

## 2,6-二-O-戊基- $\beta$ -环糊精涂渍 Symmetry C<sub>8</sub> 柱拆分 扁桃酸及其类似物对映体

阮源萍<sup>1,2</sup>, 张雪曼<sup>1,2</sup>, 陈安齐<sup>1</sup>, 邱海源<sup>1</sup>, 黄培强<sup>1</sup>

(1. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:**利用合成的 2,6-二-O-戊基- $\beta$ -环糊精涂渍 Symmetry C<sub>8</sub> 色谱柱,研究了扁桃酸及其类似物等 6 种外消旋对映体的反相高效液相色谱拆分。优化了色谱分离条件,探讨了扁桃酸的手性拆分机理。结果表明,采用优化后的甲醇-水或甲醇-0.5%三乙胺-乙酸缓冲液流动相等色谱条件,扁桃酸、扁桃酸甲酯、苯基甘氨酸、苯基琥珀酸和安息香等 5 种外消旋对映体达到或接近基线分离,其中前 4 种对映体均为(S)-构型先出峰。该法可用于实际样品的对映体纯度测定。

**关键词:**高效液相色谱法;手性固定相;2,6-二-O-戊基- $\beta$ -环糊精;对映体分离;手性分离;扁桃酸

**中图分类号:** O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2004)04-0420-04

## Enantiomeric Separation of Mandelic Acid and Its Analogues by High Performance Liquid Chromatography with 2,6-Di-O- Pentyl- $\beta$ -Cyclodextrin Coated Symmetry C<sub>8</sub> Column

RUAN Yuanping<sup>1,2</sup>, ZHANG Xueman<sup>1,2</sup>, CHEN Anqi<sup>1</sup>, QIU Haiyuan<sup>1</sup>, HUANG Peiqiang<sup>1</sup>

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Key Laboratory of Analytical Sciences of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** 2,6-Di-O-pentyl- $\beta$ -cyclodextrin, synthesized from  $\beta$ -CD in dimethyl sulfoxide (DMSO), was dynamically coated on a Symmetry C<sub>8</sub> column through hydrophobic interaction. Using the coated column, the resolution of six racemic mixtures of mandelic acid and its analogues by reversed-phase high performance liquid chromatography was achieved: ( $\pm$ )-mandelic acid, ( $\pm$ )-mandelic acid methyl ester, ( $\pm$ )-mandelic acid ethyl ester, ( $\pm$ )-2-phenyl-glycine, ( $\pm$ )-phenylsuccinic acid and ( $\pm$ )-benzoin. The enantiomeric separation mechanism is discussed. The method can be applied conveniently to determine the enantiomeric excess of mandelic acid and its analogues.

**Key words:** high performance liquid chromatography; chiral stationary phase; 2,6-di-O-pentyl- $\beta$ -cyclodextrin; enantiomeric separation; chiral separation; mandelic acid

环糊精(cyclodextrin, CD)具有独特的手性疏水空腔结构,在分子识别中占有重要的地位。作为手性选择子,各种天然的和衍生化的环糊精广泛应用于气相色谱、液相色谱、毛细管电泳等领域的手性分离研究<sup>[1]</sup>。在高效液相色谱(HPLC)中,采用 $\beta$ -CD和甲基化 $\beta$ -CD拆分扁桃酸及其类似物已有一些报道<sup>[2-5]</sup>。如 Debowski 等人<sup>[2]</sup>以 $\beta$ -CD作为手性流动相添加剂,用反相高效液相色谱研究了扁桃酸的拆分,但实际效果很不理想。Fujimura 等人<sup>[3]</sup>和 Armstrong 等人<sup>[4]</sup>采用 $\beta$ -CD柱研究了扁桃酸及其相关化合物的拆分。Zukowski 等人<sup>[5]</sup>采用低浓度

甲基化 $\beta$ -CD(DM- $\beta$ -CD和TM- $\beta$ -CD)作为流动相添加剂,在ODS微柱上较好地拆分了扁桃酸及其甲酯和乙酯对映体。

本文采用自行研制的 2,6-二-O-戊基- $\beta$ -环糊精涂渍 Symmetry C<sub>8</sub> 色谱柱,以反相高效液相色谱模式研究了扁桃酸及其类似物等 6 种外消旋对映体(结构见图 1)的色谱拆分。文中考察了流动相中甲醇比例、pH 值对扁桃酸及其类似物对映体色谱拆分的影响,探讨了扁桃酸的手性拆分机理。本法可用于一些实际光学活性扁桃酸及其类似物的对映体纯度测定。

收稿日期:2003-09-16

作者简介:阮源萍,男,副教授,研究方向为手性液相色谱, Tel: (0592)2182442, E-mail: ypruan@jingxian.xmu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20272048, 203900505).

