

对氨基苯胂酸及其氧化物的色谱研究

康 建 马小峰 孟璐露 马东初

(沈阳军区总医院医学实验科 沈阳 110015)

提 要 用紫外分光光度计分析了其对氨基苯胂酸(PABAA)及其氧化物的光谱特征后,在十八烷基键合相硅胶柱上,以甲醇-缓冲液作流动相,研究了二者的容量因子随流动相离子强度、柱温、甲醇含量变化的规律。用季铵盐作离子对试剂,反相离子对色谱法分离 PABAA 时,分离机理符合离子对机理,在适当条件下,所试验的化合物都可有所保留。对保留值做出贡献的有固定相排阻作用、分配作用以及居次要地位的 PABAA 与固定相表面剩余硅醇基的相互作用。排阻作用及分配作用的相对重要性与流动相中甲醇和离子对试剂的浓度有关。

关键词 对氨基苯胂酸,对氨基苯胂酸氧化物,色谱行为

分类号 O658/R9

1 前言

砷化物能下调白血病细胞 BCL-2 基因表达,在治疗急性白血病和诱导白血病细胞凋亡研究中已取得许多新进展^[1]。对氨基苯胂酸(4-aminobenzene-arsonic acid, PABAA)系有机砷,其急性毒性比无机砷低,砷元素的氧化还原态与化学结构对其药效影响很大^[2],但对色谱行为的影响尚不甚清楚。本实验以 PABAA 为原料,对其还原后的氧化物(4-aminophenylarsine oxide, PAAPO)进行对照比较,采用离子对反相液相色谱分离,辅以外紫外求导光谱分析,探讨了 PABAA 及 PAAPO 的光谱特征与色谱行为。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 LC-10A(日本 Shimadzu 公司),配 SCL-10A 中心控制系统,SPD-10AD 紫外检测器及 C-R4A 色谱数据处理仪。紫外分光光度计 Lambda 2 型(美国 Perkin-Elmer 公司)。

PABAA(英国 BDH 公司);N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(Sigma 公司);其它试剂均为分析纯。去离子水经 Millipore 纯水器处理。

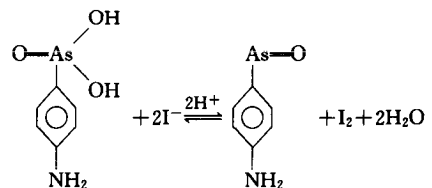
2.2 色谱条件

十八烷基键合硅胶柱(Nucleosil C₁₈),250 mm × 4.6 mm i. d.(中国科学院大连化学物理研究所)。流动相为 V(甲醇):V(含 10 mmol/L 磷酸二氢钾的水溶液) = 30:70,流速 0.8 mL/min,检测波长 254 nm,AUFS 0.05,温度 30 ℃。以质量分数为 10%的硝酸铵测定死体积。

2.3 对氨基苯胂酸氧化物的制备^[3]

PABAA 在酸性介质下,经碘化钾还原成三价砷的氧化物,加入硫代硫酸钠以除去反应碘,以淀粉

作指示剂滴定至蓝色消失为反应终点,经碱性溶液萃取后得到 PABAA 氧化物结晶。反应方程式为:



3 结果与讨论

3.1 紫外吸收光谱特征

将 PABAA 及 PAAPO 分别溶于甲醇溶液进行紫外光谱扫描。根据苯胺衍生物紫外光谱特征选择扫描范围,在 200~380 nm 范围内其光谱特征表现为 PABAA 的最大吸收峰处为 254 nm,其氧化物的最大吸收峰处为 258 nm,后者的整个谱峰比前者呈比例后移,见图 1-a。纯度定性系根据两个波长下吸收比为一常数且与浓度无关^[4],故根据 254 和 270 nm 处所测吸收系数比分别为 2.13 和 1.39 的结果可知,PABAA 和 PAAPO 系不同结构的化合物。三阶导数光谱显示二者的光谱特征见图 1-b。除 240 nm 附近有重叠外,其它波长处呈比例位移。不同批次样品的紫外光谱基本一致,仅在 320 nm 处有很小差异,这可能是由于杂质组分干扰,但主成分不变。

3.2 对氨基苯胂酸及其氧化物的色谱行为

3.2.1 甲醇的体积分数及 pH 的影响 PABAA 的醇羟基和氨基构成较强极性,通常在甲醇淋洗时需着重考虑 PABAA 及 PAAPO 在柱中的保留时间(t_R)。最初用体积分数为 90%的甲醇为流动相,二者保留时间与柱死体积时间相差不大,表明样品在柱中几乎不被保留(见图 2),此时固定相排阻起主要作用。分别用体积分数为 10%~90%的甲醇,由高至低递减溶剂强度,样品保留值随之增大,当甲醇

