

纤维素衍生物手性固定相 HPLC 拆分非洛地平对映体^①

唐晓丹 王绍艳^② 丛景香 王智超

(辽宁科技大学化学工程学院 辽宁省鞍山市高新区千山路 185 号 114051)

摘 要 采用高效液相色谱法(HPLC),在硅胶涂敷纤维素三-(4-甲基苯甲酸酯)手性固定相上拆分非洛地平。研究了异丙醇体积含量、流速及柱温对非洛地平对映体拆分行为的影响。同时还模拟了在制备分离条件时,增大进样体积和进样浓度对非洛地平拆分的影响。并结合色谱理论和热力学理论对非洛地平的手性识别机理进行探讨。实验表明在正己烷:异丙醇=90:10,流速 0.8 mL/min,柱温 30℃时,非洛地平对映体可实现基线分离。

关键词 高效液相色谱法;纤维素衍生物固定相;非洛地平;手性分离

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2011)05-2573-05

1 引言

随着生命科学的发展,人们越来越认识到,外消旋体药物中对映异构体的错误使用是一种严重的药物污染,其毒副作用有时可能比具有医药活性对映体的疗效要大得多^[1]。非洛地平是一种长效的二氢吡啶类钙通道阻滞剂,抑制心血管肌膜钙离子的活动,扩张外周血管而导致血压下降^[2]。由于其左旋体和右旋体药理学特征的不同,不良反应也不同,具体表现为头痛和面部潮红,右旋体与左旋体和消旋体比较,不良反应的发生率更高^[3]。已有报道采用 α -酸性糖蛋白柱^[4]、纤维素^[5,6]以及替考拉宁^[7]手性固定相拆分非洛地平对映体。本文采用固定相为纤维素三-(4-甲基苯甲酸酯)的 Chiralcel OJ 手性柱拆分非洛地平对映体。对影响药物拆分的主要因素,如醇类添加剂的种类及含量、流速及色谱柱温进行研究,同时还模拟了制备分离条件时,增大进样体积和进样浓度对非洛地平保留及拆分的影响,并结合色谱理论和热力学参数对非洛地平的手性识别机理进行探讨。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-10AT VP 高效液相色谱仪、SPD-10A VP 紫外检测器(日本岛津公司);HP-5205 色谱柱温箱(上海济成分析仪器有限公司);Chiralcel OJ 手性柱(10 μ m, 250mm \times 4.6mm,日本 Daicel 公司);SB 2200 超声器(上海申波超声公司)。

非洛地平(纯度>99.0%,湖北恒硕化工有限公司);正己烷、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异

① 辽宁省教育厅创新团队项目(2008T093);辽宁科技大学青年基金团队项目子课题(2010T06);辽宁科技大学大学生科研训练项目(第六期)

② 联系人,电话:(0412)5929480;E-mail:aswsy64@163.com

作者简介:唐晓丹(1979—),女,辽宁省盘锦市人,讲师,硕士,主要从事手性药物及天然药物分离工作。

收稿日期:2011-01-06;接受日期:2011-02-23

丁醇、叔丁醇(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司);实验用水为二次蒸馏水(自制)。

2.2 色谱条件

色谱柱: Chiralcel OJ 柱(10 μ m, 250mm \times 4.6mm);流动相为不同体积比的极性添加剂与正己烷组成的正相体系;流速 0.8mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 254nm;进样量 20 μ L;样品及流动相配成合适浓度,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤并超声脱气后使用。

3 结果与讨论

实验采用的 Chiralcel OJ 柱为纤维素类手性柱,手性识别主要取决于聚合物螺旋型空穴的“立体配合”包结作用,高度有序螺旋通道对芳环有较高聚合合力,被分离的溶质分子可与固定相上的甲酸酯基团、苯基基团产生氢键、偶极-偶极和 π - π 作用等,以实现手性拆分的目的。结合色谱参数容量因子 k' 、分离因子 α 和分离度 R_s ^[8] 来讨论各因素对非洛地平对映体拆分的影响。

