第 32 卷　　分析化学 (FENXI HUAXUE)　研究报告　　第 2 期
2004 年 2 月　　Chinese Journal of Analytical Chemistry　　134～138

高效液相色谱手性固定相法分离酸性化合物对映体

蔡小军　徐秀珠*　张大同　何红梅　潘春秀
(浙江大学化学系 杭州 310027)

摘　要　在自制的涂敷型纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)和 Pirkle 型(S, S)-Whelk-O1 两种手性柱上,对 6 种酸性化合物(西替立嗪、外消旋萘普生、托品酸、布洛芬、酮洛芬以及 2,2-二苯环丙烷羧酸)进行了对映体分离。考察了在流动相正己烷中,不同的醇类添加剂、酸性添加剂对手性分离的影响,研究了溶质的体积大小及空间立体结构因素对手性分离的影响,并初步探讨了手性识别机理。

关键词　高效液相色谱,手性固定相,对映体分离,酸性化合物

1　引　　言

药物对映异构体的活性差别很大。因此,对映体的分离具有重要的意义。萘普生[1,2]、酮洛芬和布洛芬[3,4]都是非甾体消炎镇痛药,在一些手性固定相上的拆分已见文献报道;托品酸[5,6]是合成抗胆碱药阿托品的前体,在β-环糊精手性固定相上获得过分离;西替立嗪[7,8]是一种抗过敏性药物,在蛋白质(AGP)和 Chiralpak AD 上进行过分离;2,2-二苯环丙烷羧酸的对映体分离尚未见文献报道。系统地研究一组酸性化合物的对映体分离亦未见报道。纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)对各种类型的手性化合物都表现出了较高的手性识别性能[9,10],但由于在其手性空腔中或附近通常有很多不同的手性和非手性结合点,故其手性识别的机理非常复杂。本文在自制的涂敷型 CDMPC 和 Pirkle 型(S, S)-Whelk-O1 手性柱上对上述 6 种酸性化合物的对映体分离作了研究,分别考察了在流动相正己烷中,不同的醇类添加剂、酸性添加剂对手性分离的影响,研究了溶质的体积大小及空间立体结构因素对手性分离的影响,在此基础上对其手性识别机理进行探讨和比较。

2　实验部分

2.1　仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪,Waters 996 光电二极管阵列检测器,Waters Millennium[32]软件系统(美国 Waters 公司)。西替立嗪(cetirizine)(浙江医药发展研究有限公司);萘普生(naproxen)(浙江省仙居制药厂);托品酸(tropic acid)(杭州民生药业集团公司);布洛芬(ibuprofen)及酮洛芬(ketoprofen)(浙江九洲药业股份有限公司);2,2-二苯环丙烷羧酸(以下简称环丙烷酸)(2,2-biphenyl-cyclopropane carboxylic acid)(浙江大学化学系);其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

2.2　实验方法

2.2.1　手性柱　涂敷型 CDMPC(20 nm, 300 mm ×4.0 mm i.d.)手性柱[11],(S,S)-Whelk-O1(12 mm, 250 mm ×4.0 mm i.d.)手性柱。

2.2.2　样品和流动相的制备　各种待分析酸性手性样品用乙醇配成合适浓度,经 0.2 mm 微孔膜过滤。将醇和正己烷配成所需比例,经 0.5 mm 微孔膜过滤并超声脱气。

3　结果与讨论

3.1　流动相中异丙醇浓度对手性分离的影响

3.1.1　在涂敷型 CDMPC 柱上的分离　改变流动相正己烷中异丙醇的浓度(含 0.1 %三氟乙酸)对这 6 种酸性化合物进行手性分离,结果见表 1。图 1 是它们在 CDMPC 柱上的对映体色谱分离图。

2003-04-07 收稿;2003-08-25 接受
本文系浙江省分析测试基金资助项目

表 1 显示:(1)随着异丙醇含量的减少,流动相的极性减弱,对映体在 CDMPC 上的保留逐渐增强,分离度逐渐增大;但分离因子基本不变,说明流动相极性的改变不影响手性固定相识别的实质。(2)除托品酸和酮洛芬外,其它溶质都获得了基线分离。从溶质与固定相的结构来看,除了溶质芳环与固定相苯环部分之间的π-π作用,溶质的羧基与固定相氨基甲酸酯之间存在两个氢键作用。萘普生、布洛芬与固定相之间只有这两种氢键作用点,它们在 CDMPC 上的保留很弱,都获得很好的分离,酮洛芬多了一个羰基,与固定相之间的氢键作用点不只两个,却只获得部分分离,表明远离手性中心的氢键作用对手性识别不起作用。可见在 CDMPC 上手性识别主要取决于溶质的结构,包括大小、形状和环的数目。(3)西替立嗪在固定相上的保留最强,获得了最好的分离;而托品酸保留虽强,却只获得部分分离,说明溶质保留的强弱并不是手性识别的关键因素,可能溶质在固定相手性空腔中的包容作用以及溶质体积大小和立体结构对其适应性才是关键。

