

高效液相色谱手性固定相的研究

I. *L*-缬氨酸-叔丁酰胺型固定相的制备及对映体拆分

徐修容* 唐琴梅 汪润瑛

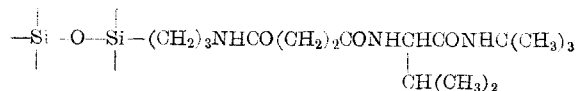
(中国科学院上海药物研究所)

本文报道一种新型手性 *L*-缬氨酸-叔丁酰胺型固定相的制备及用它直接拆分对映体的实验。实验结果表明,这种手性固定相对外消旋氨基酸衍生物有较好的拆分效果。洗脱液中异丙醇的含量对拆分效果有较大影响,异丙醇的含量增加,拆分效果下降。拆分样品的结构对总分离度 (R_s) 也有一定影响,在四种不同洗脱液系统中, *DL*-苯丙氨酸衍生物的 R_s 都比 *DL*-缬氨酸衍生物和 *DL*-亮氨酸衍生物小。流量 0.6~2.0 mL/min 时对总分离度无明显影响。实验结果也证明,四种氨基酸衍生物都是 *D* 型的先洗脱。

近年来,由于微粒硅胶和以它为基质的化学键合固定相在高效液相色谱中的应用,使高效液相色谱的分离效果更为显著,许多难以分离的异构体、同系物都能获得满意的分离效果。因此,应用高效液相色谱拆分对映体,成为色谱工作者极感兴趣的课题。利用对映体与旋光衍生试剂反应生成非对映异构体,加上正相或反相色谱分离^[1~4],可获良好的分离效果。但这种方法比较麻烦,需要选择一种旋光化合物进行衍生反应。最近,应用手性填料^[5~9]或手性洗脱液^[10,11]直接拆分对映体的方法引起了广泛的注意,取得了初步结果。

在上述分离方法中,最引人注目的是使用手性固定相拆分对映体,这种方法操作简便,可使用一般的正相或反相色谱的洗脱条件,重现性好,可应用于分析或制备色谱。Frank 等^[12]报道了数种 *L*-缬氨酸-酰胺型气相色谱用固定相,其中以 *L*-缬氨酸-叔丁酰胺型固定相效果最好,对氨基酸、羧基酸、二醇、氨基醇等外消旋体有良好的拆分效果,这一结果也引起我们的兴趣。

我们设计和制备了一种新型手性 *L*-缬氨酸-叔丁酰胺型化学键合固定相,应用于高效液相色谱,其结构如下:

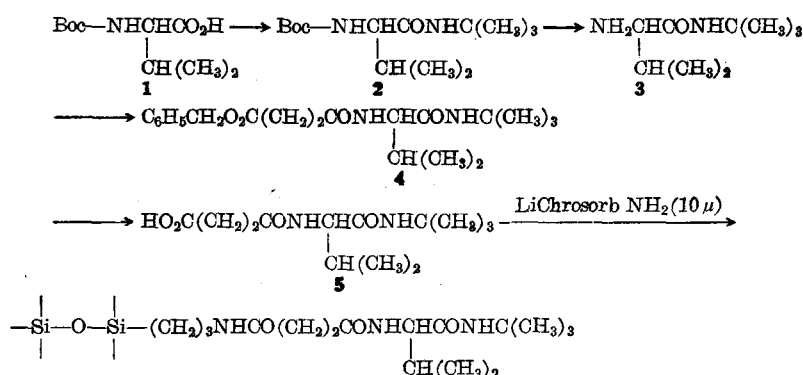


以上述手性固定相填充的高效柱,对外消旋 α -氨基酸衍生物有较好的拆分效果。我们还研究了流量和洗脱液的洗脱强度对总分离度的影响。

手性固定相的制备途径如下:

1983年12月13日收到。本文曾在1981年11月“中德色谱学术讨论会”上宣读。

* 通讯联系人。



Boc-*L*-缬氨酸(1)与叔丁胺缩合得到相应的 Boc-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(2)。2 与三氟乙酸反应得 *L*-缬氨酸-叔丁酰胺(3)。3 与琥珀酰氯单苄酯缩合得到 *N*-β-苄氧羰基丙酰-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(4)，4 以 10% 钨炭常压催化氢解，得 *N*-琥珀酰-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(5)，5 与 LiChrosorb NH₂ 缩合，即得到所需的手性固定相。

