

α -羟酸在 Chiralpak AD-H 手性柱上的分离研究

张 凯, 赵淑凤, 王 欢, 胡磊磊, 陆嘉星*

(上海市绿色化学与化工过程绿色化重点实验室, 华东师范大学化学系, 上海 200062)

摘 要: 利用 Chiralpak AD-H 手性柱建立了 4 种重要的解热镇痛药物合成中间体苯羟乙酸(扁桃酸)、2-苯基-2-羟基丙酸(阿卓乳酸)、2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸、2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸的高效液相色谱手性拆分方法。以正己烷-乙醇-三氟乙酸(TFA)为流动相体系, 通过调整正己烷与乙醇的比例、改变醇的种类以及 TFA 的含量着重探讨了待测组分与手性固定相(CSP)之间的作用以及分离规律, 同时也实现了四种 α -羟酸对映异构体的完全分离。

关键词: 高效液相; 手性柱; α -羟酸; 容量因子; 分离度

α -羟酸在有机合成中是一类非常重要的药物合成中间体, 主要用于日常生活中常用非甾体消炎镇痛药的合成。由于自然界中的生命存在于由生物大分子组成的手性环境中, 酶和受体系统总是显示出对映体选择性或立体选择性^[1], 因而手性药物各对映体的药效学、药动学和毒理学可能存在很大的差异。例如日常生活中常用的解热镇痛药布洛芬(Ibuprofen)主要起作用的是(S)构型, 其(R)构型则完全没有活性, 只会增加体内代谢负担, 为此建立药物对映体的手性拆分方法显得日益重要和迫切。

高效液相色谱法因其适用范围广的特点应用于对手性药物的拆分越来越受到科研工作者的青睐^[2]。例如, 利用对映体在蛋白质类、环糊精类、多糖及其衍生物类等改性天然高分子手性固定相(CSP)上吸附与解吸附能力的不同而进行分离的吸附型手性固定相拆分方法近年来倍受重视而发展迅速^[3~6]。余露山等^[3]曾采用直链淀粉-三(3, 5-二甲基氨基甲酸酯)衍生物(Chiralpak AD) CSP 成功拆分了洛尔类手性药物, 陈仲益等^[4]也利用 Chiralpak AD 柱对对氟比洛芬、酮洛芬、氟伐他汀等 8 个手性药物进行了拆分研究。遗憾的是, 在他们的研究中都没有讨论对映体与 CSP 之间的相互

作用。实际上, 对于不同的手性物质与手性固定相之间的作用规律一直以来都还是研究的难点, 一般认为可能存在着偶极-偶极、氢键-氢键、 π - π 作用、空间排阻、疏水包含等多种相互作用^[7,8]。本实验利用 Chiralpak AD-H 手性柱(是另一种在 5 μ 硅胶表面涂布有直链淀粉-三(3, 5-二甲基氨基甲酸酯)的涂敷型手性柱, 这种类直链淀粉手性固定相结构含有疏水空腔, 空腔周围的氧原子含有孤对电子, 因此可能与含有富电子苯环的待测组分发生多种作用)研究了在结构上有递变规律的 4 种含有手性中心的重要解热镇痛药物合成中间体包括苯羟乙酸(扁桃酸)、2-苯基-2-羟基丙酸(阿卓乳酸)、2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸、2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸的分离, 通过改变分离条件着重探讨了待分离组分的结构变化与分离效果之间的关系以及各种相互作用之间的规律, 为不对称合成常用的消炎镇痛中间体分析以及其他 α -羟酸的药物分离提供了直接有效的分离检测条件和一定的理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HPLC 色谱系统配有泵(Alltech 426 HPLC Pump)以及紫外检测器(Linear UVIS 200); 紫外-可

* 基金项目: 国家自然科学基金(20573037)、上海市重大基础研究项目(08dj1400100)和上海市重点学科(B409)项目资助

作者简介: 张 凯(1984-), 女, 博士研究生; E-mail: zhangkai1984824@163.com、jxlu@chem.ecnu.edu.cn

