

高效液相色谱法在极性有机溶剂模式和反相模式下拆分外消旋阿苯达唑亚砷对映体

翟宗德, 师彦平*

(中国科学院兰州化学物理研究所甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 73000)

摘要: 建立了在极性有机溶剂模式和反相模式下, 在直链淀粉-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(ADMPC)手性固定相上手性拆分广谱驱虫药物阿苯达唑亚砷外消旋体(Albendazole Sulfoxide, ABZSO)的高效液相色谱法(HPLC)。二元和三元流动相由甲醇、乙腈和水组成。通过优化流动相组分的浓度, 阿苯达唑亚砷外消旋体在两种模式下都达到了基线拆分。另外比较了阿苯达唑亚砷单一对映体在使用各种流动相时的洗脱顺序, 结果未发现单一对映体洗脱顺序的改变。

关键词: 手性拆分; 色谱模式; 洗脱顺序; 阿苯达唑亚砷; 直链淀粉-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)

使用直链淀粉-三(3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(ADMPC)手性固定相的高效液相色谱法已经被证明是非常有效的拆分手性化合物的方法[1,2]。自从这种固定相发明以来, 它主要用于正相模式中。但是最近这几年来, 这种固定相在反相和极性有机溶剂模式下的应用也有一些成功的例子。而且, 商品化的在反相模式下使用的 ADMPC-CSP (Chiralpack AD-RH)也已经开发出来。然而, 目前 ADMPC-CSP 的应用还是主要在正相模式中, 对于在反相模式下的应用文献报道很少[3-5]。

阿苯达唑(Albendazole, ABZ)是一种属于苯并咪唑类的广谱驱虫药物, 已被证实在治疗各种常见的神经系统寄生虫病时非常有效。另外阿苯达唑在治疗其它常见的寄生虫病如包虫病、绕虫病、线虫病(蛔虫、鞭虫、类圆线虫)、囊虫病等亦十分有效。阿苯达唑进入人体后通过肝脏微粒酶的作用大量代谢为它的主要活性代谢产物阿苯达唑亚砷(Albendazole Sulfoxide, ABZSO), 这种代谢产物进一步代谢为阿苯达唑砷(Albendazole Sulfone, ABZSO₂) (见图 1)。ABZ 的杀虫活性主要来源于 ABZSO, 而 ABZSO₂ 不具有任何杀虫活性^[6,7]。ABZ 是一种前手性药物, 而其经过代谢产生的活性代谢产物 ABZSO 是一种由 (+) ABZSO 和 (-) ABZSO 组成的外消旋对映体 (S 原子为手性原子)^[8,9]。

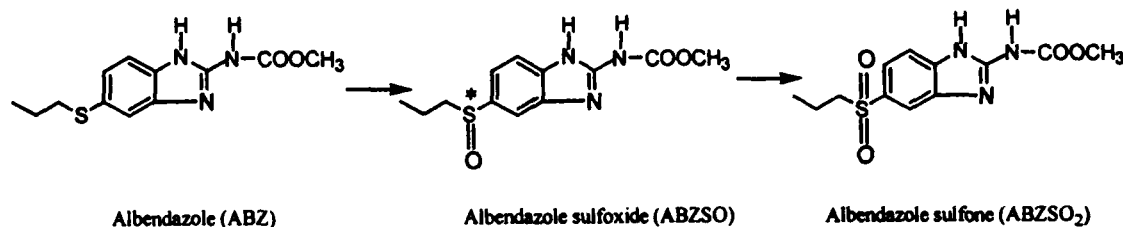


图 1 阿苯达唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷的化学结构及阿苯达唑的代谢示意图

虽然动物体内和人体内的阿苯达唑亚砷立体选择药物动力学的机理已有所研究, 但其单一对映体在药理、副作用、疗效方面是否存在显著差别到目前为止在医学上仍不清楚^[8-11]。对于 ABZSO 的拆分亦有所报道^[8,9], 但研究都是在正相模式下进行的, 目前未见在反相和极性有机溶剂模式下在

*通讯联系人 e-mail: shiyp@lzb.ac.cn

ADMPC 手性固定相上拆分 ABZSO 的报道。

本实验中我们使用了高效液相色谱的方法,用自制的直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(ADMPC)手性固定相,在反相和极性有机溶剂模式下对阿苯达唑亚砜外消旋对映体进行了直接拆分。选用甲醇、乙腈和水组成二元或三元流动相体系对 ABZSO 样品进行拆分,筛选出了比较合适的流动相体系,并优化了流动相中各组分的比例,拆分结果令人满意。

