

柱前衍生高效液相色谱法测定 NTCA 的光学纯度

都婷婷, 黎利军, 宋 航*, 张义文, 王 欣, 罗 佳

(四川大学制药与生物工程系, 成都 610065)

摘 要: 用 1-萘胺对乙酰四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸进行柱前衍生, 产生非对映体衍生物。以正己烷和乙醇或异丙醇为流动相, 选择 Chiralcel OD-H 色谱柱上对 NTCA 衍生物进行了拆分, 考察了流动相组成和柱温对其衍生物分离的影响, 获得较好的分析条件, 分离因子达到 1.3。该结果进一步与旋光仪法相比较, 相对偏差不超过 1.9 %。

关键词: 乙酰四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸; 高效液相色谱; 柱前衍生化; 光学纯度

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0720(2009)06-076-04

(R)-N-乙酰四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸 [(R)-N-acetylthiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid, (R)-NTCA] 是 (R)-四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸 ((R)-TTCA) 经仲氨基位酰化所得的一种新型的手性拆分试剂, 可作为手性酸直接拆分碱类或氨基酸类物质^[1]。(R)-NTCA 拆分外消旋氨基酸, 不仅可以得到 D-型氨基酸, 而且得到了具有很好药用价值的 L-N-乙酰氨基酸^[1,2], 有较好的应用前景。

目前尚未见国内报道使用高效液相色谱法拆分 NTCA 消旋体, 本课题组曾尝试用 OD-H、Whelk-O1、DNB-Leucine、DNB-PG 等手性柱对 NTCA 消旋体进行直接拆分未获得成功。由于柱前衍生法目前应用非常广泛^[3~5], 所以本课题组选择苯胺和 1-萘胺作为衍生试剂, 但发现使用苯胺作衍生试剂时, NTCA 发生消旋。所以采用 1-萘胺进行柱前衍生, 然后使用手性柱在高效液相色谱上进行拆分, 通过二极管阵列紫外检测器和在线旋光检测仪对衍生物进行检测, 确定了两个单一对映体的保留时间。并结合旋光度测定, 确定该柱前衍生化法的可靠性和准确性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪和 SPD-M20A 型二极管阵列紫外检测器、OR-2090 在线旋光检测仪

(日本 JASCO 公司); Class VP 色谱工作站(日本 SHIMADZU 公司); HCT-360 型柱温箱(天津恒奥科技发展有限公司)。正己烷、甲醇、乙醇、异丙醇为国产 HPLC 级, 其余试剂为国产分析纯(航嘉生物制药有限公司)。TTCA、NTCA 由本实验室自制^[6]。

1.2 色谱条件

Chiralcel OD-H 手性柱, 250 mm × 4.6 mm i. d. (5 μm, 10 nm) (日本 DAICEL 公司)。流动相均经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气后使用。流速均为 1.0 mL/min, 柱温 5~35 °C。测定的样品用流动相溶解, 进样量约 5 μL/次, 死时间由甲醇测定, $t_0 = 2.773$ min。

1.3 样品衍生化处理

用 1-萘胺将 NTCA 衍生化^[6]。称取 0.21 g NTCA 和 0.17 g 1-萘胺, 溶于 20 mL 二氯甲烷, 加入 0.25 g EEDQ (2-Ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carbonsaeureethylester) 作催化剂, 30 °C 振荡反应。反应结束后, 依次用 2 mol/L HCl 和水洗, 干燥, 抽去溶剂, 得微黄色晶体。

反应过程中, 0.2 mL 甲苯作内标物, 每隔 30 min 取样进行 HPLC 分析, 产品与内标物峰面积之比对时间作图, 发现反应 3 h 以上, 这个比例基本不再改变。所以反应时间定为 3 h。

* 收稿日期: 2008-04-01; 修订日期: 2008-07-05

作者简介: 都婷婷 (1983 -), 女, 硕士研究生; E-mail: hangsong@vip.sina.com

2 结果与讨论

2.1 二极管阵列紫外检测器和在线旋光检测仪对 NTCA 衍生物检测

二极管阵列紫外检测器对 NTCA 衍生物进行检测,如图 1 所示,利用全波段扫描确定最佳检测波长为 281 nm (杂质峰较少)。利用在线旋光仪,检测出对映体的出峰顺序,如图 2 所示。流动相为 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 90 : 10 : 0.5$,柱温为 25 °C。

