

Разработка препаративного способа получения энантиомерно чистой субстанции сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии

В. Н. Царев✉, Н. Г. Базарнова, И. В. Микушина

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» (АлтГУ), 656049, Россия, Алтайский край, г. Барнаул, пр-т Ленина, д. 61

✉ Контактное лицо: Царев Виталий Николаевич. E-mail: tsarewn@yandex.ru

ORCID: В. Н. Царев – <https://orcid.org/0000-0003-1236-9692>; Н. Г. Базарнова – <https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>; И. В. Микушина – <https://orcid.org/0000-0003-1280-7154>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 19.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

Резюме

Введение. Все большее количество исследований, проводимых в различных странах в области биофармации, убедительно показывают различия физиологического воздействия на организм человека стереоизомеров фармацевтических субстанций. Как правило один из энантиомеров оказывает необходимое фармакологическое воздействие, другой энантиомер либо инертен, либо проявляет негативное побочное влияние. В настоящее время актуальным является получение энантиомерно чистых фармакологических субстанций из их рацемических смесей.

Цель. Получение R-изомера сальбутамола из рацемической смеси сальбутамола и разработка препаративной методики хирального разделения методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) с достаточным для производственного процесса выходом целевого продукта.

Материалы и методы. Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) широко используется для проведения аналитических и препаративных разделений энантиомеров фармацевтических субстанций. Актуальность использования сверхкритической флюидной хроматографии СФХ обусловлена в большей мере тем, что в качестве основного компонента подвижной фазы (ПФ) в ней используется суб- или сверхкритический диоксид углерода (СК- CO_2). Исследования проводили на полупрепаративном Investigator SFC (Waters Corporation, США) и препаративном Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) сверхкритических флюидных хроматографах, с PDA-детекторами. Образцы взвешивали с точностью до 0,0001 г на весах XPE206DR (Mettler Toledo, США).

Результаты и обсуждение. Изучен процесс хирального разделения сальбутамола сульфата методом СФХ на Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США). Выявлено, что в хроматографической системе в сверхкритических условиях происходит разделение соли на кислотный и основной остатки, что значительно снижает производительность и сокращает продолжительность непрерывной работы хроматографа. Разработаны условия препаративного хирального разделения рацемической смеси сальбутамола основания на R- и S-изомеры с высокими энантиоселективностью и производительностью. Полученный R-изомер сальбутамола основания может быть переведен в фармсубстанцию в виде сульфата или другой соли, без потери энантиомерной чистоты, S-изомер может быть подвергнут рацемизации и последующему использованию.

Заключение. Разработан препаративный способ хирального разделения рацемической смеси сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) с выходом целевого продукта (R-изомера) 5,5 г в смену (8 часов).

Ключевые слова: сверхкритическая флюидная хроматография, энантиомерно чистая субстанция сальбутамола основания, препаративный способ хирального разделения

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. Н. Царев осуществлял проведение экспериментов полупрепаративного и препаративного хиральных разделений сальбутамола сульфата и сальбутамола основания методом СФХ. Н. Г. Базарнова, И. В. Микушина осуществляли концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Статья написана при участии всех соавторов и согласования ими итоговой версии.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании ОАО «Алтайвитамины» за предоставленную возможность выполнения работы на препаративном сверхкритическом флюидном хроматографе (СФХ) Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США), коллективу лаборатории сверхкритических флюидных технологий Института общей и неорганической химии имени Н. С. Курнакова РАН (ИОНХ РАН) за помощь в разработке физико-химического обоснования процессов при разработке аналитической методики хирального разделения сальбутамола сульфата методом СФХ.

Для цитирования: Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Микушина И. В. Разработка препаративного способа получения энантиомерно чистой субстанции сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):160–169. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-160-169>

Development of a Preparative Method for Obtaining an Enantiomerically Pure Substance of Salbutamol by Supercritical Fluid Chromatography

Vitaly N. Tsarev✉, Natalya G. Bazarnova, Irina V. Mikushina

Altai State University, 61, prospekt Lenina, Barnaul, Altai Territory, 656049, Russia

✉ Corresponding author: Vitaly N. Tsarev. E-mail: tsarewn@yandex.ru

© Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Микушина И. В., 2022

© Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Mikushina I. V., 2022

ORCID: Vitaly N. Tsarev – <https://orcid.org/0000-0003-1236-9692>; Natalya G. Bazarnova – <https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>; Irina V. Mikushina – <https://orcid.org/0000-0003-1280-7154>.

Received: 06.09.2022

Revised: 19.10.2022

Published: 25.11.2022

Abstract

Introduction. An increasing number of studies conducted in various countries in the field of biopharmacy convincingly show the differences in the physiological effects on the human body of stereoisomers of pharmaceutical substances. As a rule, one of the enantiomers has the necessary pharmacological effect, the other enantiomer is either inert or has a negative side effect. Currently, it is important to obtain enantiomerically pure pharmacological substances from their racemic mixtures.

Aim. Obtaining the R-isomer of salbutamol from a racemic mixture of salbutamol and developing a preparative procedure for chiral separation by supercritical fluid chromatography (SFC) with a yield of the target product sufficient for the production process.

Materials and Methods. Supercritical fluid chromatography (SFC) is widely used for analytical and preparative separations of enantiomers of pharmaceutical substances. The relevance of the use of supercritical fluid chromatography SFC is largely due to the fact that it uses sub- or supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) as the main component of the mobile phase (MP). Studies were carried out on semi-preparative Investigator SFC (Waters Corporation, USA) and preparative Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) supercritical fluid chromatographs with PDA detectors. Samples were weighed to the nearest 0.0001 g on a XPE206DR balance (Mettler Toledo, USA).

