

提纯与分离

化学试剂, 2011, 33(12), 1117 ~ 1120

钙拮抗剂尼莫地平对映体在 Chiralcel OJ 柱上的拆分机理

张燕^a, 唐晓丹^{*b}, 王绍艳^b, 丛景香^b, 田雨^a

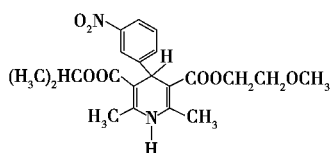
(辽宁科技大学 a. 化学工程学院; b. 分离技术中心, 辽宁 鞍山 114051)

摘要:采用高效液相色谱法(HPLC),在 Chiralcel OJ 手性柱上拆分尼莫地平。以正己烷-异丙醇为流动相,研究了异丙醇体积含量、流速及柱温对尼莫地平对映体拆分行为的影响。并结合溶质计量置换保留模型和热力学理论对尼莫地平的手性识别机理进行探讨。实验表明 $V(\text{正己烷}) : V(\text{异丙醇}) = 90 : 10$, 流速 0.6 mL/min , 柱温 25°C 时, 尼莫地平对映体可实现良好分离。在实验的异丙醇浓度范围内, 前一个对映体 $\lg I$ 值和 Z 值均小于后一个对映体。热力学函数焓变和熵变之差为负值, 分离对映体满足 $|\Delta\Delta H^\circ| > |\Delta\Delta S^\circ|$, 手性拆分过程为焓控过程。

关键词: 高效液相色谱(HPLC); Chiralcel OJ 手性柱; 尼莫地平; 计量置换保留模型; 热力学

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2011)12-1117-04

人体中的酶和受体一般都是手性的, 当手性药物进入人体后, 其药理作用是通过与体内大分子之间的严格手性匹配和手性识别而实现的, 不同构型的药物在生物体内显示出不同的药理和毒理作用。尼莫地平(Nimodipine) 是德国 Bayer 公司 1985 年上市的作用很强的亲脂性 1,4-二氢吡啶类钙拮抗剂(DPHs), 通过抑制细胞外 Ca^{2+} 的内流、松弛血管平滑肌而起到降压作用。结构中二氢吡啶环上的 4 位 C 为不对称碳原子(结构如下所示), 存在两个对映体, 在药理活性上存在着明显差异, 其 $S(-)$ -对映体的作用要明显强于 $R(+)$ -对映体^[1]。因此, 建立快速、准确、高效的手性分离方法, 用于测定尼莫地平手性纯和监测对映体立体选择性或生理活性具有重要意义。



尼莫地平结构式

Structure of nimodipine

已有报道采用蛋白质类手性固定相^[2,3]、纤维素^[4]以及毛细管电泳^[5]等方法拆分尼莫地平对映体。本文采用固定相为纤维素三-(4-甲基苯甲酸酯)的 Chiralcel OJ 手性柱拆分尼莫地平对映体。Chiralcel OJ 手性柱为纤维素衍生物类手性柱, 其手性识别主要来自甲酸酯基与被拆分物之间形成氢键或偶极-偶极作用, 或通过被拆分物立体选择性地进入这些螺旋的沟槽和空穴中^[6], 通

过分子间作用力的不同, 实现手性药物对映体的拆分。本文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, 并利用色谱参数与溶质计量置换保留模型(SDM-R)和热力学理论之间的关系, 阐明尼莫地平对映体在固定相上的手性识别机理。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

LC-40AT VP 高效液相色谱仪、SPD-40A 紫外检测器(日本岛津公司); N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司); 色谱柱温箱 HP-5205(上海济成分析仪器有限公司); SB2200 超声器(上海申波超声公司)。

尼莫地平(中国药品生物制品检定所); 正己烷、乙醇、正丁醇、正丙醇、异丙醇、异丁醇、叔丁醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 二次蒸馏水(自制)。

