

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРЕПАРАТИВНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ САЛЬБУТАМОЛА МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

©2019 г. **И. В. Микушина***, **В. Н. Царев**, **Н. Г. Базарнова**,
М. Ю. Чепрасова, **А. В. Сысоева**, **А. В. Сысоев**, **Е. Ю. Кушнир**, **К. В. Генъш**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

* mikuschinai@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019 г. Прошла рецензирование 05.06.2019 г.

Принята к публикации 05.06.2019 г.

В работе представлены результаты масштабирования аналитической методики сверхкритического хирального разделения сальбутамола до препаративного масштаба. Определены условия хроматографирования, разработана методика препаративного разделения энантиомеров методом сверхкритической флюидной хроматографии, при которых содержание R-изомера сальбутамола (энантиомерная чистота) составляет не менее 90 %, выход целевого продукта более 30 %.

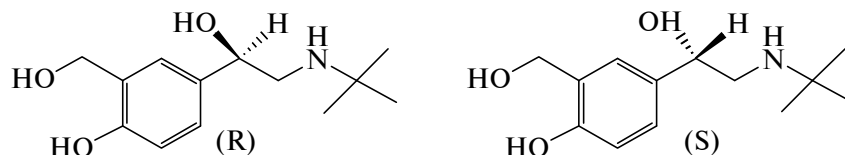
К л ю ч е в ы е с л о в а: сальбутамол, сверхкритическая флюидная хроматография, энантиомеры, масштабирование методики.

ВВЕДЕНИЕ

Среди агонистов β_2 -адренорецепторов, используемых для купирования и профилактики бронхо-легочных заболеваний, самой распространенной фармацевтической субстанцией является 2-*трет*-бутиламино-1-(4-гидрокси-3-оксиметилфенил)этанол (сальбутамол основание), а лекарственные препараты на его основе в форме солей (сульфата, тартрата, сукцината) или основания, входят в перечень жизненно важных лекарственных препаратов. Лекарственная субстанция используется более 50 лет с момента ее синтеза в 1968 г. британской фармацевтической компанией «Глахо» [1], однако в последние десятилетия установлено, что β_2 -адренергетической активностью обладает R-изомер [2], в то время как субстанция сальбутамол представляет собой рацемическую смесь R- и S-оптических изомеров.

Производство энантиомерно чистой фармацевтической субстанции позволит избавить лекарственный препарат от ряда нежелательных побочных действий, приводящих к аритмии, тахикардии, воспалительным процессам [3–5].

В ряде работ описаны способы получения R-сальбутамола методами стереоселективного синтеза [6, 7] или путем кристаллизации с диастереомерными солями



Структурные формулы энантиомеров 2-*трет*-бутиламино-1-(4-гидрокси-3-оксиметилфенил)этанола (основания сальбутамола)

L-винной кислоты или (+)4-нитротартраниловой кислоты [8—10]. Недостатками предложенных способов являются, в первую очередь, многостадийность процессов, использование большого количества вспомогательных веществ и растворителей, низкий выход целевого продукта.

В настоящее время при производстве фармацевтических субстанций и медицинских препаратов особое внимание уделяется методам получения активных веществ, в которых сводится к минимуму количество стадий процесса, а, следовательно, и количество нежелательных промежуточных веществ, токсичных отходов и выбросов [11]. Такие требования могут быть реализованы методами «зеленой химии» [12], а именно с использованием сверхкритических флюидных технологий. Применение сверхкритического CO_2 в таких технологиях удовлетворяет сразу нескольким принципам «зеленой химии»: минимальное количество вспомогательных веществ и растворителей, исключение большого числа промежуточных стадий, использование возобновляемого растворителя СК- CO_2 и другие [13—16].

Сверхкритические флюидные технологии находят широкое применение в современном производстве фармацевтических субстанций, прежде всего для экстрагирования физиологически активных веществ. Сверхкритическая флюидная хроматография наряду с ВЭЖХ используется для аналитических целей, а применение хиральных хроматографических колонок в последние годы позволяет идентифицировать разные оптические изомеры лекарственных веществ. Однако энантиомерное разделение фармацевтических субстанций с помощью сверхкритической флюидной хроматографии, до настоящего времени представляло, прежде всего, научный интерес. В то же время использование сверхкритического CO_2 для нужд фармацевтической отрасли, в частности для препаративного разделения энантиомеров фармацевтических субстанций, отличающихся физиологической активностью, представляется весьма перспективным и является недостаточно изученным.

