

HPLC 手性固定相法分离 5 个康唑类药物对映体

滕怀凤¹, 温晓丽²

(1. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036; 2. 常州合全药业有限公司, 常州 213000)

摘要 目的: 建立高效液相色谱手性固定相法拆分硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑 5 个抗真菌药物对映体, 探讨其分离机制, 得到理想的拆分条件。**方法:** 采用 Chiralcel OJ-H 手性色谱柱, 检测波长为 230 nm, 柱温为 25 °C, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL; 以保留时间(*t*)、选择因子(α)和分离度(*R*)为指标, 考察流动相中有机改性剂的种类(乙醇、异丙醇)及其占比等对 5 个药物对映体分离的影响。硫康唑、咪康唑和异康唑流动相组成为正己烷-乙醇(80:20, *v/v*); 选择分离益康唑流动相组成为正己烷-乙醇(60:40, *v/v*); 选择分离芬替康唑流动相组成为正己烷-乙醇(20:80, *v/v*)。**结果:** 硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑 5 个药物的对映体均达到完全分离, 分离度分别为 2.83、4.23、5.96、4.61、4.84。**结论:** Chiralcel OJ-H 手性色谱柱 HPLC 法对这 5 个康唑类药物选择性良好, 可用于其对映体的手性分离。

关键词: 高效液相色谱; 对映体分离; 手性固定相; 手性药物; 康唑类药物; Chiralcel OJ-H 手性

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2020)03-0436-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.03.06

Enantiomeric separation of five conazole drugs with chiral HPLC

TENG Huai-feng¹, WEN Xiao-li²

(1. Liaoning Provincial Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China;

2. Changzhou STA Pharmaceuticals Co., Ltd., Changzhou 213000, China)

Abstract Objective: To develop a high performance liquid chromatography with chiral stationary phase method for enantiomeric separation of five antifungal drug enantiomers including sulconazole, miconazole, econazole, isoconazole and fenticonazole, and also to investigate the chiral recognition mechanisms. **Methods:** HPLC method was adopted. Chiralcel OJ-H chiral column was selected. Detection wavelength was set at 230 nm; column temperature was 25 °C; flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; The injection volume was 20 μL. Using retention time, selective factors and separation rate as indexes, the influence of type and ratio of organic modifiers (ethanol, isopropanol) on the separation of 5 kinds of enantiomers in mobile phase were investigated. The mobile phase for separation of sulconazole, miconazole and isoconazole was a mixture of *n*-hexane and ethanol (80:20, *v/v*), while mobile phase for separation of econazole, a mixture of *n*-hexane and ethanol (60:40, *v/v*) and mobile phase for separation of fenticonazole, a mixture of *n*-hexane and ethanol (20:80, *v/v*). **Results:** Under

第一作者 Tel:(024) 31266302; E-mail: nicole.teng@163.com

the above condition, 5 kinds of drug enantiomers were separated completely, with the separate rate of 2.83, 4.23, 5.96, 4.61, 4.84, respectively. **Conclusions:** Established Chiralcel OJ-H chiral column-HPLC is selective for these 5 kinds of conazole drugs and can be used for the chiral separation of the enantiomers.

Keywords: high performance liquid chromatography (HPLC); enantiomeric separation; chiral stationary phase; chiral drugs; conazole drugs; Chiralcel OJ-H

硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑是目前常用的广谱抗真菌药物,尤其对深部真菌感染的疗效最为理想^[1-2]。这类药物大多为手性药物,且临床上使用的多为消旋体。研究表明,这类药物的2个(或多个)对映体的药效常有明显差异。例如*R*-(-)-益康唑和*R*-(-)-咪康唑的抗真菌活性要高于相应的*S*-异构体^[3]。药物对映体间药理、药效甚至毒性可能存在很大差异,所以这些药物对映体有非常重要的意义。

