

超临界流体色谱法分析 非对映异构体 d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯

陈伟珠^{1,2} 许鹏翔¹ 易瑞灶² 赵玉芬^{* 1}

¹(厦门大学化学化工学院化学系, 化学生物学福建省重点实验室 厦门 361005)

²(国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

摘 要 采用超临界 CO₂ 流体色谱技术, 分析 d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯手性磷的非对映异构体。色谱柱为 Hpersil ODS2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 流动相为夹带改性剂甲醇、乙醇和异丙醇的超临界 CO₂ 流体。以容量因子、选择性和分离度为指标, 考察改性剂、背压和柱温对分离的影响。在甲醇、乙醇和异丙醇 3 种改性剂中, 甲醇为最好的改性剂, 其中在 7% 甲醇改性剂下, 该化合物的分离度可达到 3.35。在 7% 甲醇改性剂条件下, 考察了压力 (10 ~ 20 MPa) 和温度 (303.15 ~ 318.15 K) 的影响。在优化的分离条件 (改性剂为 7% 甲醇, 流速为 2 mL/min, 柱温为 308.15 K, 背压为 15 MPa) 下, d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯的两种非对映异构体完全达到基线分离, 分离时间约 15 min。

关键词 超临界二氧化碳流体色谱; 非对映体分离; d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯

1 引 言

近来, 核苷及其类似物作为潜在的抗癌和抗病毒试剂已经被广泛研究^[1~3]。例如, 几种嘌呤和嘧啶核苷类似物已经被用作化学治疗的武器。然而, 由于大多数这类药物的生物活性需要细胞内核苷激酶磷酸化才能转化为 5'-单磷酸核苷^[4]。对细胞内核苷激酶的依赖性是该类药物的一个极大缺点, 因为核苷类药物的电荷严重阻止膜的渗透。因此, 利用酯溶性较好的核苷磷酸酯作为具有生物活性的化学治疗核苷类药物引起了人们的兴趣^[5~8]。这类化合物因为分子中引入氨基酸酯, 从而增加了药物分子的酯溶性, 提高了药物的生物活性, 同时减少了药物对细胞的毒性, 因此具有很好的抗 HIV-1 生物活性。最近, McGuigan 已报道过带有氨基酸甲酯的 AZT 衍生物磷酸三酯确有抗艾滋活性^[8]。它们作为抗病毒药物显示了很好的发展前景。其中的一些化合物表现出比母体核苷更强的抗病毒活性, 更小的细胞毒性^[9,10]。为了寻找更好的新型的前类药物, 本研究组合成了一系列核苷磷酸化氨基酸甲酯化合物。由于化合物中磷原子具有手性, 合成的化合物均为非对映异构体。不同异构体的药理差别很大, 如 20 世纪 60 年代在欧洲市场上销售的镇静药酞胺呱睫酮 (反应停) 的疗效来自 R 对映体, 而 S 对映体却能引起胎儿畸形, 曾带来了灾难性的后果。研究发现这是由于药物对映体的立体选择性所造成, 引起了科学家的高度重视。因此, 分离纯化疗效确切而又无毒副作用的单一构型手性化合物一直是科学家关注的问题。目前, HPLC、GC 和 SFC 等在手性化合物分离领域中均发挥着重要作用。其中, HPLC 是最通用的色谱分离技术。而超临界流体色谱 (SFC) 是一种流动相温度、压力均高于或略低于临界点的色谱技术, 与常规的 HPLC、GC 技术相比, 具有体系的粘度低、扩散和传质速率高等特点, 在提高手性分离效率、缩短分离时间方面显示了优越性, 可以有效地弥补 HPLC 和 GC 在分离手性物质方面的不足。近年来, 关于采用 SFC 技术分离手性化合物的文献报道较多^[11~17], 但 SFC 技术应用于核苷类氨基酸甲酯非对映异构体的分离的报道尚未见。本研究将 SFC 技术应用于 d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯非对映异构体的分离, 建立了 d4T-5'-N-磷酰化苯丙氨酸甲酯非对映异构体的分离分析的超临界流体色谱方法。本方法分离过程的有机溶剂使用量极少, 在制备过程中, 样品后处理简单, 只需旋干少量有机溶剂, 对环境污染少, 是一种快速、简单、环保、高效的方法, 为核苷类氨基酸甲酯类化合物的分离和制备找到一种新的方法。

