

· 研究论文 ·

## 在 Chiral-AGP 柱上分离氟布洛芬、罗哌卡因、西替利嗪 和反式-2-苯基环丙基硼酸等外消旋体化合物

夏立钧\* 唐民华 丁左定 林琳 骆宏丰 贺溶

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

**摘要** 应用 HPLC 方法在 100 mm × 4.6 mm 的 Chiral-AGP 手性固定相柱上, 分离氟布洛芬、西替利嗪、罗哌卡因等手性药物和反式-2-苯基环丙基硼酸的对映体混合物. 考察了流动相 pH 值和缓冲液浓度等对样品在柱上的保留和分离的影响, 研究了流动相中加入四种不带电荷的有机添加剂乙腈、甲醇、正丙醇和异丙醇以及加入不同浓度的有机添加剂等对对映体分离性的影响. 此方法用于手性药物合成中的对映过量值的测定, 取得满意的效果.

**关键词** 手性固定相, 高效液相色谱, 对映体分离

## Separation of the Enantiomers of Flurbiprofen, Ropivacaine Hydrochloride, Cetirizine and *trans*-2-Phenylcyclopropylboronic Acid on a Chiral-AGP

XIA, Li-Jun\* TANG, Min-Hua DING, Zuo-Ding

LIN, Lin LUO, Hong-Feng HE, Rong

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract** The separation of the enantiomers of flurbiprofen, ropivacaine hydrochloride, cetirizine and *trans*-2-phenylcyclopropylboronic acid using HPLC on a 100 mm × 4.6 mm Chiral-AGP has been accomplished. The effect of pH value and concentration of mobile phase buffer on the chromatographic performance of enantiomers of racemates was examined. The influence of properties and concentration of organic solvents (acetonitrile, methanol, *n*-propyl alcohol and isopropyl alcohol) in mobile phase on retention time and enantioselective separation level of racemates was studied. This method had been successfully applied to the determination of the optical purity of the drug enantiomers resolved from their racemates.

**Keywords** chiral stationary phase, HPLC, separation of enantiomers

许多药物具有手性结构, 手性药物的生物活性往往主要取决于其中一个对映体, 对映体的这种差异不仅仅局限于药理效应和毒性大小, 而且在药物的吸收、分布代谢及排泄等方面也均有体现<sup>[1]</sup>. 以抗组胺药物西替利嗪为例, 由于其(+)对映体在治疗寻麻疹方面很具功效, 而它的(-)对映体则用于治疗过敏性错乱, 使用单一的立体异构体可以避免因

使用外消旋物混合物带来的副作用. 目前, 无论是手性农药还是医药都趋向于使用它们的光学纯对映体, 而与之相应的手性化合物的分离和检测方法的研究, 尤其是以手性固定相(CSP)为基础的 HPLC 方法引起人们极大关注.

Chiral-AGP 是一种应用得较广的手性固定相柱子<sup>[2,3]</sup>. 本文考察了氟布洛芬(Fluprofen) 西替利嗪

\* E-mail: xialj@pub.sioc.ac.cn

Received May 31, 2002; revised August 13, 2002; accepted August 30, 2002.

(Cetiz)、罗哌卡因( Lpky )这类手性药物和反式-2-苯基环丙基硼酸( Pcpb )在 AGP 手性固定相柱上的色谱行为 ;实验了流动相 pH 值及缓冲液浓度等对样品在柱上的保留及分离选择性的影响 ;研究了流动相中加入四种不带电荷的有机添加剂以及加入不同浓度的有机添加剂等对手性拆分的影响 .方法用于手性药物合成中的对映异构体过量值的测定 ,取得满意的效果 .

## 1 实验

### 1.1 仪器与试剂

用于本工作的 HPLC 系统为 Waters 的 M510 泵、M486 可变波长紫外检测器( UV254 及 210 nm )、Rheodyne7125 进样器及 Turbochrom4 色谱数据处理机组成 . 色谱柱为 100 mm × 4.6 mm i. d. 的 Chiral-AGP 粒径为 5 μm( Chrom Tech Ltd ).

用于配制流动相的磷酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、醋酸铵、醋酸钠及醋酸等均为分析纯试剂 ,乙腈( MeCN )、甲醇( MeOH )、异丙醇( 2-PA )、正丙醇( 1-PA )均为 HPLC( Merck 公司 )级试剂 .