Results and discussion. The process of chiral separation of salbutamol sulfate by the SFC method on Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) was studied. It was revealed that in the chromatographic system under supercritical conditions, the salt is separated into acidic and basic residues, which significantly reduces productivity and shortens the duration of continuous operation of the chromatograph. Conditions for the preparative chiral separation of the racemic mixture of salbutamol base into R- and S-isomers with high enantioselectivity and productivity have been developed. The resulting R-isomer of salbutamol base can be converted into the pharmaceutical substance in the form of sulfate or other salt without loss of enantiomeric purity, the S-isomer can be subjected to racemization and subsequent use.

Conclusion. A preparative method has been developed for the chiral separation of a racemic mixture of salbutamol by supercritical fluid chromatography (SFC) with a yield of the target product (R-isomer) of 5.5 g per shift (8 hours).

Keywords: supercritical fluid chromatography, enantiomerically pure substance of salbutamol base, preparative method of chiral separation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Vitaly N. Tsarev carried out experiments on semi-preparative and preparative chiral separations of salbutamol sulfate and salbutamol base by the SFC method. Natalya G. Bazarnova, Irina V. Mikushina carried out the conceptualization and methodology of the study, as well as reviewing and correcting the article. The article was written with the participation of all co-authors and their approval of the final version.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the JSC "Altaivitaminy" for the opportunity to perform the work on a Prep 200 qSFC (Waters Corporation, USA) preparative supercritical fluid chromatograph (SFC), to the staff of the laboratory of supercritical fluid technologies of the N. S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (IGIC RAS) for assistance in developing the physicochemical substantiation of processes in the development of an analytical procedure for the chiral separation of salbutamol sulfate by the SFC method.

For citation: Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Mikushina I. V. Development of a preparative method for obtaining an enantiomerically pure substance of salbutamol by supercritical fluid chromatography. *Drug development & registration*. 2022;11(4):160–169. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-160-169>

ВВЕДЕНИЕ

Сальбутамол – β₂-адреностимулятор из ряда 1,2-аминоспиртов (рисунок 1), жизненно необходимый и важнейший лекарственный препарат для медицинского применения, который используется в ингаляционной форме в качестве бронхолитика¹.

¹ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2020 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/. Ссылка активна на 27.01.2020.

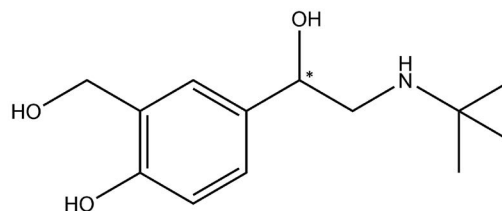


Рисунок 1. Структурная формула сальбутамола

Figure 1. Structure of salbutamol

Сальбутамол – хиральное соединение, которое чаще всего для приготовления лекарственных препаратов используется в виде рацемической смеси. Необходимой фармакологической активностью обладает

только его R-энантиомер [1], в то время как S-энантиомер проявляет минимальное сродство к β 2-адренорецепторам и оказывает побочные негативные реакции [2]. Разнонаправленное действие энантиомеров характерно не только для салбутамола [3], но и практически для всех фармацевтических субстанций, используемых в виде рацемических смесей. В настоящее время активно разрабатывают способы хиральной очистки или разделения рацемических смесей с целью получения энантиомерно чистых фармакологических субстанций [4–6]. Институт химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета в сотрудничестве с институтом общей и неорганической химии имени Курнакова РАН г. Москва и ОАО «Алтайвитамины» в рамках проекта «Создание высокотехнологичного производства жизненно важного лекарственного противоастматического препарата «салбутамол» в аэрозольной форме на основе энантиомерно чистой, микронизированной субстанции, получаемой с помощью сверхкритических флюидных технологий», разработали аналитическую методику хирального разделения салбутамола сульфата методом сверхкритической флюидной хроматографии [7]. Аналитический способ получения R-изомера салбутамола сульфата методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) защищен патентом № RU 2 727 890 C1 [8].

При апробации аналитической методики хирального разделения рацемической смеси салбутамола сульфата на промышленном хроматографе Prep

200 qSFC (Waters Corporation, США) получены результаты с низкой селективностью (рисунок 2). Кроме того, хроматографическая система бесперебойно работала не более 30 минут, далее происходил аварийный сбой системы, необходимо было промывать фритту, и запускать хроматограф заново.

Для осуществления процесса масштабирования аналитической или полупрепаративной [9] методики необходимо выявить влияние ряда условий препаративного хроматографирования, таких как природа сорбента [10], состав подвижной фазы, тип и содержание динамического модификатора [11] или модификаторов, влияние давления в хроматографическом тракте и температуры процесса.

Параметры рабочего давления установки составляют 120 бар, скорость подачи элюента в хроматографическом тракте 200 г в минуту. Диаметр препаративной колонки (30 мм) не позволяет применять систему термостатирования, поскольку невозможен равномерный прогрев колонки по всему объему.

Таким образом, учитывая вышесказанное, для разработки условий препаративного хирального разделения рацемической смеси салбутамола сульфата необходим подбор параметров, влияющих на селективность разделения рацемической смеси только таких как химическая природа аналита (соль или основание), состав подвижной фазы, природа сорбента и его доля в подвижной фазе, природа модификаторов.



