

# 手性固定相 HPLC 法拆分 3-叔丁基己二酸对映体

张义文, 宋航, 林凡, 吕果, 姚舜

(四川大学 制药与生物工程系, 四川 成都 610065)

**摘要:** 用苯胺对 3-叔丁基己二酸对映体进行柱前衍生后, 在 CHIRALCEL OD-H 手性固定相上拆分, 并通过二极管阵列紫外检测器和在线旋光检测器对其衍生物进行检测, 首次建立了一种拆分 3-叔丁基己二酸对映体和测定 3-叔丁基己二酸光学纯度的新方法。考察了流动相组成、柱温和流速对该对映体衍生物分离的影响。结果表明, 3-叔丁基己二酸衍生物对映体在正己烷-异丙醇(体积比 90:10)为流动相, 流速为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为  $30^\circ\text{C}$  时, 分离效果最佳。在优化的实验条件下, 分析在 10 min 内完成, 分离因子和分离度均大于 1.5。在质量浓度为 2~160 mg/L 范围内, (+)-3-叔丁基己二酸衍生物和 (-)-3-叔丁基己二酸衍生物的回归方程分别为  $y_1 = 2116.4x_1 - 3541.3$  ( $r_1^2 = 0.9994$ ) 和  $y_2 = 2097.6x_2 - 4774.1$  ( $r_2^2 = 0.9991$ )。该方法操作简单、重复性好, 可用于 3-叔丁基己二酸对映体的质量控制。

**关键词:** 高效液相色谱; 柱前衍生化; 手性固定相; 3-叔丁基己二酸; 光学纯度

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2010)07-0739-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.07.019

## Resolution of 3-tert-Butyladipic Acid Enantiomer by Chiral Stationary Phase High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Yiwen, SONG Hang, LIN Fan, LÜ Guo, YAO Shun

(Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract** The 3-tert-butyladipic acid enantiomer was pre-column derivatized with aniline. The derivative was separated with CHIRALCEL OD-H chiral stationary phase and detected by photo diode array detector and online optical detector. A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the separation of the racemate and the determination of the enantiomeric purity of 3-tert-butyladipic acid was established for the first time. The effects of chromatographic conditions, such as mobile phase, temperature and flow rate on chiral recognition, were investigated. A good separation was obtained at  $30^\circ\text{C}$  by using hexane-isopropyl alcohol (90:10 by volume) as mobile phase with a flow rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Under the optimal conditions, the enantiomer was successfully separated in 10 min with separation factor and resolution more than 1.5. In the concentration range of 2~160 mg/L, the regression equations for the (+)-enantiomer derivative of 3-tert-butyladipic acid and the (-)-enantiomer derivative of 3-tert-butyladipic acid were  $y_1 = 2116.4x_1 - 3541.3$  ( $r_1^2 = 0.9994$ ) and  $y_2 = 2097.6x_2 - 4774.1$  ( $r_2^2 = 0.9991$ ), respectively. The presented study provided a simple and reproducible method for the enantiomeric quality control of 3-tert-butyladipic acid.

**Key words** high performance liquid chromatography; pre-column derivatization; chiral stationary phase; 3-tert-butyladipic acid; optical purity

3-叔丁基己二酸是有机合成中的重要中间体, 可以进一步合成各种结构的环戊酮<sup>[1-3]</sup>。此外, 3-叔丁基己二酸还可用来合成一些共聚物, 而这些共聚物是制造可植入的医疗用具(如气室、移植片固定模、导管等)的重要材料<sup>[4]</sup>。

随着手性技术的发展, 手性药物的研发已受到人们越来越多的重视, 而制备光学纯的手性中间体成为开发高效手性药物的基础, 光学纯的 3-叔丁基己二酸需求量也日益增加。目前制备光学纯 3-叔丁基己二酸的方法主要是通过手性氨基锂的氧化反应<sup>[5-8]</sup>。在 3-叔丁基己二酸不对称反应研究及药物生

收稿日期: 2010-03-22 修回日期: 2010-05-07

第一作者: 张义文(1985-), 男, 四川泸州人, 博士研究生

通讯作者: 姚舜, Tel: 028-85405221, E-mail: youngsun9802@163.com

产的质量监控中, 对其进行有效的手性拆分和准确的光学纯度测定具有非常重要的意义。然而目前有关 3-叔丁基己二酸光学纯度的分析国内外尚未见文献报道, 因此研究快速测定样品中 3-叔丁基己二酸光学纯度的分析方法很有必要。