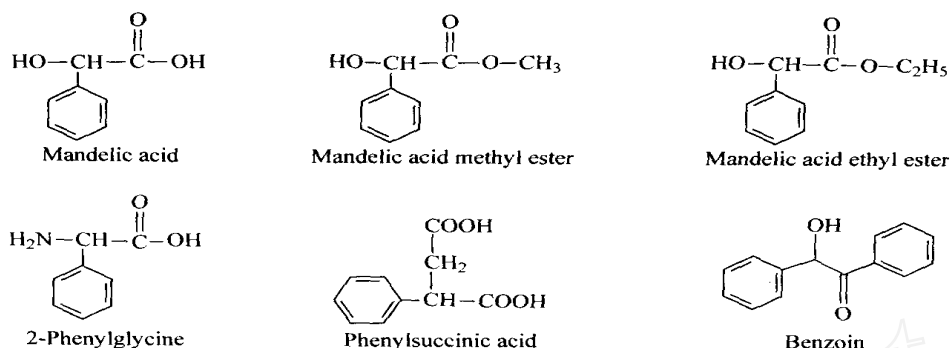


图 1 扁桃酸及其类似物的结构图  
Fig.1 Structures of mandelic acid and its analogues

## 1 实验部分

### 1.1 实验仪器与试剂

美国 TSP 公司的 HPLC 仪:Consta METRIC 3500-3200 型高压梯度泵;Spectra SYSTEM UV-2000 型双波长紫外-可见光吸收检测器;Rheodyne 7725i 进样阀;PC1000 色谱工作站。Waters 公司的 Symmetry C<sub>8</sub> 色谱柱 (3.9 mm i. d. ×150 mm, 4 μm)。Nicolet AVATAR FT-IR 360 型红外光谱仪;Varian + 500 型核磁共振仪;Finnigan Mat-LCQ 型液相色谱-质谱仪。Mettler Toledo 320 pH 计。

$\alpha$ -环糊精、溴代正戊烷(化学纯)、三乙胺(分析纯)、乙酸(分析纯)、扁桃酸(分析纯)、安息香(化学纯)为上海试剂公司产品。(R)-扁桃酸为 Zeeland 化学公司产品。外消旋苯基琥珀酸、2-苯基甘氨酸和(S)-苯基甘氨酸为 Fluka 公司产品。光学纯的苯基琥珀酸采用 L-脯氨酸结晶拆分。外消旋扁桃酸甲酯、(R)-扁桃酸甲酯和外消旋扁桃酸乙酯为本实验室合成品。甲醇为国产色谱纯溶剂,水为二次重蒸去离子水。

### 1.2 2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -环糊精的合成和表征

2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD 的合成参照文献[6]进行。采用红外(IR)、核磁共振(NMR)和质谱方法对戊基化- $\alpha$ -CD 合成品进行结构表征。IR (KBr),波数( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 425, 2 960, 2 931, 2 870, 1 461, 1 362, 1 157, 1 089, 1 038  $\text{cm}^{-1}$ 。<sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz),化学位移( $\delta$ ): 4.95, 4.92, 4.48, 3.88, 3.72, 3.60, 3.35, 3.25, 1.5, 1.3, 0.85。ESI-MS

$m/z$  (相对丰度, %): 1 647.8 ( $[M+Na]^+$ , 100), 1 718.9 ( $[M+Na]^+$ , 54), 1 776.7 ( $[M+Na]^+$ , 43)。结构分析表明,戊基化- $\alpha$ -CD 产品为 2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD,每个- $\alpha$ -CD 分子的平均戊基取代度约为 7.7。

### 1.3 涂渍过程

配制 500 mL 含 0.65 g/L 2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD 的甲醇-水(体积比为 70:30)涂渍流动相,经 0.45 μm 膜抽滤和除气后,以 0.6 mL/min 流过 Symmetry C<sub>8</sub> 柱进行涂渍。由于戊基化- $\alpha$ -CD 明显增强了环糊精外表面的疏水性,因此它们能够强烈地吸附在反相柱上形成涂渍手性固定相。涂渍后,以不含 2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD 的甲醇-水(体积比为 60:40)流动相冲洗色谱柱 20 min 后备用。采用纯甲醇流过涂渍柱可除去 2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD,恢复反相柱的使用或重新涂渍。