表 1　流动相中异丙醇浓度对酸性手性化合物在 CDMPC 上对映体分离的影响

Table 1　The influence of isopropanol concentration in mobile phase on the enantioseparation of acidic chiral compounds on celulose tris (3,5-dimethylpheny carbamite) (CDMPC)

溶质 Solute	异丙醇(%) Isopropanol			k_2'			α			R		
西替立嗪 Cetirizine	30	20	15	5.51	10.00	23.96	1.26	1.25	1.30	1.59	2.54	3.37
萘普生 Naproxen	10	5	2	1.43	2.87	8.51	1.13	1.14	1.18	1.38	1.59	2.71
托品酸 Tropic acid	10	5		3.41	10.43		1.02	1.03		0.03	0.21	
布洛芬 Ibuprofen	5	2	1	0.83	2.27	4.76	1.04	1.10	1.07	0.05	1.25	1.64
酮洛芬 Ketoprofen	2			13.22			1.04			0.46		
环丙烷酸 Cyclopropanecarboxylic acid	5	2	1	1.80	4.27	12.03	1.10	1.10	1.10	1.23	1.56	1.70

k_2'. 后洗脱对映体的保留因子(the retention factor of the second eluted enantiomer);死时间(t_0)由 1,3,5-三叔丁基苯测定(the dead time was determined using 1,3,5-tri-tert-butyl benzene);流速(flow rate):0.5 mL/min;温度(temperature):25 ℃

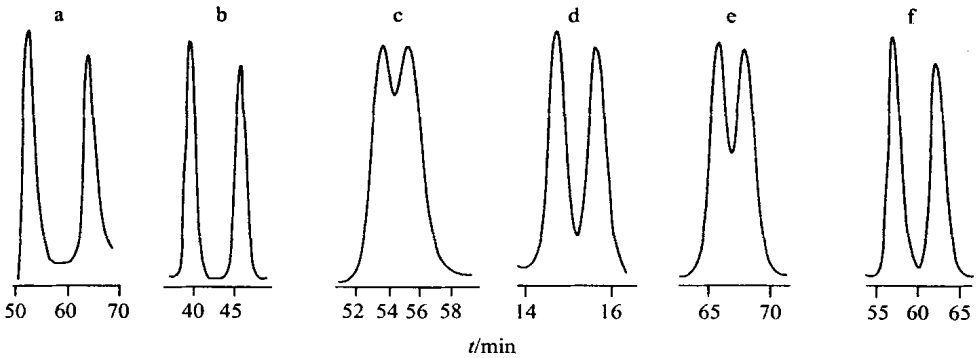

图 1　酸性手性化合物在涂敷型 CDMPC 柱上的对映体分离色谱图

Fig. 1　The enantioseparation chromatograms of acidic chiral compounds on coated tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) column

a. 西替立嗪(cetirizine);b. 萘普生(naproxen);c. 托品酸(tropic acid);d. 布洛芬(ibuprofen);e. 酮洛芬(ketoprofen);f. 环丙烷酸(cyclopropanecarboxylic acid)。流动相(mobile phase):正己烷-异丙醇-三氟乙酸(hexane-isopropanol-trifluoroacetic,(V/V/V))。a. (80∶20∶1);b,d,e. (98∶2∶1);c (95∶5∶1);f. (99∶1∶1)。其它色谱条件见表 1(other chromatographic conditions see Table 1)。

3.1.2　在(S,S)-Whelk-O1 上的分离　改变正己烷中异丙醇的浓度(含 0.1%乙酸),对上述 6 种酸性化合物进行对映体分离,结果示于表 2。图 2 是它们在 (S,S)-Whelk-O1 手性柱上的对映体分离色谱图。

