

高效液相色谱法分离测定 3-取代-(R,S)-β-丙氨酸对映异构体

陈衍强, 邱孝苹, 徐修容

(上海安化生物技术有限公司, 上海 200237)

摘要: 以 1-氟-2,4-二硝基-5-L-缬氨酰胺(Marfey 试剂)为衍生试剂,采用反相高效液相色谱法分离了 3-取代-(R,S)-β-丙氨酸对映异构体。采用梯度洗脱(流动相 A:体积分数为 0.1% 的三氟乙酸乙腈溶液;流动相 B:体积分数为 0.1% 的三氟乙酸水溶液)成功分离了 32 种 3-取代-(R,S)-β-丙氨酸衍生物,所有化合物都是 R 型异构体衍生物(R-L)较 S 型异构体衍生物(S-L)先洗脱。除 3-羟基苯和 4-羟基苯的疏水参数较小,但其取代的 β-丙氨酸衍生物的保留时间较长、分离因子较小外,其他疏水参数大的取代基的 β-丙氨酸衍生物保留时间都长于疏水参数小的取代基的 β-丙氨酸衍生物。该文同时测定了 R-和 S-β-丙氨酸的对映体过剩值。

关键词: 高效液相色谱法; 3-取代-(R,S)-β-丙氨酸衍生物; 对映异构体; 对映体过剩值

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)03-0279-03

Separation of 3-Substituted-(R,S)-β-Alanine Derivatives by High Performance Liquid Chromatography

CHEN Yanqiang, QIU Xiaoping, XU Xiurong

(Shanghai ACI Biotech Co. Ltd., Shanghai 200237, China)

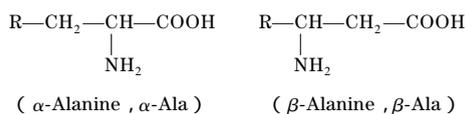
Abstract: 3-Substituted-(R,S)-β-alanines derivatized by 1-fluoro-2,4-dinitro-5-L-valinamide (Marfey's reagent) were successfully separated by reversed-phase high performance liquid chromatography. The separations were performed with gradient elution. The mobile phase A was acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and the mobile phase B was 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid aqueous solution. Thirty-two pairs of 3-substituted-(R,S)-β-alanine derivatives, phenyl, substituted phenyl, naphthyl, substituted pyridyl and thienyl, were separated. The mobile phase A content was changed from 35% to 75% in 20 min. All (R-L)-diastereomers were eluted prior to the (S-L) ones. Substituents with larger hydrophobic parameters (π) gave longer retention times (t_R) for their derivatives than those with smaller ones except for 3-hydroxyphenyl and 4-hydroxyphenyl substituents. The positioning of the substituents on benzene ring of β-alanines (β-Ala) also influenced t_R and separation. 4-Substituted-phenyl-(R,S)-β-Ala derivatives gave longer t_R and better separation than 2-substituted isomers. The enantiomer excess values of R- and S-β-Ala were also determined.

Key words: high performance liquid chromatography; 3-substituted-(R,S)-β-alanine derivatives; enantiomer; enantiomer excess values

α-氨基酸(α-AA)的应用已为人们所熟知,而有关 β-氨基酸(β-AA)的应用尚不多见。最近药物学家将 β-氨基酸作为药物的组成成分引入到药物分子中,合成了具有不同作用的新药^[1,2],使得 β-AA 在药物研究中具有良好的应用前景。为了给药物学家提供新型的 β-AA,我们合成了多种具有不同取代基的(R,S)-β-丙氨酸(β-Ala) (结构式见图 1),以及光学纯度(以对映体过剩值(ee)计)达 98% 的 β-Ala。

以高效液相色谱法(HPLC)拆分 β-氨基酸的研究不多,β-氨基酸衍生物对映体的拆分常用手性拆

分方法^[3]。曾有人用拆分 α-氨基酸的手性流动相法拆分(R,S)-β-亮氨酸(leucine),但未获成功^[4];而以 D-(+)-10-樟脑磺酸和 Marfey 试剂(1-氟-2,4-二硝基-5-L-缬氨酰胺(FDNP-Val-NH₂))^[5,6]为衍生



For R, see Table 1.