见分光光度计 (Varian Cary 100) ; 扁桃酸 (A. R.) : 姜堰市环球化工厂 (中国江苏) ; 阿卓乳酸 (2-hydroxy-2-phenyl-propionic acid, Hydrate) : 东京化成工业株式会社 (日本东京) ; 其它两种羧酸由相应羰基化合物电羧化固定二氧化碳得到, 纯品通过 MS, HNMR, IR 定性检测。正己烷 (A. R.)、乙醇 (无水 A. R.)、异丙醇 (A. R.)、正丙醇 (A. R.)、正丁醇 (A. R.)、三氟乙酸 (A. R.) 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

4 种待测 α -羟酸结构式如图 1, 按顺序依次为苯羟乙酸 (扁桃酸)、2-苯基-2-羟基丙酸 (阿卓乳

酸)、2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸、2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸, 样品在检测前配制成 0.01 mol/L 的乙醇溶液。检测波长的确定通过紫外-可见分光光度计扫描待测组分在 100 ~ 500 nm 范围的吸收, 结果发现 4 种待测组分在 235 nm 下均有最大吸光度值, 因此确定检测波长为 235 nm; 流速设定为 Chiralpak AD-H 手性柱的标准流速 0.5 mL/min; 流动相由不同比例的正己烷和醇组成, 并加入体积比不大于 1 % 的 TEA 作为酸性添加剂。

2 结果与讨论

拆分能力的评价通过考察下面 4 个因素分析得到, 见表 1。

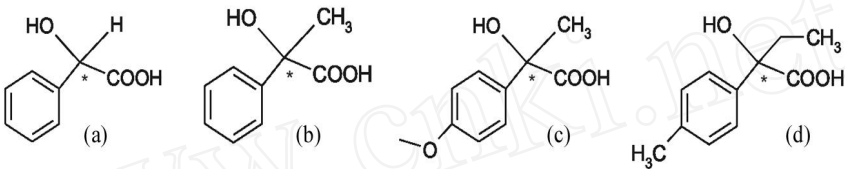
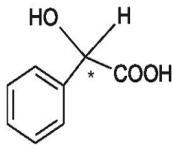
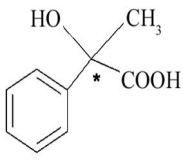
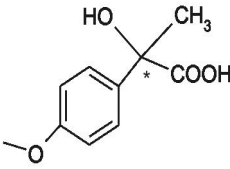
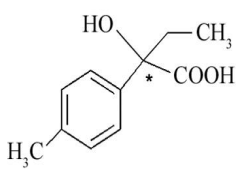


图 1 4 种 α -羟酸的结构式

表 1 4 种 α -羟酸外消旋体在 Chiralpak AD-H 手性上的色谱参数

Drug	流动相	k_1	k_2	α	R_s
	A	1.65	1.84	1.11	1.24
	B	2.46	2.76	1.12	1.50
	C	4.41	5.13	1.16	2.09
	D	2.31	2.89	1.25	3.14
	E	2.23	2.65	1.19	2.24
	F	2.18	2.42	1.11	1.33
	G	-	-	-	-
	A	1.30	1.54	1.19	1.81
	B	1.89	2.23	1.18	2.11
	C	3.22	3.68	1.14	1.94
	D	2.10	2.87	1.37	4.24
	E	1.85	2.49	1.34	3.71
	F	1.66	1.95	1.17	1.87
	G	-	-	-	-
	A	2.05	2.23	1.09	1.18
	B	3.03	3.32	1.09	1.43
	C	5.34	5.96	1.12	1.85
	D	-	-	-	-
	E	-	-	-	-
	F	2.66	2.90	1.09	1.47
	G	-	-	-	-

续表 1

Drug	流动相	k_1	k_2	α	R_s
	A	1.24	1.42	1.14	1.36
	B	1.70	1.99	1.17	1.93
	C	2.55	3.20	1.25	3.31
	D	2.23	2.64	1.18	2.19
	E	1.77	2.37	1.34	3.56
	F	1.48	1.69	1.15	1.47
	G	-	-	-	-

注: k_1 、 k_2 分别代表 S 和 R 构型两种异构体的容量因子。A - V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 80 20 1; B - 85 15 1; C - 90 10 1; D - V(正己烷) V(异丙醇) V(TFA) = 85 15 1; E - V(正己烷) V(正丙醇) V(TFA) = 85 15 1; F - V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 85 15 0.5; G - V(正己烷) V(正丁醇) V(TFA) = 85 15 1

