生物[18]等,流动相一般需要根据手性药物的极性做选择,选择原则为相似相溶原理,如 Wistuba 等[19]采用甲基化 β-环糊精(CD)固定相键合的毛细管电色谱,以磷酸-甲醇缓冲溶液为流动相,在加压的条件下,分离 N-甲基-5-苯基-5-乙基巴比妥酸、环己烯巴比妥、戊巴比妥等对映体; 李英杰等[20]用毛细管电泳色谱,以顺丁烯二酸酐-β-CD 为手性选择剂分离了沙丁胺醇; 赵楠和李英杰[21]以 6-乙二胺-β-CD 和马来酸酐为原料,合成了 6-(N-乙基氨基马来酸)-氨基-β-CD(UPA-β-CD),并以此为手性选择剂,利用毛细管电泳法对盐酸克伦特罗、非尼拉敏这两种手性药物进行拆分. 目前,还有人将纳米粒子用于毛细管电泳分离手性药物[22].

毛细管电泳法主要有以下几种不同的分离模式: 毛细管区带电泳(CZE)、毛细管凝胶电泳(CGE)、毛细管等速电泳(CITP)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管电色谱(CEC)和非水毛细管电泳(NACE). 近年来,新发展的毛细管微乳电动色谱(MEEKC)与亲和毛细管电泳(ACE)等在手性药物分离方面也有着广阔的应用前景. 毛细管电泳分离法具有成本低、分离模式多、分离效率高等诸多优点,前六种分离方法已得到广泛的应用,在手性药物的分离中发挥着重要的作用.

1.3 结晶法

结晶法是利用结晶的方法分离外消旋混合物. 结晶法是利用外消旋混合物中不同对映体具有不同的熔点,在不需要添加任何添加剂辅助剂的情况下,实现外消旋体的拆分. 具体操作是: 在一种外消旋混合物的过饱和溶液中,直接加入某一种对映体的晶种,即可得到该对映体. 工业上根据操作方式的不同,可将结晶法分为同时结晶法和有择结晶法.

1.3.1 同时结晶法

使外消旋混合物的过饱和溶液通过两个结晶室,在不同的结晶室中投入不同的晶种,从而在一条生产线中,得到两种对映体结晶. 将剩余的溶液进行浓缩,再一次通过结晶室,从而实现连续化的分离. 如工业生产抗高血压药物 L-甲基多巴的中间体[23].

1.3.2 有择结晶法

是在同一个容器中,交替加入两种对映体的晶种,对映体先后从溶液中析出的过程. 工业上生产氯霉素、甲砜霉素等都是利用该方法进行分离[23],有择结晶分离过程是亚稳态的,体系受外界影响较大,循环次数越多,掺杂杂质的可能性越大,会影响对映异构体的分离.

2 化学拆分法

化学拆分法是通过在外消旋混合物中添加手

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性添加剂,手性添加剂往往是手性酸或者手性碱. 手性添加剂与外消旋混合物中的对映体反应生成非对映异构体混合物,生成的非对映异构体混合物在物理性质上存在很大的差异,利用非对映异构体混合物的物理差异,可以结合结晶法对其进行分离,因此,这种分离方法也被叫做间接结晶法.

化学拆分的前提是外消旋混合物能与添加的手性拆分剂发生反应生成非对映异构体混合物,且非对映异构体混合物中至少有一种非对映体能形成结晶或两种非对映体在同一种溶剂中的溶解度具有显著差异.

常用的手性酸有酒石酸、扁桃酸和樟脑磺酸;常用的手性碱有麻黄碱、α-甲基苄胺和 2-氨基-1-丁醇,常用的手性酸和手性碱见图 4.

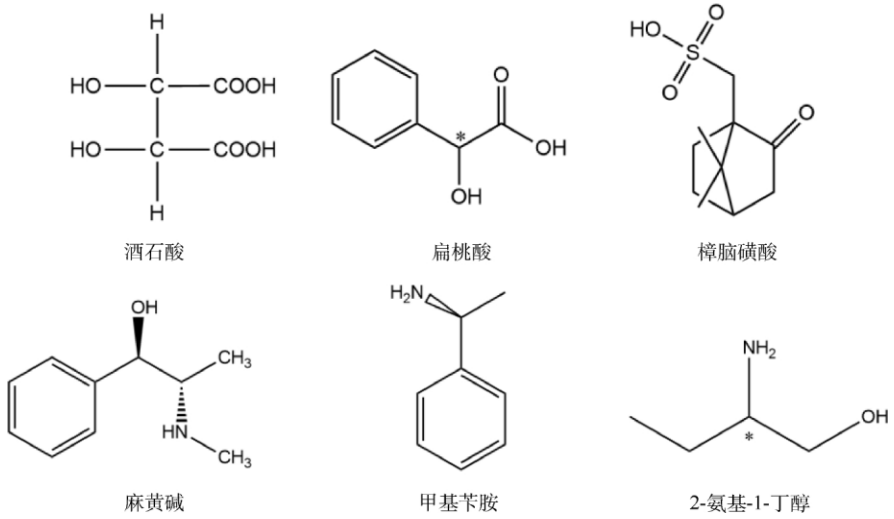


图 4　常用的手性酸和手性碱

普瑞巴林就是利用(S)-扁桃酸和 γ-氨基酸反应生成非对映异构体,在四氢呋喃/H_2O 中结晶获得普瑞巴林[23];工业上生产抗生素的中间体 D-苯甘氨酸是添加光学纯的(+)-樟脑磺酸为拆分剂进行拆分[23];酒石酸-硼酸络合酸在 NACE 中能分离 11 种氨基醇类手性药物[24].