Рисунок 2. Хроматограмма энантиомеров салбутамола сульфата, полученная при апробации аналитической методики с параметрами: ПФ-сверхкритический CO_2 :метанол (80:20), динамический модификатор-изопропиламин (ИПА) 1 об. %, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкола 2 мл, концентрация аналита 3 г/л на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSFC

Figure 2. Chromatogram of the enantiomers of salbutamol sulfate, obtained by testing the analytical method with the following parameters: PF-supercritical CO_2 :methanol (80:20), dynamic modifier-isopropylamine (IPA) 1 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 2 ml, analyte concentration 3 g/l on preparative chromatographic complex Prep 200 qSFC

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали растворы салбутамола сульфата и салбутамола основания с концентрацией от 1,0 до 3,0 г/л и 86,0 г/л соответственно. Навески рацемических смесей салбутамола отвешивали на весах XPE206DR balance (Mettler Toledo, США) с точностью до 0,0001 г, переносили в мерные калиброванные колбы на 200 мл (Колба 1-200 СН с градуированной горловиной), вносили 100 мл метанола, помещали в лабораторный встряхиватель LOIP LS-220 (ЛАБ-ПУ-04), через 15 мин вынимали колбы из встряхивателя и доводили уровень метанола до метки. Полученные растворы отфильтровывали от механических примесей через фильтр белая лента и переносили в пробоприемник (500 мл) светлого стекла. Профильтрованные растворы хранили в плотно закупоренной таре темного стекла, при температуре от 2 до 20 °С в течение 24 часов с момента приготовления.

Хроматографические исследования проводили на препаративном комплексе Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США). Диапазон условий: скорость потока подвижной фазы 200 г/мин; что соответствует рабочему параметру для СФХ системы Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) и неизменно; состав подвижной фазы CO₂/MeOH варьировали от 70/30 % до 90/10 %; давление в хроматографическом тракте изменяли от 100 до 200 бар; сорбент – Chiralpak IG (Chiral Technologies, США); объем вводимой пробы от 0,1 до 2,0 мл. Детектирование осуществляли при длинах волн 225 и 276 нм, что соответствует максимумам поглощения аналита. Все эксперименты проводили в изократическом режиме.

Время удерживания аналита определяли по вершине хроматографического пика. За мертвое время (время выхода неудерживаемого компонента, t_0) принимали время первого возмущения базовой линии, обычно связываемого с выходом растворителя образца.

Основные параметры хроматографического исследования вычисляли с помощью стандартных формул:

$$k = (t_r - t_0)/t_0$$

где k – коэффициент удерживания; t_0 – мертвое время; t_r – время удерживания вещества.

Коэффициент асимметрии пика As вычисляли в виде отношений ширин правого и левого фронтов пика, измеренного у основания. Коэффициент селективности разделения двух энантиомеров α рассчитывали, как отношение коэффициента удерживания более удерживаемого энантиомера к коэффициенту удерживания менее удерживаемого. Ширину фронта пика измеряли от максимума пика до точки перехода фронта в базовую линию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных этапов при разработке способа хроматографического разделения энантиомеров является выбор хирального сорбента [12]. Несмотря на многочисленные исследования [13], до сих пор не предложено алгоритма поиска сорбента для хиральных разделений [14, 15]. Комплекс Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) был оснащен препаративной колонкой 250 × 30 Chiralpak IG с сорбентом на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) амилозы, с трис-3-хлор-5-метилфенилкарбаматными заместителями [16, 17]. Ранее, в работе [18] была показана возможность хирального разделения салбутамола сульфата с использованием сорбента на базе химически привитой к силикагелю (иммобилизованной) амилозы, с трис-3-хлор-5-метилфенилкарбаматными заместителями. Этот сорбент был использован нами при разработке способа препаративного хирального разделения рацемической смеси субстанций салбутамола сульфата и салбутамола основания.

Подвижная фаза в СФХ как правило включает CO₂ в сверхкритическом флюидном состоянии и соразворитель, в котором аналит имеет максимальную растворимость.

В качестве растворителей салбутамола сульфата для препаративных СФХ разделений исследовали метанол, этанол, ацетонитрил, изопропиловый спирт, диметилсульфоксид.

Низкие значения растворимости салбутамола сульфата в ацетонитриле и изопропиловом спирте приводят к низкой производительности работы хроматографа. Кроме того, при низкой растворимости и соответственно низкой концентрации субстанции происходит выпадение разделяемой субстанции в осадок в хроматографическом пути, что ведет к вынужденной остановке системы и ее промывке.

Экспериментально доказано, что образование осадка аналита в хроматографическом пути связано с понижением его растворимости из-за снижения полярности ПФ в сверхкритическом состоянии ниже предела растворимости аналита. Таким образом, соразворитель помимо высокой растворяющей способности, должен быть максимально полярным. Образование осадка субстанции в колонке приводит к ее неисправности. Салбутамола сульфат имеет невысокую растворимость в этаноле. При контакте ионного соединения салбутамола сульфата с трехкомпонентной ПФ – CO₂-EtOH-H₂O происходит высаливание. Это приводит к невоспроизводимому искажению форм пиков салбутамола, а также, возможно, к частичной преципитации салбутамола сульфата в хроматографическом пути, что проявляется в постепенном росте перепада давления между насосом и регулятором давления, по мере выполнения последовательности вколов, а также в постепенной дестабилизации работы регулятора давления.

Два других растворителя – диметилсульфоксид (ДМСО) и гексафторизопропанол (ГФИП), хорошо смешиваются со scCO_2 и позволяют обеспечить высокую растворимость салбутамола сульфата в ПФ. Однако использование их для хирального препаративного разделения не целесообразно. ДМСО интенсивно взаимодействует с сорбентами колонок и практически блокирует удерживание на них других веществ. Кроме того, ДМСО несовместим с неиммобилизованными полисахаридными фазами, так как способен десорбировать их с силикагеля и тем самым разрушить хиральную колонку. ГФИП образует с различными функциональными группами хиральных селекторов прочные водородные связи и препятствует контакту хиральных центров сорбции с целевыми веществами, тем самым нивелируя энантиоселективность. Кроме того, при попытках использования ГФИП как соразворителя в СФХ для разделения энантиомеров салбутамола сульфата наблюдали очень большие уширения пиков. Фактически регистрировали не хроматографические пики, характерные для элюентной хроматографии, а растянутое во времени постепенное вымывание салбутамола сульфата с колонок.

