2008 年 9 月 色 谱 Vol. 26 No. 5
September 2008 *Chinese Journal of Chromatography* 643 ~ 645

直链淀粉手性固定相法分离利阿唑对映体

陈玉青， 马 郑， 安 芳， 郭兴杰
（沈阳药科大学药学院，辽宁 沈阳 110016）

摘要：建立了利阿唑对映体的高效液相色谱拆分方法。采用 Chiralpak AD-H 手性柱在正相条件下直接拆分利阿唑对映体，考察了流动相中有机极性调节剂的种类和浓度、酸碱的种类和含量、柱温及流速等对利阿唑对映体分离的影响。确定了最佳的拆分条件：流动相为正己烷-乙醇（含 0.3% 二乙胺和 0.1% 冰醋酸）（体积比为 80∶20），流速 0.6 mL/min；检测波长 254 nm；柱温 20 ℃。在此条件下利阿唑对映体的分离度为 3.4。该法简单快速，重现性好。

关键词：高效液相色谱法；直链淀粉手性固定相；对映体拆分；利阿唑
中图分类号：O658 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-8713(2008)05-0643-03 **栏目类别**：技术与应用

Enantiomeric separation of liarozole on amylose chiral stationary phase

CHEN Yuqing, MA Zheng, AN Fang, GUO Xingjie
(*Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was established for the enantiomeric separation of liarozole. Baseline chiral separation of liarozole was achieved under normal-phase chromatographic mode by the Chiralpak AD-H chiral stationary phase. The influences of the concentration and kind of organic solvent, the proportion of acid and base, column temperature and flow rate on the enantiomeric separation were studied. The optimized chromatographic conditions were hexane-ethanol (containing 0.3% diethylamine and 0.1% glacial acetic acid) (80∶20, v/v) as the mobile phase with a flow rate of 0.6 mL/min and detection at the wavelength of 254 nm. The column temperature was set at 20 ℃. The resolution of 3.4 for liarozole was achieved under the above chromatographic conditions. The method is simple, rapid and with good reproducibility.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); amylose chiral stationary phase; enantiomeric separation; liarozole

利阿唑(liarozole)是维甲酸代谢阻断剂，结构上属于咪唑类衍生物[1]，临床用于治疗前列腺癌、乳腺癌和慢性斑块型银屑病[2]等疾病。它在体外对肿瘤细胞毒性很小，在体内却有较强的抗肿瘤活性，是维甲酸代谢阻断剂中研究最深入且唯一经过临床研究的咪唑类化合物[3,4]。利阿唑分子中含有一个手性中心(如图 1)，据文献报道其右旋体可用于治疗由于正常细胞的异常分化或增殖引起的特征性疾病，而左旋体几乎没有活性[5]，因此利阿唑的手性拆分对安全用药、质量监控及新药研发有重要意义，但是还未见有文献报道拆分此化合物的方法。本文采用Chiralpak AD-H手性固定相高效液相色谱法拆分利阿唑对映体。

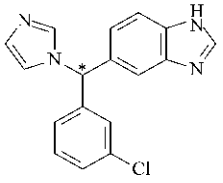

图 1 利阿唑的分子结构图

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-10A 型高效液相色谱仪、SPD-10A 型紫外

收稿日期：2008-03-23
第一作者：陈玉青，硕士研究生. E-mail：chenyuqing329@126.com.
通讯联系人：郭兴杰，教授，博士生导师，主要从事药物分析研究. Tel：(024)23986285，E-mail：gxjhyz@yahoo.com.cn.

可见检测器(日本岛津公司);Anastar 色谱工作站。

利阿唑(消旋体,纯度为 99.5%),沈阳药科大学药化实验室提供。正己烷、异丙醇、甲醇、无水乙醇均为色谱纯,天津市康科德科技有限公司产品;其他试剂均为分析纯。水为二次重蒸水。

1.2 利阿唑供试品溶液的配制

精密称取利阿唑适量,用甲醇溶解并配制成质量浓度为 1.00 g/L 的贮备液,于 4 ℃条件下保存。使用时用流动相稀释配制成质量浓度为 25.0 mg/L 的溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜。

1.3 色谱条件

色谱柱:Chiralpak AD-H 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),日本 Daicel Chemical Industries, Ltd. 产品;流动相:正己烷-乙醇(含 0.3% 二乙胺和 0.1% 冰醋酸)(体积比为 80∶20),流速 0.6 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:20 ℃;进样量:20 μL。

