

毛细管区带电泳对 5 种三唑类化合物的手性分离

侯莹¹, 纪松岗², 赵亮³, 孙青龔⁴, 柴逸峰¹ (1 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433; 2 中国人民解放军第 401 医院药剂科, 青岛 266071; 3 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200433; 4 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433)

摘要 目的:考察毛细管区带电泳法 (CZE) 中各种因素对 B 环糊精衍生物手性分离三唑类化合物的影响。**方法:**采用 CZE 对 5 个三唑类化合物的手性分离进行研究。BECKMAN P/ACE System 5 000 毛细管电泳仪, 紫外检测器。未涂渍熔融石英毛细管 50 Lm @47 cm (有效长度 40 cm); 正极压力进样 50 mbar @3 s 检测波长 200 nm。B 环糊精的 3 种衍生物做为手性添加剂。**结果:**羧甲醚 B 环糊精为手性选择剂是 5 个化合物都能达到较好的手性分离, 而硫酸酯 B 环糊精和二氟代羧甲醚 B 环糊精对这 5 个化合物无手性分离能力。在羧甲醚 B 环糊精环境下, 优化选择 30 mmol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲液含羧甲醚 B 环糊精 5 mmol/L, 用 H_3PO_4 调节 pH 2.2 温度 20 °C, 电压 20 KV, 在此条件下 5 个化合物都能达到良好的手性分离。**结论:**B 环糊精的种类和缓冲液的 pH 是影响这 5 对三唑类对映异构体分离的关键因素。

关键词 毛细管区带电泳; B 环糊精衍生物; 三唑类; 手性拆分

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)03-0214-04

Chiral separation of five triazole antifungals by capillary zone electrophoresis

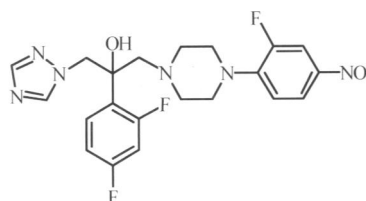
HOU Ying¹, JI Songgang², ZHAO Liang³, SUN Qingyan⁴, CHAI Yifeng¹ (1 Department of Pharmaceutical Analysis School of Pharmacy Second Military Medical University Shanghai 200433 China 2 Department of Pharmacy No 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China 3 Department of Pharmacy Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Second Military Medical University Shanghai 200433, China 4 Department of Organic Chemistry School of Pharmacy Second Military Medical University Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective To investigate the factors that influence the chiral separation of triazole antifungals by capillary zone electrophoresis using B2cyclodextrin derivatives as chiral selector. **Methods** Analyses were carried out on a P/ACE 5000 capillary electrophoresis system (Beckman, USA) with a UV detector using an uncoated fused silica capillary 50 Lm @47 cm with an effective length of 40 cm. Samples were injected into the capillary by 50 mbar pressure for 3 s. The detective wavelength was set at 200 nm. Three B2cyclodextrin derivatives were used as chiral selectors. **Results** Satisfactory separation of the five triazole antifungals were achieved when using carboxymethylated B2cyclodextrin (CM2B2CD) while the sulfolbutylether B2cyclodextrin (SBE2B2CD) and difluoro2carboxymethylated B2cyclodextrin showed no chiral separation ability to the five triazole antifungals. When using CM2B2CD, the enantiomeric separation of the five compounds and the best results were obtained in 30 mmol/L NaH_2PO_4 buffer (adjusted to pH 2.2 with H_3PO_4) containing 5 mmol/L CM2B2CD. The voltage was 20 KV and the temperature was 20 °C. The five triazole compounds were well separated on this condition. **Conclusion** The type of B2CD and the pH of buffer is the major factor influencing the separation of the five triazole antifungals.

