

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

離子液體應用於對掌性光敏藥物之分離及有機磷萃取技術
的開發

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2113-M-041-002-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學醫藥化學系

計畫主持人：葉錦芬
共同主持人：何文岳、郭玉萍、李美貴



處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 27 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
 期中進度報告

離子液體應用於對掌性光敏藥物之分離及有機磷萃取技術
的開發

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2113-M-041-002

執行期間：96年08月01 日至 97年07月31日

計畫主持人：葉錦芬

共同主持人：李美貴、何文岳、郭玉萍

計畫參與人員：呂則融、莊雅玲、潘嘉玫等專題生

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學醫藥化學系

中 華 民 國 97 年 10 月 31 日

中文摘要

本研究以 1-甲基咪唑為起始物，與(R)-3-bromo-2-methyl-1-propanol 進行烷化反應，合成含有鹵素陰離子且具有光學活性之離子化合物後，再將此離子化合物與 $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$ 之無機鹽類進行陰離子交換反應，藉此得到具有光學活性之室溫型離子液體。將此對掌性離子液體，即為(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropyl) imidazolium+ NTf_2^- 以靜態塗佈(static coating)方式，塗佈於毛細管柱(長度：10 m、內徑：250 μm 、外徑：350 μm 、膜厚：0.66 μm)內壁作為氣相層析(gas chromatography, GC)之分離管柱，此靜相有助於對衍生化之酪胺酸(dl-tyrosine)的分離，解析度為 0.85。

另外，建立一套液相層析結合感應耦合電漿質譜儀(liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometer, LC-ICP-MS)的分離偵測系統，在一逆相層析管柱(Zorbax C-18, 4.6 x 150 mm, 5 μm)，流動相為含有離子對試劑 5 mmol L^{-1} tetrabutyl ammonium hydroxide 和 1% (v/v) methanol 之 50 mmol L^{-1} ammonium acetate/acetic acid buffer (pH 4.72) 的條件下，以 0.8 mL/min 之流速將 glyphosate, glufosinate, fosamine, ethephon 等四種有機磷化合物最適化的分離。

關鍵字：對掌性離子液體、氣相層析、衍生化之酪胺酸、高效能液相層析、感應耦合電漿質譜儀、機磷化合物

Abstract

A new type of chiral RTIL has been synthesized. An optical active anionic ionic compound is prepared from 1-methylimidazole react with (R)-3-bromo-2-methyl-1-propanol, then the result anionic compound is mixed with different salts like $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$ to undergo ion exchange reaction, and to form optical active RTIL. The new RTIL-coated capillary was prepared by the static method and investigated for performing the separation of enantiomers of *N*-trifluoroacetyl-*O*-alkyl esters of dl-tyrosine by gas chromatography.

Otherwise, this paper describes the approach that simultaneously separate four polar, water-soluble organophosphorus herbicides, i.e., glyphosate, glufosinate, fosamine and ethephon. The target herbicides were separated completely by ion pair chromatography on a reversed phase column, (Zorbax C-18, 4.6 x 150 mm, 5 μm), with 50 mmol L^{-1} ammonium acetate/acetic acid buffer (pH 4.72) containing 5 mmol L^{-1} tetrabutyl ammonium hydroxide and 1% (v/v) methanol flowing at 0.80 mL min^{-1} as the eluent. On-line inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using a quadrupole mass spectrometer was employed as a sensitive and selective detector of the effluents.

Key words: chiral room temperature ionic liquids, gas chromatography, *N*-trifluoroacetyl-*O*-alkyl esters of dl-tyrosine, high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry, organophosphorus pesticides

一、前言

室溫-離子溶液(Room-temperature ionic liquids, RTILs)為一種熔點接近或略低於室溫的鹽類，其係由一含有有機官能基的陽離子與各種陰離子所組合而成的離子性介質，它們在室溫下以液體的形式存在[1, 2]。RTILs 具有非揮發性、非燃性以及高的熱穩定性等性質，使得它們取代了傳統的有機溶劑而成為綠色化學(green chemistry)的理想溶劑。RTILs 的物性(如吸濕性、黏度、疏水性、表面張力、熔點與熱穩定性)可以由有機官能基環上的烷基碳數與陰離子的本性所主導。這種化學製備上的多樣性，亦使得 RTILs 成為化學溶劑的新寵，亦被稱為“Designer solvents”。目前它們已被廣泛地應用在有機合成、工業催化、電化學、液相萃取及作為氣相層析的固定相等。室溫離子液體的主要特性之一係可依實驗需求被設計、合成，因此目前有愈來愈多新離子液體被合成開發。如 Rogers 等人則發表在 RTIL 上陽離子上的有機官能基衍生成具有與金屬錯合配位劑，此種稱為 task-specific ILs [3]。