### 1.2 外消旋体样品和光学活性样品溶液的制备

用于本工作的氟布洛芬( Fpofen ,由我所现代有机合成化学室提供 )、罗哌卡因( Lpky ,山东诚创医药技术开发公司提供 )、反式-2-苯基环丙基硼酸( Pcpb ,我所金属有机开放实验室提供 )和西替利嗪( Cetiz )的化学结构示于图 1. 实验时 ,用流动相溶液配制各自的外消旋体样品和光学活性样品溶液 ,其浓度及进样体积控制在每次色谱分析的样品量小于 5 nmol .

### 1.3 对映体分离能力的评价

下列参数用于对映体分离能力的评价 : $k_1'$ ( 容量因子 )= $(t - t_0)/t_0$  ,  $\alpha$ ( 分离因子 )= $k_2'/k_1'$  ,  $R_s$ ( 分离度 )= $\Delta(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$  . 此处  $t$  ,  $t_0$  分别为对映体的色谱保留时间和溶剂通过色谱柱的时间( 死时间 ) , $t_1$  ,  $t_2$  ,  $k_1'$  ,  $k_2'$  分别为柱上洗脱下来的第一个和第二个对映体的保留时间和容量因子 , $w_1$  ,  $w_2$  分别为一对对映异构体的基线峰宽 .

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相 pH 值对对映体分离的影响

AGP 具有较低的等电点( 2.7 ) ,当 pH 从 2.7 增加到 7 时 ,CSP 的净电荷为负值 ,这就为 CSP 与带电

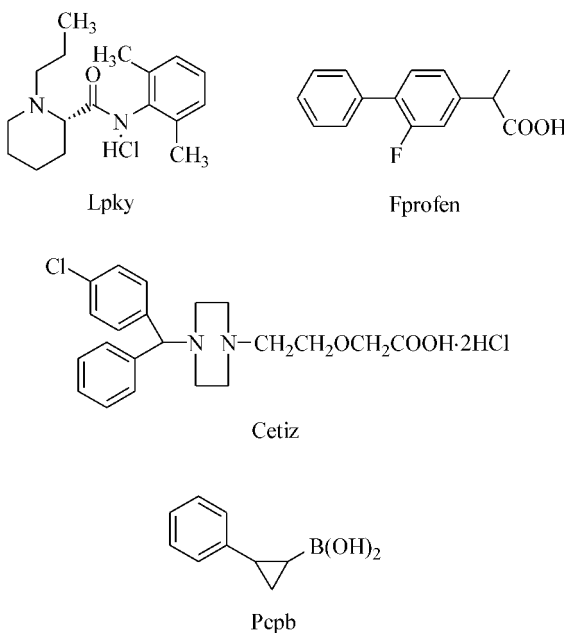


图 1 Lpky , Fpofen , Pcpb 和 Cetiz 四种手性化合物的结构  
Figure 1 Chemical structure of Lpky , Fpofen , Pcpb and Cetiz

荷的样品之间的相互作用创造了条件 .表 1 列出的是在 AGP 柱上流动相 pH 值的变化对这四种外消旋化合物对映体分离的影响 ,对于 Lpky , Cetiz 这类带有铵离子基团的样品 ,当 pH 从 4.0 变化到 7.0 时 ,随着 CSP 的负电荷增大 ,样品与 CSP 之间的作用力也增大 ,导致它们的  $k'$  增加和对映体之间的拆分得到改善(  $\alpha$  增加 ) .反之 ,对于 Pcpb 和 Fpofen 而言 ,  $k'$  和  $\alpha$  值随 pH 增大的变化或不那么明显( Pcpb ) 或有所下降( Fpofen ) .显然 ,对映体样品在 AGP 柱上分离效果与流动相 pH 之间相关的程度与样品的结构有关 .

### 2.2 流动相中有机添加剂的浓度对对映体分离的影响

Hermansson 等用实验证明 ,用作流动相添加剂的乙腈和丙醇等可以明显的吸附到 AGP 柱上 ,从而导致柱子选择性的改变<sup>[2]</sup> .表 2 表示的是流动相中有机添加剂 MeCN 和 2-PA 的浓度变化对三种对映体分离的影响 .从表 2 可见 ,随着流动相中 2-PA 或 MeCN 浓度的增加 ,对映体在柱上的保留值在变小 .其次 ,除了 Cetiz 的  $\alpha$  及  $R_s$  值随着 MeCN 浓度的增加而变小外 .对于 Fpofen 及 Lpky 而言 ,其  $R_s$  值先随着 2-PA 浓度的增大而增大 ,当  $R_s$  达到最大值后 ,又随着 2-PA 浓度增大而变小 .这个现象表明 ,流动相中加入 MeCN , 2-PA 等有机添加剂后诱导了 AGP 的对映体选择性发生变化 ,通过加入适量的此类添加剂 ,可以改善对映体分离 .