的体积分数低于 20% 时, 样品仅部分被洗脱, 信号

强度明显减小, 半峰宽增加。

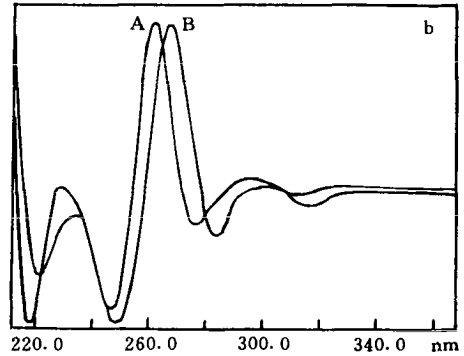
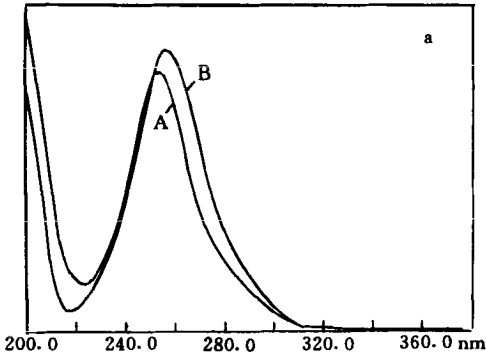


图 1 对氨基苯肿酸(A)及其氧化物(B)紫外吸收光谱比较

Fig. 1 Absorbance curves of PABAA (A) and PABAO (B)

a. 普通光谱(absorption spectra), b. 三阶导数光谱(third derivative spectra).

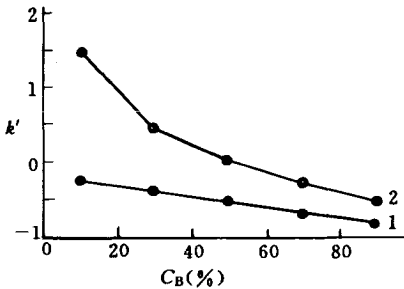


图 2 甲醇的体积分数对容量因子 k' 的影响
Fig. 2 Effect of methanol volume fraction on capacity factor k'

流动相为 A+B 溶液, 其中 A: 水, B: 甲醇。 C_B 为甲醇的体积分数。

Mobile phase: A+B; A; water; B; methanol. C_B : methanol volume fraction.

曲线(Curve): 1. PABAA, 2. PABAO.

以 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 30 : 70$ 溶液为流动相时, 用体积分数为 0.1% 的三氟乙酸调 pH 值为 2, PABAA 色谱峰展宽及拖尾严重, 同时保留值也较大。流动相 pH 值影响硅醇基的电离, 随着 pH 值的增大, 弱酸性的硅醇基将逐步电离为硅氧负离子, 与溶质间的相互作用将增大。甲醇的体积分数值较高时 PABAA 的色谱峰对称性较好; 随着甲醇体积分数值减少, 色谱峰逐渐出现拖尾。加入 DMF 可减少硅醇基的影响。

3.2.2 不同离子对试剂的影响 用含 5 mmol/L 十六烷基三甲基溴化胺的 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 30 : 70$ 的溶液作流动相时, PABAA 的保留时间增大为 19.41 min, 其氧化物在 60 min 内未观察到色谱峰。改用 10 mmol/L 四丁基溴化铵(TBAB)作离

子对试剂, PABAA 的保留时间为 12.43 min, PABAO 的保留时间达 56 min。固定其它条件, 改变 TBAB 在流动相中的体积分数, 结果见图 3。

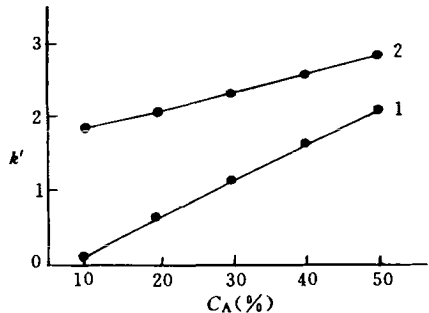


图 3 TBAB 的体积分数对容量因子 k' 的影响
Fig. 3 Effect of tetrabutyl ammonium bromide volume fraction on capacity factor, k'

流动相为 A+B+C 溶液, 其中 A: 10 mmol/L TBAB (溶于 C 中); B: 甲醇; C: 10 mmol/L KH_2PO_4 水溶液。固定 B 时, C_A 相当于流动相中 TBAB 的体积分数。

Mobile phase: A+B+C; A; 10 mmol/L TBAB (dissolved in C); B; methanol; C; 10 mmol/L KH_2PO_4 . When B fixed, C_A equals to TBAB volume fraction.

曲线(Curve): 1. PABAA, 2. PABAO.