В работе [17] показана возможность разделения энантиомеров сульфата салбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии на хиральных хроматографических сорбентах на основе замещенных полисахаридов, целлюлозы и амилозы. Авторами [18] предложена методика аналитического разделения рацемической фармацевтической субстанции сульфата салбутамола с использованием сверхкритической флюидной хроматографии.

Цель данного исследования — разработка методики препаративного разделения изомеров салбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Разработку методики аналитического хирального разделения основания салбутамола и контроль энантиомерной чистоты полученного основания R-салбутамола проводили на полупрепаративном сверхкритическом флюидном хроматографе. Использовалась модель хроматографа Investigator SFC System производства компании Waters Corp, США с аналитической хиральной колонкой с сорбентом, модифицированным хиральным селектором на основе иммобилизованной трис-(3-хлор-5-метилфенилкарбамат)амилозы (IG) Chiralpak IG, длина колонки 150 мм, диаметр 4,6 мм; диаметр зерна сорбента 5 мкм. Разделение проводили при скорости потока элюента 4 мл/мин, содержащего 15 об. % соразтворителя (метанол + динамический модификатор) (массовый расход CO_2 составляет 2 г/мин, соразтворителя — 0,475 г/мин), объемная доля динамического модификатора триэтиламина — от 0

до 1,5 % по отношению к метанолу, давление — 12 МПа. Температура колонки — 35 °С. Длина волны детектирования 225 нм.

Препаративное хроматографическое разделение рацемического основания салбутамола проводили на ЗАО «Алтайвитамины» на препаративной сверхкритической флюидной хроматографической системе со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области Prep 200 QSFS, производства компании Waters Corp, США. Система снабжена препаративной хиральной хроматографической колонкой Chiralpak IG с аналогичным сорбентом, диаметр колонки 30 мм, длина колонки 250 мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм. Разделение проводили при массовом расходе CO₂ 200 г/мин; соразтворителя (метанол + триэтиламин) 47,5 г/мин (60 мл/мин), динамический модификатор триэтиламин — 0,5 об. % по отношению к метанолу, давление — 12 МПа. Объем вводимой пробы раствора рацемического основания салбутамола в метаноле (концентрация 86 г/л) составляет 0,80 мл. Температура колонки 23 °С. Длина волны детектирования 225 нм.

Динамический модификатор — активное вещество, которое обратимо адсорбируется на неподвижной фазе и изменяет механизмы взаимодействия аналита с сорбентом, аналита с элюентом и элюента с сорбентом. Добавление малого количества динамического модификатора может приводить к подавлению кислотного или основного сольволиза аналита в подвижной фазе, способно изменять растворяющую способность флюида по отношению к исследуемым объектам, модифицировать преимущественный тип удержания веществ на сорбенте колонки, формировать ионные пары с ионными веществами в пробе, влиять на энантиоселективность [19].

Идентификацию оптической конфигурации изомеров салбутамола в растворах разделенных фракций с различными значениями времен удерживания проводили методом поляриметрии на поляриметре P3002 по величине удельного оптического вращения метанольного раствора. Для R-изомера салбутамола $[\alpha] = -26,90 \pm 0,02$ (°) млдм⁻¹г⁻¹.

Концентрацию основания салбутамола в метанольном растворе после разделения определяли методом УФ-спектроскопии аналогично методике, описанной в работе [20]. Для этого готовили калибровочные растворы прямым растворением основания салбутамола фармакопейной чистоты в метаноле. Концентрацию растворов варьировали в диапазоне от $2,45 \cdot 10^{-6}$ до $1,25 \cdot 10^{-5}$ г/мл, аликвотные части отбирали при помощи градуированных пипеток. Электронные спектры поглощения растворов регистрировали в координатах интенсивность (*I*) — длина волны (λ) на сканирующем спектрофотометре UV-VisCary 60 фирмы Agilent Technologies (USA) при температуре 20 °С в диапазоне волн 200—800 нм в кюветках из кварцевого стекла толщиной 10 мм. На основании полученных данных строили калибровочную прямую. В условиях, аналогичных описанным, регистрировали электронные спектры экспериментальных растворов, проводили измерение интенсивности поглощения и по калибровочной прямой находили концентрацию основания салбутамола в исследуемом растворе.