表 1 流动相 pH 值对对映体分离结果的影响<sup>a</sup>

Table 1 Influence of pH on the chromatographic properties of four pairs of racemates

化合物	pH	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	流动相
Cetiz	4.4	11.27	12.85	1.14	5% MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	5.0	11.87	14.00	1.18	5% MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	6.0	12.97	17.12	1.32	5% MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
	7.0	13.24	19.07	1.44	5% MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
Fprofen	4.0	> 50	> 50	—	3% 2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	5.0	> 50	> 50	—	3% 2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	6.0	13.17	17.15	1.30	3% 2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB
	7.2	8.72	10.55	1.21	3% 2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB
Pcpb	4.4	13.1	25.28	1.93	1% MeOH-0.01 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	5.0	12.4	22.69	1.83	1% MeOH-0.01 mol·L <sup>-1</sup> NaAc 缓冲液
	6.0	14.0	25.90	1.85	1% MeOH-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
	7.0	14.2	27.41	1.93	1% MeOH-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
Lpky	4.0	0.56	0.56	1	7% 2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
	5.0	1.10	1.10	1	7% 2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
	6.0	4.30	5.42	1.26	7% 2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB
	7.0	11.80	16.40	1.39	7% 2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB

<sup>a</sup> PB = 磷酸盐缓冲液.

表 2 流动相中有机添加剂浓度对于对映体分离的影响<sup>a</sup>

Table 2 Effect of concentration of mobile phase additives on the retention and enantioselectivity

化合物	OA/%	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$	流动相
Fprofen <sup>b</sup>	1	14.60	13.87	1.21	1.68	2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
	3	8.72	10.56	1.21	1.80	2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
	5	5.61	6.62	1.18	1.24	2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
	7	1.95	2.32	1.19	0.82	2-PA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
Lpky <sup>b</sup>	2	45.28	58.00	1.28	1.28	2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	5	18.48	25.50	1.38	1.39	2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	7	11.80	16.40	1.39	1.51	2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	10	8.54	11.53	1.35	1.45	2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	15	5.51	7.05	1.28	1.26	2-PA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
Cetiz <sup>c</sup>	5	13.24	19.07	1.44	3.78	MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
	6	9.41	13.17	1.40	2.32	MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
	7	7.04	9.15	1.30	1.69	MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
	8	5.85	7.20	1.23	1.34	MeCN-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )

<sup>a</sup> PB = 磷酸盐缓冲液 ; <sup>b</sup> OA = 2-PA ; <sup>c</sup> OA = MeCN.

2.3 有机添加剂种类对手性拆分的影响

表 3 比较了流动相中使用同一浓度的 4 种不带电荷的有机添加剂后 ,四个外消旋混合物在 AGP 柱上拆分的情况.随着添加剂的极性降低 ,样品在 AGP 上的保留值也有随之下降的趋势.表 3 的数据还表明 ,四种化合物在 AGP 上的  $R_s$  值及  $\alpha$  值与有机添加剂的性质有关 ,即使添加剂的性质只有少许差异 (如 1-PA , 2-PA ) ,也会使样品 Lpky 在 AGP 上的  $\alpha$  ,  $R_s$  值发生明显变化.由于有机添加剂具有不同的氢键特性 (如给体 ,受体特性 )和疏水特性 ,它们在 AGP 的可逆吸附会对 AGP 的选择性产生不同的影响.因

此 ,对映体化合物在 AGP 上的拆分性能(  $R_s$  )除了与样品的性质有关外 ,还与流动相中的有机添加剂性质有关.

2.4 缓冲液浓度对拆分的影响

流动相中磷酸盐的浓度也会对对映体分离结果带来影响.以 Fprofen 为例 ,用 3% 2-PA-磷酸盐缓冲液( pH 7.0 )为流动相时 ,当缓冲液浓度由 5 mol·L<sup>-1</sup> 逐级变换到 25 mol·L<sup>-1</sup> 时 ,首先从柱上洗脱下来对映体的  $k'$  由 2.8 增加到 8.7 ,二个对映体之间的  $R_s$  值也由 1.05 增至 1.86 ,适当地调节缓冲液浓度有利于改善对映体分离的效果.