## 2 结果与讨论

### 2.1 扁桃酸及其酯衍生物对映体的拆分

扁桃酸的  $pK_a$  为 3.41,在水中易发生电离。采用甲醇-0.5%三乙胺-乙酸缓冲液(TEAA)(体积比为 8:92)流动相,控制合适的 pH 值,扁桃酸可得到较好的拆分。从表 1 可以看出:随着流动相 pH 值的减小,扁桃酸的保留因子( $k$ )增加,选择性因子( $\alpha$ )增大,分离度( $R_s$ )增加,峰形得到改善,流动相的最佳酸度为 pH 3.00;随着流动相中甲醇比例的降低,外消旋扁桃酸对映体的保留因子和分离度明显增大,对映体选择性也略有增加。

表 1 流动相 pH 值和甲醇的体积分数对扁桃酸拆分的影响

Table 1 Effects of pH value and methanol volume fraction in mobile phase on resolution of mandelic acid

pH <sup>1)</sup>	$k$	$\alpha$	$R_s$	(MeOH) <sup>2)</sup> / %	$k$	$\alpha$	$R_s$
6.00	6.47	1.19	1.10	30	5.02	1.25	1.15
5.00	7.09	1.21	1.25	24	8.34	1.25	1.96
4.00	9.22	1.27	1.74	18	11.05	1.26	2.03
3.00	24.51	1.30	2.60	12	18.92	1.26	2.30

Mobile phases: 1) MeOH:0.5% TEAA (8:92, v/v); 2) MeOH:0.5% TEAA (pH 3.00). Flow rate: 1.0 mL/min.

扁桃酸甲酯和扁桃酸乙酯为中性化合物,可以直接采用甲醇-水流动相进行分离。采用甲醇-水(体积比为 16:84)流动相时,扁桃酸甲酯也达到基线分离, $k'$ 和 $R_s$ 分别为 14.13, 1.18 和 1.60。由于扁桃酸乙酯的疏水性增大,因而保留时间延长,在实验中未能达到基线分离。图 2 给出外消旋扁桃酸

及其甲酯和乙酯衍生物拆分色谱图,出峰顺序采用单一对映体样品确认。值得注意的是,若采用 MeOH-0.5%TEAA(体积比为 25:75)流动相,扁桃酸甲酯在 2,6-二-O-戊基- $\beta$ -CD 涂渍  $C_8$  柱上的出峰时间比扁桃酸提前,这一结果与  $\beta$ -CD 键合柱分离结果<sup>[4]</sup>相似。

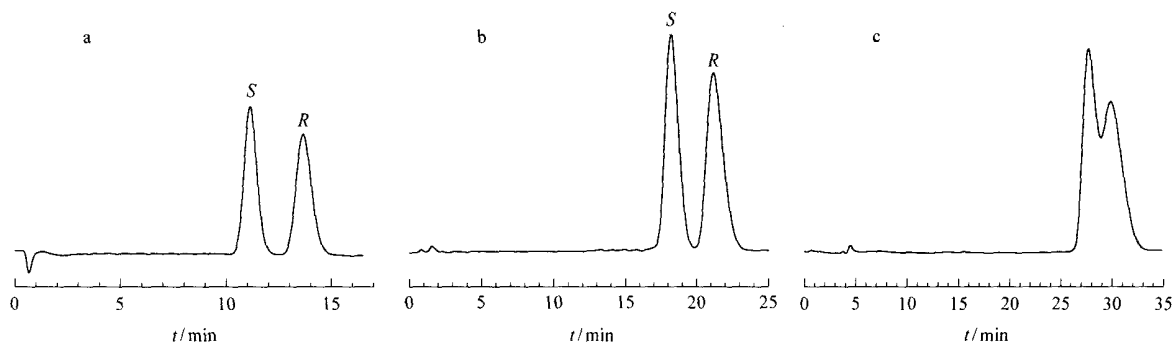


图 2 外消旋扁桃酸(a)、扁桃酸甲酯(b)和扁桃酸乙酯(c)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of racemic mandelic acid (a), mandelic acid methyl ester (b) and mandelic acid ethyl ester (c)  
Column: 2,6-di-O-pentyl- $\beta$ -CD coated on Symmetry  $C_8$ ; mobile phases: a. MeOH-0.5%TEAA (pH 3.00) (24:76, v/v), b. MeOH-H<sub>2</sub>O (16:84, v/v), c. MeOH-H<sub>2</sub>O (20:80, v/v); flow rate: 1.0 mL/min; detection: UV at 254 nm.

