

高效液相色谱手性流动相添加剂法 分离扁桃酸和邻氯扁桃酸对映体

王金朝 曾 苏*
(浙江大学药学院,杭州 310031)

1 引言

扁桃酸和邻氯扁桃酸是医药生产中的重要中间体。以氨基酸和金属离子作为手性流动相添加剂的配体交换色谱已被广泛应用于手性物质分离,但用于拆分扁桃酸较难,因其紫外吸收波长短,而使用最常用的 Cu^{2+} 作为配合离子时有很强的紫外吸收。本实验采用 Zn^{2+} 作配合离子,避开了检测方面的难题,直接拆分了扁桃酸和邻氯扁桃酸对映体。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂 SCL-6A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-6A 紫外检测器。扁桃酸和邻氯扁桃酸及其单体购自浙江省药品检验所。 L 氨基酸为药用规格,甲醇为色谱纯,硫酸锌等试剂为分析纯。

2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent Hypersil ODS 柱(250 mm \times 4 mm, 5 mm); 流动相: L 亮氨酸溶液(10 mmol/L) / ZnSO_4 (5 mmol/L), pH 6.5; 流速: 0.5 mL/min; λ : 220 nm。

3 结果与讨论

3.1 氨基酸和金属离子克分子浓度对拆分的影响 考察了 3 种 L 氨基酸(脯氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸)和 5 种金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cd^{2+}) 不同组合对扁桃酸和邻氯扁桃酸的拆分。结果表明,在其最大吸收波长范围, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 有强紫外吸收, Cd^{2+} 无分离效果。以 Zn^{2+} 作为配合离子时,脯氨酸无分离效果,苯丙氨酸不能拆分扁桃酸,但可部分拆分邻氯扁桃酸,而亮氨酸对两者都有较好的分离效果,见图 1。

固定亮氨酸和 Zn^{2+} 摩尔浓度比例为 2:1,研究了不同浓度添加剂对分离的影响。结果表明亮氨酸和 Zn^{2+} 摩尔浓度 (mmol/L) 在 4~10.5 范围内,扁桃酸异构体的分离度 R_s 值由 1.10 上升到 1.14, R_s 值由 0.58 上升到 1.05; 邻氯扁桃酸异构体的分离度 R_s 值为 1.5, R_s 值由 1.19 上升到 2.15。当摩尔浓度达到 16 mmol/L 8 mmol/L 时,分离度略有下降。

3.2 流动相 pH 值的影响 流动相 pH 值对于拆分很关键。使用稀磷酸来调节 pH,固定亮氨酸和 Zn^{2+} 摩尔浓度在 16 mmol/L 8 mmol/L,在 pH 值 4.6~6.5 范围内,随着 pH 值的升高,扁桃酸的分离度 R_s 值由 1 上升到 1.05, R_s 值由 0 上升到 0.64; 邻氯扁桃酸的 R_s 值由 1 上升到 1.12, R_s 值由 0 上升到 2.00。

3.3 甲醇含量的影响 甲醇是常用的有机改性剂之一。向流动相中添加不同比例甲醇,结果表明,随着甲醇添加,扁桃酸和邻氯扁桃酸的容量因子和分离度逐渐降低。

3.4 柱温对对映体分离的影响 比较柱温为 20、30 和 40 时对分离的影响,发现随着柱温升高,保留时间会明显减小,但对分离度无显著影响。

3.5 流速的影响 流速对分离度影响不大,流速超过 0.5 mL/min 分离度略有降低。

4 结论

一般来说在氨基酸和金属离子的手性配合交换 RP-HPLC 中, Cu^{2+} 是最有效的配合离子。但对于低波长吸收的物质如扁桃酸来说,即使 Cu^{2+} 降至 0.5 mmol/L 时,背景干扰依然很大。本方法简便快速,有望用于其他类似羧酸对映体拆分。

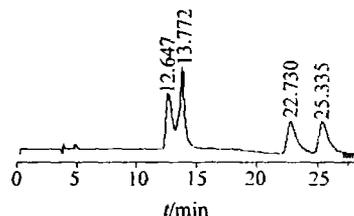


图 1 扁桃酸和邻氯扁桃酸对映体分离典型色谱图

Fig 1 The chromatogram of mandelic acid and *o*-chloro mandelic acid