Использовали рацемическую смесь основания салбутамола фармакопейной чистоты, ЛСР-010823/08-291208; метанол марки «х.ч.», ТУ 2636-081-29483781-2015; CO₂ марки «пищевой» ГОСТ 8050-85; триэтиламин «х.ч.» СТП ТУ КОМП 2-686-13.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разделение рацемата сульфата салбутамола на полупрепаративном хроматографе Investigator SFC System (США) с хиральной аналитической колонкой

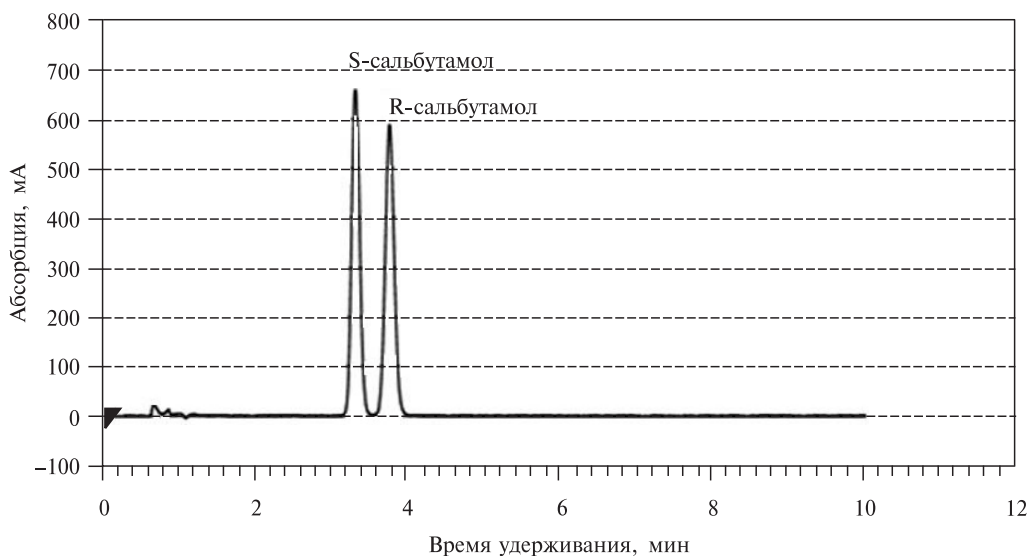


Рис. 1. Хроматограмма энантиомеров сульфата сальбутамола (аналитическая колонка Chiralpak IG, соразтворитель метанол, динамический модификатор изопропиламин, объемное соотношение CO_2 : (MeOH + *изо*PrNH₂) = 85:15, объемная доля *изо*PrNH₂ 1 % по отношению к метанолу, давление 12 МПа, температура колонки 35 °С, скорость потока 3 мл/мин, объем вводимой пробы аналита 5 мкл)

проводили в соответствии с методикой аналитического энантиомерного разделения рацемической фармацевтической субстанции, предложенной авторами [18]. В аналитическом режиме получено хорошее разделение изомеров сальбутамола сульфата в указанных условиях хроматографирования (рис. 1).

При масштабировании данной методики из аналитической в препаративную, выявились проблемы, связанные с недостаточной растворимостью сульфата сальбутамола в элюенте. Растворимость рацемической смеси сульфата сальбутамола увеличивали добавлением некоторых фторированных спиртов, которые при этом не оказывали существенного влияния на селективность разделения. Данный подход не привел к созданию эффективной методики флюидного хроматографического разделения. Масштабирование методики сверхкритического энантиоразделения разрабатывали для основания сальбутамола, которое имеет большую растворимость в элюенте. Кроме того, в качестве динамического модификатора использовали триэтиламин, так как авторы [17] допускают использование в качестве динамических модификаторов при энантиоразделении изомеров сульфата сальбутамола первичных, вторичных, третичных аминов и аммонийных солей.