目前已有文献报道采用手性固定相法、手性流动相添加剂法和毛细管电泳法对一些抗真菌药物对映体进行拆分^[4-7]。其中,Aboulenein等^[4]使用六种纤维素衍生物手性固定相在正相色谱条件下对益康唑、咪康唑和硫康唑进行了拆分,唐岚等^[8]使用Chiralcel OD-H柱对益康唑、咪康唑进行了拆分。本

文使用Chiralcel OJ-H手性柱分离硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑对映体的方法更高效、简便,也未见有相关报道。有文献报道使用Chiralcel OJ-H手性柱拆分抗组胺类药物^[9]、扁桃酸系列药物^[10]及手性农药^[11-12],通过本文的研究建立了更高效快捷的手性抗真菌药物的液相拆分方法,进一步增加了Chiralcel OJ-H手性柱的广泛应用性,为后续相关药物的对映体研究提供参考。

Chiralcel OJ-H,是以纤维素-三-(4-甲基苯甲酸酯)为手性选择剂的一种分离能力较强的涂覆型手性柱。本文使用正相色谱条件,对硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑5个抗真菌药物对映体进行了分离研究。考察了醇类改性剂的种类及比例,流速和柱温对分离的影响,并探讨了其手性识别机理。本文研究的5个药物对映体的结构如图1所示。

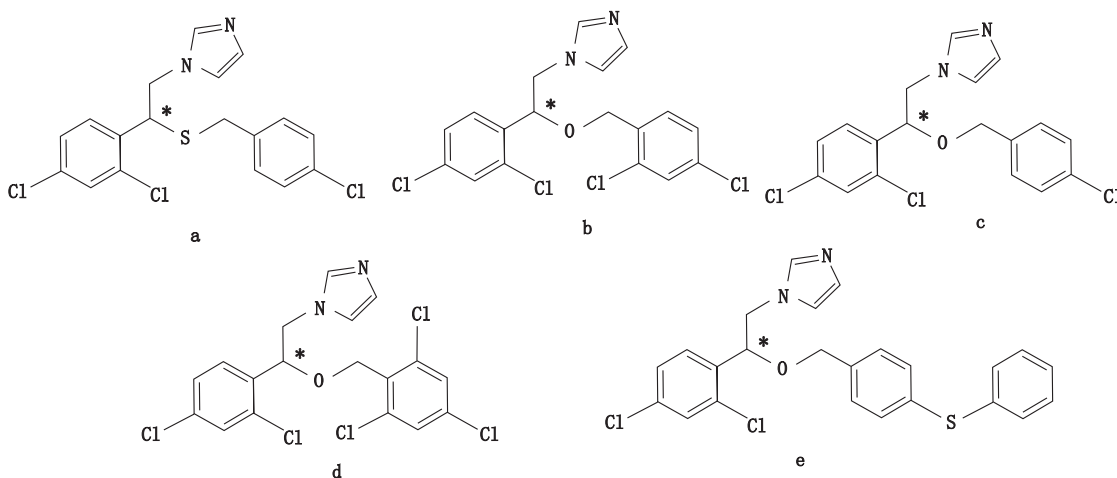


图1 硫康唑(a)、咪康唑(b)、益康唑(c)、异康唑(d)和芬替康唑(e)化学结构

Fig. 1 The chemical structures of sulconazole (a), miconazole (b), econazole (c), isoconazole (d) and fenticonazole (e)

1 仪器与试剂

Jasco Pu-1580型高效液相色谱仪(Jasco公司), SPD-15C型紫外检测器(Shimadzu公司), N2000色谱工作站(浙江大学智达信息有限公司)。

正己烷、乙醇、异丙醇(色谱纯,山东禹王实

业有限公司), 对照品硝酸硫康唑(批号101081-201001)、硝酸咪康唑(批号100213-201406)、硝酸益康唑(批号100214-201204)(中国食品药品检定研究院), 硝酸异康唑(批号1.0)和硝酸芬替康唑(批号1.0)(欧洲药典对照品)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Chiralcel OJ-H 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Daicel 公司), 流动相: 正己烷-乙醇(50:50), 检测波长: 230 nm, 柱温: 25 °C, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 进样量: 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