При изучении растворителей, в том числе доступных литературных данных [19], установлено, что в качестве соразворителя для элюирования салбутамола сульфата (солевой формы) в СФХ целесообразно использовать только метанол. Кроме того, с экономической точки зрения, применение метанола в качестве соразворителя является более выгодным в препаративном разделении в условиях фармацевтического производства.

Состав ПФ является одним из принципиальных факторов, определяющим удерживание, селективность разделения и форму хроматографических пиков. Повышение содержания соразворителя приводит к росту растворяющей способности ПФ по отношению к анализам, сокращению времен удерживания, коэффициентов удерживания, а также к частичному подавлению тейлинга, если таковой проявляется. Влияние доли соразворителя на коэффициенты селективности более сложно и в общем случае *a priori* непредсказуемо. Поэтому подбор доли соразворителя для препаративных энантиомерных разделений, в которых селективность является ключевым вкладом в разрешение – необходимый шаг оптимизации способа и методики СФХ разделения рацемической смеси на отдельные энантиомеры.

Приемлемой степенью селективности для препаративного разделения является такая ее величина, при которой имеется возможность настроить алгоритм сбора фракций с оптической чистотой не менее 97 %.

Теоретически, для выбора конкретного значения доли соразворителя в подвижной фазе необходимо учитывать влияние доли соразворителя на форму пиков в нелинейном режиме, при перегрузе колонки. В этих условиях большое значение приобретает учет

совместного влияния соразворителя и растворителя образца на формы пиков.

Экспериментально доказано, что при уровне соразворителя в подвижной фазе 16 % степень селективности достаточна для настройки алгоритма сбора чистых энантиомеров салбутамола сульфата (рисунк 3).

Для повышения производительности была предпринята попытка в качестве добавки к основному соразворителю (метанолу) использовать ГФИП. В присутствии ГФИП растворимость салбутамола сульфата в метаноле увеличивается при увеличении доли ГФИП в смеси растворителей (таблица 1).

Таблица 1. Изменение растворимости салбутамола сульфата в метаноле в зависимости от добавляемой объемной доли ГФИП

Table 1. Change in the solubility of salbutamol sulfate in methanol depending on the added volume fraction of HFIP

№	Форма салбутамола Form of salbutamol	Растворимость, г/л (при н.у.) Solubility, g/l (at n.c.)					
		ГФИП 0,5 % HFIP 0,5 %	ГФИП 1,0 % HFIP 1,0 %	ГФИП 2,5 % HFIP 2,5 %	ГФИП 5,0 % HFIP 5,0 %	ГФИП 10,0 % HFIP 10,0 %	CH_3OH
1	Салбутамол сульфат Salbutamol sulfate	50	90	180	260	400	3

Использование раствора салбутамола сульфата в сочетании с ГФИП резко сократило продолжительность безаварийной работы с 30 до 5 минут в зависимости от концентрации анализата. Наблюдалась линейная зависимость уменьшения времени безаварийной работы от роста концентрации салбутамола сульфата.

Основной причиной аварийной остановки комплекса Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) являлся критический перепад давлений между насосом высокого давления и автоматическим регулятором обратного давления. Перепад давлений выше допустимого происходит за счет химического взаимодействия в системе сверхкритический CO_2 – метанол – ГФИП – салбутамола сульфат, в результате которого образуется осадок, нерастворимый в подвижной фазе. Образующийся осадок задерживается на предколонке, что ведет к увеличению перепада давления вплоть до критического.

Из полученных экспериментальных данных очевидно, что препаративное хиральное разделение салбутамола сульфата проводить как технологически, так и экономически не целесообразно. Дальнейшие эксперименты по хиральному препаративному разделению проводили на субстанции салбутамол основание. Растворимость салбутамола основания в метаноле составляет 86 г/л, что обеспечивает производительность работы от 3,5 до 5,5 г чистого R-изомера салбутамола основания в рабочую смену. Время

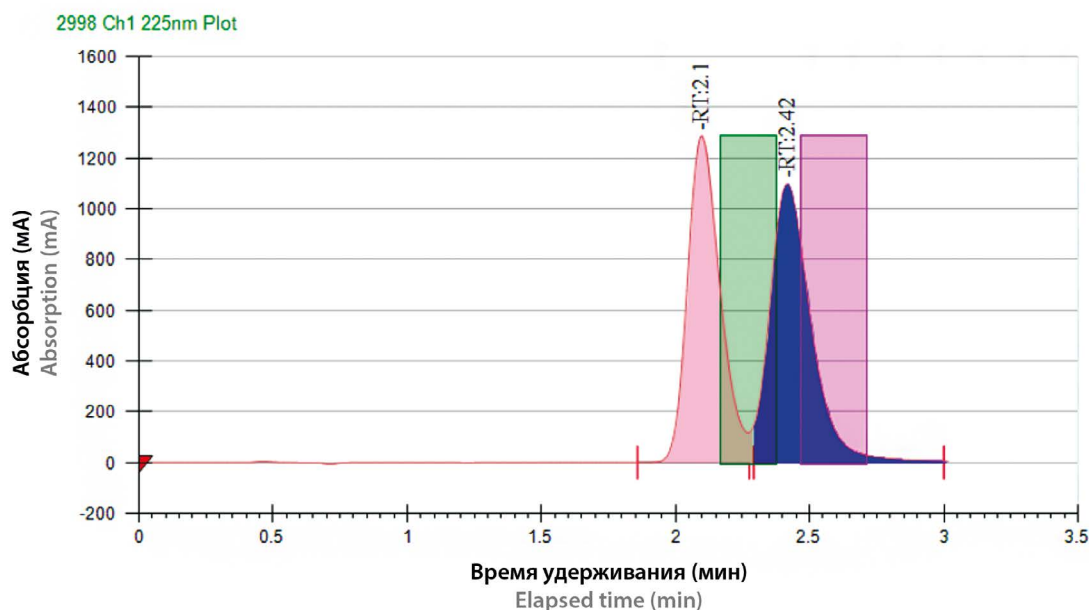


Рисунок 3. Хроматограмма энантиомеров салбутамола сульфата, демонстрирующая визуализацию алгоритма сбора R- и S-изомеров салбутамола сульфата в условиях: ПФ-сверхкритический CO_2 :метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкола 2 мл, концентрация аналита 3 г/л

Figure 3. Chromatogram of the enantiomers of salbutamol sulfate, showing the visualization of the algorithm for collecting the R- and S-isomers of salbutamol sulfate under the conditions: PF-supercritical CO_2 :methanol (84:16), dynamic modifier-isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 2 ml, analyte concentration 3 g/l

безаварийной работы комплекса Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США) увеличилось с 0,5 до 595 часов.