容量因子 $k = (t - t_0)/t_0$; 分离度 $R_s = 2(t_2 - t_1)/(\omega_1 + \omega_2)$; 分配系数 $\alpha = k_2/k_1$ 。其中 t_1 、 t_2 为对映体的保留时间, t_0 为死时间, ω_1 、 ω_2 为对映体峰宽值。

2.1 流动相中乙醇与 TFA 比例的改变对分离的影响

首先研究了在保证 TFA 体积比为 1% 不变的条件下改变乙醇的比例对分离效果的影响, 如表 1 所示。当流动相由 A 变为 B 再到 C, 随着乙醇比例的逐渐减小, 4 种 α -羟酸所对应的 R 和 S 两种异构体容量因子都增大, 同时分离度和选择性因子也体现了增大的趋势, 阿卓乳酸在由 V(正己烷) V(乙醇) = 85 15 变为 90 10 时, R_s 相差不大分别为 2.11 和 1.94, α 相应为 1.18 和 1.14, 均实现了完全分离。结果说明乙醇含量的减小增强了待测组分与 CSP 之间的相互作用。乙醇的极性指数 P' 为 4.3, 在所研究醇中极性最大, 乙醇含量的增大可以加速纯样品在流动相中的溶解, 从而加快了待测组分从 CSP 上的洗脱分离, 缩短了保留时间, 分离度和选择性因子也随之有所降低。因此, 在达到分离要求的前提下可以通过提高乙醇的含量来缩短检测时间。

在维持 V(正己烷) V(乙醇) = 85 15 不变的情况下, 将流动相由 B 变为 F, TFA 的体积比由 1% 降到 0.5%, 4 种酸 S 和 R 两种异构体容量因子、分离度和选择性因子同时减小。三氟乙酸作为酸性添加剂, 其浓度的增加也有利于流动相极性的增大, 导致酸与溶质对 CSP 的非手性和手性作用点的竞争逐渐加强, 溶质保留逐渐减弱, 从

而不利于实现 α -羟酸在手性柱上的分离, 这与蔡小军等^[9]的研究结果是一致的。

2.2 流动相中不同醇对分离效果的影响

将乙醇分别换为异丙醇、正丙醇(流动相由 B 换为 D 和 E), 除 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸之外明显提高了其他羟酸两种异构体之间的分离度且均大于 1.5, 实现了 3 种物质的完全分离, 对映异构体选择性因子 α 和容量因子 k 均有增大的趋势。而使用支链较多的异丙醇比正丙醇保留时间更长, 分离更彻底。结果说明将乙醇换为更长碳链的正丙醇以及异丙醇可能促进了待分离物质与 CSP 之间的偶极-偶极、 π - π 作用、空间排阻、疏水包含等多种相互作用, 因此在提高分离度的同时保留时间增长。随着待分析物烷烃链的增长, 诱导偶极的逐渐增大, 使用碳链更长、结构相对更复杂的醇也可以与 α -羟酸产生偶极-偶极作用, 并且这些协同作用对物质的分离是有利的。对于 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸 R 和 S 两种异构体的手性拆分, 到目前为止还没有任何文献报道, 本实验所考查的四种醇中只有使用了乙醇的流动相才基本实现这种结构两种异构体的完全分离 ($R_s = 1.43$), 当正己烷的体积含量由 84.16% 增大到 89.11% 之后可达 1.85, 保留时间也相应有所增长。而在换用流动相 D 和 E 之后, 其分离图谱中都只出现一个响应非常大的单峰。乙醇的这种特殊作用可能是由于乙醇含有的羟基可以与固定相中的 C=O 双键产生强烈的氢键-氢键作用, 从而大大减弱了溶质 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)与 CSP 之间作用的竞争, 促进了溶质与 CSP 之间的相互作用。

另外, 在使用流动相 G 时, 由于在 235 nm 的紫外检测波长下, 流动相中所含一定比例的正丁醇使得流动相本身变得不再透明, 因此不适合这 4 种 α -羟酸的分离, 对波长进行适当的调整之后结果仍然不能够令人满意。

