

3,5-双三氟甲基苯乙醇的手性毛细管电泳拆分

吴沁航¹, 李建其², 王旻^{1*} (1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009; 2. 上海医药工业研究院化学部, 上海 200437)

摘要:目的 建立用毛细管电泳对3,5-双三氟甲基苯乙醇对映体的手性拆分方法。方法 采用环糊精及其衍生物作为手性选择剂,用毛细管电泳技术对3,5-双三氟甲基苯乙醇对映体进行分离,考察了环糊精种类、环糊精浓度、缓冲溶液 pH 值、缓冲溶液浓度、分离电压、温度等因素对分离的影响,并对分离条件进行了优化和重复性考察。结果 在 pH=8.0 的磷酸缓冲溶液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磺丁基- β -环糊精为手性选择剂,15 kV 为分离电压,在 15℃ 下可使 3,5-双三氟甲基苯乙醇对映体达到基线分离,分离度为 1.54。分离度 RSD 小于 2%,迁移时间 RSD 小于 5%。结论 该方法简单快速,灵敏度高,重复性好。

关键词:毛细管电泳;3,5-双三氟甲基苯乙醇;磺丁基- β -环糊精;手性分离

中图分类号:R917.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)04-0256-04

作者简介:吴沁航,女,硕士研究生 Tel:13851830848 * 通讯作者:王旻,男,研究员,博士生导师

WU Qin-hang¹, LI Jian-qi², WANG Min^{1*} (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method for the separation of 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by capillary electrophoresis. **METHODS** Using β -cyclodextrin and its derivatives as chiral selectors. The effects of the type and the concentration of cyclodextrin, buffer pH, buffer concentration, voltage, and temperature used on resolution were studied and optimized. The reproducibility were also investigated. **RESULTS** Using $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sulfobutyl ether- β -cyclodextrin as the chiral selector, and $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate solution (pH 8.0) as the running buffer, the base line separation of 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol enantiomers was achieved with a resolution factor of 1.54. The RSD for resolution and migration time were lower than 2% and 5%. **CONCLUSION** The developed method is sensitive and accurate, and can be repeated easily.

KEY WORDS: Capillary electrophoresis; 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol; sulfobutyl ether- β -cyclodextrin; chiral separation

手性是自然的本质属性之一,光学活性物质广泛存在于生物、医药、环境等众多研究领域。在药学领域,具有手性中心的物质,其对映体之间的生物活性往往存在着显著差异。随着人们对手性药物认识的发展,手性化合物的分离分析具有非常重要的意义。毛细管电泳(CE)技术以其高效、快速、手性样品和试剂消耗量少等优点为手性化合物的分离提供了一条简便的途径,是一种行之有效的分离分析方法^[1-2]。近年来在毛细管电泳手性分离中,发展最快、应用最为广泛的手性选择剂是环糊精及其衍生物,它具有价廉、易得和分析范围广的优点^[3]。修饰后的环糊精物理化学性质会发生一定的变化,往往具有较好的手性识别能力。

3,5-双三氟甲基苯乙醇是一种重要的化学合成前体,广泛应用于医药、化工等领域。它的 α 碳原子为手性碳原子,有两种对映体见图1。S构型是NR1受体拮抗剂,是多种抗抑郁药的重要中间体,而R构型没有此活性。

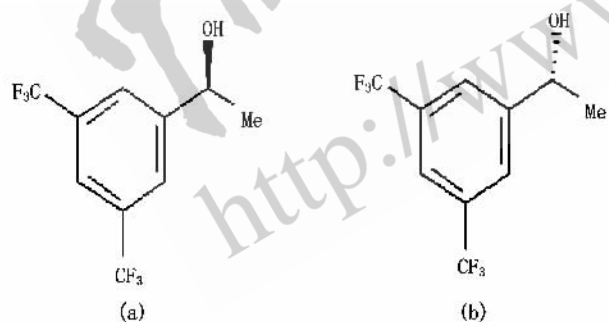


图1 3,5-双三氟甲基苯乙醇的对映异构体结构

Fig 1 Molecular structures of the enantiomers of 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol

(a) S-(-)-3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol; (b) R-(+)-3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol

本项研究建立了3,5-双三氟甲基苯乙醇的毛细管电泳拆分方法,通过考察手性选择剂、背景缓冲液和温度等因素对分离的影响,确立最佳实验条件,并进行了重复性考查,使3,5-双三氟甲基苯乙醇两个对映体达到了良好的分离。