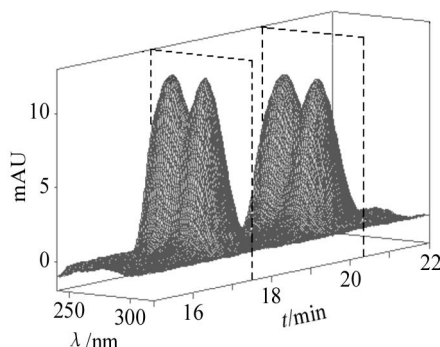


图 1 二极管阵列检测器对 NTCA 衍生物的检测结果

Fig. 1 Chromatograms of NTCA derivatives detected by a photo-diode array detector

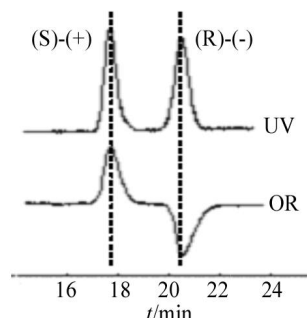


图 2 NTCA 衍生物紫外-在线旋光仪联用的 HPLC 图

Fig. 2 Chromatograms of NTCA derivatives with UV and on-line polarimeter as detectors

2.2 流动相组成对分离的影响

以正己烷为流动相,添加醇类物质调节溶剂强度,对获得最佳峰间距和分离度有一定的影响。本文考察了正己烷-异丙醇系统和正己烷-乙醇系统,其中柱温为 25 °C的结果列于表 1。由于乙醇的极性比异丙醇大,所以添加量应较小;另外,加入乙酸调节峰形。随着流动相极性的增大,对映体保留时间减小,分离因子 α 都减小,异丙醇做流动相极性调节剂时,分离因子比乙醇高。实验表明, $V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 85 : 15 : 0.5$ 是较适合分析使用的条件。

表 1 流动相组成对 NTCA 衍生物拆分的影响

Tab. 1 Effect of composition of the mobile phase on resolution of NTCA derivative

流动相的组成	容量因子		分离因子 α
	k_1	k_2	
$V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 95 : 5$	5.922	7.092	1.198
$V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 93 : 7$	5.152	6.151	1.194
$V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 90 : 10$	4.835	5.736	1.186
$V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 87 : 13$	3.732	4.385	1.175
$V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 83 : 17$	-	-	未达到基线分离
$V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) = 90 : 10$	8.230	10.464	1.271
$V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) = 87 : 13$	5.745	7.377	1.284
$V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) = 85 : 15$	5.195	6.691	1.288
$V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) = 80 : 20$	-	-	未达到基线分离

2.3 温度对分离的影响

在 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 90 : 10 : 0.5$ 和 $V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) : V(\text{冰醋酸}) = 87 : 13 : 0.5$ 两种流动相下,分离因子与温度几乎呈线性

关系。随着温度的降低,溶质在固定相和流动相之间传质速度变慢,两对映保留时间延长,分离因子 α 增大,考虑分离效率,选用 25 °C作为分析温度。

2.4 线性关系、检出限及精密度

用 NTCA 衍生物消旋体配制一系列标准液, NTCA 衍生物的浓度在 11.3~360 mg/L 的范围内, 即 NTCA 的浓度在 20.4~650 mg/L 的范围内, 标准曲线有良好的线性。标准曲线为 $Y = 7 \times 10^{-7} \rho + 0.0057$ (Y 为 NTCA 衍生物峰面积, $\times 10^{-3}$ mAU s; ρ 为 NTCA 的浓度, mg/L)。NTCA 的检出限为 42 μ g/L。连续 6 次进行平行测定, RSD 为 2.7 %。