实 验

一、仪器和试剂

上海科学仪器厂 YSB-2 型往复柱塞泵；日立 200-0182 型可变波长紫外可见光检测器和记录仪，检测波长为 230 nm。

氨基酸、正己烷和异丙醇为分析级试剂，所有的 *N*-乙酰-氨基酸甲酯按一般方法衍生而成。

二、色谱条件

色谱柱为不锈钢柱，柱长 10 cm，内径 0.5 cm。以四氯化碳为溶剂进行匀浆装柱^[13]，压力 400 kg/cm²，拆分用的洗脱液为含不同量异丙醇的己烷溶液，流量 1.3 mL/min 或 2.0 mL/min。样品溶于异丙醇中，以微量注射器进样。实验温度为 27~33°C，以溶剂峰确定死时间(*t*₀)。

三、*L*-缬氨酸-叔丁酰胺型固定相的制备

Boc-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(2) 20 g 1 溶于 70 mL 干燥氯仿，于 10°C 以下搅拌滴入 12.8 mL 三乙胺，然后于 0°C 以下滴入 7 mL 氯甲酸甲酯，加完后继续于 0°C 以下搅拌半小时，滴入 14.8 mL 叔丁胺和 50 mL 干燥氯仿混合液，于冰浴中再搅拌 1.5 h，反应液用 60 mL 1 *N* 盐酸洗涤，再用水洗。溶液经干燥后减压除去溶剂，得无色固体，用异丙醇结晶，得 13.6 g 2，m. p. 190~192°C，得率 54%，[α]_D²⁰ -12.6° (c. 0.023, CHCl₃)。

[分析] C₁₄H₂₈N₂O₃ 计算值：C, 61.73；H, 10.36；N, 10.28。实测值：C, 61.93；H, 10.52；N, 10.00。

L-缬氨酸-叔丁酰胺(3) 于 0°C 时将 15 mL 三氟乙酸加于 7 g 2 中，发热，待大部分固体溶解后，室温放置 45 min，并不断摇振。然后于 50°C 以下减压除去过剩的三氟乙酸。残余物加入 60 mL 冰水，于 0°C 用三乙胺调节 pH 至 9。反应液用乙酸乙酯提取，经干燥后减压除去溶剂，得到 4 g 黄色液体 3，不经纯化即进行下一步反应。

N-β-苯氧羰基丙酰-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(**4**) 7g 琥珀酸单苯酯与6mL 氯化亚砷混合,待固体全部溶解后室温放置45min,然后于35°C以下减压除去过剩的氯化亚砷。残余物溶于15mL 干燥氯仿,于0°C时加入含4g**3**的35mL 氯仿溶液,在搅拌下滴入3.6mL 三乙胺,搅拌3h后放置过夜。经用冰水,5% NaHCO₃,2% HCl,冰水洗涤、干燥后减压除去溶剂,得6.5g 粗制品,用石油醚结晶得4.5g**4**, m. p. 102°C, 得率50% (按**2**计算), $[\alpha]_D^{30} - 23.9^\circ$ (c. 0.023, CHCl₃)。

[分析] C₂₀H₃₀N₂O₄ 计算值: O, 66.27; H, 8.80; N, 7.73. 实测值: O, 66.19; H, 8.55; N, 7.89.

N-琥珀酰-*L*-缬氨酸-叔丁酰胺(**5**) 2g**4**溶于200mL 无水乙醇,加入0.5g 10% 钯炭,在常压下催化氢解,约3h 反应完毕。过滤,减压除去溶剂后得白色固体,用乙酸乙酯结晶得1g 无色结晶**5**, m. p. 167~168°C, 得率67%, $[\alpha]_D^{25} - 48.0^\circ$ (c. 0.023, CHCl₃)。

[分析] C₁₃H₂₄N₂O₄ 计算值: O, 57.33; H, 8.88; N, 10.29. 实测值: O, 56.96; H, 8.81; N, 10.07.