3.1 极性添加剂的种类和体积含量对拆分的影响

考察乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇和叔丁醇为流动相中极性添加剂对非洛地平对映体分离的影响。从分离效果来看,只有异丙醇能够使非洛地平基线分离(图 1), R_s 为 1.624。其余极性添加剂均不能基线分离非洛地平。因此,选择异丙醇为流动相极性添加剂。

以正己烷-异丙醇为流动相,流速 0.8mL/min, 30 $^{\circ}$ C 条件下,考察了异丙醇体积含量对非洛地平对映体分离的影响。色谱保留及拆分结果见表 1。

表 1 异丙醇含量对非洛地平对映体拆分的影响

正己烷:异丙醇(V:V)	k_1'	k_2'	α	R_s
95:5	7.613	12.394	1.628	2.211
90:10	3.154	5.120	1.623	1.531
85:15	1.628	2.628	1.614	1.128
80:20	1.035	1.621	1.566	0.679
75:25	0.724	1.104	1.524	0.498

由表 1 可知,随着异丙醇含量的减少,对映体的容量因子 k' 和分离因子 α 随之增大。这主要是由于随着醇的减少,溶剂极性降低,洗脱能力下降,醇与溶质竞争固定相上的氢键作用部位减弱,溶质与手性固定相的作用增强,在固定相上的保留和立体选择性增加,从而使得手性识别增强。正己烷:异丙醇=95:5 时, R_s 可达 2.211,但此时对映体保留时间相对较长,实验最终选择流动相比例为正己烷:异丙醇=90:10(V/V)。

3.2 流速对拆分的影响

在正己烷:异丙醇=90:10(V/V),温度 30 $^{\circ}$ C,检测波长 254nm 条件下,考察了不同流速对非洛地平拆分的影响,拆分结果见表 2。

由表 2 可知,流速越小,物质在固定相的保留越长,分离度相对越高;但流速过低时,出峰时间慢,对映体的色谱峰会变宽,峰形变差。在考察的流速范围内,随着流速逐渐增大,对映体的保留因

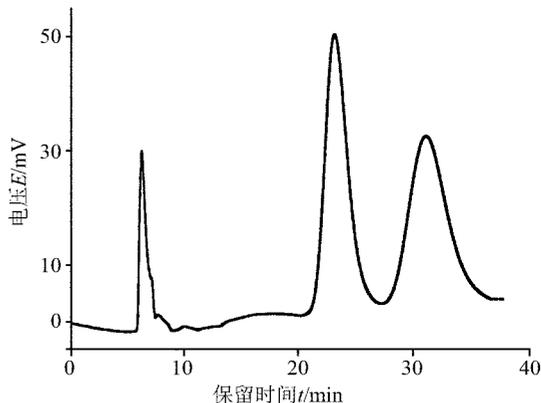


图 1 非洛地平对映体拆分数谱图

流动相:正己烷:异丙醇=90:10(V/V);温度:30 $^{\circ}$ C;流速:0.8mL/min;检测波长:254nm。

子 α 和容量因子 k' 变化不大。实验最终选择 0.8 mL/min 为最佳流速。

表 2 不同流速对非洛地平对映体保留及分离的影响

流速 (mL/min)	k'_1	k'_2	α	R_s
0.4	3.194	5.196	1.627	1.650
0.6	3.179	5.165	1.625	1.568
0.8	3.154	5.120	1.623	1.531
1.0	3.073	4.986	1.622	1.247
1.2	3.067	4.953	1.615	0.892

3.3 色谱柱温对拆分的影响

在色谱法分离光学异构体过程中, 溶质的容量因子 k' 和分离因子 α 与柱温的关系可用 Van't Hoff 方程表示^[9]:

$$\ln k' = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R + \ln \Phi = -\Delta H^0/RT + \Delta S^* ;$$

$$\ln \alpha = -\Delta \Delta G^0/RT = -\Delta \Delta H^0/RT + \Delta \Delta S^0/R$$