Проведена серия экспериментов препаративного хирального разделения салбутамола основания с разным составом ПФ. Найдены условия, позволяющие получить высокую селективность и оптическую чистоту целевых продуктов, причем без использования добавок к соразтворителю – метанолу в виде ГФИП и динамических модификаторов, типа диэтил- или триэтиламина, которые использовали в аналитическом и полупрепаративном способах. Полагаем, что это результат высокой растворимости салбутамола основания в метаноле. Условия препаративного хирального разделения субстанции салбутамола основания защищены патентом RU 2 727 890 C1, патентодержатель – ЗАО (теперь ОАО) «Алтайвитамины» [20].

Достигнута полная воспроизводимость результатов (рисунок 4) одиночных вколов, сделанных с разницей 7 часов между ними.

Как следует из полученных результатов (рисунок 4), в течение рабочей смены сохраняется стабильность и качество хирального разделения, что отражается в постоянстве времен удерживания изомеров и коэффициентов селективности.

Результаты серийного хирального хроматографического разделения салбутамола основания в режиме производственного цикла представлены на рисунке 5.

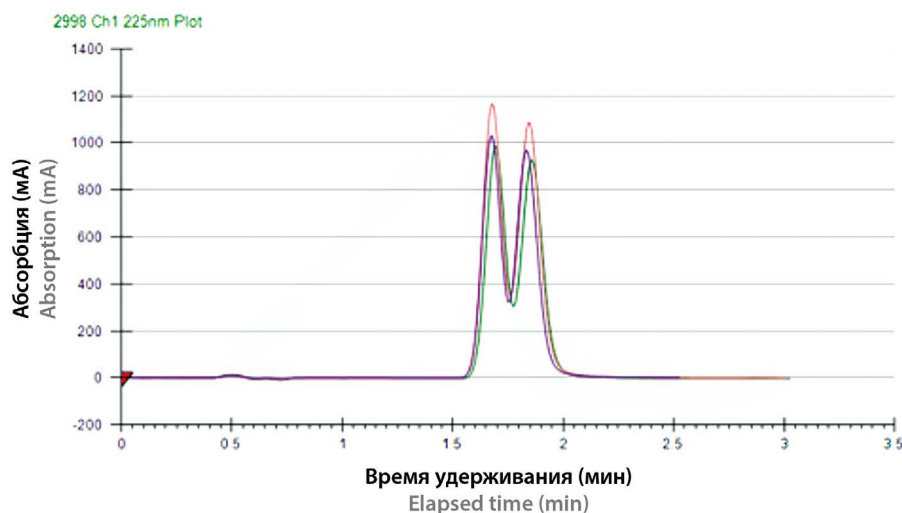
Содержание R-изомера салбутамола основания в целевом продукте контролировали, используя аналитический режим сверхкритического хроматографа

Investigator SCF (Waters Corporation, США). Полученные результаты представлены на рисунке 6. Как следует из представленного рисунка, хроматограмма целевого продукта имеет один выраженный пик, время удерживания которого совпадает с временем удерживания, характерным для R-изомера салбутамола основания, определенным ранее в аналитическом режиме в аналогичных условиях на сверхкритическом хроматографе Investigator SCF (Waters Corporation, США) при анализе рацемической смеси салбутамола основания. Количественное содержание R-изомера салбутамола основания в целевом продукте определяли по площади пика.

Чистота пяти последовательно полученных, в течение рабочей недели, энантиомерных фракций салбутамола основания в предложенных условиях составила более 98 % (таблица 2).

Остаточное количество рацемической смеси энантиомеров в сбросе подвижной фазы рисунок 7, определяемое в аналитическом режиме на СКФ хроматографе Investigator SCF находится на уровне следовых количеств

В ходе проведенного эксперимента оптимальными для препаративного хирального способа разделения салбутамола основания методом сверхкритической флюидной хроматографии на СКФ хроматографе Prep 200 qSFC, следует считать: состав ПФ сверхкритический CO_2 :метанол (84:16), динамический модификатор-отсутствует, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкола 0,86 мл, концентрация аналита 85 г/л.



№	Маркер Marker	Время/дата Time/Date
1	■	08:00/09.10.20
2	■	15:00/09.10.20
3	■	22:00/09.10.20

Рисунок 4. Хроматограммы энантимеров сальбутамола основания, полученные с временным интервалом 7 часов на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF, демонстрирующие воспроизводимость процесса хирального разделения сальбутамола основания

Figure 4. Chromatograms of enantiomers of salbutamol base obtained with a time interval of 7 hours on a Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex, demonstrating the reproducibility of the chiral separation of salbutamol base

