

置换色谱法分离表阿霉素和阿霉素异构体的研究

祁彦¹, 储晓刚¹, 黄骏雄²

(1. 中国进出口商品检验技术研究所, 北京 100025; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 采用置换色谱法在 Kromasil KR100-10C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i.d., 10 μm) 上成功地分离了二元异构体——表阿霉素和阿霉素的混合物, 并研究和探讨了置换剂类型、浓度、流动相的组成及流速对分离的影响。结果表明: 选用 30 g/L 的海胺 1622 为置换剂, 流速 0.2 mL/min, 以及在有机相比例较低的流动相中加样, 而将置换剂溶解在有机相比例稍高的流动相中进行置换展开, 可以达到较好的分离。在最佳分离条件下, 采用置换展开方式可以在分析色谱柱上一次分离 30 mg 异构体的混合物。该结果充分显示了置换色谱上样量大, 可充分利用高效的色谱填料、产率高、分辨率好以及溶剂消耗少等优点, 适用于药物和生物制剂的制备分离。

关键词: 置换色谱; 表阿霉素; 阿霉素; 异构体; 制备分离

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2004)02-0106-05

Study on Separation of Epirubicin and Doxorubicin Isomers by Displacement Chromatography

QI Yan¹, CHU Xiaogang¹, HUANG Junxiong²

(1. China Import & Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025, China;

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: Displacement chromatography was successfully used to separate, at the preparative scale, a binary isomer mixture of epirubicin and doxorubicin, which are anthracycline antitumor antibiotics, on an analytical column (Kromasil KR100-10C₁₈ column, 250 mm × 4.6 mm i.d., 10 μm). Displacement parameters such as the type and the concentration of displacer, the composition and the flow-rate of mobile phase were investigated. The displacer employed was 30 g/L benzethonium chloride. The flow-rate was 0.2 mL/min. Loading of feed at lower initial organic level of mobile phase coupled with displacement at higher organic level was found to give efficient separation. The binary isomer mixture of 30 mg was separated on the analytical column. The results have indicated that displacement mode had high efficiency, greatly reduced solvent consumption in the process of purification, and offered the possibility of both high resolution and high loading. It has also demonstrated again that high performance displacement chromatography is one of the effective methods for the purification of therapeutic compounds in industrial processes.

Key words: displacement chromatography; epirubicin; doxorubicin; isomers; preparative separation

1943年, Tiselius^[1]首次提出了置换色谱的概念, 建立了置换色谱的理论, 并在1948年首先运用置换技术以活性炭为固定相分离了糖类化合物。但是, 在以后的几十年里, 受低效的色谱系统及填料的限制, 该技术很少再使用。直到20世纪80年代中期, 随着高效液相色谱(HPLC)技术的发展和高效色谱填料的深入研究, Horvath等^[2]将置换色谱应用于生物分子的分离与纯化, 才使该技术重新崛起。置换色谱是一种非线性色谱技术, 是指样品输入色

谱柱后, 用一种与固定相作用力极强的置换剂通入色谱柱, 去替代结合在固定相表面的溶质分子。样品在置换剂的推动下沿色谱柱前进, 使样品中各组分按作用力强弱的次序, 形成一系列前后相邻的谱带, 并在置换剂的推动下流出色谱柱^[3]。

色谱技术是药物和生物分子分离的最基本和最有效的技术之一。目前, 制备规模的分离主要应用超载洗脱的方式^[4]。置换展开与超载洗脱方式相比具有上样量大、产率高、分辨率好和有机溶剂消耗

少的优点,同时,被分离样品在分离过程中可能自行浓缩^[3]。置换色谱尤其适用于分离结构和性质极相似的物质,如外消旋体和各种异构体,并获得较高的浓度和产量^[5,6]。因此,将这一技术应用于药物和生物分子的分离显得越来越重要^[7]。

