

手性流动相添加剂高效液相色谱法 分离苯基琥珀酸对映体

阮源萍^{1,2}, 郑子达¹, 张雪曼¹, 黄培强¹

(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: 以七(2,3,6-三-O-甲基)- β -环糊精(TM- β -CD)作为手性流动相添加剂,反相高效液相色谱研究苯基琥珀酸(PSA)对映体拆分;在Nova-pak C₁₈色谱柱上,采用0.30 mmol/L TM- β -CD、含0.05%三氟乙酸的乙腈-水(体积比16:84)为流动相,(R)-(-)-PSA和(S)-(+)-PSA的容量因子分别为5.43和6.42,对映体分离因子为1.18,分离度为2.50;对比PSA在 β -CD手性流动相法和2,6-丁基化- β -CD涂渍C₁₈柱的色谱行为,探讨环糊精分子对PSA的手性拆分机理;本法已用于测定L-脯氨酸化学拆分苯基琥珀酸对映体产品的光学纯度。

关键词: 高效液相色谱;手性流动相添加剂;七(2,3,6-三-O-甲基)- β -环糊精;对映体拆分;苯基琥珀酸

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2004)01-0055-03

High Performance Liquid Chromatographic Separation of Racemic Phenylsuccinic Acid Using Chiral Mobile Phase Additives

RUAN Yuan-ping^{1,2}, ZHENG Zi-da¹, ZHANG Xue-man¹, HUANG Pei-qiang¹

(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: The enantiomeric separation of phenylsuccinic acid (PSA) was studied by RP-HPLC using heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin (TM- β -CD) as a chiral mobile phase additive. The operating conditions were Nova-pak C₁₈ column (3.9 mm i. d. \times 150 mm, 4 μ m) at room temperature (ca. 25 $^{\circ}$ C), 0.30 mmol/L TM- β -CD + 0.05% TFA + 16% CH₃CN as a mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min and UV detection at 254 nm. The capacity factors of (R)-(-)-PSA and (S)-(+)-PSA were 5.43 and 6.42, respectively. The separation factor and resolution were respectively 1.18 and 2.50. Comparing β -CD as a chiral mobile phase additive and 2,6-butylated β -CD coated ODS column, the chiral recognition mechanism of PSA was investigated. The likely roles were inclusion interaction and hydrogen bonding between β -CD and PSA. This method has been applied to determine the enantiomeric purity of PSA obtained from a resolution process.

Key words: High performance liquid chromatography; Chiral mobile phase additive; Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin; Enantiomer separation; Phenylsuccinic acid

在液相色谱和毛细管电泳中, β -环糊精(β -CD)及其甲基衍生物是最常见的手性添加剂之一^[1],大多用于中等大小分子的对映体分离。特别是甲基化 β -CD在ODS柱上发生强烈吸附^[2],有效地克服了 β -CD在反相色谱流动相中溶解度较差的缺陷,增大手性色谱拆分能力,较好地用于苦杏仁酸类、琥珀酰亚胺、巴比妥类盐、肾上腺素类^[3]、1-二茂铁乙醇和1,1-联二萘-2,2-磷酸氢二酯^[4]以及乳酸^[5]等对映体拆分。

本文采用反相高效液相色谱TM- β -CD手性流动相添加剂法研究苯基琥珀酸(PSA)对映体拆分。同时与 β -CD手性流动相添加剂法和2,6-丁基化- β -环糊精涂渍C₁₈柱手性固定相法进行对比,探讨可能的手性识别机理。本法已用于测定一些化学拆分苯基琥珀酸产物的对映体纯度。

收稿日期: 2003-01-11; 修回日期: 2003-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20072031; 20272048; 203900505)

作者简介: 阮源萍(1956-),男,福建泉州人,副教授,硕士。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 TSP 公司 HPLC 仪: 3500-3200 型梯度泵; UV-2000 型紫外-可见光吸收检测器; Rheodyne 7725i 进样阀; PC1000 色谱工作站。Nova-pak C₁₈(3.9 mm × 150 mm, 4 μm); SGE Exsil ODS(4.6 × 250 mm, 5 μm)。PE 341 型旋光仪。

-环糊精为上海化学试剂采购站中心化工厂产品; 七(2,3,6-三-O-甲基)- α -环糊精为 Hungarian Cyclolab Ltd 产品(江云宝教授馈赠); 外消旋苯基琥珀酸为 Fluka 产品, 光学纯的苯基琥珀酸采用 L-脯氨酸化学衍生结晶法拆分^[6]; 2,6-丁基化- β -环糊精为本实验室合成品^[7]; 乙腈和甲醇为国产液相色谱淋洗剂; 三氟乙酸(TFA)为 Fluka 公司产品; 水为二次去离子重蒸水。