На рис. 2 и 3 приведены результаты разделения энантиомеров сульфата и основания сальбутамола при использовании в качестве динамического модификатора триэтиламина на полупрепаративном хроматографе Investigator SFC System (США) с хиральной аналитической колонкой.

Как следует из представленных хроматограмм, солевая форма сульфата сальбутамола характеризуется большим значением времени удерживания (более 3 мин), чем основания сальбутамола (менее 3 мин). Вероятно, изменяются возможности специфических взаимодействий с селекторами сорбента, что и приводит к снижению селективности и ухудшению разделения энантиомеров, в то время как сальбутамол в форме основания показал хорошую эффективность разделения. Подбор

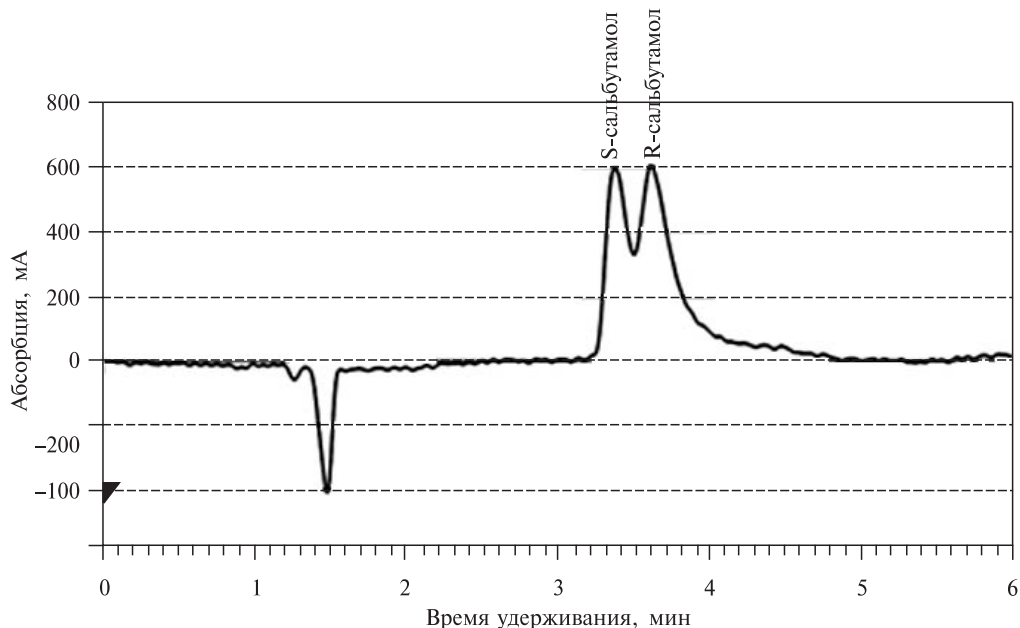


Рис. 2. Хроматограмма энантиомеров сульфата салбутамола (аналитическая колонка Chiralpak IG, объемная доля триэтиламина 0,5 % по отношению к метанолу)