表阿霉素和阿霉素作为一种有效的抗生素类抗肿瘤药物,可以治疗早期及晚期的乳腺癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌和肠癌等^[8],它们的结构十分相似,不同的仅是糖元中 C-4' 羟基的空间位置。本文采用反相置换色谱法,选用海胺 1622(又称氯化苄乙氧铵)作为置换剂,在常规分析柱上分离了制备量的表阿霉素和阿霉素的混合物,并对置换色谱的实验参数——置换剂类型、浓度、流动相的组成及流速等对分离的影响进行了研究和探讨,实验结果充分显示了置换展开方式的优势,表明置换色谱应用于生物制剂和药品的制备分离具有广阔的前景。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TSP 高效液相色谱仪(美国 TSP 公司), P4000 四元梯度泵, AS3000 自动进样器, Focus 紫外-可见二极管阵列检测器, TSP PC1000 工作站(3.0 版本)。所有的置换分离及流出物的分析均采用 Kromasil KR100-10C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm i.d., 10 μm, 瑞典 Eka Chemicals 公司)。海胺 1622 购自 Fluka 公司,所用试剂为色谱纯和分析纯,实验用水由 Milli-Q 装置制备。阿霉素和表阿霉素的标准品及样品由浙江海正药业有限公司提供。

1.2 实验步骤

1.2.1 置换分离

用流动相平衡色谱柱;将表阿霉素和阿霉素的混合物(质量比为 1:1)溶解在流动相中作为样品液(以下实验中平衡色谱柱的流动相和配制样品的溶剂均一致),将样品液注入样品环;然后以 0.2 mL/min 的流速泵入置换剂溶液进行置换分离,同时分步收集流出色谱柱的流分;当置换剂的前沿突破峰出现时,分离完成,停止收集流分;用 100% 甲醇以 1.5 mL/min 的流速冲洗 20 min,再生色谱柱;经起始流动相再平衡后,又可进行下一次置换分离。

1.2.2 流出物分析

样品流分的分析条件: Kromasil KR100-10C₁₈ 色谱柱,流动相为甲醇-水(60:40, 甲酸调节 pH=2.4)(文中甲醇与水的比例均为体积比),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm。将所收集的流分经分析定性和定量后,所得数据以流出液体积为横坐标,流分的浓度为纵坐标绘制置换分离图。

2 结果与讨论

2.1 置换剂的选择

置换剂的选择是置换色谱能否成功地分离目标产物的关键因素之一^[2,3]。理想的置换剂应是:在色谱分离过程中,置换剂对固定相的吸附力比样品中组分强,且呈现 Langmuir 吸附行为,其特点表现为吸附等温线处在置换组分的等温线上方;置换剂在分离过程中性质稳定,不与样品中任何组分发生反应;在所选择的流动相中有较大的溶解度;能快速地从此色谱柱中去除,使色谱柱再生等。本文分别研究了乙二醇、二甲亚砜、正辛醇、十六烷基-三甲基溴化铵、柠檬酸铵、柠檬酸、甘油、异戊醇、苄基-三甲基氯化铵、海胺 1622 作为置换剂分离表阿霉素和阿霉素混合物的情况。实验结果表明海胺 1622 较为合适,它在固定相上的保留时间比样品组分长,且符合置换色谱对置换剂的其他要求;此外,以下的实验中选用海胺 1622 作为置换剂,也表现出了良好的置换色谱行为。

2.2 置换剂浓度的选择

由置换色谱的理论可知,置换剂浓度的变化必然引起置换分离中操作线斜率的变化,从而影响整个分离结果。只有当操作线的斜率小于被分离组分等温线的起始斜率,样品才能进行置换展开,形成置换序列^[3]。因此,我们首先对置换剂的浓度进行优化。分别选择 12, 30, 50 g/L 的海胺 1622 进行置换分离,结果如下:当置换剂的质量浓度为 12 g/L 时,即使流动相为甲醇-水(50:50, pH=2.4),即有机相比例高达 50% 的情况下,样品液中的表阿霉素和阿霉素也没有被置换,色谱峰是以洗脱展开的方式流出色谱柱;而 30 和 50 g/L 的置换剂均可以较好地置换样品液(见图 1)。其中,采用较低浓度置换剂展开速度慢,样品流出色谱柱所需置换剂的体积较大(见图 1-a),而采用浓度较高的置换剂则正相反(见图 1-b)。此外,随着置换剂浓度的增加,阿霉素和表阿霉素的流出液的浓度也随之增加,各组分的置换区带变窄,叠加增加;当采用 50 g/L 的置换剂时,由于置换区带的叠加严重,得到的纯组分较少,使分离效率明显降低。以上实验结果均符合置换色谱的理论^[2,3]。考虑到在保证较好分离的情况下,得到尽可能多的纯组分,以下实验均选用 30 g/L 为最佳浓度。