## 2.2 扁桃酸类似物对映体的拆分

苯基甘氨酸、苯基琥珀酸和安息香是 3 个与扁桃酸结构相似的化合物。Debowski 等人<sup>[2]</sup>采用  $\beta$ -CD 作为手性流动相添加剂未能拆分苯基甘氨酸。最近,本文作者<sup>[7]</sup>报道采用 TM- $\beta$ -CD 手性流动相添加剂拆分了苯基琥珀酸。朱军和邹汉法等人<sup>[8]</sup>采用  $\beta$ -CD 固定相填充电色谱柱较好地拆分了安息香。Chen 等人<sup>[9]</sup>用新型衍生化环糊精固定相、Riering 等人<sup>[10]</sup>在全甲基  $\beta$ -CD 柱上采用 HPLC 拆分了安息香。

苯基甘氨酸的  $pK_a$  分别为 1.83 和 4.39。采用 MeOH-0.1%TEAA(体积比为 5:95)流动相考察 pH 对分离的影响,结果表明,随着流动相 pH 值的降低,苯基甘氨酸的保留时间变小,选择性因子降低,

当 pH 2.20 时几乎没有拆分。进一步在甲醇体积分数为 0~5%的 MeOH-0.1%TEAA(pH 6.0)流动相中进行优化实验,发现苯基甘氨酸在不含甲醇的 0.1%TEAA 流动相中的拆分效果最好, $k'$ 和 $R_s$ 分别为 1.46, 1.26 和 1.65。苯基琥珀酸的  $pK_a$  分别为 3.78 和 5.55,采用 MeOH-0.5%TEAA (pH 3.00)(体积比为 60:40)流动相分离, $k'$ 和 $R_s$ 分别为 2.88, 1.29 和 1.95。这一结果明显好于采用 CHIREX 3019 型手性柱正相色谱的拆分效果<sup>[11]</sup>。安息香是中性化合物,采用甲醇-水(体积比为 45:55)流动相也接近基线拆分, $k'$ 和 $R_s$ 分别为 28.13, 1.14 和 1.45。实验表明:随着流动相中甲醇比例的降低,苯基琥珀酸和安息香的保留因子和分离度均增大。图 3 给出外消旋苯基甘氨酸、苯基琥

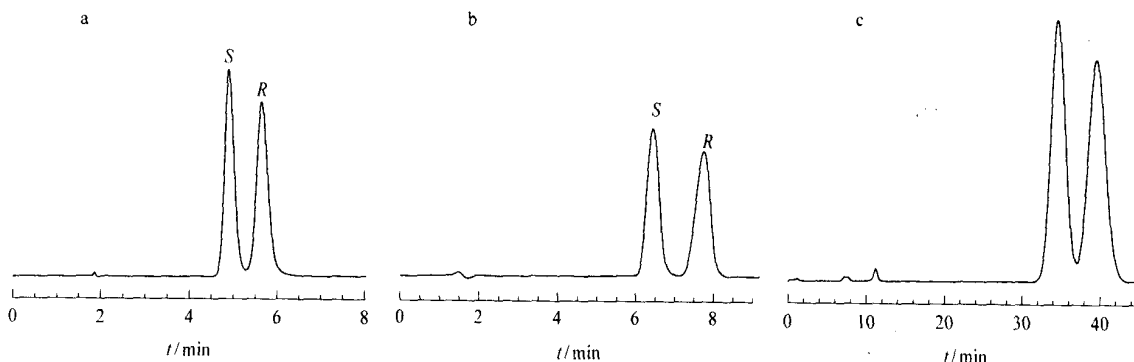


图 3 外消旋苯基甘氨酸(a)、苯基琥珀酸(b)和安息香(c)的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of racemic 2-phenylglycine (a), phenylsuccinic acid (b) and benzoin (c)  
Column: 2,6-di-O-pentyl- $\beta$ -cyclodextrin coated on Symmetry  $C_8$ . Mobile phases: a. 0.5%TEAA aqueous solution (pH 6.0), 0.6 mL/min; b. MeOH-0.5%TEAA (pH 3.0) (60:40, v/v), 0.7 mL/min; c. MeOH-H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), 1.0 mL/min. Detection: UV at 254 nm.