随着离子对试剂浓度的增加, 样品保留值也增加, 这与离子对色谱法的一般规律一致, 且与甲醇含量有关。本实验观察到随着离子对试剂烷基链长度和浓度的增加(链长 > 4, 浓度 > 10 mmol/L), 易形成胶束色谱, 其分离机理不同于离子对色谱机理^[5]。

3.2.3 无机盐的影响 PABAA 易被电离, 在以简单的水及甲醇组成的流动相体系上几乎不产生保

留,流动相中加入离子对试剂及无机盐类修饰剂以增大其保留能力是使之分离的关键。若加入 10 mmol/L KH_2PO_4 便能使 PABAA 的 t_R 有所增加,但对 PAPA0 的 t_R 影响不大。值得注意的是,借助离子缔合效应来增大 PABAA 柱内保留能力是有限的,过多的盐的存在对硅胶键合相柱的使用是不利的,因此对其盐浓度变化应限制在 20 mmol/L 以内。

3.2.4 温度的影响 选择 4 个温度点 18, 28, 38 及 48 °C, 研究温度对 PABAA 及其氧化物的影响。结果表明,随着温度的升高,流动相粘度系数减小, PAPA0 流出时间加快,但对 PABAA 保留时间的影响不大,仅略有增加趋势,其原因尚不清楚,可能与固定相间的相互作用增大有关^[6](见表 1)。

3.2.5 分离机理 实验发现,在甲醇-水体系中两种试验化合物基本没有保留;流动相中加入无机盐, PABAA 可有一定保留;加入离子对试剂, PAPA0 和 PABAA 均有保留。根据“动态离子交换”机理,电荷越多,保留值应越大。但 PABAA 阴离子电荷比其氧化物多,保留值却较小,这可以从 PABAA 与 PAPA0 形成了离子缔合物这一假设中得到解释。在甲醇-水流动相中两种化合物均在硝酸铵之前出峰,这意味着流动相中的阳离子对分离是必不可少的,并

由此推测二者会形成离子缔合物。若形成离子缔合物,电荷越多、极性越强,在反相柱上的保留则越小,这与本结果相似,故分离机理为“离子对模型”。

表 1 温度对色谱保留时间的影响($n=3$)

Table 1 Retention times of PABAA and PAPA0 at different temperatures ($n=3$)

温度 Temperature(°C)	PABAA t_R /min	PAPA0 t_R /min
18	4.45±0.04	7.99±0.08
28	4.50±0.07	7.36±0.06
38	4.52±0.05	7.13±0.04
48	4.56±0.06	6.81±0.05

参 考 文 献

- 1 Chen G Q, Zhu J, Shi X G et al. Blood, 1996, 83: 1052-1061
- 2 Lin L, Wang J S, Caruso J. J Chromatograph Scie, 1995, 33:177-180
- 3 Erhlich P, Bertheim A. CA, 1910, 4:1752-1753
- 4 黄 芳, 康继宏, 郁 建等. 色谱, 1995, 13(1):33~37
- 5 Morin P, Amran M B, Lakkis M D et al. Chromatographia, 1992, 33:581-585
- 6 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章著. 离子对高效液相色谱法. 郑州:河南科学技术出版社, 1994. 94~97

Separation of *p*-Aminobenzenearsonic Acid and Its Oxide by Ion-Pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Kang Jian, Ma Xiaofeng, Meng Lulu and Ma Dongchu

(General Hospital of Shenyang, PLA, Shenyang, 110015)

Abstract To study the separation of *p*-aminobenzenearsonic acid (PABAA) and its oxide, *p*-aminophenylarsine oxide (PAPA0), both the absorption spectra were scanned at the wavelengths from 200 nm to 380 nm. PABAA had absorption maximum at 254 nm and PAPA0 258 nm. The effects of salt concentration, column temperature, methanol and ion-pair agent concentrations on the capacity factor were investigated. Compounds of high polarity showed almost no retention on reversed-phase column; as the volume fraction of the methanol decreased from 90% to 10%, the retention time of PABAA gradually increased with broad peak, and partially eluted when methanol volume fraction being below 20%. With temperature rising, the retention time of PABAA was decreased. But PABAA capacity factor can be increased by selecting an appropriate salt concentration for the mobile phase. The cetyltrimethyl and tetrabutyl ammonium ions were separately added as ion-pair agents to the mobile phase containing methanol in phosphate buffer of 10 mmol/L, the changes of retention time were observed. The mechanism of retention based on reversed phase ion-pair model is proposed. Besides, the retention behaviour is also influenced by size exclusion in stationary phase as well as polar interactions with residual silanol group on the silica surface.

Key words *p*-aminobenzenearsonic acid, *p*-aminophenylarsine oxide, chromatographic behaviour