表 3 流动相中使用不同调节剂的拆分结果比较<sup>a</sup>

Table 3 Comparison of the enantioselectivity using different mobile phase additives

化合物	OA	$k_1'$	$k_2'$	$\alpha$	$R_s$	流动相
Cetiz	2-PA	7.60	7.60	1.0	0	5% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
	MeCN	13.24	19.07	1.44	3.78	5% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
	MeOH	17.87	17.87	1.0	0	5% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.0 )
Fprofen	2-PA	8.72	10.55	1.21	1.86	3% OA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
	MeCN	11.62	12.55	1.08	0.68	3% OA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
	MeOH	13.82	13.82	1.0	0	3% OA-0.025 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 )
Pcpb	2-PA	7.01	10.52	1.50	1.92	1% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 6.0 )
	MeCN	10.11	17.79	1.76	3.18	1% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 6.0 )
	MeOH	12.30	23.12	1.88	3.97	1% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 6.0 )
Lpky	2-PA	11.80	16.40	1.39	1.51	7% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	MeCN	27.81	37.54	1.35	1.36	7% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	MeOH	> 50	—	—	—	7% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )
	1-PA	9.91	17.24	1.74	2.10	7% OA-0.01 mol·L <sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 )

<sup>a</sup> PB = 磷酸盐缓冲液 ; OA = 流动相有机添加剂 .

2.5 应用

图 2 表示的是在 AGP 上分别分离 Pcpb ( A ) ,

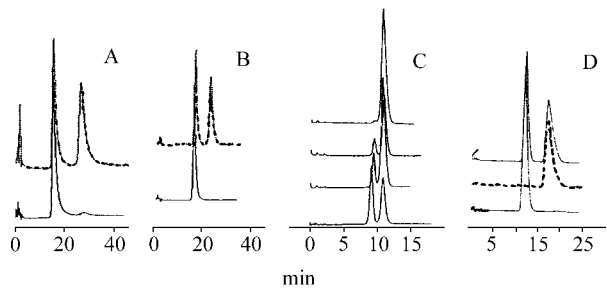


图 2 在手性 AGP 柱上 Pcpb , Cetiz , Fprofen 和 Lpky 的对映体分离

Figure 2 Enantiomeric separation of Lpky , Fprofen , Cetiz and Pcpb on AGP

( A ) Pcpb : MeOH/0.01 mol·L<sup>-1</sup> PB ( pH 6.0 ) = 1 : 99 ( V : V ) ,  $F = 0.8$  mL/min , UV = 214 nm ; ( B ) Cetiz : MeCN/0.01 mol·L<sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 ) = 5 : 95 ( V : V ) ,  $F = 0.9$  mL/min , UV = 214 nm ; ( C ) Fprofen : 2-PA/0.025 mol·L<sup>-1</sup> PB ( pH 7.2 ) = 3 : 97 ( V : V ) ,  $F = 0.8$  mL/min , UV = 214 nm ; ( D ) Lpky : 2-PA/0.01 mol·L<sup>-1</sup> PB ( pH 7.1 ) = 7 : 93 ( V : V ) ,  $F = 0.8$  mL/min , UV = 214 nm .

Cetiz ( B ) , Fprofen ( C ) 和 Lpky ( D ) 的结果 . 每张谱图上还比较了样品的外消旋体对照品及在不同合成条件下得到的对映异构体含量的情况 , 用此结果计算  $ee\%$  值及评价光学活性物质的纯度 , 取得满意效果 .

致谢 上海应用技术学院张丽洁、张雪芬、陈静、周辉同学曾参加部分实验工作 , 山东诚创医药技术开发公司于东海先生及上海有机所邓敏智先生提供部分样品特此致谢 .

References

1 Persson , B. A. ; Balmer , K. ; Legerstrom , P. O. *J. Chromatogr.* **1990** , 500 , 629 .

2 Hermansson , J. ; Hermansson , I. *J. Chromatogr.* **1994** , 666 , 181 .

3 Enguist , M. ; Hermansson , J. *J. Chromatogr.* **1990** , 519 , 271 .

( Y0205311 QIN , X. Q. ; DONG , H. Z. )