1 实验部分

1.1 试剂

球形硅胶系本实验室合成,粒径 5-6 μm ,比表面积 110 m^2/g ,平均孔径 13nm; γ -氨丙基三乙氧基硅烷(TM-550)(武汉天目科技发展有限公司);直链淀粉(FLUKA);3,5-二甲基苯基异氰酸酯(ACROS);阿苯达唑亚砜外消旋体(浙江万马集团);其余试剂均为分析纯,购自天津化学试剂二厂。

1.2 仪器与色谱条件

液相色谱系统由 515 HPLC 泵(Waters, 美国);2487 型紫外可见波长检测器(Waters, 美国);Waters Millennium32 色谱数据处理器(waters, 美国);7725i 手动进样阀(10 μL)(Waters, 美国)组成。红外光谱用 Bruker FT-IR 光谱仪测定;紫外光谱用光谱仪测定;元素分析在 Vaivo Element 元素分析仪上进行。

色谱柱为 250mm \times 4.6mm.i.d.,匀浆法在 3.7 $\times 10^7$ Pa 压力下填充。柱温:室温;紫外检测器检测波长:219nm,流动相流速:1.0 mL/min。

1.3 手性柱的制备

γ -氨丙基硅胶(APS)的合成参照文献[12]的方法,直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(ADMPC)的合成参照[13]的方法,将 0.45 g ADMPC 溶于 30ml 四氢呋喃中,将该溶液 10mL 加入 APS 中,蒸发除去溶剂,此过程重复 3 次,最终得到涂敷量为 15%的固定相。

1.4 色谱计算

柱死体积(t_0)用 1,3,5-三叔丁基苯测定,分离因子(α)按 $\alpha = k_2'/k_1'$,容量因子(k')按 $k_1' = (t_1 - t_0)/t_0$, $k_2' = (t_2 - t_0)/t_0$ 计算,分离度 $R_s = 1.18(t_2 - t_1) / [W_{(1/2)1} + W_{(1/2)2}]$, $W_{(1/2)1}$ 和 $W_{(1/2)2}$ 分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰之半峰宽。

2 结果与讨论

2.1 阿苯达唑亚砜外消旋体在极性有机溶剂模式下的拆分

表 1 极性有机溶剂模式下对阿苯达唑亚砜(ABZSO)的拆分结果

流动相	体积比	k_2'	α	R_s
甲醇	100%	2.38	2.03	1.46
乙醇	100%	2.42	2.08	1.22
乙腈	100%	25.8	1	-
甲醇/乙腈	5/5	1.69	2.25	1.74

实验选用了甲醇、乙醇、乙腈或它们的混合物作为流动相拆分结果见表 1。结果表明,纯乙醇作为流动相拆分 ABZSO 的效果不如纯甲醇好。而纯的乙腈作为流动相,样品的保留时间非常长,达到了 67min,而且不能实现 ABZSO 外消旋体的拆分。使用 3 个 C 以上的长链醇,如纯的异丙醇、正丁醇等作为流动相,一方面柱压很大,对手性柱的寿命影响很大;另一方面,拆分效果也很差。从表 1 还可以看出,使用 5:5 的甲醇和乙腈作为流动相拆分 ABZSO 的效果较最好。

为了实现更好的拆分效果，我们对甲醇和乙腈的比例进行了优化，结果见图2。由图2，随着流动相中强极性溶剂甲醇的比例升高，弱强极性溶剂乙腈的比例降低，ABZSO的保留因子随之减小，分离度也随之减小。极性有机溶剂模式正相色谱条件下，不同的有机溶剂作为流动相，一般认为流动相的极性越大，则流动相中有机溶剂与对映体竞争能力越强，对映体与固定相之间的相互作用就会越弱，所以 k' 就会越小。当甲醇和乙腈的比例达到1:9时，分离度达到最大($R_s=2.96$)，但对映体洗脱时间较长($k_2'=9.77$)，两个单一对映体的保留时间分别为：13.1和26.9min。综合考虑分离度和保留时间，甲醇和乙腈的比例为3:7时，拆分效果最好，分离因子达到最大值($\alpha=2.40$)，分离度为2.45，两个对映体的保留时间分别为：5.49和9.64 min。