1.2 色谱条件

Chiralcel OJ 柱($10 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ i. d.) 日本 Daicel 公司产品; 流动相为正己烷中加入醇类极性添加剂的二元正相体系; 检测波长

收稿日期: 2011-01-21

基金项目: 辽宁省教育厅创新团队项目(2008T093); 辽宁科技大学大学生科研训练项目第六期(2010006)。

作者简介: 张燕(1989-), 女, 辽宁葫芦岛人, 本科生, 主要研究方向为天然产物的分离与分析。

通讯作者: 唐晓丹, E-mail: tx413@163.com。

237 nm; 进样量 10 μL ; 分别改变流动相的组成、流速及柱温,测定尼莫地平对映体的保留时间,计算容量因子 k' 、分离因子 α 和分离度 R_s ^[7]。样品及流动相配成合适浓度,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤并超声脱气后使用。

2 结果与讨论

2.1 不同醇类添加剂及浓度对拆分的影响

实验的流动相以正己烷为主,分别加入不同的极性醇类添加剂乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丙醇和叔丁醇,考察不同碳数和不同立体结构的醇与正己烷组成二元流动相体系对拆分的影响。结果表明,只有异丙醇能够拆分尼莫地平对映体, R_s 为 1.237。其拆分原因可能与异丙醇形成氢键的能力、极性、体积大小、空间立体结构以及浓度等多种因素有关,共同决定了溶质对映体在固定相上的保留和分离。其中溶质与固定相之间的氢键作用、 $\pi - \pi$ 作用是发生手性识别的关键。通过作用力间的竞争,形成了稳定性不同的非对映体包络配合物,从而实现对映体的拆分。

在正己烷-异丙醇为流动相,流速 0.8 mL/min,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,波长 237 nm 条件下,考察不同含量的异丙醇对尼莫地平对映体分离的影响,测定对映体的容量因子 k' 和分离因子 α (表 1)。

表 1 不同异丙醇含量对对映体拆分的影响

Tab. 1 Effect of different content of isopropanol on enantioseparation

$V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})$	k_1'	k_2'	α	R_s
95:5	9.439	15.332	1.624	1.269
90:10	3.582	5.692	1.589	1.135
85:15	1.928	2.710	1.406	0.972
80:20	1.218	1.655	1.359	0.704
75:25	1.036	1.305	1.260	0.513

由表 1 可知,随着流动相中异丙醇含量的减少,流动相的极性减弱,洗脱能力减弱,溶质保留增强,分离度和分离因子也逐渐增大。这可能是因为随着异丙醇含量的减少,它与溶质对固定相上手性和非手性作用点之间的竞争能力减弱,使得溶质在固定相上的保留增强。当异丙醇含量由 15% 减到 5% 时,分离度由 0.872 升到 1.269,这说明流动相极性的改变影响手性固定相识别的实质,极性越弱有利于对映体在固定相上的手性识别。但是,异丙醇含量较低时,溶质的保留增强会

延长对映体的出峰时间,综合考虑分离度和出峰时间,选择最佳流动相比例为 $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇}) = 90:10$ 。

流动相中醇类添加剂强度对拆分的影响,可用溶质计量置换保留模型(SDM-R)的简化表达式 $\lg k' = \lg I - Z \lg [D]$ ^[8] 来研究。式中 k' 为容量因子, $[D]$ 为醇类添加剂浓度。 $\lg I$ 反映溶质对固定相亲合势的大小,它可表征溶质与固定相之间作用力的大小; Z 表示溶剂化溶质被固定相吸附时,从两者接触表面释放的溶剂分子数,该值反映对映体与固定相接触面积的变化。当 $[D]$ 的变化不太大时, $\lg I$ 和 Z 是两个常数。

当异丙醇浓度在 0.653 ~ 3.266 mol/L 范围内变化时,以 $\lg k'$ 对 $\lg c_{\text{异丙醇}}$ 进行线性回归,计算出置换参数 $\lg I$ 和 Z 值(表 2)。