1 仪器与试剂

Agilent G1100 毛细管电泳系统(配二极管阵列检测器);未涂层熔融石英毛细管柱($50 \mu\text{m} \times 48 \text{ cm}$,有效长度 40 cm ,河北永年光学纤维厂);Agilent ChemStation 工作站(仪器自带)。

磷酸氢二钠、磷酸均为分析纯(南京试剂一厂); β -环糊精(β -CD);羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)、磺丁基- β -环糊精(SBE- β -CD)(上海西宝生物科技有限公司);试验用水为重蒸水。3,5-双三氟甲基苯乙醇消旋对照品由本实验室经3,5-双三氟甲基苯乙酮(北京金奥利维科技有限公司)还原纯化制得。

磷酸缓冲溶液:精密称取一定量的 Na_2HPO_4 ,用重蒸水定容,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 或 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3PO_4 调至所需 pH,将环糊精溶于其中,经 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤。样品用重蒸水配制成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,冷藏备用。

电泳条件:每天运行前用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH,水和运行缓冲液分别洗柱 3,5,5 min,每两次运行之间用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH,水和运行缓冲液分别洗柱 2,3,3 min。正极进样,负极检测,进样压力为 50 mbar ,进样时间为 6 s ,紫外检测波长 210 nm 。

2 结果与讨论

2.1 手性选择剂类型对分离的影响

手性选择剂当前以环糊精及其衍生物最为常用。在毛细管电泳手性拆分中,不同类型的环糊精由于分子结构的差异、空腔大小和带电性质的不同,导致与对映体非对映异构作用的差异,因而具有不同的选择性^[4]。本研究选用电中性的 β -CD, HP- β -CD 和带负电的 SBE- β -CD 进行实验,结果表明, β -CD 和 HP- β -CD 对 3,5-双三氟甲基苯乙醇没有拆分作用,只有 SBE- β -CD 可拆分使其达到基线分离,电泳图见图 2。

SBE- β -CD 是一种带负电的 β -环糊精衍生物,其分子中磺酸基团的存在使之在宽的 pH 范围内解离而带负电,而且磺酸基团的亲水性使得环糊精在水中的溶解度得到很大提高^[5]。SBE- β -CD 与手性药物分子之间除了疏水包合作用和氢键作用外,负电性的 SBE- β -CD 在毛细管电泳中其迁移方向与带正电荷的 3,5-双三氟甲基苯乙醇恰好相反,这种相向

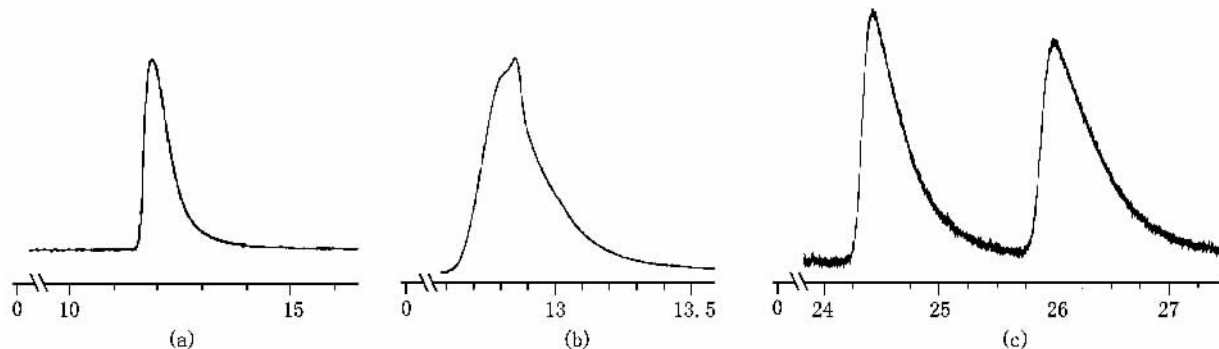


图2 不同手性选择剂分离3,5-双三氟甲基苯乙醇

Fig 2 Separation of 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol using different chiral selectors

(a) β -cyclodextrin (β -CD); (b) Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD); (c) sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD)