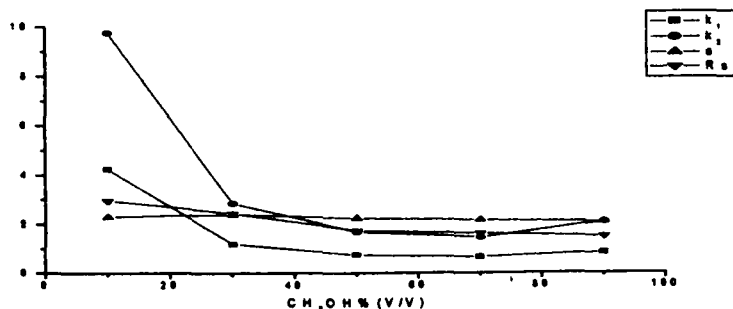


图2 极性模式下甲醇的含量对拆分的影响 (流动相: 甲醇/乙腈)

2.2 阿苯达唑亚砷外消旋体在反相模式下的拆分

实验中首先尝试了甲醇和水组成的二元流动相体系，结果见图3(1)。由图中可以看出，当水的体积比由5-20%之间变化时，虽然对ABZSO的拆分可以取得比较大的分离因子，但是由于色谱峰的严重展宽(柱效降低)，分离度却很小，达不到基线分离。随着水含量的增加，样品的保留因子随之增加，分离因子略有增加，但由于色谱峰的展宽，分离度却随之减小。导致色谱峰展宽的原因可能是由于水与硅胶表面残余硅羟基的强的氢键作用，使样品在硅胶表面产生了强的吸附，不能快速的洗脱下来，从而导致柱效严重降低，色谱峰展宽。

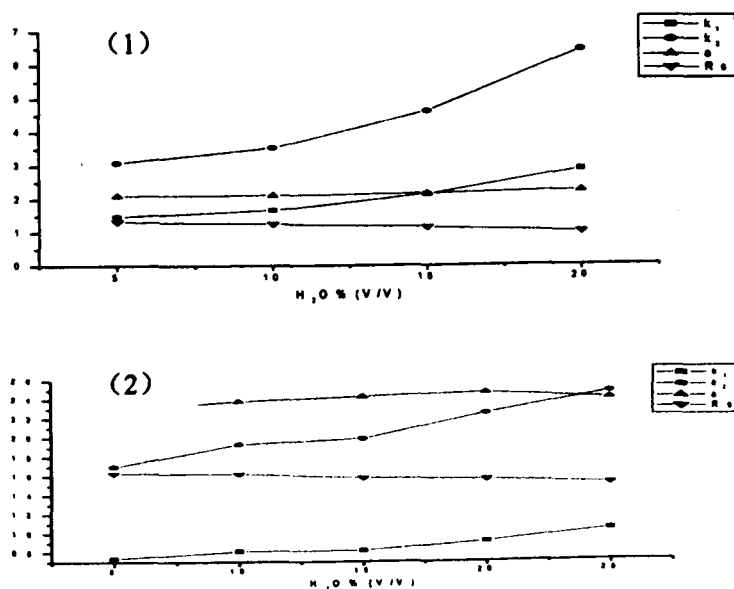


图3 反相模式下H₂O的含量对拆分的影响

流动相: (1) 甲醇/水, (2) 甲醇/乙腈/水, 其中甲醇与乙腈的体积比固定为3/7。

考虑到极性有机溶剂模式下,流动相中甲醇和乙腈的比例为3:7时,对ABZSO取得了比较好的拆分结果。于是,在反相体系下,固定甲醇和乙腈的比例为3:7不变,添加了不同比例的水作为流动相,实验结果见图3(2)。由图可以看出,水的体积比由5-25%之间变化时,均可实现对ABZSO的基线分离,且分离因子(α)在2.30以上,但与甲醇和水组成的二元流动相体系类似,随着水含量的增加,样品的保留因子随之增加,分离因子略有增加,分离度却随之减小。图4给出了两种模式下ABZSO外消旋对映体的手性拆分数谱图。