二、研究目的與文獻探討

對於製藥學與醫藥科學而言，對掌性異構物的分離是相當受到重視的。此乃由於對掌性異構物雖然具有相似的結構，但在生理學上卻有大相逕庭的表現，有時會對人體造成重大的傷害，藥物的分離便顯得格外重要[4]。由於毛細管電泳為另一種可取代傳統層析之分離技術，其發展與應用亦趨純熟，又基於 RTIL 的多樣性而將毛細管內壁塗覆修飾或鍵結上對掌性-RTIL 靜相，或作為緩衝液的添加劑以進行對掌性分析物的分離之相關文獻在今年亦有發表。如 Francois 等人合成兩種對掌性-RTIL，加入含有 β 環糊精的緩衝液內，探討對於分離 Carprofen 和 Suprofen 的影響[5]。

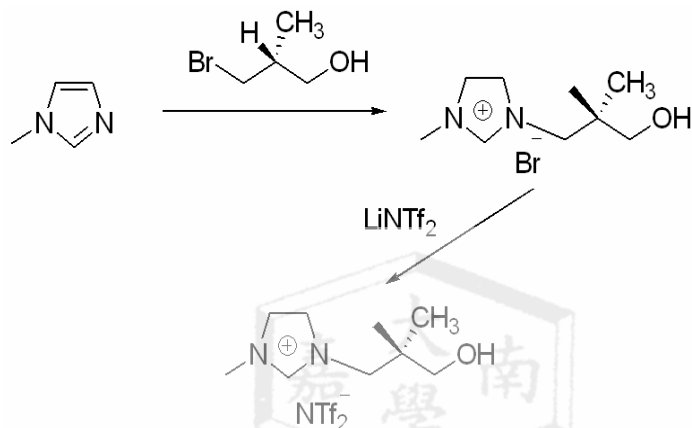
基於 95 年度研究計畫之延續，靜態塗佈方式對於 CE 之毛細管的適用性需要更謹慎的評估，結果發現對掌性-RTIL 會於進行電泳分析時剝落，導致對掌性胺基酸的分離不具再現性；若將對掌性-RTIL 加在緩衝溶液內卻無法進一步將對掌性胺基酸分離。不過，若能將已塗覆對掌性-RTIL 之毛細管柱作為 GC 之分離管柱，由於流動相是氣體，所以對已塗覆對掌性-RTIL 的剝落影響小，但卻會受到管柱溫度的影響。而類似將對掌性離子液體作為氣相層析靜相的文獻已有發表[6]。另外，依循文獻[7]選定 7 種 OPPs (monocrotopos, mevinphos, phosphamidon, omethoate, methamidophos, diazinon, parathion, phorate, malathion, fenitrothion)作為測試分析物，卻發現雖可在 GC-MS 分離偵測，卻無法以 LC-ICPMS 分離偵測，原因在於上述有機磷化合物需使用較多的有機溶劑作為液相層析的流動相，但學校分析檢測中心現有的 ICPMS 只能允許低於 10%(v/v)有機溶劑進入，所以搜尋相關文獻[8, 9]後，更改以極性較高的 4 種有機磷化合物-glyphosate, glufosinate, fosamine, ethephon，以所建立離子對層析法進行分離。

三、研究方法

(一). 對掌離子液體作為氣相層析之靜相於對掌異構物的分離應用

1. 對掌性-RTIL 的合成

建立合成對掌性-室溫離子液體的流程。以 1-甲基咪唑為起始物，與(R)-3-bromo-2-methyl-1-propanol 進行烷化反應，合成含有鹵素陰離子且具有光學活性之離子化合物後，再將此離子化合物與 KPF_6 或 $LiN(CF_3SO_2)_2$ 不同之無機鹽類進行陰離子交換反應，藉此得到具有光學活性與不同極性之室溫型離子液體(圖一)。