的迁移可以在手性选择剂和样品之间产生强的静电相互作用,使得它在拆分对映体时具有特殊的性质,用低浓度的手性选择剂就可以达到高的立体拆分效果^[6]。

2.2 缓冲液 pH 值对分离的影响

在毛细管电泳手性拆分中,背景电解质的 pH 值是一个重要的影响因素,因为它不仅影响电渗流的大小,也同时决定了被分析物的带电性,以及其有效迁移率的大小。我们选择了 pH 值为 5~10 进行研究,实验表明在 pH 小于 7 时,60 min 内未见拆分,这可能是由于低 pH 时电渗流小,总迁移率下降,而导致迁移时间过长^[7]。在 pH 值为 7~10 时,随着 pH 的增加,分离度先增加后降低,而迁移时间变短,见图 3。这是因为随着 pH 升高,SBE- β -CD 的电离度增加,与被分离样品之间相互作用的几率增加,但同时由于电渗流随着 pH 的升高而增大,使被分离样品与 SBE- β -CD 在毛细管柱的迁移时间变短,因而较高的 pH 值反而不利于对映异构体的分离。实验发现在 pH = 8.0 时,手性分离效果最好。

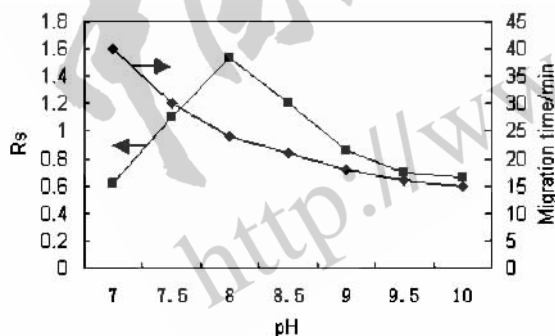


图3 缓冲溶液的 pH 对分离的影响

Fig 3 Influence of pH of buffer on resolution

Buffer, 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ SBE- β -CD; 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ Na₂HPO₄ at different pHs; injection 50 mpar $\times$ 6 s; separation voltage 15 kV; capillary temperature 15 $^{\circ}$ C

2.3 环糊精浓度对拆分的影响

在 pH = 8.0 的磷酸缓冲液中,考察了 0.005~0.04 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 SBE- β -CD 对拆分的影响。结果发现,随着环糊精浓度的增大,其分离度增加,但迁移时间变长,见图 4。这是由于随着 SBE- β -CD 浓度的增加,3,5-双三氟甲基苯乙醇与 SBE- β -CD 疏水性空腔之间的络合能力增大,增强了手性识

别作用,分离度增大;同时,由于 SBE- β -CD 与 3,5-双三氟甲基苯乙醇的结合,具有了与电渗流方向相反的电泳迁移率,随着 SBE- β -CD 浓度的增加延长了出峰时间。综合考虑迁移时间和分离度,选择缓冲溶液中 SBE- β -CD 的浓度为 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹。

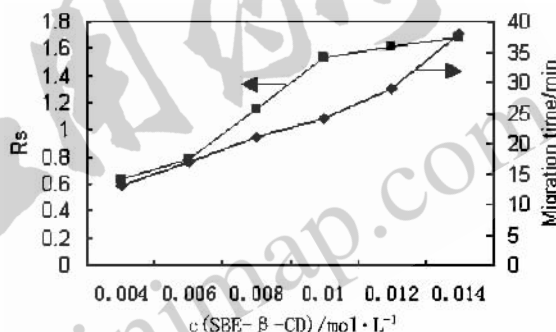


图4 SBE- β -CD 浓度对分离的影响

Fig 4 Influence of concentration of SBE- β -CD on resolution

Buffer, 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ Na₂HPO₄ at pH = 8; different concentrations of SBE- β -CD; injection 50 mpar $\times$ 6 s; separation voltage 15 kV; capillary temperature 15 $^{\circ}$ C

2.4 缓冲溶液浓度对拆分的影响

选择含 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ SBE- β -CD 的不同 Na₂HPO₄-H₃PO₄ 浓度的缓冲体系 (pH = 8.0),考察 3,5-双三氟甲基苯乙醇对映体的分离度随 Na₂HPO₄ 浓度的变化趋势。当 Na₂HPO₄ 由 0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 上升到 0.075 mol $\cdot$ L⁻¹ 时,分离度先增大后降低,而且迁移时间逐渐增加,见图 5。这是因为低浓度的缓冲溶液离子强度不够,缓冲溶液浓度过高,焦耳热增大,体系黏度增加,影响分离度,并延长了出峰时间。在缓冲溶液浓度为 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 时两个对映异构体达到基线分离 (Rs = 1.54),迁移时间相对较短,故选择缓冲溶液的浓度为 0.05 mol $\cdot$ L⁻¹。