虽然化学拆分法操作简单易行,但其明显的局限性在于拆分剂和溶剂的选择较为盲目,拆分剂价格昂贵等,这些因素也限制了化学拆分在分离手性药物中的使用.

3　生物拆分法

生物拆分法分离手性药物主要有生物酶分离法和生物膜分离法两种.

3.1　生物酶分离法

生物酶分离法主要是应用酶与手性药物的特异性结合而实现分离,生物酶具有四维空间结构,不同的空间结构和药物的结合位点不同,酶的活性中心是不对称结构,这是酶特异性识别手性药物的基础,从而导致不同结构的底物与酶的结合能力不同,可以利用这一性质,将手性药物进行分离.

生物酶分离手性药物具有副产物少,分离效率高,操作简单和无污染等优势,但由于酶的活性受温度、pH 等环境因素影响较大,因此生物酶催化法仍有其局限性. 熊吉滨和刘均忠[25]利用氨基酰化酶固定化细胞,考察了温度、pH 值、底物浓度等对酶促反应的影响. 在最佳条件下成功拆分 N-乙酰-D,L-3-甲氧基丙氨酸,且氨基酰化酶固定化细胞对 N-乙酰-L-3-甲氧基丙氨酸的拆分率可达 96%;柯彩霞等[26]介绍了不同种生物酶在外消旋体拆分中的应用.

3.2　生物膜分离法

生物膜分离技术主要是利用膜的孔径对药物分子进行筛分的过程,而生物膜由于其表面有一定的生物分子的存在,在药物分子穿过膜孔时,还会受到生物分子的特异性识别,能被识别的药物分子将正常通过膜孔,而不能被识别的药物分子将继续留在膜的一侧,从而达到生物分离的作用. 目前的生物膜往往需要加入一定的手性拆分剂来分离手性药物,如 Higuchi 等[27]用固定 DNA 膜和 DNA 溶剂体系两种方法比较对外消旋苯丙氨酸进行拆分的异同. DNA 膜与 L-苯丙氨酸的相互作用,

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

使得 L-苯丙氨酸优先透过固定 DNA 的纤维素手性拆分膜,而在 DNA 溶剂体系的超滤中,则是 D-苯丙氨酸优先透过膜;张志良和王兵[28]利用合成的手性杯[4]芳烃修饰生物膜分离了萘普生对映异构体.

膜分离技术是近几年发展起来的新兴节能技术,对其的研究尚处于起步阶段,但生物膜分离技术的连续性和能量低耗有效等众多优点,已成为许多研究员研究热点.

生物分离法相比与物理和化学分离法具有污染少,条件相对简单等优势,在未来将会是手性药物分离研究的热点.

4 结束语

手性药物的分离纯化有助于提高药物的疗效,减小药物对人体的不良作用,从而提高用药安全.目前应用于实际工业生产中的手性药物分离方法各有不同的优点和适用范围,但各类分离方法仍有诸多不足,如何改善分离效果,提高分离效率,并能使其工业化生产中实现无污染,高效率,高经济效益等将会成为今后研究的重点,同时,通过计算机技术模拟药物分离过程也将大大促进手性分离技术的进步与发展,手性分离技术研究也必将成为药物研究领域的热点.

参 考 文 献

[1] 周颖. 反应停致短肢畸形事件[J]. 药物不良反应杂志,2010,12(5):335-337.

[2] 李淑芬,白鹏. 制药分离工程[M]. 北京:化学工业出版社,2012.

[3] 吴夏清,齐建平,王欣然,等. 超临界流体色谱分离手性药物进展[J]. 分析仪器,2014(3):1-6.

[4] LOHMANN D, DAPPEN R. Enantiomeric silanes, modified packing material, and use thereof[J]. Chirality, 1993, 5(3):168-171.

[5] HEIKO G, VOLKER S. Enantioselective capillary gas chromatography and capillary supercritical fluid chromatography on an immobilized gamma-cyclodextrin derivative[J]. J Chromatogr A, 1997, 761(96):181-193.

[6] 申睿. 手性选择剂及其在手性药物分离分析中的应用进展[J]. 国外医学药学分册,2005,12(6):413-417.