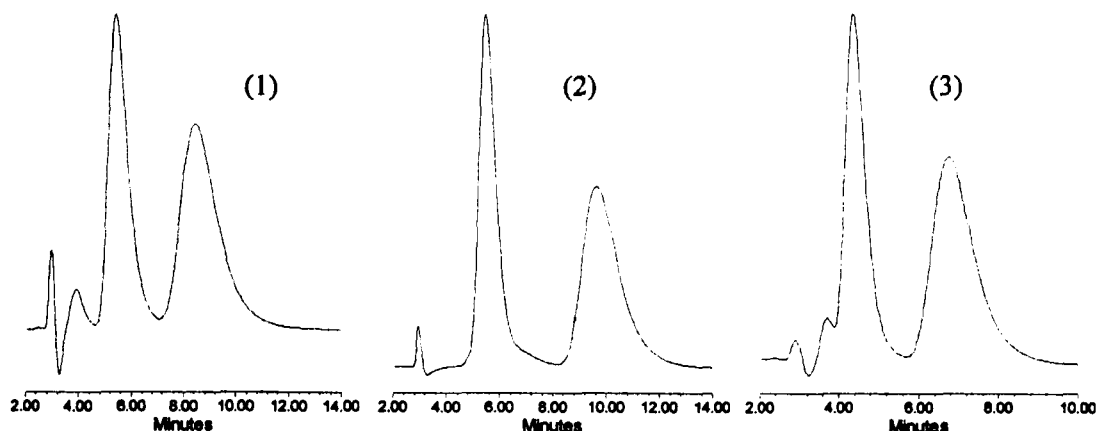


图4 两种流动相模式下阿苯达唑亚砒(ABZSO)的拆分数谱图

(1) 100%甲醇 (2) 甲醇/乙腈 3/7 (3) 甲醇/乙腈/水=28.5/66.5/5

2.3 在各个分离模式下阿苯达唑亚砒单一对映体洗脱顺序的比较

单一对映体的洗脱顺序的研究是手性分离科学领域研究的热点之一,单一对映体洗脱顺序的反转现象,虽然比较少,但也时常在研究HPLC的手性识别时观察到。研究单一对映体洗脱顺序的反转现象有非常大的意义,意义之一是在测定单一对映体的纯度时,如果少量不纯对映体能够先于主成分对映体洗脱出色谱柱,将使测定结果十分准确。反之,则可能得不到可靠的测定数据。实验中比较了正相、反相、极性有机溶剂模式下,不同流动相组成时,ABZSO单一对映体的洗脱顺序(测定需要的ABZSO单一对映体按照文献[14]获得),但是未发现洗脱顺序改变的情况。

3 结论

实验成功地实现了在极性有机溶剂模式和反相模式下,使用高效液相色谱法在直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相上对阿苯达唑亚砒外消旋体的手性拆分。通过优化流动相组分的浓度,阿苯达唑亚砒外消旋体在两种模式下都达到了基线拆分。随着ADMPC-CSPs等多糖类手性固定相在极性有机溶剂模式和反相模式下的广泛应用,将大大扩展了多糖类手性固定相的使用范围,从而进一步推动手性分离科学的进展。

参考文献

- [1] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1020.
- [2] Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 403.
- [3] P.S. Bonato, M. P. Lama, R. Carvalho, *J. Chromatogr. B*, 796 (2003) 413-420
- [4] X. Teng, S. Wang, N.M. Davies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33 (2003) 95-100
- [5] H. Kanazawa, A. Okada, M. Higaki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2003) 1817-1824

- [6] Bonato, P. S., Lanchote, V. L., Takayanagui, O. M., *J. Chromatogr. B*, 783 (2003) 273-275
- [7] Goldsmith, R. S., in: Katung, B.G (Ed), *Basic. Clin. Pharm.*, Appleton & lange, Norwalk, CT 1995, pp.804-807.
- [8] Lanchote, V. L., Maria P. S., Takayanagui, O. M., *J.Chromatogr. B*, 709 (1998) 273-279.
- [9] Paias, F.O., Lanchote, V. L., Takayanagui, O. M., Bonato, P. S., *Chirality* 9 (1997) 722-726.
- [10] Delatour, P., Benoit, E, Besse, S., Boukraa, A., *Xenobiotica* 21:217-221,1991
- [11] Kitzman, D., Cheng, K. J., Fleckenstein, L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30(2002)801-813
- [12] Huisden, R. E., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr.*, 1990,508(2):289-299.
- [13] Okamoto, Y., Kawashima M, Hatada K., *J. Chromatogr.*, 1986,363 (2):173-186.
- [14] Z. Zhai, H. Zhang, Y. Shi, *Chinese J. Anal. Chem.*, 2005, 33(1):109-113.