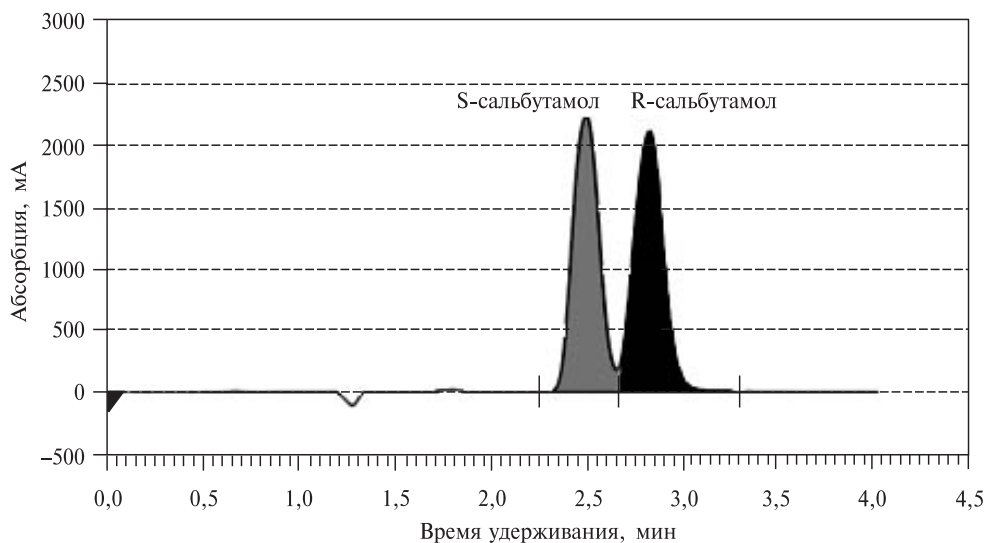


Рис. 3. Хроматограмма энантиомеров основания салбутамола (аналитическая колонка Chiralpak IG, объемная доля триэтиламина 0,5 % по отношению к метанолу)

концентрации динамического модификатора в системе осуществлялся экспериментально от 0 до 1,5 об. % (рис. 4).

Отсутствие динамического модификатора в хроматографической системе практически не влияет на время удерживания энантиомеров, но не позволяет получить симметричные пики (рис. 4), а при переходе к препаративному разделению в силу изменения процессов диффузии массопереноса отклонения в форме пиков

могут проявиться в еще большей степени. Наиболее оптимальные по симметрии пики получены при концентрации триэтиламина 0,5 об. % (рис. 3), а дальнейшее увеличение концентрации модификатора не приводит к их улучшению.

Данную методику испытали в промышленных условиях с использованием препаративной сверхкритической флюидной хроматографической системы со спектрофотометрическим детектированием в УФ-области Prep 200 Q SFS с препаративной хиральной хроматографической колонкой (рис. 5).

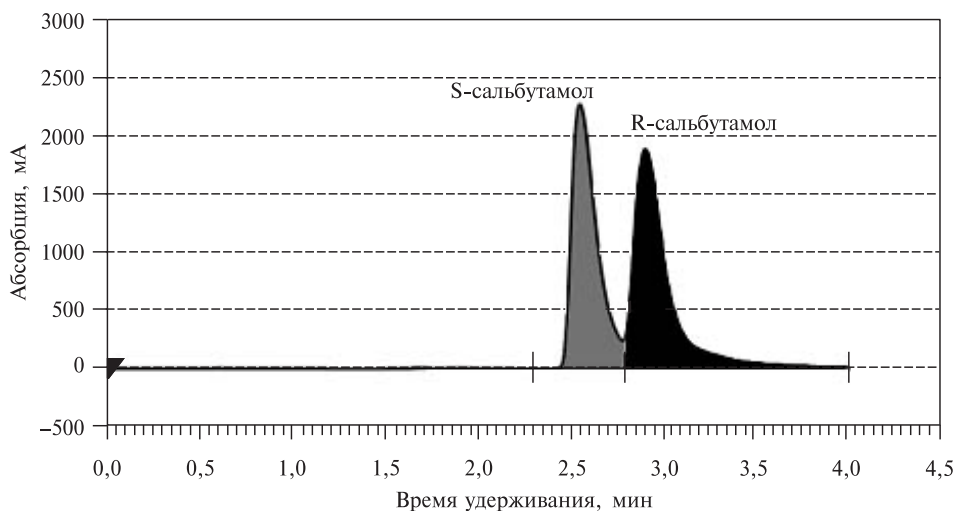


Рис. 4. Хроматограмма энантимеров основания салбутамола (аналитическая колонка Chiralpak IG, объемная доля триэтиламина 0 % по отношению к метанолу)