2 结果与讨论

2.1 流动相体系的选择

2.1.1 极性调节剂的种类及含量

直链淀粉是 D-葡萄糖以 α-1,4-糖苷键相连而形成的线型聚合物。Chiralpak AD-H 手性柱是将直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)涂布在硅胶载体上制成的[6]。氨基甲酸酯基围绕主链形成许多沟槽,对映体进入沟槽中,主要通过吸引和包合作用实现对映异构体的拆分。该手性柱可拆分的药物范围广泛,其对药物手性拆分的程度和两个对映体与固定相之间通过 π-π 作用、氢键作用以及偶极-偶极作用所形成的瞬间非对映体配合物的稳定性有差异相关[7-9]。

流动相中的极性调节剂不仅可与对映体分子竞争固定相上的手性作用点,与固定相上的氨基甲酸酯基形成氢键,还可以改变手性空穴的空间环境,使对映体分子与手性空穴中苯基氨基甲酸酯之间的作用发生变化,影响对映体的分离[10]。在正己烷中以甲醇或异丙醇做极性调节剂均不能拆分利阿唑对映体;而使用乙醇做调节剂时,利阿唑可以达到基线分离。这说明在乙醇的影响下,手性空穴的立体环境改变使得固定相和不同对映体之间的作用产生了差异。因为乙醇形成氢键的能力介于甲醇和异丙醇之间,因此可以推测氢键作用不是利阿唑对映体被分离的主要因素。当流动相中二乙胺的体积分数为 0.1% 时,流动相中乙醇的含量对利阿唑对映体分离产生的影响见表 1。

表 1 流动相中乙醇的含量(用体积分数表示)对利阿唑对映体分离参数的影响*

φ(乙醇)/%	t_{R1}/min	t_{R2}/min	选择性因子	分离度
15	32.7	42.0	1.34	4.3
18	20.9	26.0	1.34	3.4
20	19.8	24.6	1.33	3.2
23	16.5	20.4	1.38	3.0

* 在流动相中二乙胺的体积分数为 0.1% 的条件下.

由表1可见,随着乙醇含量的增加,利阿唑对映体的保留时间缩短,分离度略有下降,但选择性因子变化不大。这是因为乙醇含量的增大使得流动相的极性增大,因而保留时间缩短,分离度降低。为了兼顾保留时间和分离度,最后选择乙醇的体积分数为 20%。

2.1.2 酸碱液的种类及含量

利阿唑为弱碱性药物,在流动相中加入二乙胺呈弱碱性可抑制利阿唑的离子化,使之更易于和直链淀粉衍生物固定相发生作用,有利于手性分离。实验中发现,流动相中未添加二乙胺时,利阿唑的色谱峰拖尾严重且分离度低;与三乙胺对比,添加二乙胺时,峰形大大改善。本文考察了加入不同比例的二乙胺对分离的影响(见表 2):当二乙胺的体积分数由 0.1% 增加至 0.3% 时,柱效和分离度均明显增加,峰形得到改善。

表 2 流动相中二乙胺的含量对利阿唑对映体分离参数的影响

φ(二乙胺)/%	N_1	N_2	选择性因子	分离度
0	2234	2374	1.33	2.3
0.1	3753	3599	1.33	3.2
0.2	3679	3831	1.34	3.7
0.3	4068	3901	1.34	3.8

在流动相中加入冰醋酸可改善峰形,增加柱效。实验结果表明,在含有 0.3% 二乙胺的流动相中添加 0.1% 冰醋酸可以进一步抑制色谱峰的拖尾,因此最后选择的流动相为正己烷-乙醇(含 0.3% 二乙胺和 0.1% 冰醋酸)(体积比为 80∶20)。