图 1 α-丙氨酸和 β-丙氨酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of α-alanine and β-alanine

试剂衍生,可使两组非对映异构体都得到分离,其中 Marfey 试剂的衍生物分离效果更佳。我们以 Marfey 试剂为衍生试剂,采用柱前衍生化法,成功地分离了 32 种 3-取代-(*R,S*)- β -丙氨酸,大多数化合物都得到了极佳的分离效果;同时测定了它们的对映体过剩值。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 600S 泵,717 型自动进样器,490 型可变波长检测器,Millennium 2010 操作系统。

乙腈、甲醇为色谱纯(上海化学试剂研究所),丙酮为分析纯(上海菲达公司),碳酸氢钠为分析纯(上海红光化工厂),三氟乙酸纯度为 99%(Merck 公司),FDNP-Val-NH₂(Nova Biochem 公司)。

1.2 色谱条件

Waters NovaPak C₁₈ 柱(5 μ m,150 mm \times 3.9 mm i. d.)。流动相 A:乙腈(含 0.1%(体积分数)的三氟乙酸);流动相 B:水(含 0.1%(体积分数)三氟乙酸);线性梯度程序 35% A $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 75% A,流速 1.0 mL/min。检测波长 340 nm。柱温 30 $^{\circ}$ C。进样量 20 μ L。

1.3 标准液的配制和衍生化反应

取 100 mg FDNP-Val-NH₂ 溶于 10 mL 丙酮中,配成 10 g/L 的溶液。取样品 2~4 mg,加入 750 μ L 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液和 750 μ L 50%(体积分数)的甲醇水溶液。样品溶解后取出 30~50 μ L,再加入 18 μ L FDNP-Val-NH₂ 丙酮溶液。混合均匀后于 40 $^{\circ}$ C 下反应 1.5 h,然后用 350 μ L 甲醇稀释,放入自动进样器中进样。

2 结果和讨论

2.1 洗脱条件的选择

分离(*R,S*)- β -亮氨酸使用的衍生试剂为 1-氟-2-*A*-二硝基-5-*L*-丙氨酸酰胺,用 30%(体积分数)乙腈水溶液等度洗脱,其衍生物的分离效果极佳,但分离过程需要 35 min。我们所要拆分的 3-取代-(*R,S*)- β -丙氨酸对映体疏水性($\log P$)都大于(*R,S*)- β -亮氨酸;所用 Marfey 试剂的 $\log P$ 也大于分离(*R,S*)- β -亮氨酸使用的衍生试剂。为了缩短分离时间,本文采用梯度洗脱,并使乙腈的体积分数在 20 min 内由 35% 升至 75%。在此条件下,32 种 3-取代-(*R,S*)- β -丙氨酸的非对映异构体得到较好的分离,且保留时间(t_R)为 5~13 min,结果见表 1。

2.2 化学结构与 t_R 和分离因子(α)的关系

3-取代-(*R,S*)- β -Ala 的取代基 R 为芳香或杂

表 1 3-取代-(*R,S*)- β -Ala 衍生物的分离
Table 1 Separation of 3-substituted-(*R,S*)- β -alanine derivatives

R in Fig. 1	π^*	Retention times/min			α
		$t_{R(R)}$	$t_{R(S)}$	Δt	
Phenyl	2.31	6.47	9.25	2.78	1.54
2-Fluorophenyl	2.27	6.50	8.78	2.28	1.44
3-Fluorophenyl	2.27	6.08	8.57	2.49	1.52
4-Fluorophenyl	2.27	6.60	9.23	2.63	1.50
2-Chlorophenyl	2.84	6.91	9.25	2.34	1.42
3-Chlorophenyl	2.84	7.45	10.78	3.33	1.54
4-Chlorophenyl	2.84	7.50	10.48	2.98	1.48
2-Bromophenyl	2.99	6.82	8.87	2.05	1.37
3-Bromophenyl	2.99	7.35	10.35	3.00	1.50
4-Bromophenyl	2.99	8.22	11.38	3.16	1.46
2-Trifluoromethyl phenyl	3.01	7.33	9.52	2.19	1.36
3-Trifluoromethyl phenyl	3.01	8.10	10.77	2.67	1.39
4-Trifluoromethyl phenyl	3.01	9.38	11.95	2.57	1.34
α -Naphthyl	3.37	8.77	11.62	2.85	1.38
β -Naphthyl	3.37	9.00	11.75	2.75	1.36
2- β -Dichlorophenyl	3.55	8.47	11.13	2.71	1.37
2- A -Dichlorophenyl	3.55	8.95	11.88	2.93	1.38
6-Methoxyppyridyl	0.63	4.46	6.13	1.67	1.53
6-Chloropyridyl	1.34	4.76	6.72	1.94	1.56
2-Hydroxyphenyl	1.46	5.03	6.63	1.60	1.43
3-Hydroxyphenyl	1.46	10.90	11.63	0.73	1.07
4-Hydroxyphenyl	1.46	11.13	12.22	1.03	1.11
2-Thienyl	1.81	5.65	7.60	1.95	1.40
3-Thienyl	1.81	5.97	8.38	2.41	1.52
2-Nitrophenyl	1.85	6.42	7.98	1.56	1.29
3-Nitrophenyl	1.85	6.43	8.67	2.24	1.44
4-Nitrophenyl	1.85	6.70	8.93	2.23	1.42
3-Cyanophenyl	1.56	5.37	7.02	1.65	1.41
4-Cyanophenyl	1.56	5.62	7.28	1.66	1.39
2-Methylphenyl	2.69	6.58	9.03	2.45	1.47
3-Methylphenyl	2.69	6.83	9.63	2.80	1.51
4-Methylphenyl	2.69	6.98	9.48	2.50	1.44