2011-09-21 收稿; 2012-03-02 接受

本文系国家自然科学基金面上项目 (Nos. 21075103, 20972130) 资助

* E-mail: yfzhao@xmu.edu.cn

2 实验部分

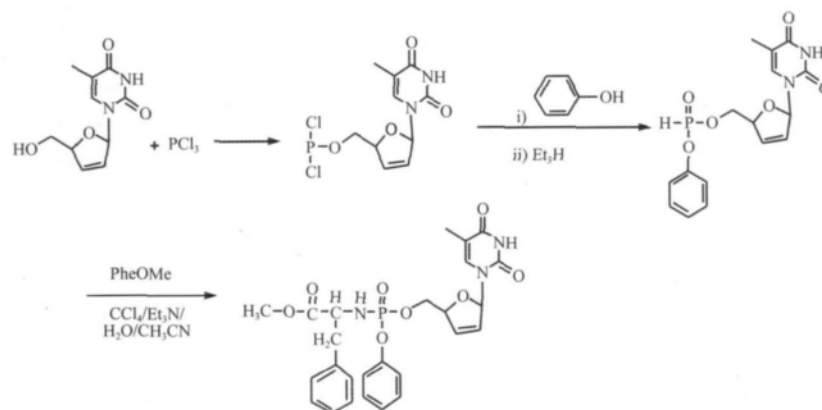
2.1 仪器与试剂

SFC Method Station II 超临界流体色谱仪(美国 Thar 科技公司) 配有 FCM-1200 超临界流体泵和改性剂泵, 5 μ L 定量阀, 柱温箱(室温 ~363.15 K 可调), 2998 检测器(美国 Waters 公司)。

二氧化碳(纯度 99.99%, 厦门林德气体有限公司); 甲醇(色谱纯, 德国默克公司); 无水乙醇(分析纯, 上海联试化工试剂有限公司); 异丙醇(色谱纯, 上海化学试剂研究所); 1,3,5-三叔丁基苯(97%, 美国 Sigma 公司); d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯(自制)。

2.2 样品的合成

d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯的合成路线见图解 1^[18, 19]:



图解 1 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of phenylalanine methyl ester 5'-phosphoramidates of d4T(d4T-p-N-PheOMe)

2.3 样品配制

准确称取 10 mg 合成的 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯, 置于进样瓶中, 加入 1 mL 乙腈溶解, 得到 10.04 g/L 的 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯的乙腈溶液, 进样分析。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Hpersil ODS2 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为超临界二氧化碳-甲醇、超临界二氧化碳-乙醇及超临界二氧化碳-异丙醇; 检测波长: 254 nm; 进样量: 3 μ L; 对温度、压力、流动相流速及组成进行优化。

3 结果与讨论

由于流速对手性化合物的分离基本无影响^[13], 所以以下所有的实验流速均定为 2.0 mL/min。色谱柱的死体积时间用 1,3,5-三叔丁基苯(TTBB) 在 2.0 mL/min 的流速条件下, 在不同改性剂的流动相中测得。结果表明, 在不同改性剂的流动相中, TTBB 基本都在色谱图上的第一个基线波动后出峰, 且保留时间的偏差小于 2%。因此, 本研究将色谱图上的第一个基线波动定义为死体积时间。

为了得到较好的分离条件, 以容量因子 k' 和分离度 R_s 为指标, 优化改性剂的浓度(在流动相中所占的体积百分数, 下同)、柱温和背压条件。两种非对映异构体的容量因子分别用 k_1' 、 k_2' 表示。 k' 和 R_s 的计算方法如下:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

式中: t_R 为样品分子的保留时间, t_0 为色谱柱的死时间。

$$t_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (2)$$

式中: t_{R1} 、 t_{R2} 分别为化合物的保留时间, W_1 、 W_2 为所对应的色谱峰底宽。

3.1 改性剂的影响

在背压 15 MPa、柱温 308.15 K 和流动相流速 2.0 mL/min 的相同条件下, 分别以甲醇、乙醇、异丙醇为改性剂, 并调节改性剂在流动相中的体积分数, 所得容量因子和选择性变化如图 1 所示。