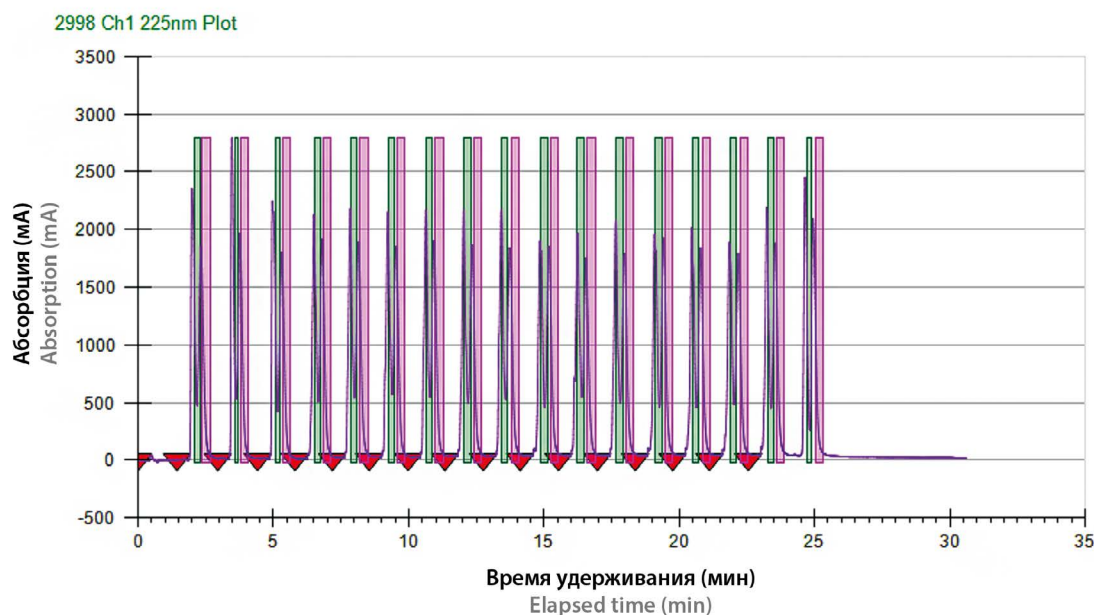


Рисунок 5. Хроматограмма серийного разделения энантимеров сальбутамола основания в условиях: ПФ-сверхкритический CO_2 :метанол (84:16), динамический модификатор-отсутствует, давление 120 бар, скорость потока 200 г/мин, объем вкола 0,86 мл, концентрация аналита 80 г/л, на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF

Figure 5. Chromatogram of serial separation of enantiomers of salbutamol base under the conditions: PF-supercritical CO_2 :methanol (84:16), no dynamic modifier, pressure 120 bar, flow rate 200 g/min, injection volume 0.86 ml, analyte concentration 80 g/l, on the Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex

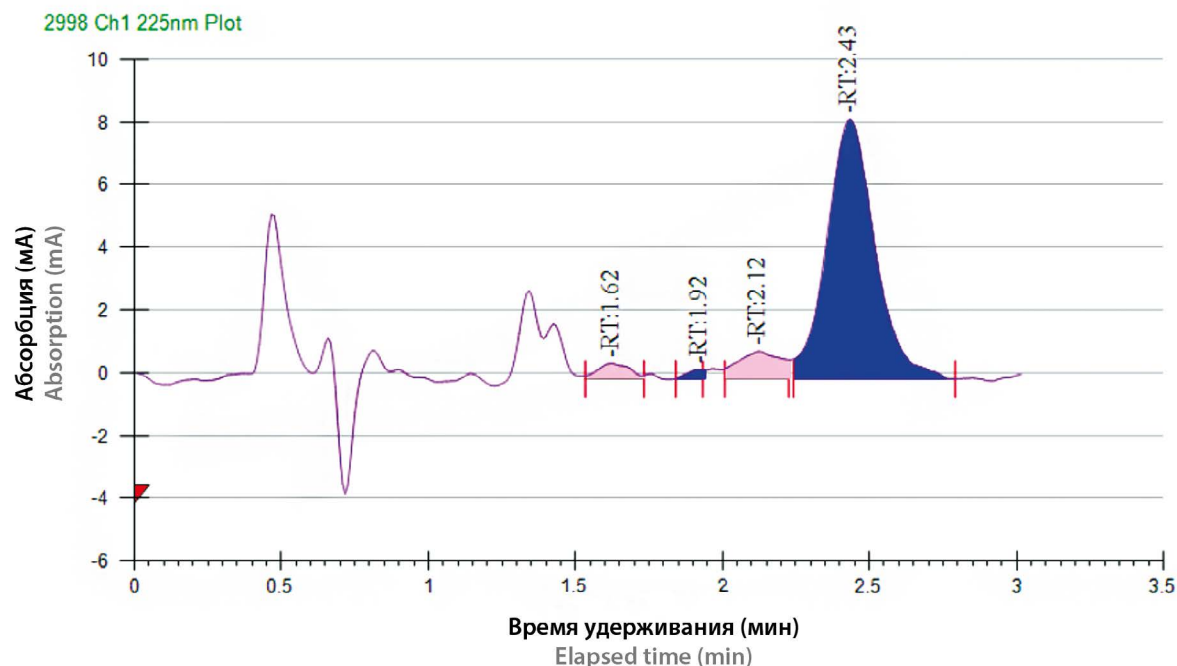


Рисунок 6. Хроматограмма целевого продукта R-изомера сальбутамола основания, полученная в аналитическом режиме: ПФ-сверхкритический CO_2 :метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 5 мл/мин, объем вкола 10 мкл, концентрация аналита 0,01 г/л на сверхкритическом хроматографе Investigator SCF

Figure 6. Chromatogram of the target product of the R-isomer of salbutamol base, obtained in the analytical mode: PF-supercritical CO_2 :methanol (84:16), dynamic modifier isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 5 ml/min, injection volume 10 μl , analyte concentration 0.01 g/l supercritical chromatograph Investigator SCF



Рисунок 7. Остаточное количество смеси энантимеров в сбросе подвижной фазы исследованное в аналитическом режиме в условиях: ПФ-сверхкритический CO_2 :метанол (84:16), динамический модификатор-изопропиламин 1,0 об. %, давление 120 бар, скорость потока 5 мл/мин, объем вкола 10 мкл, на СКФ хроматографе investigator SCF