式中: k' ——容量因子; Φ ——相比; T ——柱温; R ——气体常数。在一定的温度范围内, $\ln k'$ 和 $\ln \alpha$ 分别与 $1/T$ 作图可得到良好的线性关系, 从曲线的斜率和截距可以求得色谱保留过程中自由焓 ΔH^0 和其差值 $\Delta \Delta H^0$, 熵值 ΔS^0 和其差值 $\Delta \Delta S^0$ 。由于熵焓相互抵消的性质而存在一个等对映体选择温度 T_{iso} , 即 $\Delta \Delta G^0 = 0, T_{iso} = \Delta \Delta H^0 / \Delta \Delta S^0$ 。此时, 对映体不能分离。

为了进一步探讨手性识别机理, 实验考察了不同柱温对非洛地平拆分的影响。结果见表 3。结合分析时间和分离效果, 实验选择 30°C 为最佳温度。

表 3 不同温度对非洛地平对映体保留及分离的影响

温度 (°C)	k'_1	k'_2	$\ln k'_1$	$\ln k'_2$	α	$\ln \alpha$	R_s
15	3.742	6.331	1.319	1.845	1.692	0.526	0.713
20	3.397	5.612	1.222	1.725	1.652	0.502	0.890
25	3.173	5.093	1.155	1.628	1.605	0.473	1.005
30	2.983	4.701	1.093	1.548	1.576	0.455	1.531
35	2.776	4.289	1.021	1.456	1.545	0.435	1.281

注: 流动相: 正己烷: 异丙醇 = 90:10; 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 254 nm。

分别以 $\ln k'$ 、 $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 进行线性回归, $R^2 \geq 0.9910$, 线性关系良好, 说明在实验的温度范围内保留机制及对映体选择作用不变。求得对映体在手性拆分过程中的 ΔH^0 、 ΔS^* 、 $\Delta \Delta H^0$ 和 $\Delta \Delta S^0$, 结果见表 4。

表 4 热力学参数和相关系数

热力学参数	ΔH^0_1 (kJ/mol)	ΔS^*_1 (J/mol/K)	R^2_1	ΔH^0_2 (kJ/mol)	ΔS^*_2 (J/mol/K)	R^2_2	$\Delta \Delta H^0$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta S^0$ (J/mol/K)	R^2
	-10.97	-3.27	0.9941	-14.43	-4.19	0.9949	-3.46	-7.63	0.9912

表 4 可知, (1) 在实验温度范围内, ΔH^0 值为负值, 说明溶质与固定相作用较强, 随温度升高, 色谱保留值减小。 ΔS^* 也为负值, 说明对映体总体上变得更有序, 自身的自由度减少, 这主要由于对映体进入到纤维素衍生物的螺旋沟槽中, 与固定相形成氢键、偶极-偶极等作用, 从而获得更加有效的手性识别。(2) $\Delta \Delta H^0$ 、 $\Delta \Delta S^0$ 值都为负值, 且在实验范围内满足 $\|\Delta \Delta H^0\| > \|\Delta \Delta S^0\|$, 说明非洛地平对映体的分离过程主要是一个焓驱动的过程。(3) 从热力学函数值的大小也可以判断主客体间作用类型, Kusters 等^[10]认为, $\Delta \Delta H^0$ 的绝对值在 2.1—4.2 kJ/mol 区间时, 立体障碍的贡献被弱相