* π : hydrophobic parameter.

环类,如苯基、萘基、取代苯基、噻吩基和取代吡啶基。它们的结构和疏水参数(π)各不相同, π 值相差很大,如 2- β -二氯苯基和 2-*A*-二氯苯基的 π 值为 3.55,6-甲氧基吡啶基的 π 值为 0.63^[7],其他取代基 R 的 π 值都介于两者之间,这些取代基取代的 β -Ala 的 t_R 也多在 2- β -二氯苯基和 6-甲氧基吡啶基- β -Ala 的 t_R 之间,这表明取代基 R 的 π 值和 t_R 之间有一定的相关性,其中羟基苯的 π 值较小,3-(2-羟基苯基)- β -Ala 衍生物的 t_R 也较短, α 值和其他化合物相近;但 3-(3-羟基苯基和 4-羟基苯基)- β -Ala 衍生物的 t_R 都较长,而 α 值却较小。我们分析可能是间位和对位的羟基也与衍生试剂发生了反应,而邻位的羟基由于空间位阻作用较难与衍生试剂作用。这一特殊情况值得进一步探讨。此外,苯环上取代基的位置对 t_R 也有一定影响。多数情况下,2-取代苯基化合物的 t_R 和 α 都与 4-取代相应化合物

有差异, t_R 较短, α 值较小。本文在同一洗脱系统下分离了若干3-取代-(*R,S*)- α -Ala的Marfey试剂衍生物,并与3-取代-(*R,S*)- β -Ala做了分离情况的比较(见表2)。从表2可以看出,虽然取代基R相同,但 α -Ala衍生物的 t_R 较 β -Ala衍生物的长,而 β -Ala的衍生物的分离因子 α 值大。图2给出了(*R,S*)-3-(4-甲基苯基)- α -丙氨酸和(*R,S*)-3-(4-甲基苯基)- β -丙氨酸的色谱图。

2.3 3-取代- β -Ala的构型与洗脱顺序的关系

文献[6]报道取代基为中性基团(如萘基、苯基等)的3-取代-(*R,S*)- α -Ala的Marfey试剂衍生物的*S*型先洗脱,*R*型后洗脱;而取代基为碱性基团(如吡啶基)的3-取代-(*R,S*)- α -Ala的Marfey试剂衍生物是*R*型先洗脱,*S*型后洗脱。而3-取代-(*R,S*)- β -Ala的*R- β -Ala和*S- β -Ala与Marfey试剂反应生成非对映异构体,都是*R*型衍生物先洗脱,*S*型衍**

生物后洗脱,碱性3-取代- β -Ala也不例外,绝大多数*R*型 β -Ala的旋光为左旋,大多数*S*型 α -Ala的旋光也为左旋。

2.4 对映体过剩值的测定

分别测定非对映体的峰面积,按以下公式计算对映体过剩值(*ee*)亦即光学纯度):

$$ee_{(R-AA)} = \frac{[A_{(R-L)} - A_{(S-L)}]}{[A_{(R-L)} + A_{(S-L)}]} \times 100\%$$

$$ee_{(S-AA)} = \frac{[A_{(S-L)} - A_{(R-L)}]}{[A_{(S-L)} + A_{(R-L)}]} \times 100\%$$

