

柱前衍生化高效液相色谱法测定乳酸的光学纯度

杨 丹, 徐 旭, 陈宇静, 张 林, 姚长洪, 宋 航*

(四川大学制药与生物工程系, 成都 610065)

摘 要: 用苯胺将乳酸衍生化, 得到的对映体衍生物在 DNB-Leucine 柱上进行了拆分, 建立了一种用柱前手性衍生化结合手性固定相正相高效液相色谱法检测乳酸光学纯度的方法, 并考察了流动相组成和柱温对其分离的影响。分离结果经二极管阵列紫外检测器检测, 以及与对照品比较得到确认。当流动相为 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 90 : 10$, 温度为 25℃, 流速为 1.5 mL/min 时, 乳酸达到基线分离, 分离因子达 1.30 以上。将此法测定乳酸光学纯度的结果与旋光仪方法测定的结果进行比较, 相对偏差不超过 2%。本方法可用于乳酸对映体的光学纯度准确检测。

关键词: 高效液相色谱; 衍生化; 手性拆分; 光学纯度; 乳酸

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2008)04-052-04

乳酸(Lactic Acid)是食品工业重要的酸味剂和防腐剂, 也是医药、化工、皮革、香料等工业的重要原料^[1]。乳酸分子中羧基的 α 位碳原子为不对称的手性碳原子, 因此乳酸存在左旋(D 型)、右旋(L 型)两种旋光异构体及 DL 型外消旋体。由于人体只能代谢 L-乳酸, 因此世界卫生组织(WHO)明确规定, 人体每天摄入 D-乳酸的量必须限制在 100 mg/(kg 体重)以下, 尤其是生产婴幼儿营养食品应避免使用 D-或 DL-混合乳酸^[2]。因此建立能准确、高效分析乳酸对映体的方法是很有意义的。

对乳酸的手性色谱分析, 常见报道的是采用气相色谱法, 如用全甲基 β -环糊精手性色谱柱对乳酸衍生物-乳酸乙酯进行拆分^[3]。也可用胆甾型苯并-15-冠-气相色谱固定相分离乳酸和乳酸乙酯^[4]。液相色谱拆分乳酸的报道却很少。后来有人采用 β -环糊精作为手性流动相添加剂, 用反相高效液相色谱法拆分了乳酸对映体^[5]。这种方法出峰时间较早, 但拆分效果不理想。手性固定相色谱法是高效液相色谱法中拆分对映体的有效手段之一, 其中酰胺类刷型手性固定相如 DNB-Leucine

等是当前已商业化的应用最广的手性固定相之一^[6], 然而这类手性固定相对乳酸对映体的直接拆分却未见报道。已有研究表明柱前衍生化法手性固定相拆分法是一种行之有效的方法^[7], 据此本研究探索将乳酸先衍生化, 使其在酰胺类刷型手性固定相 DNB-Leucine 上成功地得到了拆分, 拆分效果好, 并测定了乳酸的光学纯度, 建立了一种高效、准确的分析乳酸对映体的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪, SPD-M20A 检测器, Class VP 色谱工作站(日本岛津公司), HCT-360 型柱温箱(天津恒奥科技发展有限公司), HPLC 旋光检测仪 JASCO OR-2090 (JASCO 日本分光株式会社), Autopol 型旋光仪(美国鲁道夫公司, 精度 0.001°), FA/JA 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), SHZ-85 恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司)。

超纯水; 甲醇、乙醇、异丙醇以及正己烷均为色谱纯; CH_2Cl_2 、无水乙醇和苯胺均为 AR 纯;

* 收稿日期: 2006-11-21; 修订日期: 2007-02-10

基金项目: 四川大学星火计划项目资助

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

2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1, 2-二氢喹啉 (EEDQ, ACROS ORGANICS, New Jersey, USA); 消旋体乳酸 (成都科龙化工试剂厂); L 型乳酸 (深圳光华伟业实业公司)。

1.2 色谱分离条件

色谱柱: DNB-Leucine (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm, 美国 Regis Technologies 公司)。所有流动相均经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气后使用。流动相流速均为 1.5 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 10 ~ 35。测定的样品用甲醇溶解, 进样量约 0.5 μL/次, 死时间以乙酸乙酯测定。