2.3 流动相组成对置换分离的影响

置换色谱的流动相又称载液(carrier),它对样品应有足够大的溶解度,以免样品液在分离过程中被逐渐浓缩,超过饱和溶解度而发生沉淀,堵塞色谱

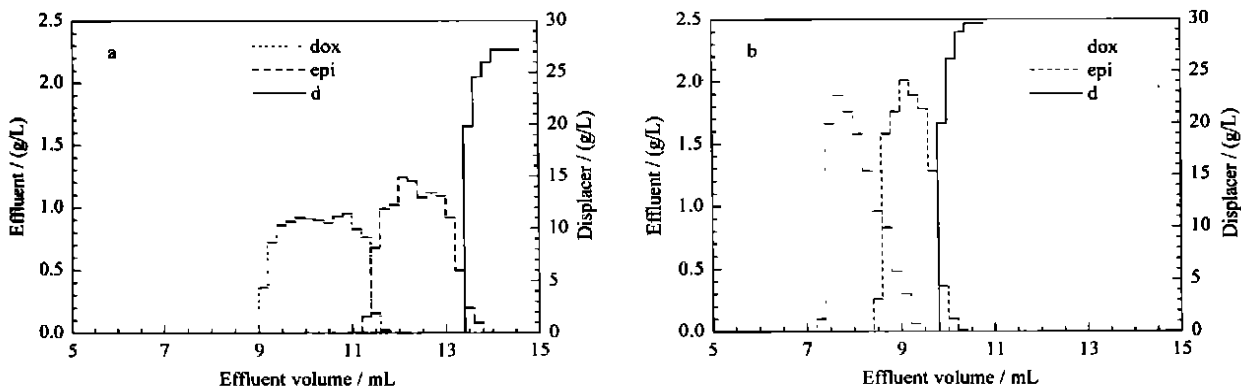


图 1 置换剂浓度对分离的影响

Fig. 1 Effects of the displacer concentration

Mobile phase and displacer solvent; methanol-water (40:60, v/v, pH=2.4). Feed load; 4 mg of isomer mixture. Flow-rate; 0.2 mL/min. The concentration of benzethonium chloride (displacer): a. 30 g/L; b. 50 g/L. dox, doxorubicin; epi, epirubicin; d, displacer.

柱; 流动相应有良好的化学稳定性、低粘度、低毒性, 且较易和样品分离。此外, 由于流动相分别是样品和置换剂的溶剂, 所以, 流动相中有机相的比例的微小变化即可引起置换分离的较大改变。

首先研究了流动相和置换剂的溶剂均为甲醇-水(20:80, pH=2.4)(简称: 20 初始平衡/20 置换展开, 见图 2-a), 以及流动相和置换剂溶剂均为甲醇-水(40:60, pH=2.4)(简称: 40 初始平衡/40 置换展

开, 见图 2-b)对样品进行分离的情况。结果显示: 随着流动相中甲醇比例的提高, 分离时间明显减少; 但是, 流动相中较高的有机相比例也使得各样品组分在色谱柱中的移动速度太快, 选择性降低, 分离效率下降; 采用有机相比例较低的流动相进行分离, 样品中各组分在固定相上得到了较充分的分离, 分离度明显增大, 且增加了流出物的浓度; 但是, 由于明显延长了分离时间, 使产率降低。