相互作用如弱 π - π 作用、弱氢键作用等放大。非洛地平的 $\Delta\Delta H^0$ 的绝对值为 3.49kJ/mol ，也就是说，对映体与固定相形成的 π - π 作用和氢键作用对拆分有贡献，而立体障碍也起着主导作用。(4) 非洛地平对映体 T_{iso} 为 452.8K ，此时两对映体同时洗脱，无法拆分。柱温在 T_{iso} 以下时，分离因子随温度的升高而降低。当柱温超过 T_{iso} 时，对映体的洗脱顺序将发生翻转，药物焓与焓的数值 $\Delta\Delta H^0$ 、 $\Delta\Delta S^0$ 值相应变为正值，手性拆分为焓驱动。

3.4 进样体积和进样浓度对拆分的影响

分离和制备单一药物对映体一直是医药领域的研究热点，也是技术难点。模拟移动床色谱 (SMB) 是最有希望在手性药物的大规模制备方面发挥重要作用的一项新技术。为了提高产品的收率和产量，结合 SMB 手性拆分的实际需要，实验模拟了制备进样条件，即对非洛地平的分析条件进行了放大，考察了进样体积和进样浓度对对映体拆分的影响(图 2 和 3)。

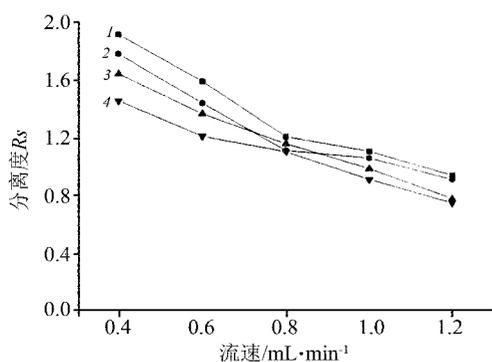


图 2 不同流速下不同进样体积
对非洛地平对映拆分影响

1— $5\mu\text{L}$; 2— $10\mu\text{L}$; 3— $20\mu\text{L}$; 4— $40\mu\text{L}$ 。

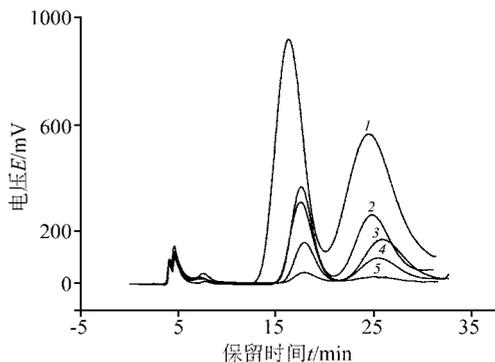


图 3 不同进样浓度对非洛地平拆分的影响

1— 10000mg/L ; 2— 5000mg/L ; 3— 3333mg/L ;
4— 2000mg/L ; 5— 1000mg/L 。

图 2 可知，正己烷：异丙醇 = 90 : 10 时，随着洗脱流速从 0.4mL/min 增大到 1.2mL/min 时，分离度从 1.9 下降到 0.7 相同流速下，随着进样体积从 $5\mu\text{L}$ 增加到 $50\mu\text{L}$ 时，对分离度没有太大影响。

图 3 可知，进样浓度从 1000mg/L 增加到 3333mg/L 时，保留时间基本不变，峰形也是对称的，分离度变化不大。浓度超过 3333mg/L 时，保留时间缩短，峰形变的略微不对称。浓度越大，色谱峰前伸，保留时间提前。对于所有浓度的分离来说， R_s 都超过 1.0，色谱峰都没有拖尾。

3.5 方法评价与应用

在优化的实验条件下，即正己烷：异丙醇 = 90 : 10，流速 0.8mL/min ，检测波长 254nm ，柱温 30°C 条件下，连续 9 次进样，考察对映体分离的重现性。结果发现，对映体保留时间的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.716% 和 1.501% ，峰面积 RSD 分别为 3.425% 和 2.127% 。说明该方法简便，快速，重现性良好。