分别取对照品硝酸硫康唑、硝酸咪康唑、硝酸益康唑、硝酸异康唑和硝酸芬替康唑适量, 精密称定, 用乙醇溶解并制成质量浓度约为 1.0 mg · mL⁻¹ 的各对照品储备液, 4 °C 保存。精密量取各对照品储备液适量, 用乙醇稀释制成质量浓度为 0.1 mg · mL⁻¹ 的各对照品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件的选择和优化

2.3.1 醇类改性剂种类对分离的影响 使用 Chiralcel OJ-H 柱, 在正相色谱条件下, 以正己烷为底剂, 分别考察了加入乙醇和异丙醇 2 种醇类改性剂对硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑的保留因子(k_1)、选择因子(α)和分离度(R)的影响。根据药物的保留, 优先选择正己烷和醇类改性剂初始体积比为 80:20。结果发现硫康唑等 4 种药物在上述色谱条件下均能出峰, 但芬替康唑直至 60 min 仍未见出峰。因此, 将正己烷-醇类改性剂体积比调整为 50:50, 并以此为流动相, 研究了芬替康唑的对映体分离。5 个药物对映体在上述 2 种醇类改性剂条件下的分离结果见表 1。

表 1 醇改性剂种类对分离的影响

Tab. 1 Effect of alcohol modifiers on chiral separation

| 药物 (drug) | 乙醇 (ethanol) | | | | 异丙醇 (isopropanol) | | | |
|----------------------|------------------|-------|----------|------|-------------------|-------|----------|------|
| | 含量 (content) / % | k_1 | α | R | 含量 (content) / % | t_1 | α | R |
| 硫康唑 (sulconazole) | 20 | 10.8 | 1.27 | 2.83 | 20 | 18.5 | 1.64 | 2.46 |
| 咪康唑 (miconazole) | 20 | 5.7 | 1.76 | 4.23 | 20 | 11.6 | 1.33 | 0.98 |
| 益康唑 (econazole) | 20 | 9.9 | 2.37 | 7.41 | 20 | 22.2 | 1.87 | 2.82 |
| 异康唑 (isconazole) | 20 | 4.2 | 1.78 | 4.61 | 20 | 7.8 | 2.27 | 2.76 |
| 芬替康唑 (fenticonazole) | 50 | 17.9 | 2.43 | 6.86 | 50 | 22.8 | 2.79 | 3.23 |