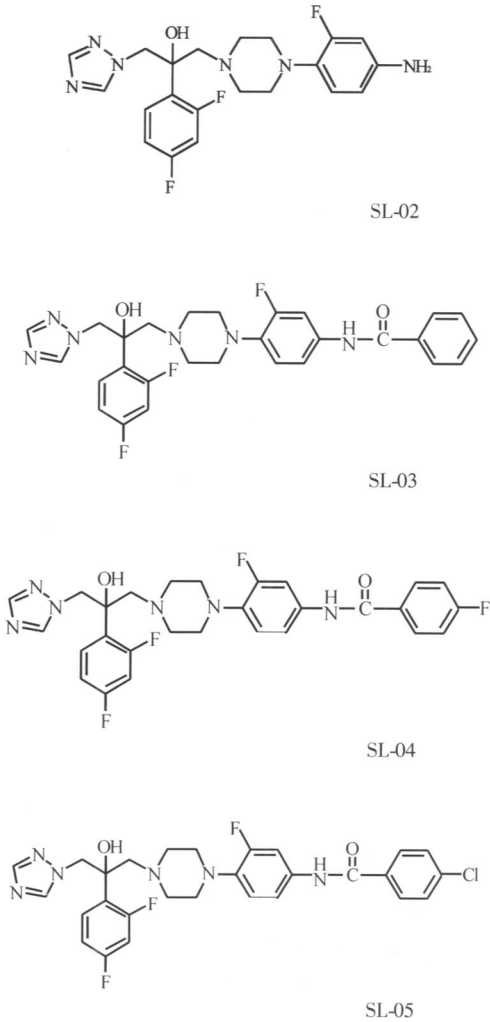
KEY WORDS capillary zone electrophoresis; B2cyclodextrin derivative; triazole; chiral separation

三唑类药物是目前临床主要使用和正在进一步研制开发的一类主要抗真菌药。三唑类抗真菌药物都具有一个 1,2,4-三氮环的结构, 其中 1N 通过一个亚甲基与手性碳原子相连, 与手性碳相连的其它两个基团分别为 2,4-卤代苯环和烷基或一个不相同的取代苯环。用于分析三唑类化合物对映体的方法主要有 HPLC 法^[1~4]、CE 法^[5,6]和 SFC 法^[3,7]。

国内未见有用环糊精做为手性选择剂拆分三唑类化合物的报道。



SL-01



1 材料和方法

1.1 仪器 BECKMAN P/ACE System 5000毛细管电泳仪(美国贝克曼公司), 紫外检测器。5个三唑类化合物及羧甲醚2B环糊精(CM2B环糊精), 硫酸酯2B环糊精(SBE2CD), 二氟代羧甲醚2B环糊精纯度大于98%, 为我院有机教研室合成。磷酸(分析纯, 上海试剂四厂昆山分厂), 磷酸二氢钠(分析纯, 上海精化科技研究所), 甲醇(色谱纯, 美国Fisher公司), 水为重蒸馏水。

1.2 电泳条件 未涂渍熔融石英毛细管(河北永年光学纤维厂), 50 Lm @ 47 cm(有效长度40 cm); 背景电解质溶液, 30 mmol/L NaH₂PO₄缓冲液, 用磷酸调节pH, 含有羧甲醚2B环糊精, 硫酸酯2B环糊精, 二氟代羧甲醚2B环糊精; 进样条件, 压力进样, 50 mbar @ 5 s; 检测波长, 200 nm。

1.3 溶液配制 分别称取 SL201, SL202, SL203, SL204, SL205适量, 用甲醇溶解, 配制成这五种样品的浓度约为0.1 mg/mL。