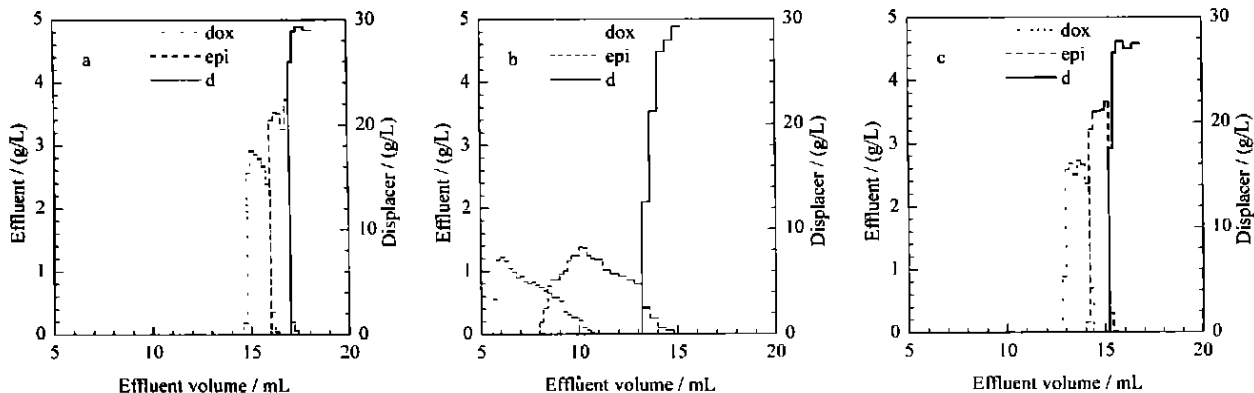


图 2 流动相的组成对分离的影响

Fig. 2 Effects of the composition of mobile phase

Feed load; 8.1 mg of isomer mixture. Flow-rate; 0.2 mL/min. a. mobile phase and displacer solvent; methanol-water (20:80, pH=2.4). b. mobile phase and displacer solvent; methanol-water (40:60, pH=2.4). c. mobile phase; methanol-water (20:80, pH=2.4); Displacer solvent; methanol-water (30:70, pH=2.4). The concentration of displacer; 30 g/L.

通常, 置换色谱中平衡色谱柱的流动相和置换剂的溶剂组成均一致。然而, 为了获得高产率, 在保证较好的分离度的同时, 还要兼顾分离时间。本文研究了流动相与置换剂的溶剂组成不同对置换分离的影响: 即流动相为甲醇-水(20:80, pH=2.4), 置换剂的溶剂为甲醇-水(30:70, pH=2.4)(简称: 20 初始平衡/30 置换展开, 见图 2-c)。比较图 2-c 和图 2-a 可以看出, 采用“20 初始平衡/30 置换展开”和“20 初始平衡/20 置换展开”方式的置换分离, 两者的分

离效率没有明显差别, 而前者可以缩短分离时间。

综上所述, 采用有机相比例较低的流动相平衡色谱柱, 然后加样, 使样品各组分在固定相上的吸附能力产生较大的差别, 而将置换剂溶解在有机相比例稍高的流动相中进行置换展开, 不仅可以缩短置换分离所需的时间, 而且可以达到较有效的分离。因此, 在以下的实验中, 均采用甲醇-水(20:80, pH=2.4)平衡色谱柱, 将置换剂溶解在甲醇-水(30:70, pH=2.4)中置换展开。

2.4 流速对置换分离的影响

置换色谱的理论认为, 较低的流速可以使样品中各组分得到较好的置换分离^[2, 3], 因此置换色谱所采用的流速一般明显低于洗脱色谱。但是, 近年也有文献报道, 流速并不是影响置换展开的关键因素, 分别在较低的流速(0.1 mL/min)和较高的流速(0.75 mL/min)下进行的置换展开并没有明显的区

别^[9]。为此, 本文研究了不同的流速对二元异构体置换分离的影响, 结果见图 3-a、b 和图 1-a。经比较可以看出: 在 0.1 和 0.2 mL/min 流速下, 表阿霉素和阿霉素的分离较完全, 各组分区带的叠加明显减少; 在 0.5 mL/min 流速下分离, 两组分的区带形状不规则, 且叠加明显增加。