2.5 分离电压和温度对拆分的影响

实验表明,较低的温度和电压有利于拆分。这是由于温度升高会使溶液的黏度降低,迁移时间缩短,并且较高的温度会降低络合物的稳定性,因此较低的温度有利于拆分。电压为 15~25 kV 时,随着电压的升高导致电流增大,从而使

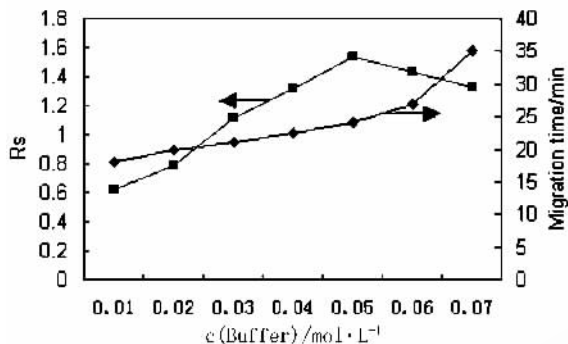


图5 缓冲溶液浓度对分离的影响

Fig 5 Influence of concentration of buffer on resolution

Buffer, 0.01 mol · L⁻¹ SBE-β-CD; different concentration of Na₂HPO₄ at pH = 8.0; injection 50 mpar × 6 s; separation voltage 15 kV; capillary temperature 15℃

焦耳热增大,分离度降低。综合考虑分离度和迁移时间,选择分离温度为 15℃,分离电压为 15 kV。

2.6 拆分条件的重复性

3,5-双三氟甲基苯乙醇对映异构体在 0.01 mol · L⁻¹ 的 SBE-β-CD 为手性选择剂,0.05 mol · L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH = 8.0) 为电泳缓冲液,15 kV 为分离电压,15℃ 条件下能得到良好的拆分,分离度达 1.54。在同样条件下,将 1 mg · mL⁻¹ 的 3,5-双三氟甲基苯乙醇消旋体于 1 日内重复进样 5 次,测得分离度平均值为 1.52, RSD = 0.56%, 迁移时间平均值为 24.5 min, RSD = 1.88%; 于 5 d 内重复进样 5 次 (1 日 1 次), 测得分离度平均值为 1.50, RSD = 0.92%, 迁移时间平均值为 24.8 min, RSD = 3.23%。可见,该条件的重复性较好,日内 RSD < 3%, 日间 RSD < 5%。

3 结语

综上所述,SBE-β-CD 是拆分 3,5-双三氟甲基苯乙醇比

较合适的手性选择剂,经过对分离条件进行优化,3,5-双三氟甲基苯乙醇两个对映体能达到良好的分离,并且重复性较好,能实现快速、高效的拆分。

参考文献

- [1] ZHU X F, LIN B CH. Chiral resolution by Capillary Electrophoresis[J]. Chin J Chromatogr (色谱), 1999, 17(2): 153-157.
- [2] YOU J, LAO W J, WANG G J. Enantiomeric separation of pesticides by high performance Capillary Electrophoresis[J]. Anal Test Technol Instrum (分析测试技术与仪器), 2001, 7(2): 100-104.
- [3] RUAN Z Q, LU H J, LI J B, *et al.* Enantiomeric separation of five basic drugs with cyclodextrins as chiral additive by Capillary Electrophoresis[J]. Chin J Anal Chem (分析化学研究简报), 2000, 2(28): 201-205.
- [4] FRIDSTROM A, NYHOLM L, MARKIDES K E, *et al.* Neutral cyclodextrins as chiral agents for enantiomeric separations of chromanes in Capillary Electrophoresis[J]. Chromatographia, 1997, 44 (5/6): 313-319.
- [5] LU H J, RUAN Z Q, OU Q Y. Synthesis and application of sulfobutyl ether-β-cyclodextrins as chiral additives for chiral separation by Capillary Electrophoresis[J]. Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2000, 5(19): 16-19.
- [6] GUO L, LIN SH J, YANG Y F, *et al.* Capillary Electrophoresis enantioseparation of arylglycine amids with high sulfated β-cyclodextrins as chiral selector[J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2002, 20(9): 407-410.
- [7] LI D M, LI C F, LIU S X, *et al.* Chiral separation of 3-Phenyllactic Acid by Capillary Electrophoresis [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2004, 22(3): 281-283.

收稿日期: 2006-10-16