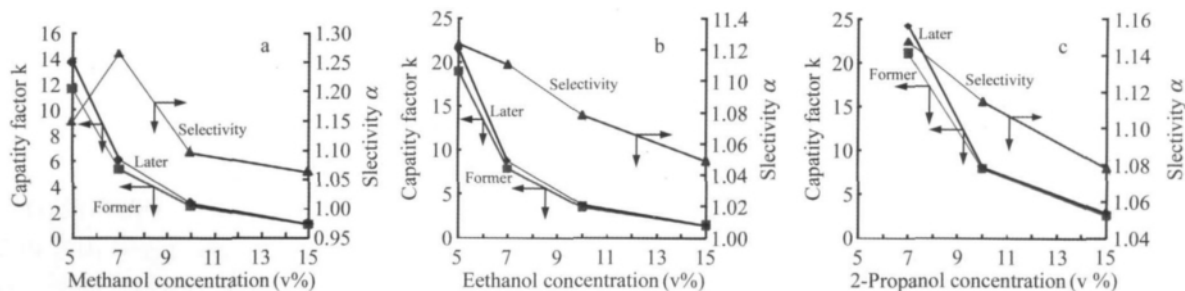


图 1 改性剂浓度对 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯的容量因子和非对映立体选择性的影响

Fig. 1 Effect of modifier concentration on capacity factor and diastereoselectivity for compound 1

色谱条件: 背压 15 MPa、柱温 308.15 K 和流动相流速 2.0 mL/min。 (a) 甲醇; (b) 乙醇; (c) 异丙醇。

Chromatographic conditions: 15 MPa, 308.15 K, 2 mL/min. (a) Methanol; (b) Ethanol; (c) 2-Propanol.

改性剂的作用是改变流动相的极性, 对超临界流体色谱的分离有重要影响。由表 1 可见, 当改性剂

表 1 改性剂种类及浓度对 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯非对映异构体的容量因子、选择性和分离度的影响

Table 1 Effect of type and concentration of modifier on capacity factor, diastereoselectivity and resolution factor

改性剂 Modifier	比例 Percentage (%)	容量因子 Capacity factor (k'_1)	容量因子 Capacity factor (k'_2)	选择性 Selectivity (α)	分离度 Resolution (R_s)
甲醇 Methanol	5	11.658	13.666	1.147	4.28
	7	5.363	6.032	1.263	3.35
	10	2.468	2.705	1.096	2.26
	15	1.016	1.079	1.062	1.61
乙醇 Ethanol	5	19.084	21.442	1.124	3.23
	7	7.979	8.863	1.111	2.79
	10	3.526	3.800	1.078	1.92
	15	1.384	1.453	1.049	1.30
异丙醇 2-Propanol	5				60 min 未出峰 No peak in 60 min
	7	21.105	24.237	1.148	2.95
	10	7.900	8.111	1.115	2.58
	15	2.695	2.905	1.078	1.71

体积分数在 5% ~ 15% 变化时, 非对映异构体的分离度不断减小。从图 1 可见, 保留因子和选择性也基本随着改性剂体积分数的增加而减小; 甲醇为改性剂时, 获得的分离度比用相同体积分数的乙醇、异丙醇为改性剂时高, 且峰型较佳; 当甲醇的体积分数为 5% 时, 分离效果最佳, 分离度为 4.25; 当甲醇的体积分数为 7% 时, 分离度 3.35, 但选择性最好 (1.263, 图 1a)。综合考虑选择性和容量因子, 本研究选用 7% 甲醇作为改性剂, 如图 2 所示。

3.2 柱温的影响

在改性剂为 7% 甲醇、流速 2.0 mL/min 和背压 15 MPa 条件下, 考察柱温 (303.15 ~ 318.15 K) 对分离效果的影响, 所得容量因子、选择性和分离度变

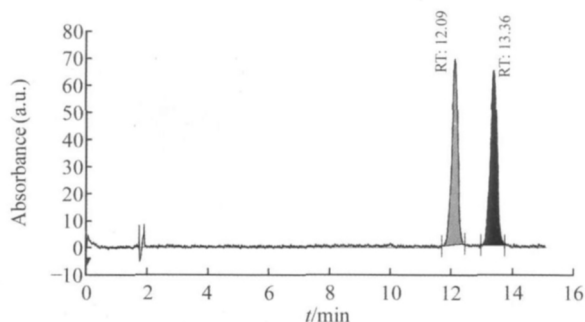


图 2 较佳条件下 ODS2 柱分离 d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯非对映异构体化合物的超临界流体色谱图