珀酸和安息香拆分色谱图。

### 2.3 扁桃酸手性拆分机理的探讨

在2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD涂渍柱上,(S)-扁桃酸在(R)-扁桃酸之前出峰,与DM- $\alpha$ -CD流动相添加剂法中的出峰顺序<sup>[5]</sup>一致,但与TM- $\alpha$ -CD流动相添加剂法出峰顺序<sup>[5]</sup>相反。Salvatierra等<sup>[12]</sup>采用NMR测定了 $\alpha$ -CD对(R)-扁桃酸和(S)-扁桃酸的包络常数分别为811和178(mol/L)<sup>-1</sup>,说明 $\alpha$ -CD对(R)-扁桃酸的包络稳定性高。(R)-扁桃酸在涂渍柱上后出峰的这一结果也表明,2,6-戊基- $\alpha$ -CD/(R)-扁桃酸包络物比较稳定。最近作者<sup>[7]</sup>也发现苯基琥珀酸在2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD涂渍柱上的出峰顺序也正好与TM- $\alpha$ -CD流动相添加剂法的出峰顺序相反。这些结果说明 $\alpha$ -CD大环空腔口的C-2和C-3位基团的氢键能力直接影响到它对扁桃酸对映体的包络程度,可能是决定分子手性识别的主要因素。环糊精C-3位上的羟基被烷基化后,强氢键作用的减弱可能是使扁桃酸对映体出峰顺序发生逆转的重要原因。

### 2.4 涂渍柱的稳定性

在实际应用中,涂渍柱的稳定性是一个值得关注的重要问题。2,6-二-O-戊基是否流失取决于流动相中甲醇的比例。甲醇比例越低,稳定性越好。采用以甲醇-水(体积比为50:50)在0.6 mL/min流速下连续冲洗2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD涂渍柱的方式考察涂渍柱的稳定性(见表2),结果表明,冲洗48 h,安息香的k值略有下降,但涂渍柱还保持良好的拆分能力。

表2 涂渍柱的稳定性

Table 2 Stability check of the coated column

V/mL	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>
200	17.67	20.10
410	17.70	20.12
600	17.59	20.09
900	17.55	20.05
1 330	17.59	19.99
1 750	17.51	19.93

Solute: (±)-benzoin. Mobile phase: MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v).

在pH 3.0的MeOH:0.5% TEAA(体积比为8:92)流动相中,6次平行分析外消旋扁桃酸对映体的平均保留时间分别为(10.86±0.08) min和(13.58±0.12) min,相对峰面积分别为(50.20±0.08)%和(49.80±0.08)%。(S)-扁桃酸和(R)-扁桃酸的柱效分别为1.04×10<sup>4</sup>/m和1.00×10<sup>4</sup>/m。

### 3 结语

基于疏水作用原理,2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD强烈地吸附在Symmetry C<sub>8</sub>固定相表面。扁桃酸及其类似物等6种外消旋对映体在这一新型涂渍固定相上得到很好的拆分。2,6-二-O-戊基- $\alpha$ -CD涂渍柱的手性分离特性与甲基化 $\alpha$ -CD流动相添加剂法及 $\alpha$ -CD柱有所不同,但 $\alpha$ -CD的包络作用在手性拆分过程中起着重要作用。

### 参考文献:

- [1] Juvancz Z. Trends in Anal Chem, 2002, 21(5): 379
- [2] Debowski J, Sybilka D, Jurczak J. Chromatographia, 1982, 16: 198
- [3] Fujimura K, Kitagawa M, Takayanagi H, Ando T. J Liq Chromatogr, 1986, 9(2-3): 607
- [4] Armstrong D W, Han Y I, Han S M. Anal Chim Acta, 1988, 208: 275
- [5] Zukowski J, Nowakowski R. J Liq Chromatogr, 1989, 12(9): 1545
- [6] Dai Rongji, Fu Ruonong. Chemical Reagents (戴荣继,傅若农. 化学试剂), 1997, 19(2): 65
- [7] Ruan Yuanping, Zheng Zida, Zhang Xueman, Huang Peiqiang. Journal of Instrumental Analysis (阮源萍, 郑子达, 张雪曼, 黄培强. 分析测试学报), 2004, 23(1): 55
- [8] Zhu Jun, Zou Hanfa, Shi Wei, Rui Jianzhong, Ni Jianyi, Zhang Yukui. Science in China, Series B (朱 军, 邹汉法, 施 维, 芮建中, 倪坚毅, 张玉奎. 中国科学, B 辑), 1999, 29(5): 418
- [9] Chen L, Zhang L F, Ching C B, Ng S C. J Chromatogr A, 2002, 950: 65
- [10] Riering H, Sieber M. J Chromatogr A, 1996, 728: 171
- [11] Zhang Xueman, Ruan Yuanping. Chinese Journal of Chromatography (张雪曼, 阮源萍. 色谱), 2003, 21(5): 533
- [12] Salvatierra D, Sánchez-Ruiz X, Garduño R, Cervelló E, Jaime C, Virgili A, Sánchez-Ferrando F. Tetrahedron, 2000, 56: 3035