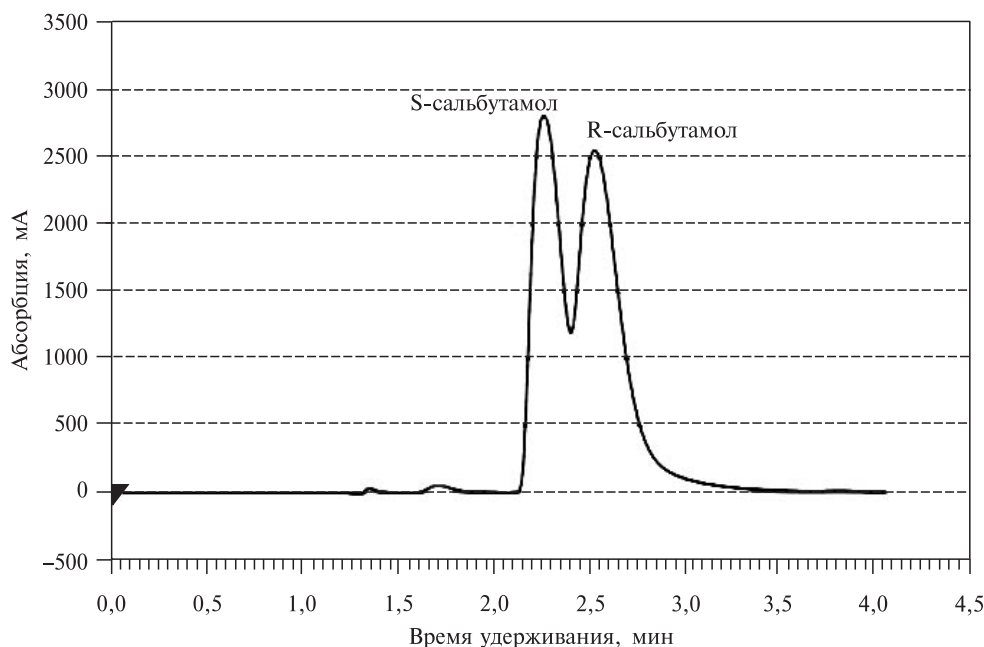


Рис. 5. Хроматограмма энантимеров основания салбутамола (препаративная колонка Chiralpak IG)

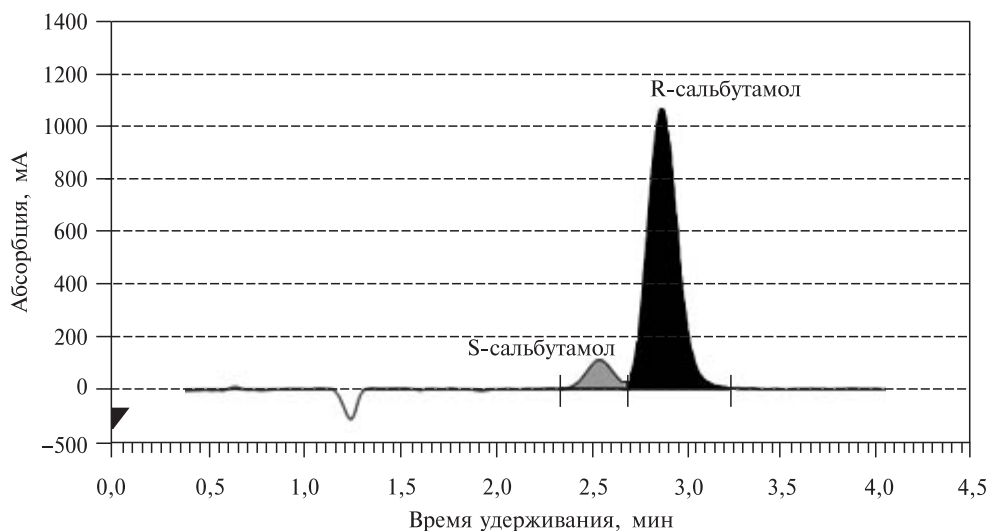


Рис. 6. Хроматограмма R-изомера основания салбутамола (аналитическая колонка Chiralpak IG, объемная доля триэтиламина 0,5 % по отношению к метанолу)

Методом УФ-спектроскопии определяли концентрацию основания салбутамола по калибровочным графикам и рассчитывали его массу, содержащуюся в целевом метанольном растворе после разделения. Она составила 31,3 % от массы использованного для разделения рацемата основания салбутамола.