2 结果

以硫酸酯2B环糊精、二氟代羧甲醚2B环糊精时都无法达到手性分离, 只有羧甲醚2B环糊精能够手性分离这5对对映体, 结果如图1所示。

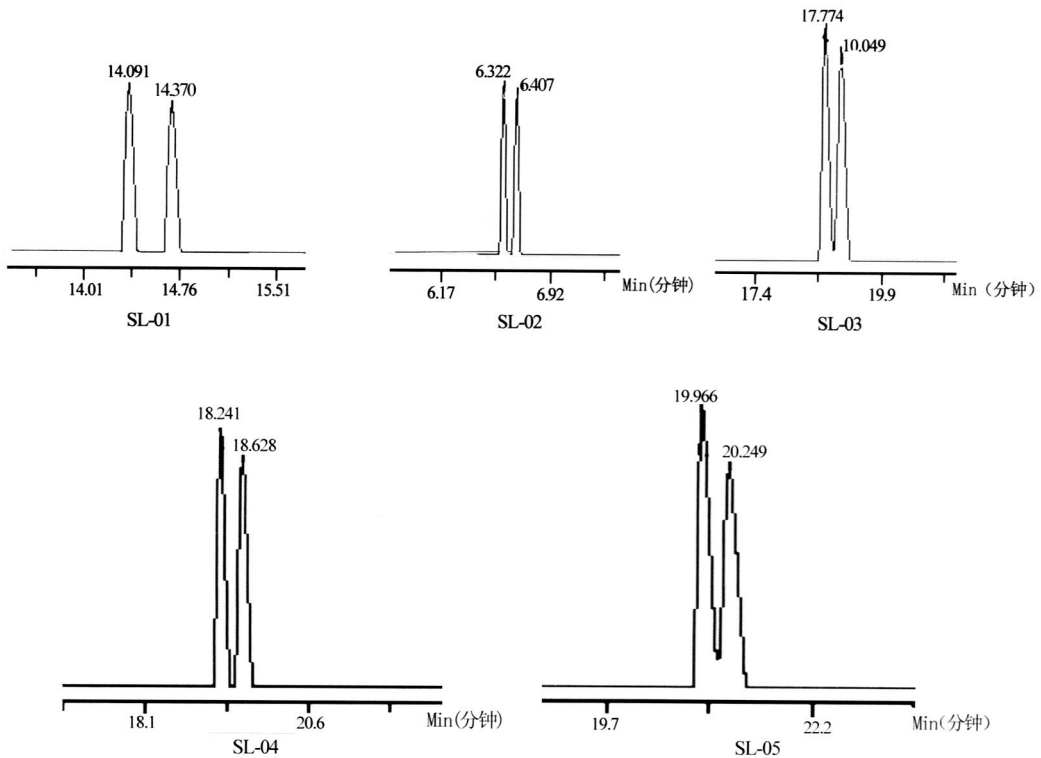


图1 羧甲醚2B环糊精为手性选择剂对映异构体的分离图

3 讨论

3.1 手性选择剂种类对分离的影响 分别以羧甲醚 2B 环糊精、硫酸酯 2B 环糊精和二氟代羧甲醚 2B 环糊精为手性选择剂, 我们考察了 pH、手性选择剂浓度、温度、电压等因素对分离选择性的影响, 发现只有羧甲醚 2B 环糊精对这 5 个化合物有手性选择性, 而硫酸酯 2B 环糊精和二氟代羧甲醚 2B 环糊精不能手性分离这 4 个化合物。分析原因可能是由于羧甲醚 2B 环糊精只有 6 位取代, 而硫酸酯 2B 环糊精为 2, 6 位取代, 其 2 位取代基产生空间位阻阻碍了对映体和硫酸酯 2B 环糊精形成包结物, 影响了硫酸酯 2B 环糊精的分离效率。由于化合物可能深入环糊精空腔形成疏水包含的是被两个氟原子取代的苯环, 而二氟代羧甲醚 2B 环糊精的 6 位取代基上也有两个氟原子, 可能是由于它们之间有一定的排斥作用使疏水母核不能完全进入环糊精空腔, 从而无法达到分离。

3.2 缓冲液 pH 值的考察 在拆分过程中, pH 范围是分离效果最优化的重要因素, 缓冲液的 pH 值影响可解离分析物的有效电荷, 决定其在电场中的迁移速度。同时它还影响 Zeta 电势, 通过 pH 值的选择可调整电迁移和电渗的平衡, 增加分离度。图 2 所示为羧甲醚 2B 环糊精为手性选择剂时, pH 对手性拆分的影响。分离因子在 pH 2.0~3.0 的范围内变化明显, 5 对对映体中只有 SL202 受 pH 影响与其它 4 个化合物的趋势不一致, 最终选择运行缓冲液的 pH 为 2.2, 在此条件下综合比较 5 对对映异构体的分离情况最佳。