表 2 显示:(1)异丙醇浓度变化对分离的影响趋势与 CDMPC 的基本一致;(2)对于西替立嗪,Whelk-O1 没有表现出手性识别能力,萘普生获得了极好的分离,R 达到 7.02;(3)托品酸在该柱上也只获得了部分分离,主要原因可能是托品酸与萘普生、酮洛芬、布洛芬的结构有明显差别,尤其是其手性碳上的取代基团含有羟基;(4)布洛芬、酮洛芬与萘普生结构相似,同属于 2-芳基丙酸,在该柱上分离都优于CDMPC,只是酮洛芬的保留比布洛芬大得多,这可能是因为酮洛芬的芳基上多了一个苯基和羰基,使得其与固定相之间的π-

π作用、氢键作用增强;(5)与CDMPC不同,环丙烷酸未获得基线分离。综上所述,决定溶质保留和发生手性识别的关键是溶质与固定相之间的吸引作用,主要是氢键作用和π-π作用。

表2 流动相中异丙醇浓度对酸性手性化合物在(S,S)-Whelk-O1上对映体分离的影响

Table 2 The influence of isopropanol concentration in mobile phase on the enantioseparation of acidic chiral compounds on (S,S)-Whelk-O1

溶质 Solute	异丙醇(%) Isopropanol			k_2'			α			R		
萘普生 Naproxen	30	20	15	4.88	6.96	8.99	2.04	2.06	2.06	5.80	6.48	7.02
托品酸 Tropic acid	5	3	2	7.83	15.05	35.37	1.07	1.07	1.08	0.24	0.29	0.57
布洛芬 Ibuprofen	5	2	1	1.14	2.57	4.56	1.23	1.23	1.23	1.47	1.77	1.89
酮洛芬 Ketoprofen	5	3	2	9.96	15.23	25.75	1.12	1.12	1.11	1.36	1.36	1.39
环丙烷酸 Cyclopropanecarboxylic acid	5	2	1	1.37	3.23	5.19	1.07	1.14	1.25	0.18	0.99	0.99

色谱条件(chromatographic conditions):流速(flow rate);1.5 mL/min;温度(temperature):25 ℃。

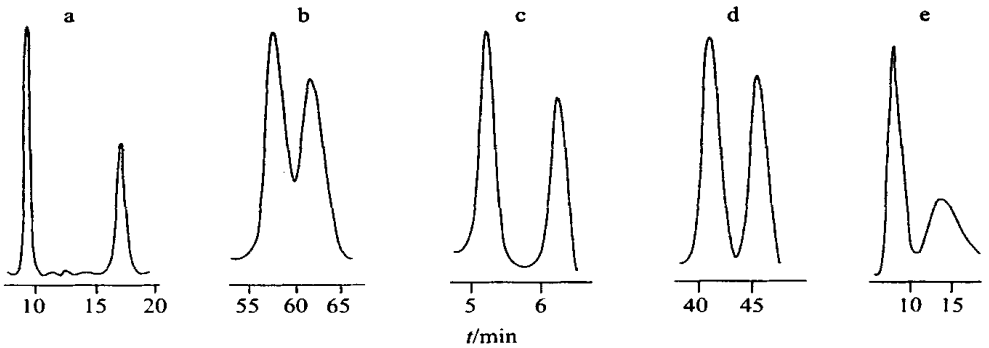

图2 酸性化合物在(S,S)-Whelk-O1手性柱上的对映体分离色谱图

Fig. 2 The enantioseparation chromatograms of acidic compounds on (S,S)-Whelk-O1 chiral comlumn

a. 萘普生(naproxen);b. 托品酸(tropic acid);c. 布洛芬(ibuprofen);d. 酮洛芬(ketoprofen);e. 环丙烷酸(cyclopropanecarboxylic acid)。流动相(mobile phase):正己烷-异丙醇-乙酸(hexane-isopropanol-acetic,(V/V/V)),a.(85∶15∶0.1);b.(98∶2∶0.1);e.(99∶1∶0.1);正己烷-叔丁醇-乙酸(hexane-t-butanol-acetic,(V/V/V));c、d.(98∶2∶0.1)。其它色谱条件见表2(other chromatographic conditions see Table 2)。

3.2 不同极性的醇类添加剂对手性分离的影响

表3给出了乙醇、异丙醇和叔丁醇的一些性质参数,它们形成氢键的能力依次增强,分子体积也依次增大。在流动相中分别添加这3种醇对布洛芬和酮洛芬进行手性分离,结果列于表4和表5。

由表4可见:(1)异丙醇作添加剂时,溶质的保留最强,分离最好,很可能是因为不同的醇分子体积大小不同,对溶质与CDMPC之间氢键作用的竞争能力不同,对手性空腔的手性环境改变也不同,其中异丙醇使得溶质与之最适应;(2)对于布洛芬,叔丁醇作添加剂时比乙醇保留弱,分离度大,但对于酮洛芬,情况恰恰相反,说明醇的影响还与溶质体积大小和空间结构有关。