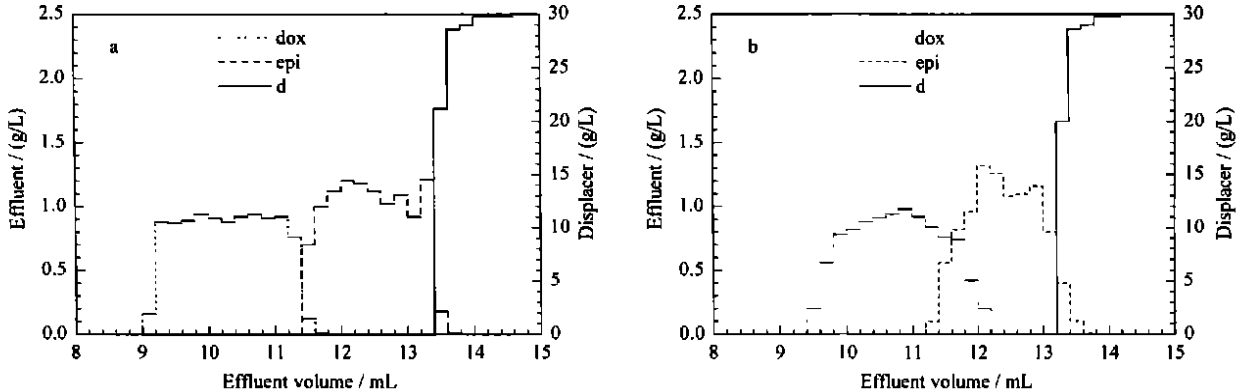


图 3 置换剂流速对分离的影响

Fig. 3 Effect of the flow-rate of displacer

Mobile phase and displacer solvent: methanol-water (40:60, pH=2.4). Displacer concentration: 30 g/L. Feed load: 4 mg of isomer mixture. Flow-rate: a. 0.1 mL/min; b. 0.5 mL/min.

以上结果表明, 尽管 0.5 mL/min 的流速对于洗脱色谱来说仍是较低的流速, 但对于置换色谱而言, 0.1 和 0.2 mL/min 的流速对样品各组分的充分分离更为有利, 分离度和区带的叠加情况均相似。因此, 在保证分离度的情况下兼顾分离时间, 以下实验选用 0.2 mL/min 为最佳的流速。

2.5 制备分离

在前述所选择的最佳置换分离条件下分离二元异构体的混合物 30 mg, 置换分离结果见图 4。

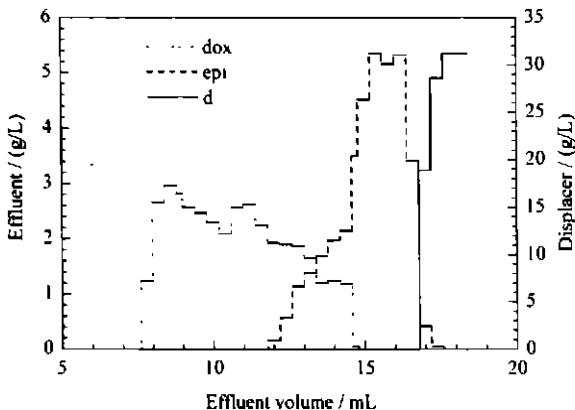


图 4 置换展开方式分离表阿霉素和阿霉素的混合物
Fig. 4 Preparative separation of doxorubicin and epirubicin mixture by displacement mode

Mobile phase: methanol-water (20:80, pH=2.4). Displacer concentration: 30 g/L. Displacer solvent: methanol-water (30:70, pH=2.4). Flow-rate: 0.2 mL/min. Feed load: 30 mg of isomer mixture.

可以看出, 在 Kromasil KR100-10C₁₈ 色谱柱上可以成功地分离制备量的二元异构体的混合物。流分收集后经分析定量, 纯度大于 99.0% 的阿霉素和表阿霉素的量分别为 9.49 和 8.14 mg。而在同一色谱柱上, 以超载洗脱的方式仅可以分离 0.2 mg 表阿霉素和阿霉素的混合物(见图 5)。

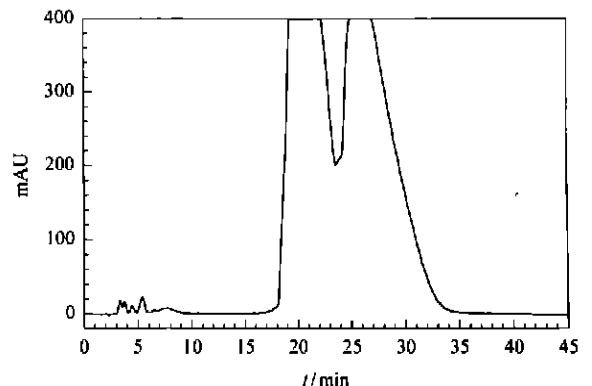


图 5 超载洗脱法分离表阿霉素和阿霉素混合物
Fig. 5 Chromatogram illustrating the overloading in elution chromatography of doxorubicin and epirubicin mixture

Mobile phase: methanol-water (40:60, pH=2.4); flow-rate: 1.0 mL/min; UV detection wavelength: 254 nm; feed load: 0.2 mg of isomer mixture (1:1, m/m).