L-缬氨酸-叔丁酰胺型手性固定相 将12mL 含1g *N*-羟基丁酰亚胺的DMF 溶液与16mL 含1.46g**5**的DMF 溶液混合后加入1.50g 于50°C 减压干燥8h 的LiChrosorb NH₂。然后将4mL 含1.2g 二环己基碳二亚胺的DMF 溶液加于冷却至0°C 的上述混合物,保持0°C 搅拌1h,再在室温搅拌48h。过滤,反应物用甲苯、丙酮及甲醇洗涤,置于五氧化二磷干燥器中减压干燥24h,即得*L*-缬氨酸-叔丁酰胺型手性固定相。

[分析] LiChrosorb NH₂ 实测值: C, 7.85; H, 0.78; N, 1.54. *L*-缬氨酸-叔丁酰胺型手性固定相 实测值: C, 9.28; H, 2.08; N, 2.67.

结 果 和 讨 论

我们首先以*N*-乙酰-*L*-亮氨酸甲酯(*N*-Ac-*L*-Leu-OMe)和*N*-乙酰-*L*-苯丙氨酸甲酯(*N*-Ac-*L*-Phe-OMe)为标准样品,用含4% 异丙醇的己烷溶液作洗脱液测定柱效,柱效分别为5200 板/m 和5270 板/m。

我们以*N*-乙酰-*DL*-缬氨酸甲酯(*N*-Ac-*DL*-Val-OMe)为拆分对象,采用上述洗脱系统,当流量为1.3mL/min 时总分离度(*R_s*)为0.57。

为了选择最佳的色谱条件,我们首先研究了流量对*R_s*的影响。实验结果表明,当流量为0.6~2.0mL/min 时,流量对*R_s*无明显影响(表1)。

使用的拆分洗脱流量为1.3mL/min,对保留时间长的色氨酸衍生物则使用2.0mL/min 洗脱流量。我们又选择了四种外消旋α-氨基酸和一种芳烷胺作为拆分样品,氨基酸制成相应的*N*-乙酰-*DL*-氨基酸甲酯,芳烷胺制成乙酰衍生物。图1,表2表明,洗脱液中异丙醇含量对缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸衍生物的拆分效果有较大影响。异丙醇含量增加,拆分效果明显下降,当异丙醇含量由1% 增至8% 时,亮氨酸的*R_s*由0.95 降为0.26。洗脱液中异丙醇含量对*N*-乙酰-*DL*-色氨酸甲酯(*N*-Ac-*DL*-Try-OMe)的拆分影响不大,当异丙醇含量由4% 增加到10% 时,*R_s*只降低0.12。异丙醇含量对拆分对映体的详细结果见表2。

表 1 流量对总分离度的影响
(Influence of eluting rate on resolution)

流量 (Flow rate) (mL/min)	k'_1	k'_2	α	R_s^*
2.0	3.52	3.94	1.12	0.51
1.5	3.48	3.94	1.13	0.60
1.3	3.52	4.02	1.14	0.60
1.0	3.28	3.86	1.14	0.59
0.6	3.40	3.85	1.13	0.54

* 柱长 ϕ : 10 \times 0.5 cm I. D.; T : 30°C; 检测: UV 300 nm; 样品: N -乙酰- DL -缬氨酸甲酯 (N -Ac- DL -Val-OMe); 洗脱液: 96:4 C_6H_{14} - i - C_3H_7OH

* 按下列方程计算 R_s 和 α : $R_s = 1/4[(\alpha-1)/\alpha][k'_2/(1+k'_2)]\sqrt{N}$, k'_1 和 k'_2 分别为两种异构体的容量因子, N 为柱的理论板数。

这种手性固定相对四种外消旋 α -氨基酸衍生物都有一定的拆分效果, 洗脱液中含有 1% 异丙醇时亮氨酸、缬氨酸及苯丙氨酸衍生物可得最佳的拆分效果, 但在此条件下样品的保留时间较长, DL -亮氨酸的拆分需要 40 分钟(图 2)。

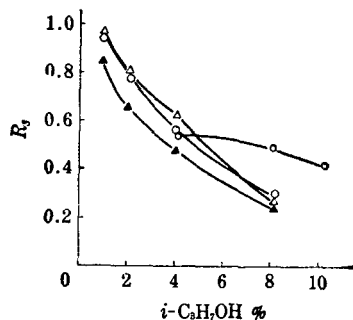


图 1 洗脱液中异丙醇含量对 R_s 的影响
(The influence of isopropanol in eluent on resolution of enantiomers)

柱: 10 \times 0.5 cm I. D.; 洗脱液: i - C_3H_7OH - C_6H_{14} ; T : 27~33°C; 流量: 1.3 mL/min; 检测: UV 230 nm.