圖一 對掌性-室溫離子液體的合成流程

2. 對掌性-RTIL 塗覆於 GC 毛細管內壁的過程

本研究所使用的空毛細管柱為：Polymicro 公司所製，管柱規格為外徑 353 μm 、內徑 250 μm 、長度 10 m 之融矽石英毛細管柱，填充管柱之 5 mL 注射針為：HAMILTON 公司製造。用於封管柱口之真空膏為 APIEZON 公司所製造，M 級。去除管柱溶劑所用之真空抽氣馬達為 PANCHUM 公司製造，型號 VP-60D。恆溫水槽為 WISDOM 公司製造，型號 BO-2D。用於活化管柱處理之注射式幫浦為 KD 公司所製造，型號 101。

在管柱製備之前必須先活化管柱以利離子液體塗佈管壁的效果更佳。利用注射式幫浦依序將 0.1M NaOH 5 mL、二次水 10 mL、Acetone 5 mL 注入管柱內，流速約 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。利用 NaOH 將管柱侵蝕造成管壁腐蝕產生凹洞後，利用二次水將 NaOH 洗淨避免殘留造成管壁阻塞，最後再利用 Acetone 將水揮發，最後利用真空幫浦將管柱溶劑完全抽乾即完成活化管柱的部份。

本實驗選用塗佈靜相方法為靜態塗佈法(static method)，先設定所須膜厚，利用公式(1)、(2)計算出欲配製靜相濃度，將已配好之靜相溶液填充入毛細管內後再用真空抽氣馬達將溶劑抽乾，使其在毛細管壁上形成薄膜。而本實驗所有管柱膜厚都固定為 0.33 μm ，利用公式(2)計算[公式(2)由公式(1)經單位換算而得，公式(1)中 d_f 為管柱的膜厚，單位 μm ；c

為靜相濃度以體積百分比表示； r 為管柱的內徑，單位 μm ；公式(2)中 C 為靜相濃度，單位 mg/mL ； ρ 為靜相密度，單位 g/mL 各靜相所須配製濃度皆以二氯甲烷(dichloromethane)為溶劑(TEDIA，ABSLOV 級)， $d_f = rc / 200$ (1)

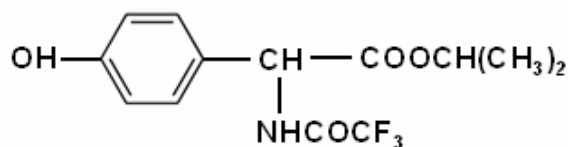
$$C(\text{mg/mL}) = 2000\rho d_f / r \text{(2)}$$

靜相種類	密度 $\rho(\text{g/mL})$	濃度 $C(\text{mg/mL})$	膜厚 (μm)
(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropanyl) imidazolium ⁺ NTf ₂ ⁻	1.60	8.45	0.66

表一、對掌性-RTIL 作為靜相之三種性質

3. 胺基酸的衍生步驟

循文獻[10]進行在冰浴的狀態下將異丙醇(4 mL)與 Acetyl chloride(1 mL)混合，取此混合液 500 μL 加入 5 mL 的梨型玻璃瓶中。再以水配製 0.1 M 胺基酸水溶液，取 0.1 M 胺基酸水溶液 500 μL 加入上述之 5 mL 的梨形玻璃瓶中。將瓶蓋蓋緊後，加熱 100 $^{\circ}\text{C}$ 持續 1 小時。吹氮氣移去溶劑後，加入 500 μL 的 Dichloromethane，再加入 100 μL 的 Trifluoroacetic anhydride，於室溫中靜置 10 分鐘，再吹氮氣移去溶劑。加入 500 μL 的 n-Hexane 溶解玻璃壁上的殘留物後，以等量的二次去離子水萃取未反應完之衍生試劑，萃取時以滴管小心的移去下層的水，萃取三次後，加入適量的無水硫酸鈉去除殘留的水，即完成胺基酸的衍生。本研究選用的胺基酸 Tyrosine 衍生後之結構如為圖二。