表 2 尼莫地平对映体在 SDM-R 模型中的参数值

Tab. 2 The parameters of SDM-R model of nimodipine enantiomers

尼莫地平	$\lg I$	Z	r^2
S-对映体	0.709	1.416	0.996
R-对映体	0.905	1.574	0.996

由表 2 可知: 1) 在实验的异丙醇浓度范围内,两对映体 $\lg k'$ 对 $\lg c_{\text{异丙醇}}$ 作图线性关系良好。且两者呈负相关,即随着异丙醇浓度增加,保留因子 k' 减少,这与实验结果相符。2) 表 2 中 S-对映体的 $\lg I$ 值小于 R-对映体,说明 Chiralcel OJ 柱固定相表面对 R-对映体的亲合势要大于 S-对映体,即 R-对映体与固定相表面分子的“总作用强度”大于 S-对映体。3) 虽然两对映体有相同的化学结构,但与相同的固定相分子进行立体选择作用时,其 Z 值是不同的,结果表明 R-对映体与固定相手性空腔的空间接触面积要大,在固定相的保留时间要长,因此需要更多的异丙醇才能将其置换下来,从而实现手性分离。

2.2 不同洗脱流速对手性分离的影响

在 $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇}) = 90:10$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 条件下,考察了不同流速对对映体色谱行为的影响,结果见表 3。当流速由 0.4 mL/min 上升至 1.2 mL/min 时,尼莫地平对映体分离度随之减小,保留因子和分离因子变化不大。这是因为对映体在 Chiralcel OJ 柱上的手性识别作用能量差极小,分离完全基于溶质与固定相间的多次作用。流速越低,溶质和固定相之

间作用越充分,有利手性识别。考虑分离时间和分离效果,实验选择 0.6 mL/min 为最佳流速。

表 3 不同流速对对映体拆分的影响

Tab.3 Effect of different rate on enantioseparation

流速(mL/min)	k_1'	k_2'	α	R_s
0.4	3.679	5.826	1.593	1.289
0.6	3.590	5.714	1.591	1.217
0.8	3.582	5.692	1.589	1.135
1.0	3.569	5.616	1.574	0.955
1.2	3.461	5.381	1.555	0.937

2.3 不同柱温对手性分离的影响

高效液相色谱(HPLC) 手性拆分过程中,柱温是一个重要的影响因素。柱温的变化不仅影响对映体在固定相上吸附、解吸的速率,影响保留因子、分离因子和分离度,甚至还可能导致固定相构型发生变化,从而影响溶质与固定相间的作用,对映体的洗脱顺序可能因此而翻转^[9]。因此,实验考察了柱温分别为 15、20、25、30、35 °C 时对对映体的保留及拆分的影响。

分离光学异构体过程中,溶质的容量因子 k' 与柱温的关系和对映体分离因子 α 与柱温的相关性可用 Gibbs-Holmholtz 和 Van't Hoff 方程表示^[10]: $\ln k' = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R + \ln \Phi = -\Delta H^0/RT + \Delta S^*$; $\ln \alpha = -\Delta \Delta G^0/RT = -\Delta \Delta H^0/RT + \Delta \Delta S^0/R$ 。其中 k' 为保留因子, Φ 为相比, T 为柱温, R 为气体常数。在一定温度范围内, $\ln k'$ 或 $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 通过最小二乘法拟合可以得到很好的线性关系,即 Van't Hoff 曲线,从曲线的斜率和截距可以分别求得色谱保留过程中自由焓 ΔH^0 及其差 $\Delta \Delta H^0$, 熵值 ΔS^0 及其差值 $\Delta \Delta S^0$ 。 $\Delta \Delta H^0$ 绝对值越大,说明对映体同手性固定相间作用力差异越大; $\Delta \Delta S^0$ 绝对值越大,说明对映体在固定相