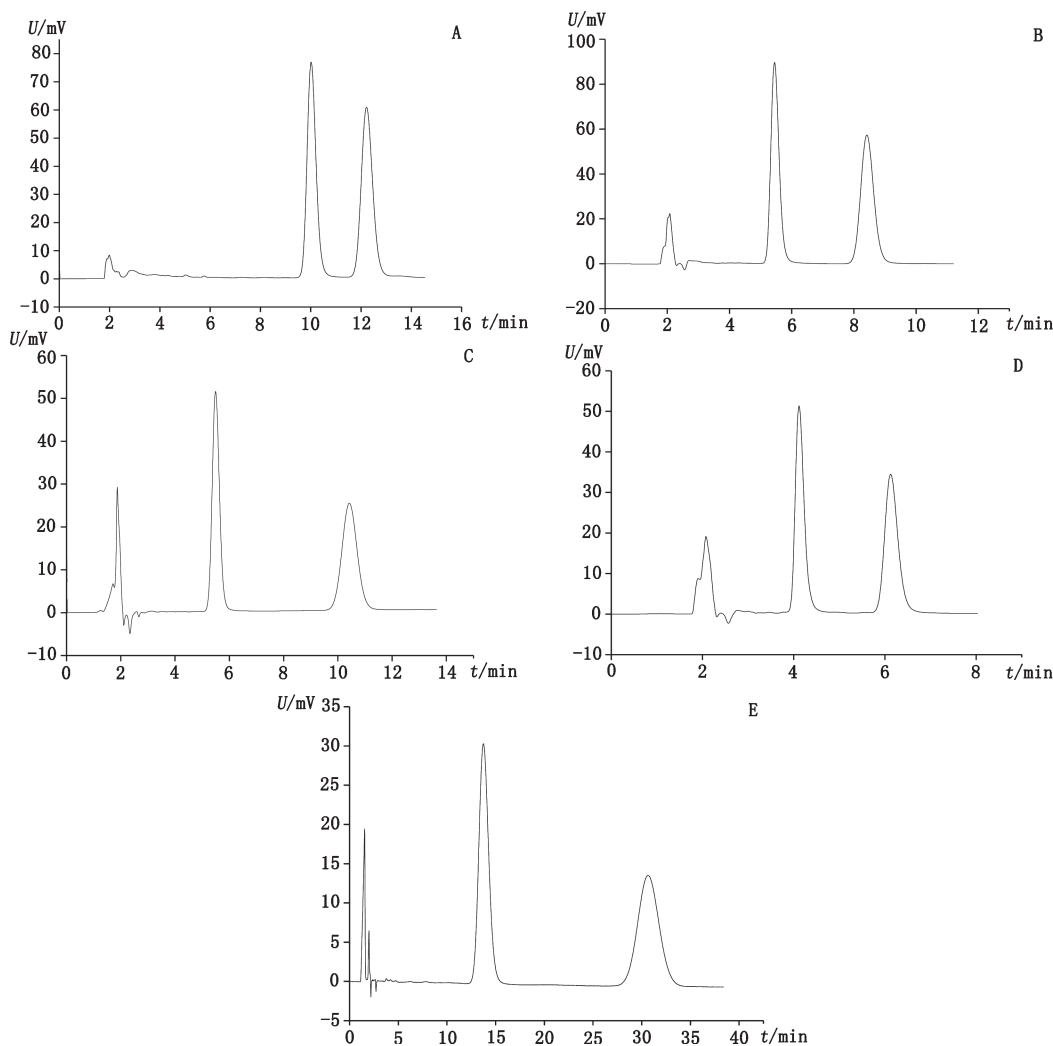
由表 1 可知, 2 种醇类改性剂对包括硫康唑在内的 5 个药物对映体均表现出了立体选择性。当使用正己烷和乙醇作为流动相时, 硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑均被完全分离; 当异丙醇作为改性剂时, 硫康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑能获得完全分离, 而咪康唑只能获得部分分离。此外, 与异丙醇相比, 乙醇为改性剂时能明显获得较高的柱效和对映体分离度。因此, 最后确定使用正己烷-乙醇为流动相分离 5 个药物对映体。

2.3.2 醇改性剂比例对分离的影响 研究了正己烷-乙醇体积比改变对硫康唑、咪康唑、益康唑、异康唑和芬替康唑对映体分离的影响, 结果见表 2。由表 2 可见, 随着流动相中乙醇比例的增加, 5 个药物的分析时间均缩短, 分离度也呈现出下降的趋势。综合考虑出峰时间、分离度和峰形, 选择分离硫康唑、咪康唑和异康唑流动相组成为正己烷-乙醇(80:20, v/v); 选择分离益康唑流动相组成为正己烷-乙醇(60:40, v/v); 选择分离芬替康唑流动相组成为正己烷-乙醇(20:80, v/v)。在最佳条件下分离得到的色谱图如图 2 所示。