[7] SVENSSON S, KARLSSON A, GYLLENHAAL O, et al. Chiral separations of metoprolol and some analogs with carbon dioxide on chiralcel OD and chiralpak AD stationary phases. Use of chemometrics[J]. Chromatographia, 2000, 51(5-6): 283-293.

[8] 陈海,韩海峰,刘大伟,等. 新型超临界流体色谱仪在手性物质拆分中的应用研究[J]. 分析仪器,2017(3):73-76.

[9] 郭兴家,黄云志,田朋,等. 直链淀粉手性固定相高效液相色谱法分离泮托拉唑钠对映体及应用[J]. 分析试验室,2009, 28(4): 67-69.

[10] 丁徐中,黄金,王普. 高效液相色谱法手性拆分 N-叔丁氧羰基-3-羟基-1-金刚烷甘氨酸对映体[J]. 浙江工业大学学报, 2015, 43(3): 298-301.

[11] 周敏,徐小英,龙远德,等. 羧甲基-β-环糊精手性固定相拆分 17 种 β-内酰胺及其机理[J]. 高等学校化学学报, 2018, 39(6): 1164-1171.

[12] 王嘉林,王斯坦. HP-β-CD 手性添加剂反相高效液相色谱拆分盐酸帕洛诺司琼 S,R 异构体[J]. 中国药师, 2015, 18(2): 237-240.

[13] 谢升谷,郑国钢,陶巧凤,等. HPLC 手性流动相添加剂法测定左旋多巴与左旋多巴片中异构体含量[J]. 海峡药学, 2015, 27(2): 54-56.

[14] 贾绍栋,张美娜,金东日. 柱前手性荧光衍生反相高效液相色谱法分离甲状腺素对映体[J]. 色谱, 2008, 26(5): 559-563.

[15] 袁明辉,郑鸿声,王东武,等. 柱前衍生-手性高效液相色谱法测定 R-3-奎宁环醇的光学纯度[J]. 中国药业, 2015,24(3):9-11.

[16] 王小平. 逆流色谱手性分离芳基羧酸及其(-)-薄荷醇酯衍生物[D]. 杭州:浙江工业大学, 2017.

[17] 吴燕燕. 苦参镇静安神有效成分的分离及药效研究[D]. 杭州:浙江中医药大学,2016.

[18] 孙嘉仪,邢玉平,宋佳新,等. 毛细管电泳法分离 4 种手性药物对映体[J]. 沈阳药科大学学报,2015, 32(3): 199-203.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[19] WISTUBA D,CZESLA H,KEDER M,et al. Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with a permethyl-β-cyclodextrin stationary phase [J]. J Chromatogr A,1998,815(2): 183 - 188.
[20] 李英杰,董艳丽,高立娣,等. 丙烯酰-β-环糊精/纳米氧化镍复合材料电色谱柱的制备及应用 [J]. 分析试验室,2016,35(2): 167 - 170.
[21] 赵楠,李英杰. UPA-β-CD 的合成及其在 CE 手性拆分中的应用 [J]. 分析试验室,2018,37(6): 691 - 695.
[22] 杜迎祥,杨玥,于涛. 纳米粒子在毛细管电泳手性药物拆分中的应用研究进展 [J]. 西北药学杂志,2014,29(5): 547 - 549.
[23] 赵临襄,王志祥. 手性药物的制备技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015.
[24] 胡迎莉,王宇,栗媛,等. 磺酸化-β-环糊精作为手性选择剂分离 4 种碱性药物对映体 [J]. 沈阳药科大学学报,2017,45(5): 396 - 399.
[25] 熊吉滨,刘均忠. 固定化细胞酶法拆 N-乙酰-D,L-3-甲氧基丙氨酸 [J]. 高等学校化学学报,2010,31(8): 1560 - 1563.
[26] 柯彩霞,徐德蛟,闫云君,等. 生物酶法拆分手性药物的研究进展 [J]. 武汉工程大学学报,2016,22(6): 517 - 526.
[27] HIGUCHI A,HARA M,HORIUCHI T,et al. Optical resolution of amino acids by ultrafiltration membranes containing serum albumin [J]. J Membrane Sci,1994,93(2): 157 - 164.
[28] 张志良,王兵. 分子识别材料 D-萘普生印迹聚合物的制备与结构性能 [J]. 高分子材料科学与工程,2010,32(9): 112 - 116.

Progress in Separation Methods of Chiral Drugs

SHI Lei　YAN Xueming

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Universit of South China, Hengyang Hunan　421001)

Abstract

At present, the separation methods of chiral drugs mainly include physical resolution, chemical resolution and biological separation. The physical method is represented by chromatography, the chemical resolution is mainly carried out by means of crystallization, the bio-resolution of chiral drugs involves the comprehensive application of biological enzymes. In this paper, the separation methods of chiral drugs at home and abroad are briefly discussed, comparison of separation techniques and methods of chiral drugs, analysis of the advantages and disadvantages of various separation methods, and make some simple prospects for the separation of chiral drugs.

Keywords: chiral drugs; separation method; chiral separation

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net