表 4 不同温度对对映体拆分的影响^注

Tab.4 Effect of different temperature on enantioseparation

温度/°C	15	20	25	30	35
$1/T$	0.003 47	0.003 41	0.003 36	0.003 30	0.003 25
k_1'	4.013	3.809	3.592	3.288	3.083
k_2'	6.578	6.094	5.693	5.110	4.697
$\ln k_1'$	1.389	1.337	1.279	1.190	1.126
$\ln k_2'$	1.884	1.805	1.742	1.631	1.547
α	1.639	1.600	1.585	1.554	1.524
$\ln \alpha$	0.494	0.470	0.461	0.440	0.421
R_s	1.032	1.133	1.217	1.058	0.932

注: 条件: $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=90:10$; 流速 0.6 mL/min; 检测波长 237 nm; 进样量 10 μL 。

和流动相中混乱度越大。尼莫地平拆分结果及热力学参数见表 4、5。

由表 4 可知,随着温度的升高,两对映体在固定相上的保留能力随之减弱,原因是增加温度,流动相黏度减小,使得组分在流动相中扩散速率增大,保留因子 k' 和分离因子 α 相应变小。在 25 °C 时,分离度较好且分析时间适宜,选择 25 °C 为最佳温度。

表 5 尼莫地平对映体拆分的热力学参数和相关系数

Tab.5 The thermodynamics parameters and correlation coefficients of nimodipine enantiomers

热力学参数	ΔH_1^0 (kJ/mol)	ΔS_1^* (J/mol/K)	r_1^2
	-10.165	-2.842	0.991
热力学参数	ΔH_2^0 (kJ/mol)	ΔS_2^* (J/mol/K)	r_2^2
	-12.816	-3.4547	0.993
热力学参数	$\Delta \Delta H^0$ (kJ/mol)	$\Delta \Delta S^0$ (J/mol/K)	r^2
	-2.664	-5.144	0.990

由表 5 可知: 1) 在考察的实验温度范围内, 尼莫地平对映体的 $\ln k'$ 、 $\ln \alpha$ 与 $1/T$ 成线性关系 ($r^2 \geq 0.991$), 说明对映体在色谱柱上的保留机理不随柱温变化而改变。2) 从线性的 Van't Hoff 曲线推得 ΔH^0 、 ΔS^* 、 $\Delta \Delta H^0$ 及 $\Delta \Delta S^0$ 都为负值, 表明在对映体分离过程中, 溶质与固定相上的吸附作用是一个放热过程。且 $|\Delta \Delta H^0| > |\Delta \Delta S^0|$, 则手性分离过程主要是一个焓驱动的过程。另外, 手性分离过程是一个负熵变过程, 不利于拆分过程的进行, 必须由手性固定相与对映体分子发生手性识别作用时所释放的焓来补偿, 才能保证尼莫地平对映体的手性分离。同时后出峰对映体较前出峰对映体与固定相存在较强的相互作用, 这与 2.1 中 $\lg I$ 值实验结果一致。3) 由于焓-焓的相互补偿性, 存在一个等对映选择温度 T_{iso} , 在该温度处熵焓因素对手性拆分的贡献相互抵消。柱温在 517 K 以下时, 分离因子随温度的升高而降低。等于 517 K 时, 两对映体同时洗脱。超过 517 K 时, 推测对映体的洗脱顺序将发生反转, $\Delta \Delta H^0$ 与 $\Delta \Delta S^0$ 变为正值, 手性拆分成熵控过程^[11]。

2.4 对映体的洗脱顺序

由于没有 (S)-尼莫地平或 (R)-尼莫地平标准品, 因此, 在同是正相条件下, 实验参照文献^[12]确定了在 $V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=90:10$, 流速 0.6 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 237 nm 色谱条件下, 尼莫地平对映体的出峰顺序, 先出峰为