Fig. 2 Supercritical CO_2 fluid chromatogram of d4T-P-N-PheOMe diastereoisomers separation under optimal conditions of ODS2 column

化如表2所示。

表2 ODS2柱上容量因子、选择性和分离度随柱温的变化

Table 2 Effect of temperature on capacity factor and resolution factor

柱温 Temperature of column (K)	容量因子 Capacity factor (k'_1)	容量因子 Capacity factor (k'_2)	选择性 Selectivity (α)	分离度 Resolution (R_s)
303.15	4.937	5.542	1.123	3.30
308.15	5.363	6.032	1.125	3.35
313.15	6.658	7.405	1.112	3.18
318.15	8.053	8.847	1.099	3.01

柱温的影响较为复杂,它综合了两方面的作用。一方面,随着柱温升高,超临界流体密度降低,样品分子的保留增强,容量因子增大;另一方面,随着柱温升高,样品分子传质速率增加,有助于从固定相表面脱附进入流动相中,容量减小。从表2可见,温度对该化合物的影响主要表现为前一方面。随着温度地升高,保留因子增加,但分离度先减小后增加。因此,确定在改性剂7%甲醇、流速2.0 mL/min和背压15 MPa条件下,分离较佳的柱温是308.15 K,此时分离度达到3.35(图1)。

3.3 柱压的影响

除了改性剂和柱温外,背压是影响超临界流体色谱分离的另一个重要因素。在改性剂7%甲醇、柱温308.15 K和流速2.0 mL/min的条件下,改变背压(10~20 MPa),容量因子、选择性和分离度变化如表3所示。

由表3可见,背压升高,超临界CO₂流体的密度增加,导致容量因子

减小,分离度降低。因此,综合考虑容量因子和分离度,确定在改性剂为7%甲醇、柱温308.15 K和流速2.0 mL/min的条件下,分离效果较好的背压为15 MPa,此时,非对映体的分离度高达3.35(图1)。

表3 ODS2柱上容量因子、选择性和分离度随背压的变化

Table 3 Effect of back pressure on capacity factor and resolution factor

背压 Back pressure (MPa)	容量因子 Capacity factor (k'_1)	容量因子 Capacity factor (k'_2)	选择性 Selectivity α	分离度 Resolution (R_s)
10	8.089	9.132	1.129	3.65
12	6.521	7.353	1.128	3.51
15	5.363	6.032	1.125	3.35
18	4.553	5.063	1.112	3.01
20	4.079	4.532	1.111	2.88

4 结论

通过考察改性剂、柱温、柱压的影响,优化了使用Hpersil ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)分离非对映异构体d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯的超临界CO₂流体色谱条件。最终确定超临界流体色谱分离条件为:紫外检测波长254 nm,改性剂为7%甲醇,流动相流速2.0 mL/min,柱温308.15 K,背压15 MPa,进样3 μ L,此时一次运行时间约15 min,分离度3.35。在此条件下,d4T-5'-N-磷酸化苯丙氨酸甲酯非对映体可实现完全基线分离,可用于此化合物对映体的分离与分析。

References

- 1 Meier C. *Synlett.*, **1998**, (3): 233~242
- 2 Zemlicka J. *Biochimica at Biophysica/Molecular Basis of Disease*, **2002**, 1587(2-3): 276~286
- 3 Freel Meyers C L, Hong L, Joswig C, Borch R F. *J. Med. Chem.*, **2000**, 43(22): 4313~4318
- 4 Furman P A, Fyfe J A, St. Clar M H, Weinhold K, Rideout J L, Freeman G A, Nusinoff Lehrman S, Biolognesi D P, Broder S, Mitsuya H, Barry D W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83: 8333~8337
- 5 Balzarini J, Naesens L, Iachmuylders J, Niphuis H, Rosenberg I, Holy A, Schellekens H, Declercq E. *Aids*, **1991**, 5: 21~28
- 6 De Clercq E. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1997**, 10: 674~693
- 7 Mistuya H, Broder S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83: 1911~1915
- 8 McGuigan C, Pathirana R, Balzarini J, De Clercq E. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36(8): 1048~1052
- 9 Siddiqui A Q, Ballatore C, Clercq E D, Balzarini J. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42(3): 393~399