1.3 样品的柱前衍生化

将 0.2 g 即 0.15 mL 乳酸 ($\rho_{\text{乳酸}} = 1.206 \text{ g/mL}$) 溶于 60 mL CH_2Cl_2 中, 加入约 1 g EEDQ, 此混合物在室温下振荡反应 5 min 后, 加入 0.37 mL 苯胺, 再于室温下振荡反应。反应历程如图 1 所示^[8] (亲核试剂为 $\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$, R 为 CH_3 时, 此反应式代表乳酸与苯胺反应的化学反应式)。反应完毕后加入 2 mol/L 的 HCl 溶液洗涤, 洗涤之后用无水硫酸钠干燥, 静置, 待溶液澄清后滤除干燥剂, 于 30 减压蒸干有机溶剂 CH_2Cl_2 得到棕黄色粘稠状产品。不同反应时间取样进行 HPLC 分析, 产品与内标物 (以甲苯为内标) 峰面积之比 (K) 对时间 (t) 作图, 如图 2 所示。可以认为 5 h 时反应完全, 但 15 min 时已反应了约 65 %, 30 min 时反应了约 80 %。因此一般情况下 15 min 时即可停止衍生化反应, 可较大幅度提高分析效率。但当反应物浓度很低时, 可适当延长反应时间来提高产率和分析效率。

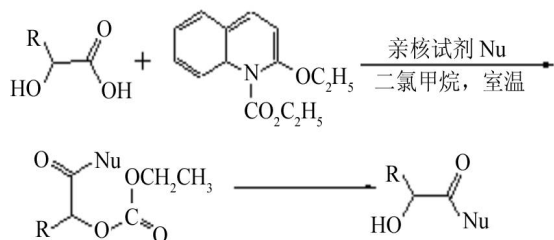


图 1 乳酸的衍生化反应历程

Fig. 1 The deriving route of lactic acid

2 结果与讨论

2.1 定性分析

将 L-乳酸和消旋体乳酸两种不同光学纯度的样品分别进行衍生化, 在流动相为 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 95 : 5$, 柱温为 35 的色谱条件下, 获

得 DNB-Leucine 手性柱对两种样品衍生物的分离结果。消旋体乳酸衍生物出现一对对映体峰 (1, 2), 峰 2 刚好与 L-乳酸衍生物的峰重合, 证明了峰 1、峰 2 分别为 L 型和 D 型乳酸衍生物的峰。

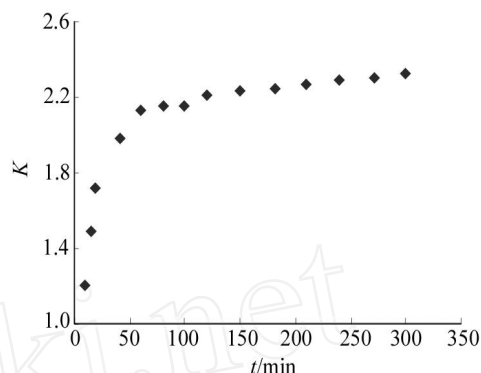


图 2 反应时间对衍生化的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on derivatization

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度。柱温为 35 时, 不同流动相极性下乳酸衍生物的分离结果如图 3 所示, 随着流动相极性的减小, 对映体保留时间增大; 乙醇作流动相极性调节剂时, 分离度较高, 且峰型较好, 而异丙醇作为调节剂时, 拖尾现象严重。实验表明, 当 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 90 : 10$ 时, 出峰时间较短, 对映体达到基线分离, 分离因子较大, 是适合分析的流动相。

2.3 温度对拆分的影响

流动相为 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 95 : 5$, 流速为 1.5 mL/min, 测定不同温度 (15 ~ 35) 下乳酸衍生物在 DNB-Leucine 上的拆分情况, 可知温度对乳酸衍生物在手性固定相上的分离具有明显的影响。温度降低, 溶质在固定相和流动相之间传质速度变慢, 两对映体保留时间延长, 分离因子 α 增大。但保留时间长, 分析效率低, 且出现拖尾现象。温度高则不利于色谱柱的寿命, 所以, 确定温度为 25 为较适合的分析温度。

2.4 线性关系、检出限和精密度

乳酸衍生物质量浓度在 1.25 ~ 0.125 mg/mL 的范围内, 以峰面积 S 对质量浓度 ρ 作图, 测得工作曲线为: $S = 64216\rho - 162.32$ ($n = 8$), 相关系数 r 达 0.9996, 线性很好。逐渐稀释样品至色谱峰信噪比接近 3 时, 得到乳酸衍生物的检出限约为