После вакуумного концентрирования целевого продукта на ротационном вакуумном испарителе Hei-VAPPrecision (Heidolph, Германия) при остаточном давлении 20 кПа при 42 °С выделяли кристаллический R-салбутамола в форме основания. Раствор полученного R-салбутамола в метаноле концентрацией 2 мг/мл анализировали на энантиомерную чистоту на полупрепаративном сверхкритическом флюидном хроматографе с хиральной аналитической колонкой в аналитическом режиме. Энантиомерная чистота, определенная из хроматограмм при помощи встроенного программного обеспечения методом внутренней нормализации по площади пиков, составила 91,73 % (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые разработана препаративная методика разделения энантиомеров салбутамола в форме основания, позволяющая выделять полупродукт R-изомера, на основе которого возможно получение фармацевтических субстанций в виде сульфата, сукцината или тартрата без изменения оптической конфигурации действующего вещества. Разработанная методика дает возможность получения целевого R-изомера салбутамола в количестве, достаточном для использования этой методики в промышленных масштабах с удовлетворительным выходом целевого продукта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-29-06033мк.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brittain R.T., Farmer J.B., Jack D., Martin L.E., Simpson W.T. // Nature. 1968. Vol. 219. P. 862.
2. Dhand R., Goode M., Reid R. // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1999. Vol. 160. P. 1136.

3. Lam S., Chen J. // Am. J. Health Syst. Pharm. 2003. Vol. 60. P. 1971.
4. Nelson H.S., Bensch G., Pleskow W.W. et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 1998. Vol. 102. P. 943.
5. Ahrens R., Weinberger M. // J. Allergy Clin. Immunol. 2001. Vol. 108. P. 681.
6. Пат. США № 7247750. 2007.
7. Пат. США № 7049469. 2006.
8. Пат. США № 8063251. 2011.
9. Пат. США № 6365756. 2002.
10. Пат. США № 6995286. 2006.
11. Кустов Л.М., Белецкая И.П. // Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. 2004. Т. XLVIII. № 6. С. 3.
12. Инновационные образовательные программы в области химии. Научно-образовательный центр. «Химия в интересах устойчивого развития — зеленая химия» / Под ред. В.В. Лунина, Е.С. Локтевой, Е.В. Голубиной. М.: Изд-во МГУ, 2007. 117 с.
13. Георгиев Д. // Наноиндустрия. 2018. Т. 11. № 5. С. 320.
14. Покровский О.И. // Фармацевтические технологии и упаковка. 2013. № 5. С. 28.
15. Гумеров Ф.М., Яруллин Л.Ю., Hung Triong Nam, Сагдеев А.А., Габитов Ф.Р., Каюмова В.А. // Вестник Казанского технологического университета. 2017. Т. 20. № 8. С. 30.
16. Покровский О.И. // Фармацевтические технологии и упаковка. 2012. № 2. С. 50.
17. Костенко М.О., Устинович К.Б., Покровский О.И., Паренаго О.О., Базарнова Н.Г., Лунин В.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2017. Т. 12. № 4. С. 24.
18. Пат. РФ № 2667002. 2018.
19. Сверхкритическая флюидная хроматография с насадочными колонками (По материалам 4-й Международной конференции по сверхкритической хроматографии, Стокгольм, Швеция, сентябрь 2010 г.). Пер. О.И. Покровского. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2011. Т. 6. № 1. С. 69.
20. Сыsoева А.В., Базарнова Н.Г., Карпицкий Д.А., Кузнецов П.С., Кушнир Е.Ю., Петрин Н.И., Сыsoев А.В., Чеprasова М.Ю., Микушина И.В. // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2018. Т. 11. № 4. С. 500.

PREPARATIVE SEPARATION METHOD DEVELOPMENT OF SALBUTAMOL ENANTIOMERS BY SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY

**I. V. Mikushina, V. N. Tsarev, N. G. Bazarnova, M. Yu. Cheprasova,
A. V. Sysoeva, A. V. Sysoev, E. Yu. Kushnir, K. V. Gensh**

Altay State University

The paper presents the results of scaling up the supercritical chiral separation of salbutamol to a preparative scale. Chromatographic conditions have been determined, a technique for preparative separation of enantiomers by supercritical fluid chromatography has been developed, in which the content of the R-isomer of salbutamol (enantiomeric purity) is not less than 90 %, the yield of the target product is more than 30 %.

Key words: salbutamol, supercritical fluid chromatography, enantiomers, scaling method.