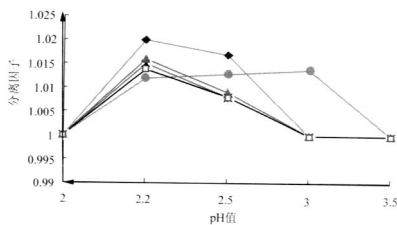


图 2 pH 与分离因子的关系

) s) SL201;) p) SL202; X) SL203; w) SL204; t) 系列 5

3.3 手性选择剂的浓度对手性拆分的影响 环糊精的浓度也是一个很重要影响因素, 当环糊精的浓度从零开始增加时, 对映体和环糊精接触的几率逐渐增大, 形成饱和物的趋势亦增加, 达到某一环糊精浓度时, 分离达到最大。但随着环糊精浓度的增加, 从宏观角度来看, 溶液的黏度也随之增加; 而从微观角度来看, 环糊精上的羟基或取代基的浓度也增加,

势必会增加对映体进入环糊精内腔的空间位阻。所以对映体的迁移率减小, 迁移时间增加, 同时对映体的平均迁移率之差也随之减小, 对分离不利, 所以达到最佳浓度后继续增加环糊精的浓度, 分离往往随之变差。图 3 显示了向缓冲液 (pH 2.2) 中加入不同浓度的羧甲醚 2B 环糊精对手性分离的影响, 只有 SL202 是随环糊精浓度的增加分离因子增大, 但综合比较当羧甲醚 2B 环糊精浓度为 5 mmol/L 时, 5 个化合物都能达到较好的分离。

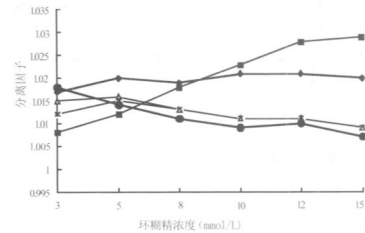


图 3 CM2B2CD 浓度与分离因子的关系

) s) SL201; u) SL202; X) SL203; &) SL204; p) SL205

3.4 缓冲溶液浓度对分离的影响 以羧甲醚 2B 环糊精为手性选择剂, 研究了 H_3PO_4/NaH_2PO_4 (pH 2.2) 缓冲溶液浓度对 5 个化合物手性分离效果的影响。实验发现, 浓度太低, 离子强度不够, 毛细管壁易吸附, 影响分离选择性, 浓度太高, 背景电解质溶液离子强度增加, 增加焦耳热, 增加扩散, 影响分离选择性。缓冲溶液的最佳浓度为 30 mmol/L。

3.5 运行电压和柱温对分离的影响 考察了不同电压对手性分离效率和分离选择性的影响, 电压过低, 分离效率低, 电压过大, 使电渗流过大引起高焦耳热, 不利于手性化合物与手性选择性包合形成, 影响分离选择性, 本研究的最佳电压为 20 kV。另外, 温度对手性拆分有很大的影响, 降低温度会提高分离效率, 低温有助于样品分子与手性选择剂发生相互作用形成包结物, 考察了柱温对手性分离的影响, 结果表明柱温 20 °C 时, 对映异构体分离最佳。

通过对以上实验条件的考察, 确定电泳条件: 30 mmol/L 的 NaH_2PO_4 缓冲液, 含有羧甲醚 2B 环糊精 5 mmol/L, 用磷酸调节 pH 至 2.2, 柱温, 20 °C; 电压, 20 kV; 进样条件, 压力进样, 50 mbar @ 3 s; 检测波长, 200 nm; 进样间的冲洗条件, 先用 0.1 mol/L 的氢氧化钠冲洗 4 min 后用运行缓冲液冲洗 4 min, 环糊精的种类和缓冲液的 pH 是影响这 5 对三唑类对映异构体分离的关键因素。

参考文献:

[1] 王 鹏, 江树人, 姜 伟, 等. HPLC 法拆分粉唑醇对映体 [J].

应用化学, 2005, 22(4): 445.