0.625 $\mu\text{g/mL}$ 。

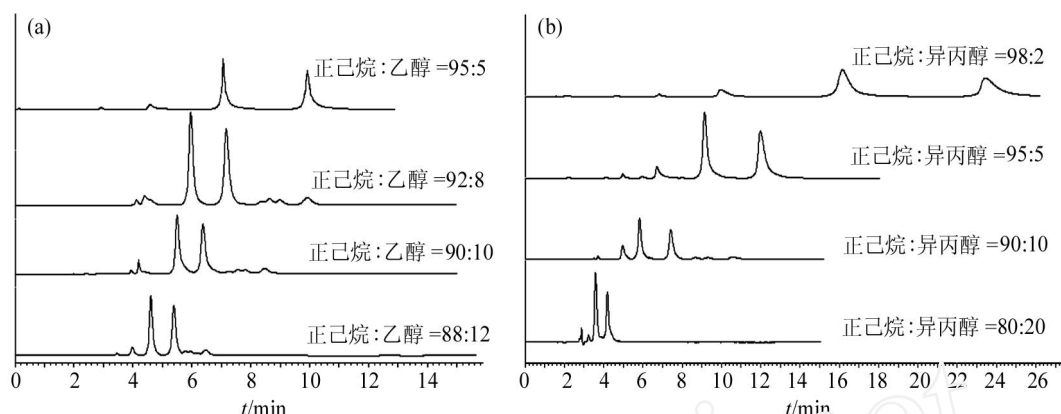


图 3 乙醇(a)和异丙醇(b)作调节剂乳酸衍生物色谱图

Fig. 3 (a) Chromatograms of lactic acid using ethanol as regulator (b) Chromatograms of lactic acid using isopropanol as regulator

2.5 测定 e. e. 值的两种方法比较

用 L-乳酸和 DL-乳酸配制 4 种不同光学纯度乳酸，测量其旋光度，通过公式(1)计算出乳酸的光学纯度。再将这 4 种不同光学纯度的乳酸进行衍生化，得到的产品分别用 HPLC 分析，按照公式(2)计算出乳酸衍生物的光学纯度，如表 1 所示。比较两种方法计算出的光学纯度，偏差最大不超过 2%，在仪器的测定偏差之内。则乳酸在衍生化过程中没发生消旋化，用苯胺衍生乳酸测定其光学纯度的方法是正确的。与旋光仪测定相比，HPLC 法排除了具有旋光的杂质对光学纯度测定的影响。对上述每个样品分别重复进样 6 次，得到相对标准偏差 RSD 为 1.82%，不超过 2%。此方法用于测定手性化合物的 e. e. 值是准确可靠的。

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

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

表 1 旋光仪与 HPLC 方法测定的乳酸光学纯度比较

Tab. 1 The comparison of Lactic acid optical purity determined with polarimeter and HPLC

项目	样品 / %	样品 / %	样品 / %	样品 / %
旋光度法	26.67	45.93	66.97	97.90
HPLC 法	27.04	46.70	68.28	98.16
偏差	1.37	1.65	1.92	0.26

3 结论

苯胺与乳酸用 EEDQ 催化，在室温下进行衍生化反应。流动相为 $V(\text{正己烷}) : V(\text{乙醇}) = 90 : 10$ ，柱温为 25℃ 时，DNB-Leucine 手性柱对乳酸衍生物对映体的分离因子达到 1.30 以上。虽然在其他条件下乳酸衍生物也能得到拆分，但在此条件下，不仅分离因子较高，出峰时间短，而且没有出现拖尾现象，峰型很好。与添加流动相的方法比较，分离效果好得多，出峰时间可控制在 7 min 左右。通过反复进样和对比实验(RSD 均小于 2%)，证明该方法具有分析效率高、准确、稳定等特点，可用于测定乳酸对映体的光学纯度。