1.2 色谱分离条件

采用 Nova-pak C₁₈ 色谱柱, 含一定量 TM- β -CD 和 0.05% TFA 的乙腈-水(体积比 16:84)流动相; 检测波长 254 nm; 泵流量为 1.0 mL/min; 进样体积为 20 μL; 室温 25 °C 测定。以 NaNO₃ 测定 t₀。

2 结果与讨论

PSA 是一种二元有机酸, pK_a 分别为 3.78 和 5.55。因此需在流动相中加入少量酸抑制其离解, 使其在色谱柱有更好的保留, 并改善色谱峰形。本文选择 CH₃COOH、H₃PO₄ 和 CF₃COOH 调节酸度, 实验表明 CF₃COOH 拆分效果最佳。

2.1 全甲基- α -环糊精手性添加剂法拆分苯基琥珀酸

与 β -CD 不同, 甲基化 β -CD 能够强烈地吸附于 ODS 柱固定相表面。以 0.30 mmol/L TM- β -CD 的乙腈-水(体积比 20:80)(含 0.05% TFA) 流动相为例, 考察在柱平衡过程容量因子和分离因子的变化(图 1)。实验表明: 只有当含有 TM- β -CD 的流动相流过 C₁₈ 色谱柱一定时间后, 苯基琥珀酸对映体才得到较好的分离。这表明 TM- β -CD 在 C₁₈ 固定相表面逐渐吸附形成一动态手性固定相。在这一过程中, 容量因子的变化可能与色谱保留过程中溶质同时受到固定相环糊精分子的包络和 C₁₈ 的疏水作用的影响有关。增大流动相中 TM- β -CD 浓度会加快柱平衡时间。

进一步考察流动相中乙腈含量对苯基琥珀酸分离效果的影响, 实验结果如图 2 所示。降低流动相中乙腈比例, PSA 的容量因子增大, 对映体分离因子也同时增大, 这反映出反相色谱中的溶剂极性特征。

图 3A 给出外消旋苯基琥珀酸对映体的分离色谱图。

(R)-(-)-PSA 和 (S)-(+)-PSA 的容量因子分别为 5.43 和 6.42, 对映体分离因子为 1.18, 分离度为 2.50。

2.2 β -环糊精手性流动相添加剂法和 2,6-丁基化- β -环糊精涂渍手性固定相法

分别采用含 5、10 和 15 mmol/L β -CD, 乙腈-水(体积比 16:84)(含 0.05% TFA) 的流动相考察(±)-PSA 在 Nova-pak C₁₈ 上的拆分试验。结果表明, 增大 β -CD 浓度有利于拆分, 但只有当 β -CD 大于 10 mmol/L 时, 外消旋苯基琥珀酸才出现明显的两个重叠峰。由于受到 β -CD 溶解度的限制, 外消旋苯基琥珀酸未能达到基线拆分, 但出峰顺序与 TM- β -CD 一样, (R)-PSA 在 (S)-

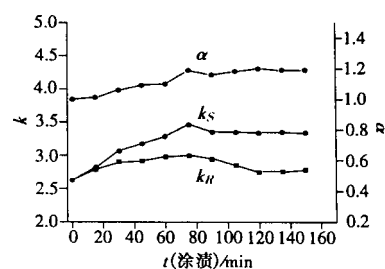


图 1 柱平衡过程容量因子和分离因子的变化

Fig. 1 Kinetics of generation of chiral stationary phase on Nova-pak C₁₈ column mobile phase: 0.30 mmol/L TM- β -CD + CH₃CN - 0.05% TFA (20:80 by volume)

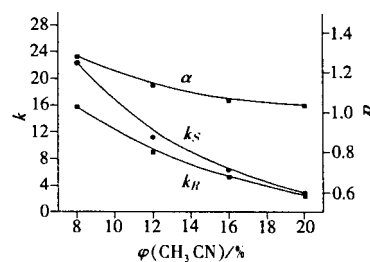


图 2 流动相中乙腈比例对容量因子和分离因子的影响

Fig. 2 Effects of acetonitrile content on capacity factor and separation factor mobile phase: 0.30 mmol/L TM- β -CD + CH₃CN - 0.05% TFA

PSA 之前出峰(图 3B)。而采用乙腈-水(体积比 12:88)(含 0.05% TFA)流动相, (±)-PSA 在丁基化-CD 涂渍 SGE Exsil ODS 柱上也得到较好的拆分(图 3C)。值得注意的是它们出峰顺序与手性流动相添加剂法相反, 即(*S*)-PSA 在(*R*)-PSA 之前出峰^[7]。进一步在流动相中加入-CD 实验, 拆分效果反而变差。这些实验结果说明环糊精手性空腔对苯基琥珀酸对映体的包络同时在流动相和固定相发生, 但在流动相和固定相发生的包络作用引起的苯基琥珀酸对映体出峰顺序正好相反, 因此拆分效果变差。一般认为全甲基-β-CD 强烈地吸附在 ODS 表面^[8], 但它与丁基-β-CD 拆分苯基琥珀酸的出峰顺序正好相反, 说明-CD 空腔口的羟基, 尤其是 3-位羟基在手性识别时起到一个重要的作用。