Whelk-O1是Pirkle型小分子手性固定相,不存在手性空腔,与溶质之间主要是通过吸引作用发生手性识别。从表5可知:(1)乙醇作添加剂时溶质保留弱,因为乙醇极性大,洗脱能力强,但同时醇的立体效应的变化也起一定的作用,故叔丁醇作添加剂时溶质保留反而比异丙醇强;(2)从乙醇、异丙醇到叔丁醇,溶质的分离因子和分离度都逐渐增大,叔丁醇作添加剂是达到最好分离。由以上现象可以推断,醇对溶质保留和分离度的影响除了与溶质结构有关,还与醇本身形成氢键能力、极性、体积大小、空间立体结构以及浓度等因素有关。

3.3 流动相中酸性添加剂对手性分离的影响

不加酸的流动相未能洗脱出对映体,而酸性添加剂的羧基与固定相以及溶质之间有两种氢键作用,还可能会影响固定相和溶质的空间结构,使得它们之间发生有效的选择性作用,从而增强了手性识别能

力。实验考察了流动相中三氟乙酸以及乙酸的浓度对对映体分离的影响,结果如表 6 和表 7 所示。

表 3　极性醇类添加剂的性质

Table 3　The properties of polar alcohol modifiers

醇 Alcohol	极性参数 P′ Polarity index	质子受体 x_e H^+ Acceptor	质子给体 x_d H^+ Donor	强偶极作用 x_n Strong dipole
乙醇 Ethanol	4.3	0.52	0.19	0.29
异丙醇 Isopropanol	3.9	0.55	0.19	0.27
叔丁醇 *t*-Butanol	4.1	0.56	0.20	0.24

表 4　流动相中极性醇类添加剂的种类对酸性化合物在 CDMPC 上对映体分离的影响

Table 4　The influence of different polar alcohol modifier in mobile phase on the enantioseparation of acidic compounds on CDMPC

溶质 Solute	添加剂 Modifier (2 %, *V/V*)	k_2'	α	*R*
布洛芬 Ibuprofen	乙醇 Ethanol	1.93	1.09	1.13
	异丙醇 Isopropanol	2.27	1.10	1.25
	叔丁醇 *t*-Butanol	1.76	1.11	1.22
酮洛芬 Ketoprofen	乙醇 Ethanol	9.61	1.04	0.31
	异丙醇 Isopropanol	13.22	1.04	0.46
	叔丁醇 *t*-Butanol	10.22	1.05	0.28

色谱条件(chromatographic conditions):见表 1(see Table 1)。

表 5　流动相中极性醇类添加剂的种类对酸性化合物在(S,S)-Whelk-O1 上对映体分离的影响

Table 5　The influence of different polar alcohol modifier in mobile phase on the enantioseparation of acidic compounds on (S,S)-Whelk-O1

溶质 Solute	添加剂 Modifier (2 %, *V/V*)	k_2'	α	*R*
布洛芬 Ibuprofen	乙醇 Ethanol	2.32	1.20	1.79
	异丙醇 Isopropanol	2.57	1.23	1.77
	叔丁醇 *t*-Butanol	2.67	1.29	2.40
酮洛芬 Ketoprofen	乙醇 Ethanol	24.11	1.07	1.17
	异丙醇 Isopropanol	25.75	1.11	1.39
	叔丁醇 *t*-Butanol	30.18	1.13	1.53

色谱条件(chromatographic conditions):见表 2(see Table 2)。

表 6　流动相中三氟乙酸的浓度对酸性化合物在 CDMPC 上对映体分离的影响

Table 6　The influence of trifluoroacetic acid concentration in mobile phase on enantioseparation of acidic compounds on CDMPC

溶质 Solute	三氟乙酸 Trifluoroacetic acid (%)	k_2'	α	*R*
西替立嗪 Cetirizine 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol (7030)	0.1	5.51	1.26	1.59
	0.2	4.33	1.36	1.75
	0.5	3.45	1.44	2.13
萘普生 Naproxen 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol 982)	0.1	8.51	1.18	2.71
	0.2	8.14	1.16	2.29
	0.5	6.97	1.14	2.10
布洛芬 Ibuprofen 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol 982:	0.1	2.27	1.10	1.25
	0.2	2.17	1.08	1.20
	0.5	1.63	1.07	0.93