2.3 待分离物质结构变化与分离结果关系

从待测组分结构变化来看, 阿卓乳酸比扁桃酸多一个碳原子, 除使用流动相 C 变化规律不明显外, 阿卓乳酸比扁桃酸的 R 和 S 两种对映体容量因子减小, 但分离度和选择性因子却显著增大。手性固定相中的多糖结构空腔是疏水的, 客体分子的非极性越高, 越易被包含, 当疏水亲脂的客体分子进入多糖衍生物结构空腔后, 其疏水基团与空腔有最大接触, 而其亲水基团远离空腔。因此手性碳上多一个甲基的存在可以削弱亲水的羟基和羧基与固定相空腔的接触, 从而使得保留时间缩短^[10]。另一方面, 比较扁桃酸和阿卓乳酸两种 R 和 S 两种异构体构型式可以看出, 甲基的存在为阿卓乳酸提供了额外的电子云增大了物质的瞬间偶极, 从而增强了与固定相之间的偶极-偶极相互作用, 因此最终实现了阿卓乳酸比扁桃酸更快更好的分离。这与保持 TFA 的体积比为 1% 分析 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸、2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸两者的分离结果规律一致。与阿卓乳酸相比, 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸苯环上存在一个供电子基导致其两种对映体的保留因子增大, 分离度和选择性因子反而减小, 当把乙醇换为异丙醇和正丙醇之后甚至不能实现 2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸 R 和 S 异构体的分离。对于 2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸, 苯环上对位变成了甲基并且手性碳上也多了一个供电子甲基, 但是这种规律变得不明显。这说明苯环对位上非常强的供电子甲氧基的存在导致苯环上高密度的电子云明显影响了手性固定相识别的实质, 从而对分离结果的影响也非常大。

通过比较各种因素最终找出这四种 α -羟酸 R 和 S 异构体的最佳分离条件分别为: V(扁桃酸) V(正己烷) V(正丙醇) V(TFA) = 85 15 1; V(阿卓乳酸) V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 80 20 1;

V(2-羟基-2-(4-甲氧基苯基)丙酸) V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 90 10 1; V(2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸) V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 85 15 1。分离度分别达到 2.24; 1.81; 1.85; 1.93, 分离色谱图如图 2 所示。其中对于 2-羟基-2-(4-甲基苯基)丁酸, 若换用 V(正己烷) V(乙醇) V(TFA) = 85 15 1 作为流动相, 保留时间大大缩短, 分离度可达 1.43。

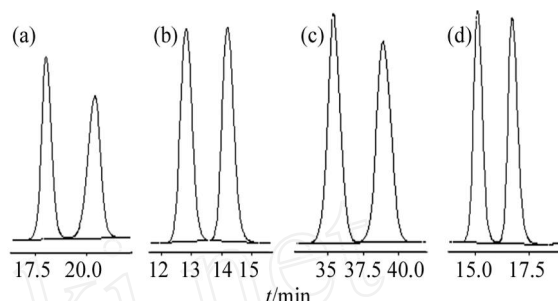


图 2 4 种 α -羟酸外消旋体在 Chiralpak AD-H 柱上的手性拆分色谱图

参考文献

- [1] Venkatachalam T K, Mao C, Uckun F M. Biochem Pharmacol, 2004, 67(10): 1933
- [2] 海沙尔, 塔依尔. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(4): 693
- [3] 余露山, 姚彤炜, 王向军. 浙江大学学报(医学版), 2002, 31(6): 414
- [4] 陈仲益, 姚彤炜, 曾 苏. 中国药学杂志, 2007, 42(7): 544
- [5] 陈胜文, 郝乃慈, 李庆华. 分析化学, 2008, 36(9): 1249
- [6] 陈德妙, 傅 强, 李 湃等. 分析化学, 2007, 35(1): 75
- [7] An D K. Selected Topics on Modern Pharmaceutical Analysis. Vol 1 Beijing: China Pharmaceutical Technology Press. 2000. 52
- [8] 张毅民, 李 潇, 孙聪善. 光谱学语光谱分析, 2008, 28(3): 711
- [9] 蔡小军, 徐秀珠, 张大同. 分析化学研究报告, 2004, 32(2): 134
- [10] 武俊杰, 宋铁珊, 陈志慧. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2005, 24(2): 51