[2] Wang P, Jiang S, Liu D, et al Direct enantiomeric resolutions of chiral triazole pesticides by high performance liquid chromatography [J]. Biochemical and biophysical methods 2005, 62: 219.

[3] Bemal JL, Torbio L, Nozal MJ et al Separation of antifungal chiral drugs by SFC and HPLC: a comparative study [J]. Biochemical and biophysical methods 2002, 54: 245.

[4] 韩小茜, 温晓光, 管永红, 等. 流动相组成及温度对 4 种 1, 2, 4-三唑类农药对映体手性拆分的影响 [J]. 应用化学, 2004, 21(2): 140.

[5] Wu YS, Lee HK, Li SFY. High performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated β -cyclodextrin mediated capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2001, 912: 171.

[6] Lin C, Chen C. Migration behavior and separation of aromatic triazole and thiazole compounds by capillary zone electrophoresis [J]. Chromatogr A, 1996, 731: 299.

[7] Torbio L, do Nozal MJ, Bemal JL, et al Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography [J]. Chromatogr A, 2004, 1046(1~2): 249.

收稿日期: 2008-03-210

HP LC法测定复方软甲膏中水杨酸和盐酸丁卡因的含量

顾伟锋, 朴淑娟, 张 纯 (第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003)

摘要 目的: 建立测定复方软甲膏中水杨酸和盐酸丁卡因含量的 HPLC法。方法: 色谱柱为 Agilent C_{18} (416 mm @150 mm, 5 Lm); 流动相为甲醇-水-磷酸 (50: 50: 0.104), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 313 nm。结果: 水杨酸溶液在 82.100~ 410.100 Lg/mL 时与其吸收值呈良好线性关系 ($r = 0.9999$), 平均加样回收率 99.80%, RSD = 11.68%; 盐酸丁卡因溶液在 5.100~ 251.00 Lg/mL 时与其吸收值呈良好线性关系 ($r = 0.9999$), 平均加样回收率 99.175%, RSD = 11.30%。结论: 本方法操作简便、快捷, 结果准确、可靠, 适用于复方软甲膏的质量控制。

关键词 高效液相色谱法; 水杨酸; 盐酸丁卡因

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0111(2008)03- 0217- 03

Determination of salicylic acid and tetracation hydrochloride in Compound onychomycosis cream by HPLC

GU Weifeng, PIAO Shujuan, ZHANG Chun (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

ABSTRACT Objective To establish a HPLC method for the determination of salicylic acid and tetracation hydrochloride in compound onychomycosis cream. Methods Agilent C_{18} (416 mm @150 mm, 5 Lm) column was used with a mobile phase of methanol-water-phosphoric (50: 50: 0.104) and a flow rate of 1.0 mL/min, at the detection wavelength of 313 nm. Results This method showed good linear relation ($r = 0.9999$) in the range of 82.100~ 410.100 Lg/mL for salicylic acid, and 5.100~ 251.00 Lg/mL for tetracation hydrochloride. The average recoveries were 99.80% and 99.175%, with the relative standard deviation of 11.68% and 11.30%, respectively. Conclusion The method is simple, quick, accurate and suitable for the quality control of compound onychomycosis cream.

KEY WORDS HPLC, salicylic acid, tetracation hydrochloride

复方软甲膏是本院研制的皮肤科制剂, 主要由水杨酸 (salicylic acid)、盐酸丁卡因 (tetracation hydrochloride) 等药物组成, 具有软化指甲板作用, 提高甲癣局部治疗的效果。本文采用高效液相色谱法同时测定复方软甲膏中主要成分水杨酸和盐酸丁卡

因的含量, 操作简便, 结果准确, 适用于复方软甲膏的质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 waters600 高效液相色谱仪 (美国); 岛津紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 梅特勒 AE240 电子天平 (梅特勒 托利多仪器 <上海> 有限公司)。

作者简介: 顾伟锋 (1978), 男, 硕士研究生. E-mail: guweifeng78@yaohoo.com

通讯作者: 张纯 (1978), 男, 副主任药师, Tel: (021)653071331