手性固定相 HPLC 法具有专属性强、分离效率高、测定灵敏度高、分析速度快等优点, 可以准确测定手性对映体光学纯度<sup>[9-10]</sup>。纤维素类手性固定相是发展最快、拆分手性化合物范围最广的一类手性固定相<sup>[11-13]</sup>。由于 3-叔丁基己二酸不能在现有的手性固定相上直接拆分, 非手性衍生化法是改变待分离对映体结构的有效方法<sup>[14]</sup>, 因而本文采用非手性试剂衍生化法, 将 3-叔丁基己二酸衍生化后在 CHIRALCEL OD-H 色谱柱上拆分, 首次建立了一种准确测定 3-叔丁基己二酸光学纯度的分析方法, 为其相关产品研发及质量控制等提供了基础数据和手段。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-M 20A 检测器和 Class VP 色谱工作站 (日本岛津公司); OR2090 在线旋光检测仪 (日本 JASCO 公司); HCT-360 型柱温箱 (天津恒奥科技发展有限公司); 超声波清洗器 (上海金华仪器厂)。

国产色谱纯正己烷、异丙醇、无水乙醇; 3-叔丁基己二酸 (消旋, 纯度 98%, 北京百灵威公司); N, N-二环己基碳酰亚胺 (DCC, 国药集团化学试剂有限公司); 苯胺 (成都科龙化工试剂厂), 其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 色谱分离条件

色谱柱: CHIRALCEL OD-H (250 mm × 4.6 mm, LTD 公司), 流动相均经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气处理。流动相流速均为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 15~35 °C。测定样品用流动相溶解, 进样量 5 μL/次, 死时间以乙醇测定。

### 1.3 样品衍生化处理

用苯胺对 3-叔丁基己二酸衍生化<sup>[15]</sup>: 称取 0.20 g (0.001 mol) 3-叔丁基己二酸于 50 mL 二氯甲烷中, 称取 0.25 g (0.0012 mol) DCC 溶于上述二氯甲烷中, 此混合物在室温下搅拌反应 5 min, 随后加入 0.15 mL (0.002 mol) 苯胺进行反应, 温度 30 °C, 总反应式见图 1。在不同反应时间取样进行 HPLC 分析, 以甲苯作内标物, 分析产品与内标物峰面积之比, 发现随着反应的进行产品与内标物峰面积之比逐渐增大, 但是当反应时间超过 2.5 h 后两者的峰面积比基本不变, 说明转化趋于稳定。将粗产品依次用 1 mol/L 盐酸、1 mol/L 氢氧化钠、水洗涤后用无水硫酸镁干燥, 过滤, 再用旋转蒸发仪减压蒸干有机溶剂得到衍生化产物。

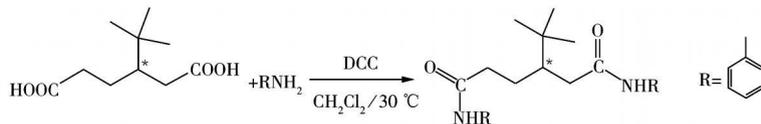


图 1 3-叔丁基己二酸衍生物的合成

Fig 1 Scheme for the synthesis of 3-tert-butyladipic acid derivative

## 2 结果与讨论

### 2.1 二极管阵列紫外检测器与在线旋光检测仪对 3-叔丁基己二酸衍生物的检测

流动相为正己烷-异丙醇 (85:15), 柱温为 30 °C 的 HPLC 条件下, 用 CHIRALCEL OD-H 手性柱对 3-叔丁基己二酸衍生物对映体进行分离。用二极管阵列紫外检测器进行检测时, 两个对映体峰相似度极高 (图 2)。用在线旋光检测仪进行检测时, 两个对映体峰分别检出, 且 (+)-3-叔丁基己二酸衍生物被优先洗脱, 如图 3 所示。

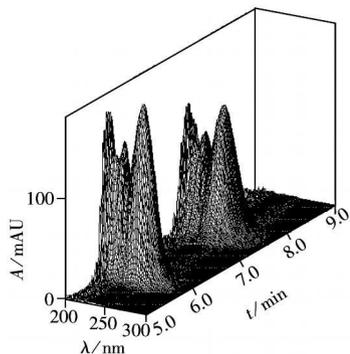


图 2 二极管阵列检测器对 3-叔丁基己二酸衍生物的检测结果

Fig. 2 Chromatogram of 3-tert-butyladipic acid derivative detected by photodiode array detector