2.3 苯基琥珀酸样品的对映体纯度测定

以 0.30 mmol/L TM-β-CD, 乙腈-水(体积比 16:84)(含 0.05% TFA)的流动相, 连续 6 次注入外消旋苯基琥珀酸试液考察保留时间和峰面积的重复性(表 1)。结果表明, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别小于 0.2% 和 0.4%, 两个对映体的峰面积比非常接近于 50:50 的理论值, 本法具有良好的重复性。表 2 给出本法测定一些苯基琥珀酸样品的对映体纯度和旋光法测定的光学纯度对照值。对于高光学纯度的样品, 手性色谱法具有更高的准确性。

3 结 论

-CD 分子对苯基琥珀酸有较好的分子手性识别能力, 除了空腔的包络作用外, 在空腔口的羟基, 尤其是 3-位羟基在手性识别时起到一个重要的作用。采用 TM-β-CD 作为手性流动相添加剂, 反相高效液相色谱可简便快速准确地测定苯基琥珀酸产品的对映体纯度。

参考文献:

- [1] 姚彤炜, 曾 苏, 丁海青. 环糊精类手性流动相添加剂及其在药物分析中的应用[J]. 色谱, 1996, 14(2): 106-110.
- [2] ZUKOWSKI J, NOWAKOWSKI R. Dynamically generated chiral stationary phase systems with γ -cyclodextrin derivatives[J]. J Liq Chromatogr, 1989, 12(9): 1545-1569.
- [3] 李 桦, 胡先明, 谢颖峰. 高效液相色谱手性流动相添加剂分离肾上腺素类对映体[J]. 色谱, 1998, 16(5): 424-426.
- [4] HU R, TAKEUCHI T, JIN J, et al. Separation of enantiomers by microcolumn liquid chromatography with methylated γ -cyclodextrin as mobile phase additive[J]. Anal Chim Acta, 1994, 295: 173-179.
- [5] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 高效液相色谱手性流动相添加剂分离乳酸对映体[J]. 分析化学, 2001, 29(4): 413-415.
- [6] STEPHANI R, CESARE V. Resolution of racemic phenylsuccinic acid[J]. J Chem Educ, 1997, 74(10): 1226.
- [7] 敖小平. 烷基化-β-环糊精涂渍反相色谱柱分离对映体研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2001.
- [8] 梁宏瑞, DURHAM D G. HPLC-β-环糊精手性流动相添加剂的研究: 全甲基-β-环糊精动态覆盖手性色谱固定相模型的提出[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(1): 27-30.

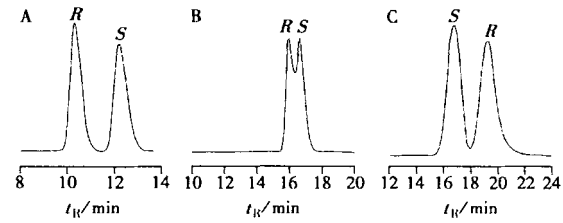


图 3 外消旋苯基琥珀酸拆分数谱图

Fig. 3 Chromatograms of racemic phenylsuccinic acid
A. column: Nova-pak C₁₈, mobile phase: 0.30 mmol/L TM-β-CD + CH₃CN - 0.05% TFA (16:84 by volume); B. column: Nova-pak C₁₈, mobile phase: 15 mmol/L γ -CD + CH₃CN - 0.05% TFA (3:97 by volume); C. column: 2,6-butylated-β-CD coated SGE Exsil ODS, mobile phase: CH₃CN - 0.05% TFA (12:88 by volume)

表 1 保留时间和峰面积的重现性

No	t_R /min	t_S /min	A_R /%	A_S /%
1	10.86	12.71	49.97	50.03
2	10.83	12.68	49.77	50.22
3	10.86	12.70	50.02	49.97
4	10.85	12.71	49.72	50.28
5	10.87	12.72	50.25	49.74
6	10.88	12.69	49.85	50.15
Mean	10.86	12.71	49.93	50.07
RSD s_r /%	0.16	0.12	0.39	0.39

表 2 色谱法和旋光法测定实际样品光学纯度比较
Table 2 Comparison of optical purity by optical rotation and enantiomeric excess by chiral HPLC

No	enantiomeric excess w/ %	Optical purity w/ %
1	90.62(<i>S</i>)	89.1(+)
2	88.24(<i>S</i>)	87.0(+)
3	36.30(<i>R</i>)	37.1(-)
4	25.09(<i>R</i>)	25.8(-)