2.5 测定 NTCA 的光学纯度

称取 NTCA 消旋体和 (R)-NTCA, 按照一定质量比混合配制出 3 种不同光学纯度 NTCA, 测量其旋光度, 通过公式 (1) 计算出 NTCA 的光学纯度。然后将这 3 种不同光学纯度的 NTCA 进行衍生化反应, 得到的产品纯化后分别进行 HPLC 分析, 按照公式 (2) 计算光学纯度 e. e. %。对每个样品分别重复实验 5 次, 得到各光学纯度值的相对标准偏差 (RSD) 均小于 3 %。比较两种方法计算出的光学纯度, 相对偏差最大不超过 1.91 %。NTCA 在衍生化过程中没有发生消旋化, 其衍生物的光学纯度就是 NTCA 的光学纯度, 使用萘胺衍生 NTCA 测定 NTCA 光学纯度的方法是准确的。而与旋光仪测定相比, HPLC 法测定光学纯度更稳定。

表 2 旋光法与 HPLC 法测定的 NTCA 光学纯度比较

Tab. 2 Comparison of NTCA enantiomeric purity determined by polarimetry and HPLC

样品 编号	旋光仪法测定的 光学纯度 [*] / %	HPLC 法测定的 光度纯度 / %	相对偏差 ^{**} / %
1	93.73	92.58	1.23
2	60.32	59.34	1.62
3	0.53	0.52	1.91

* 光学纯度按标准值为 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65.2$ (c 0.20, EtOH)^[2] 换算得到; ** 相对偏差 = (旋光法值 - HPLC 法值) / 旋光法值

$$\text{光学纯度} = \frac{\text{比旋光度测量值}}{\text{比旋光度标准值}} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{光学纯度 e. e. \%} = \frac{A_R - A_S}{A_R + A_S} \times 100 \% \quad (2)$$

公式 (2) 中 R 是主要异构体, S 是其镜像异构体, A_R 是 R 对映体的峰面积, A_S 是 S 对映体的峰面积。

3 结论

1-萘胺与 NTCA 在 EEDQ 的催化下, 温度为 25 $^{\circ}$ C 进行衍生化反应。在流动相为 V (正己烷) : V (异丙醇) : V (冰醋酸) = 85 : 15 : 0.5, 流速 1.0 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}$ C 的 HPLC 条件下, OD-H 手性柱对 NTCA 衍生物对映体的分离因子达到 1.3。衍生物的光学纯度与旋光法测定 NTCA 的光学纯度基本一致, 相对偏差不得超过 1.91 %, NTCA 在衍生化过程中没有发生消旋化。NTCA 的浓度在 11.3 mg/L 到 360 mg/L 的范围内, 标准曲线有良好的线性。可见, 用 1-萘胺衍生 NTCA 测定 NTCA 光学纯度的方法是准确的, 该法可以拆分 NTCA 消旋体, 而且可以检测 NTCA 的光学纯度。

参考文献

- [1] 李叶芝, 郭纯孝, 刁家寅等. 高等学校化学学报, 1998, 19(5) : 757
- [2] 都婷婷, 李程, 余荔等. 华西药学杂志, 2007, 22(6) : 614
- [3] 徐旭, 宋航, 孙娟等. 分析试验室, 2007, 26(4) : 89
- [4] 王婷婷, 李俊峰, 黄明刚等. 华西药学杂志, 2006, 21(3) : 224
- [5] 李俊峰, 都婷婷, 兰先秋等. 分析化学, 2007, 35(8) : 1195
- [6] Mollica A, Paradisi M P, Varani K et al. Bioorg Med Chem, 2006, 14 : 2253

Determination of enantiomeric purity of (R)-N-acetylthiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

DU Ting-ting, LI Li-jun, SONG Hang^{*}, ZHANG Yi-wen, WANG Xin and LUO Jia (Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065), Fenxi Shiyanshi, 2009, 28(6) : 76~79

Abstract: Normal-phase chromatographic model was employed for enantiomeric separation of (R)-N-acetylthiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid derivatives on the Chiralcel OD-H column in hexane/isopropyl alcohol mobile phase. The effects of chromatographic conditions such as mobile phases and temperature to chiral recognition of the N-acetylthiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid derivatives have been investigated. The optimal conditions of analysis were ob-

tained and the separation factor was more than 1.3. Furthermore, the result of the determination by polarimetry was consistent with that by HPLC and the relative deviation was not more than 1.9%.

Keywords: (R)-N-acetylthiazolidine-2-thione-4-carboxylic acid; High performance liquid chromatography; Pre-column derivatization; Optical purity

www.cnki.net