以上结果充分显示了置换色谱在制备分离中有着传统的洗脱色谱方式无可比拟的优势: 允许的上样量比洗脱色谱高得多, 可以在分析柱上一次分离

制备量的样品,单位柱长的固定相利用率最高;可以较好地分离极相似的物质,各组分在分离过程中能形成较清晰的界限,消除了洗脱分析中的拖尾现象,提高了样品组分的回收率;分离制备级的样品只需要较少的有机溶剂,减少了溶剂的后处理量。

另外,本文还考察了进一步增加上样量的情况下阿霉素和表阿霉素在置换色谱中的分离情况。实验结果表明:在使 30 mg 二元异构体混合物分离良好的色谱条件下,大于 30 mg 的样品没有得到良好的分离。这是因为样品在色谱柱中的移动过程也是样品的分离过程,样品的分离是由于被分离组分之间对固定相结合部位直接竞争作用的结果,当置换剂泵入色谱柱后,结合能力较强的置换剂置换结合能力较弱的组分,并推动其向前移动,系统达到平衡后,样品中各组分按照它们对固定相亲和力的大小形成置换序列,依次流出色谱柱。当色谱柱不够长时,样品流出色谱柱时仍未达到完全分离,没有形成置换序列,因此分离效果不理想。完全分离所需的柱长与上样量成正比^[10],可以采用适当增加色谱柱长度的方法使大于 30 mg 的阿霉素和表阿霉素的样品得到较好的分离。

3 结论

本文采用置换色谱法,在分析型色谱柱上成功地分离了表阿霉素和阿霉素的混合物,所确定的最

佳分离条件为:30 g/L海胺 1622 为置换剂;流速为 0.2 mL/min;在有机相比例较低的流动相中加样,采用置换剂溶解于有机相比例稍高的溶剂来进行置换展开。结果表明,采用置换展开的方式可以成功地在反相分析柱上一次分离制备量的二元异构体的混合物,验证了置换色谱具有上样量大、充分利用高效的色谱填料、产率高、分辨率好以及有机溶剂消耗量少等优点,使置换色谱应用于生物制剂和药品的制备分离有着广阔的前景。

参考文献:

- [1] Tisdell A. *Ark Kem Minearal Ged*, 1943, 1: 16A
- [2] Horvath Cs. In: Brunner S ed. *Science of Chromatography*. Amsterdam: Elsevier Press, 1985. 179
- [3] Qi Yan, Huang Junxiong. *Progress in Chemistry* (祁彦, 黄骏雄. 化学进展), 2001, 13(4): 294
- [4] Cdin H. In: Ganetsos G, Barker P E eds. *Preparative and Production Scale Chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1993. 11
- [5] Gerstner J. *Chem Br*, 1997, 33: 40
- [6] Gerstner J, Morris J, Londo T. *CHEMTECH*, 1995, 25: 27
- [7] Freitag R. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 300
- [8] Cukell A J, Faulds D. *Drugs*, 1997, 3: 453
- [9] Ramanan S, Velayudhan A. *J Chromatogr A*, 1999, 830: 91
- [10] Frenz J. In: Horvath Cs ed. *High Performance Liquid Chromatography — Advances and Perspectives*. Orlando: Academic Press, 1988. 211

大连地区电话号码升位及本刊联系方式变更通知

自 2004 年 3 月 21 日零时起,大连市内四区及县(市)区固定电话、小灵通号码由 7 位升至 8 位。升位方法:所有固定电话、小灵通号码前加“8”。因此,《色谱》编辑部联系方式也有相应变动。电话:(0411)84379021;传真:(0411)84379600。

特此通知。

《色谱》编辑部
2004-03-22