(*S*)-尼莫地平,后出峰为(*R*)-尼莫地平。拆分色谱图见图 1。

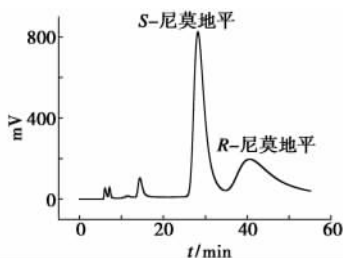


图 1 尼莫地平手性分离色谱图

Fig. 1 Enantioseparation chromatogram of nimodipine

2.5 方法的评价与应用

在优化的实验条件下,参照 2.4 条件,连续 7 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 1.67% 和 0.84%,峰面积 RSD 分别为 3.57% 和 1.26%。说明该方法精密度良好。

参考文献:

- [1] REND D B, RENATE S, ANGELIKA K, et al. Effects of nimodipine and other calcium channel antagonists in alcohol-preferring AA rats [J]. *Alcohol*, 1996, 13(3): 263-271.
- [2] 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.
- [3] FU Qiang, MATSUNAGA H, HAGINAKA J. Resolution of dihydropyridine calcium antagonist enantiomers using HPLC with ovoglycoprotein as a chiral stationary phase [J]. *Anal. Sci.*, 2001, 17(6): 897-900.
- [4] 宫丽,王嗣岑,贺浪冲. 二氢吡啶类钙拮抗剂对映体在 Chiralcel OJ 柱上的拆分特性研究 [J]. *药物分析杂志*, 2003, 23(6): 399-402.
- [5] 张效伟,张召香. 二维毛细管区带电泳/胶束电动毛细管色谱分离尿样中的药物及其对映体 [J]. *色谱*, 2010, 28(4): 397-410.
- [6] 楼张英,黄一平. 氟喹诺酮类药物的手性拆分研究进展 [J]. *医药导报*, 2004, 23(11): 844-846.
- [7] 傅若农. 色谱分析概论 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [8] 耿信笃. 计量置换理论及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.

- [9] PERSSON B A, ANDERSSON S. Unusual effects of separation conditions on chiral separations [J]. *J. Chromatogr. A*, 2001, 906(1/2): 195-203.
- [10] WENG Wen, WANG Qing-hua, YAO Bi-xia, et al. Enantioseparation of amino acid derivatives on an immobilized network polymer derived from L-tartaric acid [J]. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1042(1/2): 81-87.
- [11] MAIER N M, FRANCO P, LINDNER W. Separation of enantiomers: needs, challenges perspective [J]. *J. Chromatogr. A*, 2001, 906(1/2): 3-33.
- [12] HE Lang-chong, WANG Si-cen. Pharmacokinetic behavior and tissue distribution of nimodipine and its enantiomers using LC [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2003, 38(8): 603-608.

Separation mechanism of calcium antagonists nimodipine enantiomers on Chiralcel OJ column ZHANG Yan^a, TANG Xiao-dan^{* b}, WANG Shao-yan^b, CONG Jing-xiang^b, TIAN Yu^a (University of Science and Technology Liaoning, a. School of Chemical Engineering; b. Center of Separation Technology, Anshan 114051, China), *Huaxue Shiji*, 2011, 33(12), 1117~1120

Abstract: Nimodipine was directly resolved by high performance liquid chromatography on the Chiralcel OJ chiral column the influences of the volume of isopropanol, flow rate and temperature on the separation of nimodipine were investigated. The chiral recognition mechanism of Chiralcel OJ chiral column was studied by stoichiometric displacement model for retention and thermodynamic theory. The results showed that good separation of nimodipine was available in the mobile phase of hexane/isopropanol (90:10, V/V) with a flow rate of 0.6 mL/min and the column temperature of 25 °C. In the experimental range of concentration of isopropanol, the $\lg I$ values and Z values of the former enantiomer of nimodipine was higher than that of the later enantiomer. The enthalpy change difference and entropy change difference were negative values, meanwhile the enantioseparation meeting $||\Delta\Delta H^0|| > ||\Delta\Delta S^0||$ to indicate that the process of chiral separation was an enthalpy-controlled process.

Key words: high performance liquid chromatography; Chiralcel OJ chiral column; nimodipine; stoichiometric displacement model for retention; thermodynamics

请您继续支持关心本刊,共同进步