- 10 McGuigan C , Cahard D , Sheeka H M , De Clercq E , Balzarini J. *Med. Chem.* , **1996** , 39(8) : 1748 ~ 1753
- 11 Chen W D. *J. Chromatogr. A* , **2009** , 1216(50) : 8750 ~ 8758
- 12 Toribio L , del Nozal M J , Bernal J L , Jimenez J J , Alonso C. *J. Chromatogr. A* , **2004** , 1046(1-2) : 249 ~ 253
- 13 Su B G , Bao Z B , Xing H B , Yang Y W , Ren Q L. *J. Chromatogr. A* , **2009** , 1216 (26) : 5140 ~ 5146
- 14 JIANG Chong-Wen , YANG Yi-Wen , REN Qi-Long , WU Ping-Dong. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2003** , 31 (11) : 1337 ~ 1340
蒋崇文 , 杨亦文 , 任其龙 , 吴平东. *分析化学* , **2003** , 31(11) : 1337 ~ 1340
- 15 LIU Zhi-Min , ZHAO Suo-Qi , WANG Ren-An , YANG Guang-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.* , **1997** , 25(3) : 272 ~ 275
刘志敏 , 赵锁奇 , 王仁安 , 杨光华. *分析化学* , **1997** , 25(3) : 272 ~ 275
- 16 XIE Jian-Chun , HAN Hui-Lan , CHENG Jie , XIAO Ye-Lan , SUN Bao-Guo , ZHENG Fu-Ping. *Food Science* , **2009** , 30 (24) : 213 ~ 216
谢建春 , 韩蕙兰 , 程 劫 , 肖叶兰 , 孙宝国 , 郑福平. *食品科学* , **2009** , 30(24) : 213 ~ 216
- 17 CHENG Jie , XIE Jian-Chun , SUN Bao-Guo. *Food and Fermentation Industries* , **2008** , 34(10) : 10 ~ 12
程 劫 , 谢建春 , 孙宝国. *食品与发酵工业* , **2008** , 34(10) : 10 ~ 12
- 18 Atherton F R , Openshaw H T , Todd A R. *J. Chem. Soc.* , **1945** : 660 ~ 663
- 19 Atherton F R , Todd A R. *J. Chem. Soc.* , **1947** : 674 ~ 678

Separation of Phenylalanine Methyl ester 5'-Phosphoamidates of d4T Diastereoisomers by Supercritical Fluid Chromatography

CHEN Wei-Zhu^{1,2} , XU Peng-Xiang¹ , YI Rui-Zao² , ZHAO Yu-Fen^{*1}

¹ (Department of Chemistry and The key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province ,
College of Chemistry and Chemical Engineering , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

² (The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration , Xiamen 361005 , China)

Abstract The separation of phenylalanine methyl ester 5'-phosphoamidates of d4T (d4T-P-N-PheOMe) diastereoisomers has been investigated using supercritical fluid chromatography on Hypersil ODS2 (250 mm×4.6 mm , 5 μm) . Supercritical CO₂ modified with methanol , ethanol and 2-propanol was used as mobile phase. The influence of type and concentration of alcohol modifier , back pressure and column temperature on retention factor , diastereoselectivity and resolution was studied. Among methanol , ethanol and 2-propanol , methanol was proved to be the most favorable modifier , and 7% (V/V) of methanol was the preferred concentration at which d4T-P-N-PheOMe diastereoisomers could be separated with resolution of 3.35. The effects of pressure and temperature were investigated at 7% (V/V) of methanol in the pressure range of 10–20 MPa and temperature range from 303.15 to 318.15 K. The optimal separation condition was 7% modifier in methanol as mobile phase , 2.0 mL/min of flow rate for mobile phase , 308.15 K of column temperature , 15 MPa of back pressure. d4T-P-N-PheOMe could be separated baselinely and the running time was about 15 min under this optimal separation condition.

Keywords Supercritical fluid chromatography; Diastereoisomeric separation; Phenylalanine methyl ester 5'-phosphoamidates of d4T

(Received 21 September 2011; accepted 2 March 2012)