其中*A*为峰面积,*R*和*S*为氨基酸的对映异构体,*L*为衍生试剂的构型。

根据以上公式,计算图2-b中*S*-3-(4-甲基苯基)- β -丙氨酸的光学纯度为98.2%(产品要求其光学纯度要高于98%)。

表2 3-取代-(*R,S*)- α -Ala衍生物和3-取代-(*R,S*)- β -Ala衍生物分离的比较

Table 2 Separation of derivatives of 3-substituted-(*R,S*)- α -alanine and 3-substituted-(*R,S*)- β -alanine

R in Fig. 1	α -Ala				β -Ala			
	retention time/min			α	retention time/min			α
	$t_{(R,S)}$	$t_{(R,R)}$	Δt		$t_{(R,R)}$	$t_{(R,S)}$	Δt	
4-Fluorophenyl	7.57	9.87	2.30	1.37	6.60	9.23	2.63	1.50
4-Chlorophenyl	9.83	12.60	2.77	1.33	7.50	10.48	2.98	1.48
4-Bromophenyl	10.42	13.13	2.69	1.30	8.22	11.38	3.16	1.46
4-Cyanophenyl	6.90	8.45	1.55	1.28	5.62	7.28	1.66	1.39
4-Methylphenyl	8.15	10.72	2.56	1.38	6.98	9.48	2.50	1.44
4-Trifluoromethyl phenyl	10.70	13.03	2.33	1.25	9.38	11.95	2.57	1.34
4-Nitrophenyl	7.83	9.57	1.74	1.27	6.70	8.93	2.23	1.42
α -Naphthyl	10.08	12.77	2.69	1.31	8.77	11.62	2.85	1.38
β -Naphthyl	10.48	13.10	2.62	1.29	9.00	11.75	2.75	1.36
3-Thienyl	6.52	8.67	2.15	1.41	5.97	8.38	2.41	1.52

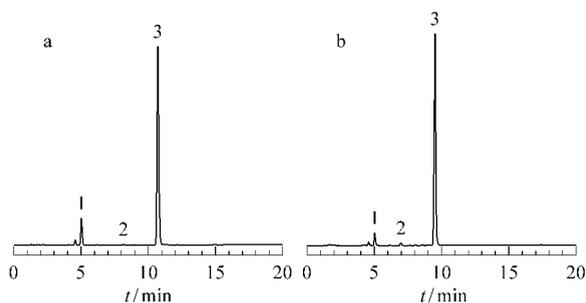


图2 (*R,S*)-3-(4-甲基苯基)- α -丙氨酸(a)和(*R,S*)-3-(4-甲基苯基)- β -丙氨酸(b)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (*R,S*)-3-(4-methylphenyl)- α -alanine (a) and (*R,S*)-3-(4-methylphenyl)- β -alanine (b)

Peaks: a. 1. FDNP-Val-NH₂; 2. *S*-3-(4-methylphenyl)- α -alanine; 3. *R*-3-(4-methylphenyl)- α -alanine. b. 1. FDNP-Val-NH₂; 2. *R*-3-(4-methylphenyl)- β -alanine; 3. *S*-3-(4-methylphenyl)- β -alanine.

参考文献:

- [1] Grayson I, Drauz K. *Chimica OGGI/Chemistry Today*, 2002, 20(10): 15
- [2] Ma J S. *Chimica OGGI/Chemistry Today*, 2003, 21(6): 65
- [3] D'Acquarica I, Gasparini F, Misiti D, Zappia G, Cimarelli C, Palmieri G, Carotti A, Cellamere S. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11(11): 2375
- [4] Aberhart D J, Cotting J A, Lin H J. *Anal Biochem*, 1985, 151(1): 88
- [5] Bruckner H, Keller-Hoehl C. *Chromatographia*, 1990, 30(11-12): 621
- [6] Chen Kan, Chen Yanqiang, Xu Xiurong, Yu Youjuan, Guo Zhongqiu, Jiang Xiaoming. *Chinese Journal of Chromatography* (陈侃, 陈衍强, 徐修容, 俞幼娟, 郭仲秋, 蒋晓明. 色谱), 2000, 18(1): 14
- [7] Hansch C, Leo A, Unger S H, Kim K H, Nikaitani D, Lien E J. *J Med Chem*, 1973, 16(11): 1207