表 2 醇改性剂比例对分离的影响

Tab. 2 Effect of the concentration of ethanol on chiral separation

| 药物 (drug) | 正己烷 (hexane)- 乙醇 (ethanol) | t_1 / min | α | R |
|-------------------------|-------------------------------|-------------|----------|------|
| 硫康唑 (sulconazole) | 90:10 | 22.9 | 1.30 | 3.58 |
| | 80:20 | 10.8 | 1.27 | 2.83 |
| | 70:30 | 7.8 | 1.25 | 2.27 |
| | 60:40 | 5.9 | 1.25 | 2.03 |
| 咪康唑 (miconazole) | 80:20 | 5.7 | 1.76 | 4.23 |
| | 70:30 | 4.6 | 1.71 | 3.56 |
| | 60:40 | 4.0 | 1.64 | 3.24 |
| 益康唑 (econazole) | 50:50 | 3.7 | 1.59 | 3.04 |
| | 80:20 | 10.0 | 2.34 | 7.41 |
| | 70:30 | 7.3 | 2.28 | 6.45 |
| 异康唑 (isconazole) | 60:40 | 5.7 | 2.24 | 5.96 |
| | 50:50 | 5.1 | 2.17 | 5.50 |
| | 90:10 | 6.7 | 1.92 | 5.83 |
| 芬替康唑 (fenticonazole) | 80:20 | 4.2 | 1.78 | 4.61 |
| | 70:30 | 3.5 | 1.75 | 3.77 |
| | 60:40 | 3.1 | 1.63 | 3.40 |
| | 50:50 | 17.9 | 2.43 | 6.86 |
| | 40:60 | 17.9 | 2.42 | 5.08 |
| | 30:70 | 16.2 | 2.41 | 5.01 |
| | 20:80 | 15.8 | 2.37 | 4.84 |



A. 疏康唑 (sulconazole) B. 咪康唑 (miconazole) C. 益康唑 (econazole) D. 异康唑 (isoconazole) E. 芬替康唑 (fenticonazole)

图 2 对应异构体分析 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of corresponding isomers under optimum conditions

2.3.3 柱温对分离的影响 在上述确定的最佳流动相条件下,研究了柱温在 25~40℃范围内变化对 5 个药物对映体分离的影响,并以此探讨化合物的手性识别机理。结果表明,随着柱温的升高,对映体保留时间缩短,分离度亦有所下降。说明低温更有利于其分离。

在液相色谱手性化合物分离中,色谱参数、柱温以及热力学参数之间关系可用如下关系式表示:

$$\ln \alpha = - \left(\frac{\Delta \Delta H^{\circ}}{RT} \right) + \frac{\Delta \Delta S^{\circ}}{R} \quad (1)$$

$$\ln k_i = - \left(\frac{\Delta H^{\circ}}{RT} \right) + \frac{\Delta S^{\circ}}{R} + \ln \Phi \quad (2)$$

其中公式(1)中 k_i 为保留因子, α 为分离因子,

是固定相与流动相体积比, R 为气体常数, T 为柱温 (单位为 K)^[13]。

分别以 5 个药物两对映体的 $\ln k_1$ 、 $\ln k_2$ 、以及 $\ln \alpha$ 对 $1/T$ 作图,建立回归曲线,发现 5 个药物均得到良好的线性关系 ($r^2 > 0.97$)。这说明固定相在柱温为 25~40℃使用时稳定,其构型未发生明显变化,保留机制及对映选择作用不变。由线性回归方程的斜率和截距可以得到对应的热力学参数,结果见表 3。由表 3 可以看出,5 个药物对映体在柱温 25~40℃范围内的 ΔH° 和 ΔS° 值均为负值,这表明其在固定相上的吸附为放热反应。除疏康唑和芬替康唑以外的其他 3 种药物的 $\Delta \Delta H^{\circ}$ 和 $\Delta \Delta S^{\circ}$ 均为负值,表明这 3 个药物对映体的拆分受焓驱动,即高温不利于它

们的分离。而硫康唑和芬替康唑的 $\Delta \Delta H^0$ 为负值, $\Delta \Delta S^0$ 为正值, 表明 2 种药物的对映体拆分不仅有焓驱动也有熵驱动, 即两者对手性识别皆有贡献。虽然硫康唑和芬替康唑的对映体分离度随着温度的升高而增加, 但在 25 °C 时, 两者的分离度均能满足对对