Figure 7. Residual mixture of enantiomers in the discharge of the mobile phase studied in the analytical mode under the conditions: PF-supercritical CO_2 :methanol (84:16), dynamic modifier isopropylamine 1.0 vol. %, pressure 120 bar, flow rate 5 ml/min, injection volume 10 μl , on investigator SCF chromatograph

Таблица 2. Содержание R-изомера салбутамола основания в целевом продукте различных партий после энантиомерного разделения рацемической смеси на препаративном хроматографическом комплексе Prep 200 qSCF

Table 2. The content of the R-isomer of salbutamol base in the target product of various batches after enantiomeric separation of the racemic mixture on the Prep 200 qSCF preparative chromatographic complex

Дата наработки партии Batch run date	Содержание R-изомера, % Content of R-isomer, %	Среднее The average	Стандартное отклонение Standard deviation
10.10.20	97,87	98,08	± 0,38
11.10.20	98,56		
12.10.20	97,98		
13.10.20	98,04		
14.10.20	97,95		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе масштабирования способа хирального разделения рацемической смеси салбутамола сульфата на отдельные изомеры установлено, что происходит разделение соли на основную и кислотную части, что не позволяет получить целевой продукт с высокими выходом, оптической чистотой и производительностью. В связи с этим, для препаративных хиральных разделений предложено использовать субстанцию салбутамола основания в виде рацемической смеси.

Подобраны условия препаративного сверхкритического флюидного хроматографического хирального разделения фармсубстанции салбутамол основание на промышленном сверхкритическом флюидном хроматографе Prep 200 qSFC (Waters Corporation, США).

Достигнуты достаточные для производственного процесса выход целевого продукта (R-изомер салбутамола основания), составляющий не менее 5 г в рабочую смену (8 часов) и энантиомерная чистота целевого продукта не менее 97 %.

ЛИТЕРАТУРА

- Penn R. B., Frielle T., McCullough J. R., Aberg G., Benovic J. L. Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human β_1 and β_2 -adrenergic receptors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1996;14(1):37–45. DOI: 10.1007/BF02772201.
- Milgrom H. Levosalbutamol in the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006;7(12):1659–1668. DOI: 10.1517/14656566.7.12.1659.
- Patel M., Thomson N. C. (R)-salbutamol in the treatment of asthma and chronic obstructive airways disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(7):1133–1141. DOI: 10.1517/14656566.2011.571210.
- Василенко И. А., Лебедева М. В., Листров В. А. Оптические изомеры в фармацевтике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):92–104.
- Gensh K. V., Gensh T. S., Bazarnova N. G. Chiral supercritical fluid chromatography of 1,2-aminoalcohols (review). *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019;13(7):1095–1102. DOI: 10.1134/S1990793119070066.
- Микушина И. В., Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Генш К. В., Чепрасова М. Ю., Сысоева А. В., Паренего О. О. Условия аналитического хирального разделения 1-(4-гидрокси-3-(гидроксиметил)фенил)-2-((6-(1-метил-3-фенилпропокси)гексил)амино)этанол. Тезисы докладов X Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации». 30 сентября – 06 октября 2019. Ростов-на-Дону: Дон; 2019. С. 135–137.
- Микушина И. В., Базарнова Н. Г., Паренего О. О., Генш К. В., Чепрасова М. Ю. К вопросу об изучении сорбции при хиральном разделении энантиомеров салбутамола и салметерола методом сверхкритической флюидной хроматографии. *Журнал СВХ. Химия*. 2019;12(3):310–318. DOI: 10.17516/1998-2836-0128.
- Покровский О. И., Паренего О. О., Лунин В. В. Способ селективного разделения рацемической смеси салбутамола. Патент РФ на изобретение RU 2667002 C1. 13.09.2018. Доступно по: <https://patent.ru/patent/RU2667002C1>. Ссылка активна на 24.07.2020.
- Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Sysoev A. V., Kushnir E. Yu., Gensh K. V. The Development of a Method for the Preparative Separation of Salbutamol Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020;14(7):1142–1147. DOI: 10.1134/S1990793120070143.
- Roy D., Armstrong D. W. Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles. *Journal of Chromatography A*. 2019;1605:360339. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.06.060.
- Костенко М. О., Покровский О. И., Паренего О. О., Лунин В. В. Влияние типа и концентрации добавок подвижной фазы на разделение энантиомеров сульфата салбутамола в сверхкритической жидкостной хроматографии. *Вестник Отделения химических наук Академии наук*. 2018;67(11):1997–2002. DOI: 10.1007/s11172-018-2320-3.
- Wu S. G., Lin A. Y., Hsieh H. Y., Tsui H. W. Elucidation of adsorption mechanisms of solvent molecules with distinct functional groups on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2016;1460:123–134. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.024.
- Berthod A. Chiral recombination in separation methods: mechanisms and applications. Heidelberg: Springer; 2010. 337 p.
- Cardoso P. A., César I. C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases. *Chromatographia*. 2018;81(6):841–850. DOI: 10.1007/s10337-018-3526-0.
- Halabi A., Ferrayoli C., Palacio M., Dabbene V., Palacios S. Validation of a chiral HPLC assay for (R)-salbutamol sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(1):45–51. DOI: 10.1016/j.japna.2003.08.020.
- Rosales-Conrado N., Dell'Aica M., de León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Determination of salbutamol by direct chiral reversed-phase HPLC using teicoplanin as stationary phase and its application to natural water analysis. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(11):1413–1422. DOI: 10.1002/bmc.2937.
- Gazić I., Bosak A., Šinko G., Vinković V., Kovarik Z. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(8):1513–1519. DOI: 10.1007/s00216-006-0566-3.
- Kostenko M. O., Ustinovich K. B., Pokrovskiy O. I., Bazarnova N. G., Lunin V. V. Effect of the Mobile Phase Composition on Selectivity in Supercritical Fluid Chromatography in the Separation of Salbutamol Enantiomers. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2018;12(7):1166–1175. DOI: 10.1134/S1990793118070059.
- Ali H. S., York P., Blagden N., Khoubnasabjafari M., Acree Jr. W. E., Jouyban A. Solubility of salbutamol and salbutamol sulphate in ethanol + water mixtures at 25 °C. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;173:62–65. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.05.021.