圖二 Tyrosine 衍生後之結構

4. 本研究用來測試管柱效能之儀器為氣相層析儀—火焰游離偵測器。氣相層析儀(Gas Chromatography)為 Agilent 6890N，所用管柱為毛細管管柱長 10 m，內徑 250 μm ，膜厚 0.66 μm ，以氮氣為載流氣體(carrier gas)，流量 0.8 mL/min，偵測器(detector)為火焰游離偵測器(Flame ionization Detector，FID)，氮氣 40 mL/min，空氣 400 mL/min，注射口及偵測器溫度皆設為 250 $^{\circ}\text{C}$ ，以非分流(splitless)注射模式。

(二). LC-ICPMS 於含磷有機化合物的分離應用

1. 4 種有機磷化合物-glyphosate, glufosinate, fosamine, ethephon 購自 Chem Service (West Chester, PA, USA)，純度 98%。精稱適當量配製成 1000 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ 之儲備溶液，儲存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 環境下備用。此 4 種有機磷化合物之結構如表二[8]所示。

Table 1. Chemical properties of herbicides of interest

Herbicide	Chemical name	Chemical structure	pK _a	Prime metabolite	P (%)	Molecular weight
Glyphosate	N-(phosphonomethyl)glycine	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	0.78, 2.09, 5.96, 10.98	Aminomethylphosphonic acid (AMPA)	18.32	169.1
Glufosinate	DL-homosalanin-4-yl-(methyl)phosphonic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \qquad \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	2.0, 2.9, 9.8	3-Methylphosphinicopropionic acid (MPPA), 2-methylphosphinoacetic acid	17.10	181.1
Fosamine	ethyl hydrogen carbamoylphosphonic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	—	Carbamoylphosphonic acid (CPA), unstable and degrades further	20.23	153.1
Ethephon	2-chloroethylphosphonic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	2.5, 7.2	Ethylene + phosphate	21.43	144.5

2. LC-ICPMS 的分離條件

HPLC 之分離管柱的出口以一 PFA 材質之管路(0.3 mm i.d.; 10 cm length)連接至 ICPMS 的霧化裝置上，其餘條件如表三所示。



表三 LC- ICP-MS的實驗操作條件

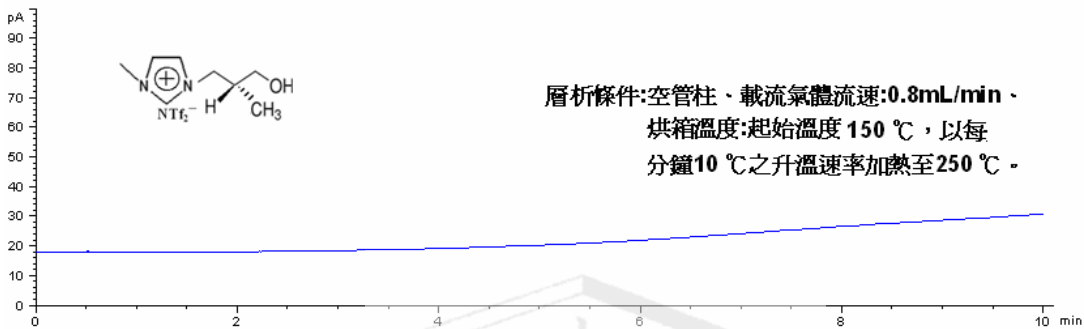
ICP-MS instrument	Agilent 7500a quadrupole ICP mass spectrometer (Yokogawa Analytical, Kyoto, Japan)
Plasma conditions	
RF power	1200 W
Plasma gas flow	15 L/min
Auxiliary gas flow	1.00 L/min
Nebulizer gas flow	1.04 L/min
Makeup gas (Ar) flow rate	0.00 L/min
Sampling depth	7.00 mm
Mass spectrometer settings	
Detector mode	pulse
Isotopes monitored	³¹ P
Sampling time	0.15 s per isotope
Acquiring data	600 s
Analysis	Agilent ICP-MS ChemStation software
LC system	SHIMADZU LC-20AT (Kyoto, Japan)
Injector	Rheodyne 7725i (USA), sample loop 20 µL
Column	Zorbax C-18, 4.6 x 150 mm, 5 µm (Agilent Technologies, , USA)
Mobile phase	5 mmol L ⁻¹ tetrabutyl ammonium hydroxide 和 1% (v/v) methanol 之 50 mmol L ⁻¹ ammonium acetate/acetic acid buffer (pH 4.72) 流速為 0.8 mL/min