\triangle — N -Ac- DL -Leu-OMe;
 \circ — N -Ac- DL -Val-OMe;
 \blacktriangle — N -Ac- DL -Phe-OMe;
 \bullet — N -Ac- DL -Tyr-OMe

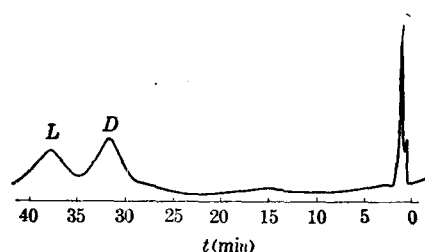


图 2 N -乙酰- DL -亮氨酸甲酯的拆分
(Resolution of N -Ac- DL -Leucine-OMe)
洗脱液: 99:1 C_6H_{14} - i - C_3H_7OH ; 其余实验条件同图 1

拆分样品的结构对 R_s 也有一定影响。在四种不同洗脱系统中, 缬氨酸、亮氨酸的拆分效果相似, 而芳香类氨基酸 N -乙酰- DL -苯丙氨酸甲酯的拆分效果不及上述两种脂肪类氨基酸。 N -乙酰- DL -色氨酸甲酯在不同洗脱系统中的容量因子 k' 虽然变化很大, 但分离因子 α 和 R_s 值却相差不多。当 k' 值由 59.5 降到 11.4 时, α 值仅由 1.10 降为 1.09, R_s 值由 0.54 降为 0.42。在我们的实验中, 这几种氨基酸衍生物都是 D 型比 L 型先洗脱(图 3), 同 Hara 等^[7]的结果一致。在上述实验条件下 N -乙酰- DL - α -苯乙胺完全不能拆分。

我们在工作过程中, 看到 Hara 等^[7]报道了数种 N -酰化- L -缬氨酰丙胺硅烷化硅胶固定相及用它拆分对映体的结果。虽然以 m 为单位计算柱效时, 我们的柱效与他们的相近, 但从实验结果来看, 在洗脱液相同的情况下, 我们在 10 cm 长的色谱柱上得到的 DL -

表 2 洗脱液组分对拆分 *N*-乙酰-*DL*-氨基酸甲酯对映体的影响(Resolution of *N*-Ac-*DL*-amino acids-OMe using a binary mixture composed of hexane and isopropanol)

$C_6H_{14}:i-C_3H_7OH$	参 数 (Parameters)	<i>DL</i> -Val	<i>DL</i> -Leu	<i>DL</i> -Phe	<i>DL</i> -Tyr
99:1	k'_1	17.82	25.00	25.07	
	k'_2	21.41	30.00	29.25	
	α	1.20	1.20	1.17	
	R_s	0.94	0.95	0.84	
98:2	k'_1	7.60	9.21	10.76	
	k'_2	9.00	10.85	12.24	
	α	1.18	1.18	1.14	
	R_s	0.78	0.79	0.64	
96:4	k'_1	4.28	4.47	5.38	54.14
	k'_2	4.88	5.13	5.91	59.46
	α	1.14	1.15	1.11	1.10
	R_s	0.57	0.62	0.49	0.54
92:8	k'_1	1.80	1.70	2.59	19.79
	k'_2	1.93	1.84	2.74	21.79
	α	1.07	1.08	1.06	1.10
	R_s	0.27	0.26	0.25	0.50
90:10	k'_1				10.24
	k'_2				11.36
	α				1.09
	R_s				0.42

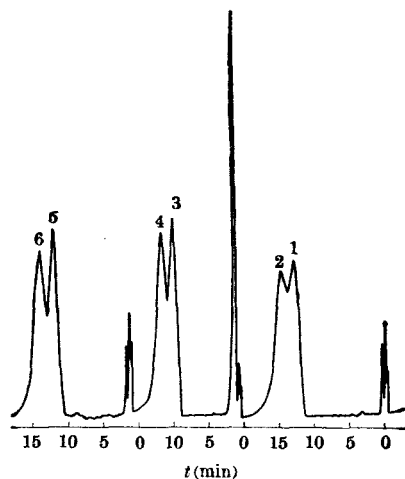
柱长: 10×0.5 cm I. D.; 流量: 1.3 mL/min (色氨酸衍生物洗脱流量: 2 mL/min); T : $27 \sim 33^\circ\text{C}$; 检测: UV 230 nm.