参考文献

- [1] 杨子培, 成琰如, 袁东波等. 食品与发酵工业, 1994, 5: 18
- [2] Livia Alm. The effect of Fermentation on Nutrients in Milk and some Properties of Fermented Liquid Milk Products, 1982. 97
- [3] 蒋艳杰, 赵春霞, 王清海等. 分析化学, 1999, 27(9): 1022
- [4] 卿笑天, 唐英. 分析化学, 1998, 26(5): 545
- [5] 白冬梅, 班睿, 赵学明等. 色谱, 2001, 19(1): 13
- [6] William H Pirkle, Thomas C Pochapsky. J Chem Rev, 1989, 89: 347
- [7] 孙娟. 四川大学硕士毕业论文, 2006. 5
- [8] Myung Ho Hyun, Moon Hee Kang, Sang Cheol Han. Tetrahedron Letters, 1999, 40: 3435

Determination of enantiomeric purity of lactic acid by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography

YANG Dan, XU Xu, CHEN Yu-jing, ZHANG Lin, YAO Chang-hong and Song Hang* (Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(4): 52 ~ 55

Abstract: Lactic acid was derivatized with aniline, and then the enantiomers of the derivatives were separated on the DNB-Leucine column. A new method for accurately measuring enantiomeric purity of lactic acid was established by derivatization combined with CSP. The influences of mobile phase composition and column temperature on separation were investigated. The separating result was confirmed by the diode array ultraviolet detector and compared with the reference substance. When the mobile phase composition was 90 % hexane and 10 % ethanol (volume) at a flow rate of 1.5 mL/min at 25 °C, lactic acid was separated on the baseline and the separation factor was more than 1.30. Compared with the result of enantiomeric purity of lactic acid determined by polarimeter, the relative deviation is less than 2 %. This method is simple, sensitive with good repeatability, and can be used to measure the enantiomeric purity of lactic acid accurately.

Key words: High performance liquid chromatography; Derivatization; Chiral separation; Optical purity; Lactic acid

(上接第 51 页)

二、征文对象和范围

首先,科学仪器涉及的人员众多,科学仪器的生产企业是仪器事业的主力军,他们不但是科学仪器的生产者、推广者,而且是科学仪器的不断革新者,各种新型仪器都通过他们推向社会,推向科研和生产的第一线。各科研单位和大专院校不但广泛地使用各种各样科学仪器,更是各种新型科学仪器的研制者,无时不在探索着前沿技术。广大的科学仪器使用者,对自己所使用的仪器了如指掌,针对自己所使用仪器的优缺点以及实际需求,能提出具有前瞻性的改进意见。

其次,科学仪器涉及的领域很广、门类很多。例如:环境监测部门需要大气、水、土壤等污染物的监测分析仪器;医疗卫生部门需要的临床检验、诊断和治疗仪器;农牧渔业部门需要食品中有害物质的检测和分析仪器;生物技术部门需要基因工程、药品的分析和检测仪器;工农业生产部门涉及门类更为齐全的各种科学仪器。

为此,凡是从事科学仪器研制和使用国产仪器进行测试分析的专家学者、技术人员、大专院校师生,有关管理人员均可投稿。

三、征文要求

1、凡符合会议内容的学术论文、研究报告均在应征之列,凡是在国内外公开刊物上发表过的,或在全国性学术会上交流过的论文不属应征之列。2、综述评论不超过 6000 字,研究报告 3000~4000 字,工作经验及报告 3000 字以内。附中英文标题。3000 字及以上论文需加中英文摘要、关键词。3、论文要求主题明确、文字简练、图表规范、数据可靠。图表请用计算机打印或用绘图纸绘制。并请用软盘或电子邮件投稿。4、请自留底稿及软盘,稿件用挂号寄来。5、截止日期:2008 年 6 月 30 日,以邮戳为准,过期恕不接受,特殊情况追加 10 %版面费。6、论文处理:会议论文,一经录用,将在《现代科学仪器》上专刊发表。

四、本届会议拟邀请多位专家、院士和主管仪器业务的负责同志参加,特邀报告 6 篇以上。读者亦可推荐报告选题。

五、欢迎国内外人士、香港、澳门、台湾各界仪器及分析界人士参加。

六、请参加会议的同志邮寄征文同时填写报名表,会议也欢迎没有写论文的同志参加。亦请认真填写报名表,并将推荐选题及建议反馈我们。

会议筹备组地址:100089 北京市海淀区西三环北路 27 号 理化楼 512 室《现代科学仪器》编辑部

E-mail: gj @instrumentation. com. cn; info @instrumentation. com. cn

电话: 010-68422478/68410135 传真: 010-68410137 联系人: 胡柏顺 吴石增 姜亚光