四、結果與討論

(一). 對掌離子液體作為氣相層析之靜相於對掌異構物的分離應用

1. 對掌靜相在氣相層析之熱穩定性的探討

將管柱裝於氣相層析儀上，未注射樣品對該管柱進行升溫程式，以觀察背景值之穩定性。升溫條件為起始溫度 150 °C，以每分鐘 10 °C 之升溫速率加熱至 250 °C。背景值之穩定性如圖三所示。(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropyl) imidazolium⁺NTf₂⁻管柱的熱穩定性可維持在 6 分鐘後，即 210 °C 的管柱溫度時背景訊號才緩慢地上升，從背景訊號的增加推測是靜相的些微滲出所造成的。



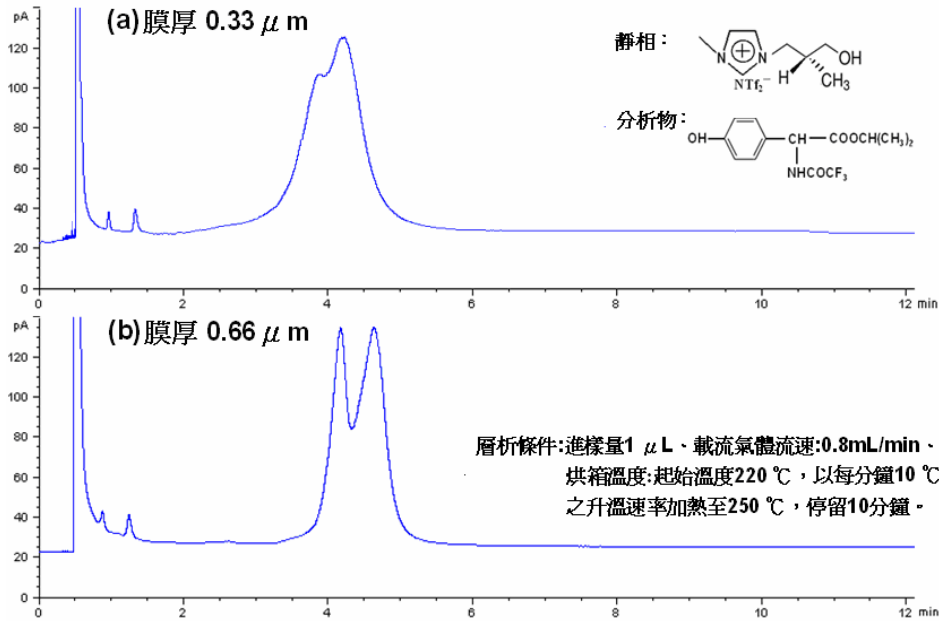
圖三 對掌靜相在氣相層析之熱穩定性

2. 管柱靜相之膜厚

膜厚是影響滯留能力及分離效率之重要因素之一，隨著膜厚的增加，對兩個滯留時間相近的化合物之分離效果越好，且有較大的樣品負荷量，但靜相之極限溫度會因膜厚的增加而下降，並且靜相之滲出現象也會隨之增加。一般常見市售的氣相層析管柱中，靜相膜厚之厚度約 0.25 μm 至 0.50 μm，長度為 30 m，主要是用在流出溫度低於 300 °C 之樣品。對於流出溫度高於 300 °C 之樣品而言，選用靜相膜厚為 0.1 μm 之管柱是較為理想的，而且管柱之長度通常會較短，約 10 至 15 m 長[11]。