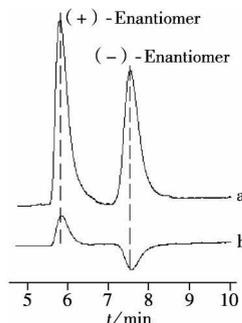


图 3 3-叔丁基己二酸衍生物的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of 3-tert-butyladipic acid derivative  
a UV detection b optical rotation detection

### 2.2 流动相组成对拆分的影响

以正己烷作为流动相分别加入异丙醇和乙醇调节极性强度, 以获得最佳峰间距和分离效果。在柱温为 30 °C 时, 考察了不同流动相条件下 CHIRALCEL OD-H 对 3-叔丁基己二酸衍生物的拆分情况。结果发现, 流动相极性的微小变化, 对对映体保留时间有较大的影响。当以异丙醇作流动相极性调节剂时, 分离效果明显比乙醇好, 且峰形较好, 没有拖尾, 分离因子和分离度良好。实验表明, 当流动相为正己烷-异丙醇(90:10)时, 对映体达到基线分离, 且出峰时间较短, 总分析时间约 10 min, 分离因子和分离度满足要求, 因此选用该流动相。

### 2.3 温度对分离的影响

流动相为正己烷-异丙醇(90:10)时, 测定不同温度下(15~55 °C) 3-叔丁基己二酸衍生物在 CHIRALCEL OD-H 的拆分情况。发现随着柱温的升高分离因子逐渐升高, 且分离因子与温度几乎呈线性关系。这说明手性拆分是一个熵驱动的过程。综合考虑分离效果和分析时间(温度升高出峰时间延长), 选择最佳柱温为 30 °C。

### 2.4 流速对分离的影响

在色谱柱温为 30 °C, 流动相为正己烷-异丙醇(90:10)的条件下, 流动相流速对分离的影响见表 1。结果表明: 在考察的流速范围内, 随着流速的增高分离因子增大, 但分离度显著下降, 当流速增至 1.2 mL·min<sup>-1</sup> 时两个对映体峰仅达基线分离; 低流速下分离度很高但分离因子 α 偏低。综合考虑分离因子和分离度, 选择 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 为适宜流速。

表 1 流动相流速对分离的影响

Table 1 Effect of flow rates on enantioseparation

Flow rate <i>v</i> / (mL·min <sup>-1</sup> )	Capacity factor		Separation factor <i>α</i>	Resolution <i>R</i>
	<i>k</i> <sub>1</sub>	<i>k</i> <sub>2</sub>		
0.5	2.679	3.524	1.315	1.867
0.8	1.297	1.817	1.401	1.753
1.0	0.862	1.402	1.626	1.702
1.2	0.530	0.875	1.649	1.640
1.5	0.254	0.484	1.899	1.473

在最佳的条件下, 3-叔丁基己二酸对映体在 10 min 内完全分离, 分离因子和分离度均大于 1.5

### 2.5 线性关系、检出限、定量下限与精密度

3-叔丁基己二酸衍生物的质量浓度在 2~160 mg/L 范围内, 其峰面积(*y*)与其质量浓度(*x*)具有良好的线性, (+)-3-叔丁基己二酸衍生物和 (-)-3-叔丁基己二酸衍生物的回归方程分别为  $y_1 = 2116.4x_1 - 3541.3 (r_1^2 = 0.9994)$  和  $y_2 = 2097.6x_2 - 4774.1 (r_2^2 = 0.9991)$  (*y* 单位为 mAU; *x* 单位为 10<sup>-7</sup> g/L)。分别以 3 倍和 10 倍信噪比计算检出限和定量下限, (+)-3-叔丁基己二酸衍生物的检出限和定量下限分别为 4.18、13.96 mg/L; (-)-3-叔丁基己二酸衍生物的检出限和定量下限分别为 5.08、16.87 mg/L。连续 11 次重复测定, 相对标准偏差在 1.3% 内, 精密度良好。

### 2.6 手性拆分机理的探讨

CHIRALCEL OD-H 色谱柱的固定相结构为纤维素氨基甲酸酯类, 除了其六元环的糖苷结构提供了 1 个“手性腔”外, 固定相中还有具有亲水性糖苷结构和疏水性的苯环结构, 极性有较大差别, 这种