映体拆分的要求, 况且高温太高会对色谱柱不利。因此, 最后确定 25 °C 为 5 个药物对映体的最佳分离温度。此外, 根据 $\Delta \Delta H^0$ 的绝对值可知, 空间位阻、氢键作用和 $\pi-\pi$ 作用是 5 个药物对映体分离的主要作用力^[14]。

表 3 五种药物的热力学参数

Tab. 3 Thermodynamic parameters of five drugs

| 药物 (drug) | $\Delta H_1^0 /$ (kJ·mol ⁻¹) | $\Delta H_2^0 /$ (kJ·mol ⁻¹) | $\Delta S_1^0 + R \ln \varphi /$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) | $\Delta S_2^0 + R \ln \varphi /$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) | $\Delta \Delta H^0 /$ (kJ·mol ⁻¹) | $\Delta \Delta S^0 /$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) |
|--------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 硫康唑 (sulconazole) | -12.69 | -13.12 | -28.23 | -27.75 | -0.43 | +0.48 |
| 咪康唑 (miconazole) | -15.43 | -17.26 | -43.67 | -45.13 | -1.83 | -1.46 |
| 益康唑 (econazole) | -10.51 | -12.98 | -30.73 | -34.28 | -2.47 | -3.55 |
| 异康唑 (isconazole) | -19.41 | -22.27 | -56.98 | -59.89 | -2.86 | -2.91 |
| 芬替康 (fenticonazol) | -18.94 | -20.25 | -45.84 | -42.95 | -1.31 | +2.89 |

2.3.4 流速对分离的影响 采用上述优化的分离条件, 考察了流速变化 (0.6、0.8、1.0 mL·min⁻¹) 对 5 个药物对映体分离的影响。结果表明, 随着流速的降低, 分离度增加, 但降低流速的同时色谱峰变宽, 延长分析时间。综合考虑, 选择流速为 1.0 mL·min⁻¹。

3 结论

本文建立了 HPLC 手性固定相法分离 5 个抗真菌药物对映体。通过考察流动相组成和比例、柱温和流速对分离的影响, 优化了分离条件。在优化的分离条件下, 5 个消旋药物获得了良好的对映体分离。说明 Chiralcel OJ-H 柱适合本文研究的 5 个药物对映体的分离, 该方法简单可靠、准确可行、操作简单易实现, 该研究可以为具有光学活性的抗真菌药物对映体的纯度测定与拆分研究提供参考。

参考文献

[1] 卢慧斌. 氮唑类抗真菌药物的研究进展[J]. 内蒙古石油化工, 2003, 29(1): 12
LU HB. Research progress of azoles antifungal drugs[J]. Inner Mongolia Petrochemical Industry, 2003, 29(1): 12

[2] 刘超美, 杨济秋. 氮唑类抗真菌药物研究进展[J]. 世界临床药物, 1993, 14(3): 138
LIU CM, YANG JQ. Research progress of azoles antifungal drugs[J]. World Clin Drug, 1993, 14(3): 138.

[3] 廖永卫, 李鸿勋. 光学活性益康唑和咪康唑的对映体选择性合成

及其抗真菌活性[J]. 药学报, 1993, 28(1): 22

LIAO YW, LI HX. Enantioselective synthesis and antifungal activity of optically active isonazole and miconazole[J]. Acta Pharm Sin, 1993, 28(1): 22

[4] ABOULENEIN HY, ALI I. Comparative study of the enantiomeric resolution of chiral antifungal drugs econazole, miconazole and sulconazole by HPLC on various cellulose chiral columns in normal phase mode[J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 27(4): 441

[5] HAMDY DA, BROCKS DR. A stereospecific high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ketoconazole enantiomers in rat plasma[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(5): 542