本研究中，管柱塗佈之膜厚原為 0.33 μm。圖四為

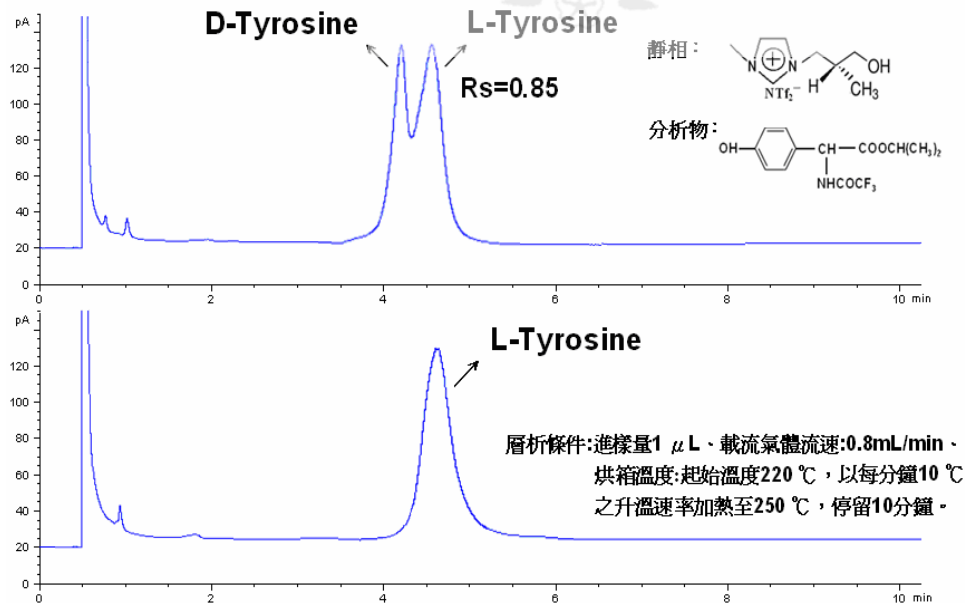
(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropyl)imidazolium + NTf₂—管柱，打入衍生後的 DL-Tyrosine 之結果。但於圖四-(a)中發現，分析物之解析度十分有限。為增加靜相與分析物之作用力，而將管柱之膜厚增加為 0.66 μm，其解析度提高至 0.85。如圖四(b)。固本研究之管柱塗佈膜厚定為 0.66 μm。



圖四 對掌靜相之膜厚對 DL-Tyrosine 分離之影響

3. DL-Tyrosine 的分離

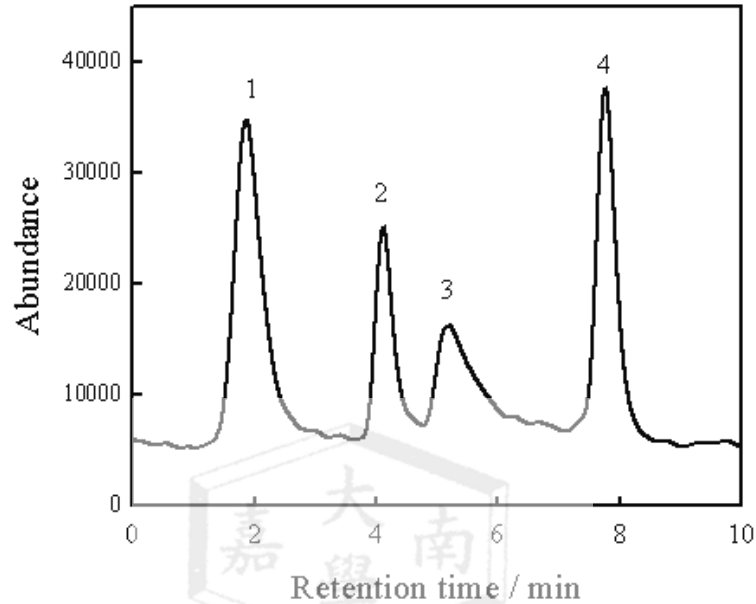
(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropyl) imidazolium⁺NTf²⁻管柱中，我們預期其陽離子結構的咪唑芳香環能與待分析之物質產生 $\pi - \pi$ interaction、烷鏈之長短可以控制分子間的凡得瓦力、而烷鏈上的 OH 官能基亦可形成 Hydrogen bonding 且烷鏈上之甲基能有立體障礙之效果。在此靜相中 DL-Tyrosine 的解析度為 0.85，如圖五所示。



圖五 DL-Tyrosine 在對掌靜相的分離行為

(二). LC-ICPMS 於含磷有機化合物的分離應用

由於所選擇之 4 種有機磷化合物-glyphosate, glufosinate, fosamine, ethephon 含有磷酸根的基團，因此其在特定 pH 值具有帶負電荷的本性，會與正電荷的離子對試劑形成離子對，如此即可在逆相層析管柱分離。其層析圖如圖六所示。