在优化的色谱条件下,利阿唑对映体拆分的色谱图见图 2。

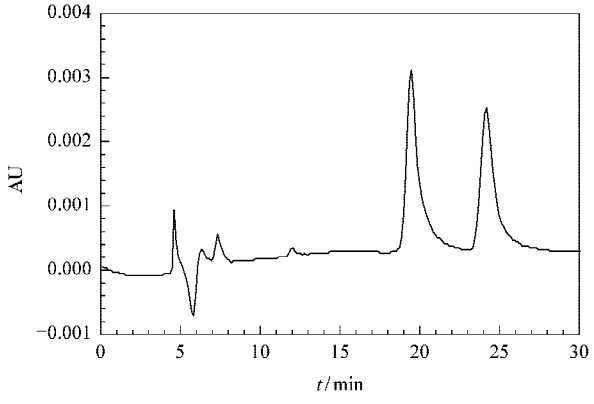

图 2 利阿唑对映体拆分的色谱图

2.2　温度对分离的影响

在上述流动相条件下,考察了柱温分别为 20,25,30 和 35 ℃时利阿唑对映体的保留因子(k)、选择性因子、分离度的变化,讨论了拆分过程的热力学参数对分离的影响。表 3 为柱温对利阿唑手性拆分效果的影响:柱温升高,对映体的保留因子和选择性因子均呈下降趋势。

表 3　柱温对利阿唑手性拆分的影响

柱温/℃	k_1	k_2	选择性因子
20	2.61	3.47	1.33
25	2.47	3.23	1.32
30	2.33	3.06	1.31
35	2.22	2.88	1.30

通常色谱参数和热力学参数有如下关系[11]:

$$\ln k = -\Delta H^0/(RT) + \Delta S^0 + \ln \Phi$$

$$\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^0)/(RT) + \Delta(\Delta S^0)/R$$

其中 ΔH^0 和 ΔS^0 分别代表该异构体在固定相与流动相间分配的摩尔焓变和熵变,Gibbs-Helmholz 参数 $\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 分别代表后出峰的异构体与先出峰的异构体在二相间分配的焓变及熵变之差。如果在某一温度范围内,$\ln k$ 或 $\ln \alpha$ 对 $1/T$ 做图(van 't Hoff 图)为一直线,则根据直线的斜率和截距可求出手性拆分过程对应的热力学参数。若线性关系良好,说明这些热力学参数在实验温度范围内为定值,固定相构型未发生明显变化,保留机制及对映选择作用不变[12]。在实验温度范围内,利阿唑在该手性固定相上的拆分对应的 van 't Hoff 图线性关系良好($r^2 > 0.99$),$\Delta(\Delta H^0)$ 和 $\Delta(\Delta S^0)$ 都为负值,说明利阿唑的拆分为焓驱动过程,即柱温越低分离效果越好,因此 20 ℃为最佳柱温。

2.3　重现性

在优化的色谱条件下,连续进样供试品溶液6次,利阿唑对映体出峰时间的相对标准偏差(RSD)分别为 0.19% 和 0.41%,峰面积的 RSD 分别为 1.1% 和 1.5%。实验表明,该方法简单、快速、重现性好,可用于利阿唑对映体的手性分离。

3　结语

淀粉及其衍生物类手性固定相主要是通过形成手性空腔而产生手性识别能力的,药物能否被分离主要取决于药物的立体结构;此外,氢键作用、偶极-偶极作用、π-π 作用等非共价键作用对其分离也有一定的影响。本文采用 Chiralpak AD-H 手性色谱柱,在正相条件下成功地拆分了利阿唑对映体,方法方便快速,为利阿唑对映体的进一步研究提供了有效的分离手段。

参考文献:

[1] 刘桂中,赵剑华,王秀琴. 生理科学进展,2000,31(4):337

[2] Kuijpers A, Van Pelt H, Bergers M, et al. J Dermatol Sci, 1998, 16(Suppl 1): S81

[3] Njar V, Gediya L, Purushottamachar P, et al. Bioorg Med Chem, 2006, 14(13): 4 323

[4] Njar V C. Mini Rev Med Chem, 2002, 2(3): 261

[5] Venet, Gaston M. Belg Patent, 9522540. 8. [1995-08-24]. http://v3. espacenet. com/origdoc? DB = EPODOC&IDX = WO9522540&F = 0&QPN = WO9522540

[6] 于兆文,刘霞,蒋生祥,等. 色谱,2000,18(1):39

[7] Okamoto Y, Aburatani R, Fukumoto T, et al. Chem Lett, 1987, 16: 1 857

[8] Okamoto Y, Kaida Y. J Chromatogr A, 1994, 666(1/2): 403

[9] Perrin C, Vu V A, Matthijs N, et al. J Chromatogr A, 2002, 947(1): 69

[10] 王来来,吕士杰,高平,等. 分析化学,1999,27(7):828

[11] Weng W, Wang Q H, Yao B X, et al. J Chromatogr A, 2004, 1 042(1/2): 81

[12] 翁文,林文士,熊雪珠,等. 分析化学,2006,34(6):805