图 3 三种氨基酸衍生物拆分的色谱图

(Resolution of *N*-Ac-*DL*-amino acids-OMe)洗脱系统: 98:2 $C_6H_{14}-i-C_3H_7OH$; 其余条件同图 1

1—*N*-Ac-*D*-Phe-OMe; 2—*N*-Ac-*L*-Phe-OMe; 3—*N*-Ac-*D*-Val-OMe;
 4—*N*-Ac-*L*-Val-OMe; 5—*N*-Ac-*D*-Leu-OMe; 6—*N*-Ac-*L*-Leu-OMe

缬氨酸、DL-亮氨酸和 DL-苯丙氨酸衍生物的 α 值均高于他们在 20 cm 色谱柱测得的 α 值。

参 考 文 献

- [1] H. Furukawa, E. Sakakibara, A. Kamei, K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1625 (1975).
- [2] J. Goto, M. Hasegawa, S. Nakamura, K. Shimada, T. Nambara, *J. Chromatogr.* **152**, 413 (1978).
- [3] C. G. Scott, M. J. Petrin, T. McCorkle, *ibid.* **125**, 157 (1976).
- [4] 徐修容, 唐琴梅, 陈洁, 徐珩, *药学报* **16**, 127 (1981).
- [5] F. Mikeš, G. Boshart, E. Gil-av, *J. Chromatogr.* **122**, 205 (1976).
- [6] C. H. Lochmüller, R. R. Ryall, *ibid.* **150**, 511 (1978).
- [7] S. Hara, A. Dobashi, *ibid.* **186**, 543 (1979).
- [8] W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.* **44**, 1957 (1979).
- [9] G. Gübitz, W. Jellenz, *J. Chromatogr.* **203**, 377 (1981).
- [10] C. Pettersson, G. Schill, *ibid.* **204**, 179 (1981).
- [11] C. Gilon, R. Leshom, E. Grushka, *ibid.* **203**, 365 (1981).
- [12] H. Frank, G. J. Nicholson, E. Bayer, *ibid.* **146**, 197 (1978).
- [13] 张仁斌, 杨一鸣, 赵国栋 王圣群, 顾群, *中国科学* **23**, 309 (1980).

CHIRAL STATIONARY PHASE IN LIQUID CHROMATOGRAPHY

I. PREPARATION OF *L*-VALINE-*t*-BUTYLAMIDE TYPE BONDED PHASE AND ITS CHROMATOGRAPHIC CHARACTERISTICS IN RESOLUTION OF ENANTIOMERS

XU XIU-RONG* TANG QIN-MEI WANG RUN-YING

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica)

ABSTRACT

A new chiral chemically bonded stationary phase for direct resolution of optical isomers in HPLC was prepared. The experimental data showed that the chiral stationary phase gave good resolution for the racemic α -amino acid derivatives and that there was no significant influence on the resolution as the eluting rate varied from 0.6 to 2.0 mL/min. The content of isopropanol in the eluent significantly affected the resolution of the enantiomers. The eluent consisting of 1% isopropanol in hexane gave most favorable result, but the retention times were a little longer. It is evident that the resolution was also influenced by the structure of the solute. In all cases, the resolution of *N*-Ac-*DL*-Phe-OMe is lower than that of *N*-Ac-*DL*-Leu-OMe and *N*-Ac-*DL*-Val-OMe. Although the capacity factor of *N*-Ac-*DL*-Tyr-OMe varied greatly in different eluting systems, the separation factor and resolution were very close. It was observed that *D*-amino acid derivatives eluted faster than the corresponding *L*-isomers. In the above chromatographic conditions *N*-acetyl-*DL*- α -phenylethylamine could not be resolved.