色谱条件(chromatographic conditions):见表 1(see Table 1)。

由表 6 可见:(1)随着三氟乙酸浓度增加,流动相极性增大,酸与溶质对固定相 CDMPC 的非手性和手性作用点的竞争(尤其是氢键作用)逐渐加强,使得溶质保留逐渐减弱;(2)西替立嗪的分离因子和分离度逐渐增加,而萘普生和布洛芬却呈减小趋势。同样,从表 7 可得:(1)乙酸浓度增加,溶质在 Whelk-O1 上的保留减弱,分离因子基本不变,布洛芬的分离度增大,酮洛芬却减小;(2)若换成三氟乙酸,酮洛芬和布洛芬的保留增强,对分离因子都没有影响,但酮洛芬的分离变差,托品酸未获得分离。由以上可推断,对于不同的酸性溶质和固定相,要达到较好分离,所需的酸以及酸的浓度都不同。

表7 流动相中酸性添加剂对酸性化合物在(S,S)-Whelk-O1上对映体分离的影响

Table 7 The influence of acidic additive in mobile phase on the enantioseparation of acidic compounds on (S,S)-Whelk-O1

溶质 Solute	酸 Acid(%)	k_2'	α	R
托品酸 Tropic acid 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol 973∶	0.1(HAc)	15.05	1.07	0.29
	0.1(TFA)	13.64	1.00	
布洛芬 Ibuprofen 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol 982∶	0.1(HAc)	2.57	1.23	1.77
	0.5(HAc)	2.05	1.26	1.85
	0.1(TFA)	2.81	1.23	1.78
酮洛芬 Ketoprofen 正己烷-异丙醇 Hexane-isopropanol 982∶	0.1(HAc)	25.75	1.11	1.39
	0.5(HAc)	22.24	1.10	1.24
	0.1(TFA)	27.81	1.11	1.33

色谱条件(chromatographic conditions):见表2(see Table 2)。

致谢 Pirkle型(S,S)-Whelk-O1手性柱子由德国Kinkel J N教授赠送,特此致谢!

References

1 Medvedovici A, Sandra P, Toribio L, David F. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 785: 159～171

2 Franco P, Minguillón C, Oliveros L. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 793: 239～247

3 Van Overbeke A, Baeyens W, Dewaele C. *J. Liq. Chrom.*, **1995**, 18: 2427～2443

4 McDaniel C M, Snider B M. *J. Chromatogr.*, **1987**, 404: 123～132

5 Svensson S, Vessman J, Karlsson A. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 839: 23～39

6 Kim K H, Shin S D, Lee J H, Hong S P, Kim H J. *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, 23: 230～236

7 Choi S O, Lee S H, Kong H S, Kim E J, Choo H Y P. *Arch. Pharm. Res.*, **2000**, 23: 178～181

8 Choi S O, Lee S H, Kong H S, Kim E J, Choo H Y P. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744: 201～206

9 Okamoto Y, Yashima E. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37: 1020～1043

10 Piras P, Roussel C. *J. Pierrot-Sanders. J. Chromatogr. A*, **2001**, 906: 443～458

11 Shao Baohai(邵保海), Xu Xiuzhu(徐秀珠), Lü Jiande(吕建德), Fu Xiaoyun(傅小芸). *Acta Chim. Sinica* (化学学报), in press (待发表)

Enantioseparation of Acidic Compounds on Chiral Stationary Phase by High Performance Liquid Chromatography

Cai Xiaojun, Xu Xiuzhu*, Zhang Datong, He Hongmei, PanChunxiu

(Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027*)*

Abstract Cellulose and cellulose derivatives are biopolymers which are often used as stationary phases for the separation of enantiomers. Describing the mechanism of such separations is a difficult task due to the complexity of these stationary phases. In this paper, the separation of six acidic compounds (cetirizine, naproxen, tropic acid, ibuprofen, ketoprofen and 2,2-biphenyl-cyclopropanecarboxylic acid) was studied on two chiral columns-trtis(3,5-dimethylpheny carbmate) (CDMPC) and (S,S)-Whelk-O1 chiral columns. The influence of the structures of the analytes on the chiral separation was investigated. The mobile phase composition including the concentration and type of the alcohol modifier and the acidic additive in hexane was varied, and the influence on the retention factor (k') for each enantiomer, the separation factor(α) and the resolution (R) was studied. Then the two different chiral recognition mechanism were discussed and compared.

Keywords High performance liquid chromatography, chiral stationary phase, enantioseparation, acidic compounds

(Received 7 April 2003; accepted 25 August 2003)