圖六 有機磷化合物的層析圖，分離條件如表三所示。層析峰標示依序如下：1, ethephon; 2, glufosinate; 3, glyphosate; 4, fosamine。

五、計畫成果與自評

首先感謝貴單位的經費補助，讓新進人員—我能在獲得博士學位後，回到教學單位仍可擁有繼續學術研究的環境。執行迄今，研究內容與原計畫相符程度約五成左右；對於達成預期目標情況，尚有一些困難需要突破解決。目前本計畫之成果在於已經建立一套毛細管塗佈的裝置。

基於 95 年度研究計畫之延續，靜態塗佈方式對於 CE 之毛細管的適用性需要更謹慎的評估，結果發現對掌性-RTIL 會於進行電泳分析時剝落，導致對掌性胺基酸的分離不具再現性；若將對掌性-RTIL 加在緩衝溶液內卻無法進一步將對掌性胺基酸分離。不過，若能將已塗覆對掌性-RTIL 之毛細管柱作為 GC 之分離管柱，由於流動相是氣體，所以對已塗覆對掌性-RTIL 的剝落影響小，但卻會受到管柱溫度的影響。本研究中所設計的

(R)-1-methyl-3-(2-methyl-3-hydroxypropanyl)imidazolium⁺NTf₂⁻ 對掌靜相，成功的分離了 DL-Tyrosine，解析度為 0.85。雖然此靜相之解析度尚未達到最理想的狀況，但結果證明了此靜相之設計針對類似 Tyrosine 之結構是具有對掌辨識能力的。有了本研究作為基礎，未來有三個方向可以持續探討：(1)可試著增加膜厚，長度不變；(2)或固定膜厚為 0.66 μm，長度加倍。以增加解析度，達到基線分離。

(3)可選擇具有苯環及 OH 基之對掌性藥物，於本系統下進行分離。往後將可以設計更多不同類型之對掌性離子液體來分離對掌異構物。另外，已經將購置之液相層析幫浦結合學校分析檢測中心現有的 ICPMS 建立一套分離與元素偵測的系統，以離子對層析法成功分離極性較高的4種有機磷化合物-glyphosate, glufosinate, fosamine, ethephon。未來應會更積極將攪拌子吸附萃取法儘速建立，以趕上進度，而有好的成果發表。

當然，私立科技大學的學生素質不足，帶領著他們進行專題研究，需要更多的耐心與時間的付出。因此，研究如何與教學並重亦考驗著在私立科技大學任教的我，當然與不同領域的學術研究工作者合作亦是條途徑吧！

六、參考文獻

1. Welton, T.; *Chem. Rev.* 1999, 99, 2071
2. Villagrán, C.; Deetlefs, M.; Pitner, W. R.; Hardacre, C.; *Anal. Chem.* 2004, 76, 2118
3. Visser, A. E.; Swatoski, R. P.; Reichert, Mayton, R.; Sheff, S.; Wierzbicki, A.; Davis, J. H.; Rogers, R. D.; *Chem. Commun.* 2001, 135
4. 謝茜如、魏國佐 *Chemistry (The Chinese Chem. Soc. Taipei)* 2001, 59, 409
5. Francois, Y.; Varenne, A.; Juillerat, E.; Villemin, D.; Pierre G.; *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 134
6. Ding, J.; Welton, T.; Armstrong, D. W.; *Anal. Chem.* 2004, 76, 6819
7. Zhu, X.; Cai, J.; Marx, B.; Yang, J.; Su, Q.; Gao, Y.; *J. Chromatogr. A* 2006, 1131, 37
8. Guo, Z-X.; Cai, Q.; Yang, Z.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 1606
9. Sadi, B. B. M.; Vonderheide, A. P.; Caruso, J. A.; *J. Chromatogr. A*, 2004, 1050, 95
10. Španik, I.; Krupčík, J.; Skačáni, I.; Sandra, P.; Armstrong, D. W.; *J. Chromatogr. A*, 2005, 1071, 59
11. <http://www.5zu.cn/post/10175.html>