4 结论

利用纤维素衍生物手性固定相，在正相条件下成功拆分非洛地平对映体。并通过色谱参数和热力学理论对对映体的手性识别机理进行探讨。(1) 以异丙醇为醇类添加剂，含量减少时，药物保留增强，分离因子增大，分离度增大；(2) 低流速时，对映体与固定相间的作用力如氢键、 π - π 作用力增强，手性识别较好；(3) 热力学研究表明，对映体在固定相上的手性拆分为典型的焓驱动过程；(4) 在相同的流速时，增大进样体积，分离度变化不大；(5) 在相同流速时，增大进样浓度对色谱峰形及

保留时间都有影响。浓度较大时, 色谱峰前伸, 保留时间提前。

参考文献

- [1] 陈立仁. 液相色谱手性分离[M]. 北京: 科学出版社, 2006. 15.
- [2] 钟伟. 非洛地平的药理作用及临床应用[J]. 中国民族民间医药, 2010, **19**(6): 49.
- [3] Aberg J, Edgar B, Grind M. Vasodilating Properties and Pharmacokinetics of S- and R-Felodipine in Man[J]. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1995, **57**(2): 167.
- [4] 杨丽萍. α -酸性糖蛋白柱分离四种手性药物[J]. 医学信息, 2010, **23**(2): 368—369.
- [5] Boatto G, Nieddu M, Faedda M V *et al.* Enantiomeric Separation by HPLC of 1, 4-Dihydropyridines with Vancomycin as Chiral Selector[J]. *Chirality*, 2003, **15**(6): 494.
- [6] 徐丽芳, 鲁耀, 李奕等. 高效液相色谱使用两种类型的纤维素-三(对甲基苯甲酸酯)固定相手性拆分非洛地平的比较[J]. 色谱, 2010, **28**(4): 426—429.
- [7] Charlte K, Kakan W, Daniel W A *et al.* Enantioselective Reversed-Phase and Non-Aqueous Capillary Electrochromatography Using a Tetricoplanin Chiral Stationary Phase[J]. *J. Chromatogr. A*, 2000, **897**(1): 349.
- [8] 傅若农. 色谱分析概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 17—20.
- [9] Volker S. Practice and Theory of Enantioselective Complexation Gas Chromatography[J]. *J. Chromatogr. A*, 2002, **965**(1—2): 315—356.
- [10] Kusters E, Loux V, Schmid E *et al.* Enantiomeric Separation of Chiral Sulphoxides: Screening of Cellulose-Based Sorbents with Particular Reference to Cellulose Tribenzoate[J]. *J. Chromatogr. A*, 1994, **666**(1—2): 421.

Separation of Enantiomer of Felodipine on Cellulose Derivatives Chiral Stationary Phase by HPLC

TANG Xiao-Dan WANG Shao-Yan CONG Jing-Xiang WANG Zhi-Chao

(School of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan, Liaoning 114051, P. R. China)

Abstract Chiral separation of felodipine was studied by high performance liquid chromatography on the chiral stationary phase of silica gel coated with cellulose 3-(4-methylbenzoate). The influences of the volume of isopropanol, flow rate and column temperature on the separation of felodipine were investigated. And the influences of increasing the injection volume and sample concentration on the separation of felodipine were also studied by simulating the preparation and separation conditions. The chiral recognition mechanism of felodipine was discussed by the chromatographic theory and thermodynamic theory. The baseline separation of felodipine was available in the mobile phase of hexane/isopropanol(90:10) with a flow rate of 0.8 mL/min and the column temperature of 30°C.

Key words High Performance Liquid Chromatography; Cellulose Derivatives Stationary Phase; Felodipine; Chiral Separation

欢迎有敬业精神的同志自荐为本刊编委

本刊编委产生的方式有三种: 自荐、推荐和聘请, 自荐是本刊提倡的方式。凡不计报酬、乐意献身于科技期刊出版事业、基本具有副高级以上技术职称、对本刊有所贡献的同志, 都可以自荐为本刊编委。

自荐者, 请将本人简历发至 色谱实验室编辑部电子邮箱: gpsy@periodicals.net.cn

《色谱实验室》编辑部