20. Сысоев А. В., Царев В. Н., Базарнова Н. Г., Кушнир Е. Ю., Генъш К. В., Чепрасова М. Ю., Микушина И. В., Сысоева А. В. Способ препаративного разделения рацемического салбутамола основания с применением сверхкритической флюидной хроматографии. Патент РФ на изобретение RU 2727890 C1. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2348455C2>. Ссылка активна на 24.07.2020.

REFERENCES

- Penn R. B., Frielle T., McCullough J. R., Aberg G., Benovic J. L. Comparison of R-, S-, and RS-albuterol interaction with human β_1 and β_2 -adrenergic receptors. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1996;14(1):37–45. DOI: 10.1007/BF02772201.
- Milgrom H. Levosalbutamol in the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006;7(12):1659–1668. DOI: 10.1517/14656566.7.12.1659.
- Patel M., Thomson N. C. (R)-salbutamol in the treatment of asthma and chronic obstructive airways disease. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2011;12(7):1133–1141. DOI: 10.1517/14656566.2011.571210.
- Vasilenko I. A., Lebedeva M. V., Listrov V. A. Optical isomers in pharmaceuticals. *Drug development & registration*. 2015;1(10):92–104. (In Russ.)
- Gensh K. V., Gensh T. S., Bazarnova N. G. Chiral supercritical fluid chromatography of 1,2-aminoalcohols (review). *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019;13(7):1095–1102. DOI: 10.1134/S1990793119070066.
- Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Parenago O. O. Conditions for analytical chiral separation of 1-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)phenyl)-2-((6-(1-methyl-3-phenylpropoxy)hexyl)amino)ethanol. Abstracts of the X Scientific-practical conference with international participation "Supercritical fluids: fundamentals, technologies, innovations". September 30 – October 06, 2019. Rostov-on-Don: Don; 2019. P. 135–137. (In Russ.)
- Mikushina I. V., Bazarnova N. G., Parenago O. O., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu. On the study of sorption during the chiral separation of enantiomers of salbutamol and salmeterol by supercritical fluid chromatography. *Zhurnal SFU. Himiya*. 2019;12(3):310–318. (In Russ.) DOI: 10.17516/1998-2836-0128.
- Pokrovsky O. I., Parenago O. O., Lunin V. V. A method for the selective separation of a racemic mixture of salbutamol. Patent RUS № 2667002 C1. 13.09.2018. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2667002C1>. Accessed: 24.07.2020. (In Russ.)
- Mikushina I. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Cheprasova M. Yu., Sysoeva A. V., Sysoev A. V., Kushnir E. Yu., Gensh K. V. The Development of a Method for the Preparative Separation of Salbutamol Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020;14(7):1142–1147. DOI: 10.1134/S1990793120070143.
- Roy D., Armstrong D. W. Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles. *Journal of Chromatography A*. 2019;1605:360339. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.06.060.
- Kostenko M. O., Pokrovsky O. I., Parenago O. O., Lunin V. V. Effect of the type and concentration of mobile phase additives on the separation of salbutamol sulfate enantiomers in supercritical fluid chromatography. *Vestnik Otdeleniya himicheskikh nauk Akademii nauk*. 2018;67(11):1997–2002. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11172-018-2320-3.
- Wu S. G., Lin A. Y., Hsieh H. Y., Tsui H. W. Elucidation of adsorption mechanisms of solvent molecules with distinct functional groups on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2016;1460:123–134. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.024.
- Berthod A. Chiral recognition in separation methods: mechanisms and applications. Heidelberg: Springer; 2010. 337 p.
- Cardoso P. A., César I. C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases. *Chromatographia*. 2018;81(6):841–850. DOI: 10.1007/s10337-018-3526-0.
- Halabi A., Ferrayoli C., Palacio M., Dabbene V., Palacios S. Validation of a chiral HPLC assay for (R)-salbutamol sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(1):45–51. DOI: 10.1016/j.jpna.2003.08.020.
- Rosales-Conrado N., Dell'Aica M., de León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Determination of salbutamol by direct chiral reversed-phase HPLC using teicoplanin as stationary phase and its application to natural water analysis. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(11):1413–1422. DOI: 10.1002/bmc.2937.
- Gazić I., Bosak A., Šinko G., Vinković V., Kovarik Z. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2006;385(8):1513–1519. DOI: 10.1007/s00216-006-0566-3.
- Kostenko M. O., Ustinovich K. B., Pokrovskiy O. I., Bazarnova N. G., Lunin V. V. Effect of the Mobile Phase Composition on Selectivity in Supercritical Fluid Chromatography in the Separation of Salbutamol Enantiomers. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2018;12(7):1166–1175. DOI: 10.1134/S1990793118070059.
- Ali H. S., York P., Blagden N., Khoubnasabjafari M., Acree Jr. W. E., Jouyban A. Solubility of salbutamol and salbutamol sulphate in ethanol + water mixtures at 25 °C. *Journal of Molecular Liquids*. 2012;173:62–65. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.05.021.
- Sysoev A. V., Tsarev V. N., Bazarnova N. G., Kushnir E. Yu., Gensh K. V., Cheprasova M. Yu., Mikushina I. V., Sysoeva A. V. Method of preparative separation racemic salbutamol base using supercritical fluid chromatography. Patent RUS № 2727890 C1. 03.10.2009. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2348455C2>. Accessed: 24.07.2020. (In Russ.)