结构为手性化合物光学异构体的分离提供了良好的手性识别环境。一般认为复合物形成的驱动力有氢键、离子结合、 $\pi-\pi$  电子作用、电荷转移和疏水相互作用, 形成键合点等。3-叔丁基己二酸衍生物和固定相结构中均含有酰胺键和苯环, 两者间可形成  $\pi-\pi$  电子作用、氢键作用等, 这些相互作用为手性识别提供了可能。

### 3 结 论

3-叔丁基己二酸与苯胺在 DCC 的催化下, 在室温下进行衍生化反应。在流动相为正己烷-异丙醇 (90:10), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的 HPLC 条件下, CHIRALCEL OD-H 柱对 3-叔丁基己二酸衍生物对映体的分离因子和分离度均在 1.5 以上。通过反复进样和对比实验 (RSD 均小于 1.3%), 证明该方法具有分析效率高、准确、稳定等特点, 可用于测定 3-叔丁基己二酸对映体的光学纯度。

#### 参考文献:

- [1] MICHAEL R, AVELINO C. Ketonic decarboxylation catalyzed by weak bases and its application to an optically pure substrate [J]. *Eur J Org Chem*, 2004, 2004(9): 2036-2039
- [2] BALLINI R, MARCANTONIE, PETRINI M, ROSNIG. A new oxidative cleavage of 2-nitrocycloalkanones by hydrogen peroxide: an important efficient method for dicarboxylic acid or keto acid synthesis [J]. *Synthesis* 1988, 1988(11): 915-916
- [3] BROWN H, LYNCH G, HAMMAR W, LIU L, RICHARD B. Solvomecuration-demercuration. 7. Regio and stereochemistry of the oxymercuration-demercuration of alkyl substituted cyclohexenes and cyclopentenes [J]. *J Org Chem*, 1979, 44(12): 1910-1915
- [4] GUENTER L. Medical devices comprising a copolymer of a modified polyamide and a polycarbonate. US. WO/2008/138569[P]. 2008-11-20
- [5] COUSINS R P, SMPKINS N S. Chiral products via asymmetric deprotonation of 4-tert-butylcyclohexanone using chiral lithium amide bases [J]. *Tetrahedron Lett* 1989, 30(51): 7241-7244
- [6] TASCHNER M J, BLACK D J, CHEN Q. The enzymic Baeyer-Villiger oxidation: a study of 4-substituted cyclohexanones [J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 1993, 4(6): 1387-1390
- [7] TANG S, KENNEDY R M. Oxidation of homochiral ketals by rhodium(VII) oxide V. [J]. *Tetrahedron Lett* 1992, 33(51): 7823-7826
- [8] CAIN C M, COUSINS R P C, COUMBARIDES G, SMPKINS N S. Asymmetric deprotonation of prochiral ketones using chiral lithium amide bases [J]. *Tetrahedron* 1990, 46(2): 523-544
- [9] 张玉英, 陈国聪. (R, S)- $\alpha$ -羟基苯丁酸乙酯的 HPLC 手性分离 [J]. *分析测试学报*, 2005, 24(1): 109-110
- [10] 余荔, 宋航, 徐旭, 杨丹, 陈宇静. 柱前衍生高效液相色谱法测定四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸的光学纯度 [J]. *分析化学*, 2007, 35(4): 545-548
- [11] 高珊, 张春泓, 于黎明. 高效液相色谱法对手性药物罗格列酮与吡格列酮的拆分 [J]. *分析测试学报*, 2009, 28(9): 1088-1091
- [12] 杨丽萍, 王立新, 徐艳丽, 钱宝英, 高如瑜. 纤维素类手性固定相高效液相色谱法拆分三唑类手性化合物 [J]. *分析测试学报*, 2004, 23(5): 25-28
- [13] 韩小茜, 李军, 员春林, 孙宇扬, 王海生. 正反相模式下键合纤维素手性固定相对手性化合物的拆分 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(11): 55-58
- [14] 曹雪玲, 刘发现, 金东日. 用非手性衍生化法提高肾上腺素类药物在手性固定相上的分离度 [J]. *分析测试学报*, 2009, 28(2): 239-242
- [15] 徐旭, 兰先秋, 杨丹, 宋航. 扁桃酸对映体光学纯度的柱前衍生化 HPLC 测定 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(6): 895-897