[6] 刘爱, 葛文娜, 吴淑燕, 等. 手性流动相添加法拆分酮康唑外消旋体[J]. 色谱, 2009, 27(2): 240

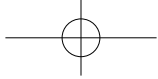
LIU A, GE WN, WU SY, *et al.* Separation of ketoconazole enantiomers using high performance liquid chromatography with chiral mobile phase additives[J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(2): 240

[7] 李关宾, 林秀丽, 蒋文强, 等. 胶束电动毛细管色谱法分离酮康唑手性异构体[J]. 分析化学, 2000, 5(5): 653

LI GB, LIN XL, JIANG WQ, *et al.* Separation of ketoconazole chiral isomers by micellar electrokinetic capillary chromatography[J]. Chin J Anal Chem, 2000, 5(5): 653

[8] 唐岚, 于海宁, 李成平等. 抗真菌药益康唑和咪康唑对映体的手性拆分研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(6): 917

TANG L, YU HN, LI CP, *et al.* Study on the chiral resolution of antifungal drugs econazole and miconazole enantiomers[J]. Chin J



- Pharm Anal, 2008, 28(6): 917
- [9] 李尚颖, 陈默, 张耀文, 等. Chiralcel OJ-H 手性色谱柱-HPLC 法同时分离 4 种 H1 受体拮抗药的对映体[J]. 中国药房, 2018, 29(30): 3189
- LI SY, CHEN M, ZHANG YW, *et al.* Simultaneous separation of 4 kinds of h1- receptor antagonist enantiomers by Chiralcel OJ-H Chiral Column-HPLC[J]. *China Pharm*, 2018, 29(30): 3189
- [10] 王敏. Chiralpak AD-H 和 Chiralcel OJ-H 手性固定相拆分扁桃酸系列化合物[J]. 色谱, 2014, 32(2): 198
- WANG M. Enantioseparation of mandelic acid compounds with Chiralpak AD-H and Chiralcel OJ-H chiral stationary phases[J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(2): 198.
- [11] 白小华, 韩小茜, 赵丽, 等. 手性农药三唑酮在 Chiralcel OJ-H 手性柱上的直接拆分[J]. 天水师范学院学报, 2007, 27(2): 47
- BAI XH, HAN XQ, ZHAO L, *et al.* Direct separation of Chiralcel OJ-H chiral column with triazolone[J]. *J Tianshui Norm Univ*, 2007, 27(2): 47
- [12] 韩小茜, 安丽丽, 刘万良. 外消旋农药氟环唑在 Chiralcel OJ-H 柱上的直接手性拆分[J]. 化学试剂, 2010, 32(11): 1030
- HAN XQ, AN LL, LIU WL. Direct chiral separation of the racemic pesticide flucycloazole on a Chiralcel OJ-H column[J]. *Chem Reag*, 2010, 32(11): 1030
- [13] 穆朋倩, 徐娜娜, 贾琪, 等. 环丙唑醇对映体的反相高效液相色谱分离及其热力学研究[J]. 农药学报, 2015, 17(5): 555
- MU PQ, XU NN, JIA Q, *et al.* Enantiomeric separation and thermodynamic investigation of cyproconazole by reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Chin J Pest Sci*, 2015, 17(5): 555
- [14] 赵丽, 韩小茜. 温度对外消旋单硒(硫)代缩水甘油醚手性拆分的影响[J]. 分析仪器, 2008, 2: 49
- ZHAO L, HAN XQ. Effects of temperature on chiral separation of racemic monoselenium (sulfur) in glycidyl ether[J]. *Anal Instrum*, 2008, 2: 49

(本文于 2020 年 1 月 6 日修改回)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统, 作者稿件一经本刊审核通过, 确定录用, 可优先数字出版, 同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录, 进入因特网提供信息服务, 并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件, 所有稿件须登录本刊网站 (<http://www.ywfxzz.cn>) 在线投稿, 并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用, 所有收费按本刊缴费通知办理。