

## 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

徐丽芳<sup>1</sup>, 鲁耀<sup>1</sup>, 李奕<sup>2</sup>, 许旭<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海应用技术学院化学与环境工程学院, 上海 200235; 2. 中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

**摘要**: 以高效液相色谱手性固定相法对非洛地平(FEL)进行手性拆分。分别采用两种类型的纤维素-三(对甲基苯甲酸酯)手性柱 Chiralcel OJ-R 和 Chiralcel OJ-H 进行比较实验, 以正己烷-异丙醇(90:10, v/v)为流动相, 考察了流动相、柱温对保留及手性拆分的影响。实验显示, 两柱拆分 FEL 的 van 't Hoff 图均发生了转折, 在高温区域为焓驱动, 在低温区域为熵驱动。两柱在温度升高时拆分 FEL 的分离度均提高, 其中 OJ-H 的分离度优于 OJ-R。两种手性柱对 FEL 具有相似的拆分机理。

**关键词**: 高效液相色谱; 手性拆分; 手性固定相; 非洛地平

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2010)04-0426-04

## Comparison of chiral separations of felodipine by high performance liquid chromatography using two cellulose tris(4-methyl benzoate) stationary phases

XU Lifang<sup>1</sup>, LU Yao<sup>1</sup>, LI Yi<sup>2</sup>, XU Xu<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China; 2. Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract**: Chiral resolutions of felodipine (FEL) were compared using two cellulose tris(4-methyl benzoate) stationary phases, Chiralcel OJ-R and Chiralcel OJ-H. The effects of the mobile phase and the column temperature on the retention and separation were compared. Using *n*-hexane/2-propanol (90:10, v/v) as mobile phase, the FEL can be enantioseparated. There are transition temperatures in the van 't Hoff plots of the two columns. In the higher temperature region the enantioseparation was enthalpy controlled, and in the lower temperature region it was entropy controlled. The higher temperature was good for the resolution of FEL enantiomers even though the selectivity was change with maximum value at 19 °C for OJ-R and 14 °C for OJ-H. The two columns showed similar mechanism in the FEL chiral separation.

**Key words**: high performance liquid chromatography (HPLC); chiral separation; chiral stationary phase; felodipine

用于手性拆分的高效液相色谱(HPLC)手性固定相已有很多<sup>[1,2]</sup>。包括纤维素衍生物在内的多糖类手性固定相,是目前HPLC中应用最广泛的一类手性固定相<sup>[3-5]</sup>,它们对多种类型的外消旋体表现了很高的对映体选择性,且负载量大。这类手性固定相有多种不同的结构,即使相同结构的固定相也会有不同品牌和型号的手性柱。对这些相同结构手性柱之间区别的研究目前少有报道。

非洛地平(felodipine, FEL)是二氢吡啶类钙拮抗剂药物,通过对外周血管的松弛作用降低血压,主要用于治疗各种原发性高血压<sup>[6]</sup>。Karlsson等<sup>[7]</sup>用酸性糖蛋白(AGP)柱、Boatto等<sup>[8]</sup>用大环抗生素万古霉素(Chirobiotic V)柱、陈仲益等<sup>[9]</sup>使用多糖类的AD柱均已实现FEL的手性分离。

值得注意的是 Soons等<sup>[10]</sup>与 Lindmark等<sup>[11]</sup>报道的对FEL的手性拆分方法。他们使用的手性

\* 通讯联系人: 许旭, 研究员. E-mail: xuxu3426@sina.com.

收稿日期 2009-10-09

固定相均为纤维素-三(4-甲基苯基甲酸酯),该固定相包括 Chiralcel OJ-R 与 Chiralcel OJ (或 OJ-H) 两类,都是将纤维素-三(4-甲基苯基甲酸酯)涂敷在  $5\ \mu\text{m}$  的硅胶上,其区别主要在 OJ-R 柱是将手性固定相涂敷在反相硅胶上,一般在反相条件下使用,而 OJ 和 OJ-H 柱则是将手性固定相涂敷在正相硅胶上,一般用于正相实验条件。但 Lindmark 报道的 FEL 拆分方法恰恰是用 OJ-R 柱在正相的正己烷-异丙醇(89:11, v/v)流动相条件下完成手性拆分的,因此对这两类手性柱进行进一步的比较研究将有助于更好地理解这类固定相的拆分机理。

本研究分别用 OJ-R 柱和 OJ-H 柱对 FEL 进行拆分比较,考察了流动相和温度对手性拆分的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

所用的高效液相色谱系统由 Waters 515 输液泵、Waters 2487 紫外检测器、Rheodyne 7725i 进样阀( $20\ \mu\text{L}$  定量环)、HCT-360 色谱柱恒温箱(上海泉岛科贸有限公司)和上海军锐色谱工作站组成。SB2200 型超声器(上海必能信超声有限公司)。

Chiralcel OJ-R( $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ )和 Chiralcel OJ-H( $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ )手性色谱柱均为日本 Daicel 公司产品。

异丙醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);正己烷(分

析纯,杭州炼油厂);1,3,5-三叔丁基苯(美国 Acros Organics 公司)。FEL 消旋体的结构式见图 1。

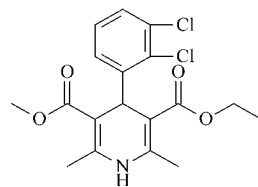


图 1 FEL 的结构式

Fig. 1 Chemical structure of FEL

### 1.2 色谱条件

分别使用 OJ-R 和 OJ-H 两种手性色谱柱,以正己烷-异丙醇(90:10, v/v)为流动相。检测波长  $230\ \text{nm}$ ,流速  $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ ,进样量  $10\ \mu\text{L}$ 。

### 1.3 对映体分离结果的评价

文中所用色谱相关参数如下:死时间  $t_0$  由 1,3,5-三叔丁基苯测出,保留因子  $k$  由  $(t_R - t_0)/t_0$  计算,  $t_R$  为出峰时间,先出峰异构体的保留因子  $k_1 = (t_1 - t_0)/t_0$ ;后出峰异构体的保留因子  $k_2 = (t_2 - t_0)/t_0$ ,选择因子  $\alpha = k_2/k_1$ ;  $R_s$  为分离度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相中醇含量对拆分效果的影响

根据文献[11],在优化流动相配比时使用 OJ-R 柱分离,温度  $37\ ^\circ\text{C}$ 。结果见表 1。

表 1 流动相中异丙醇含量对手性拆分效果的影响

Table 1 Effects of 2-propanol content on chiral separation of felodipine

V( n-hexane ): V( 2-propanol )	$t_{R1}/(\text{min})$	$t_{R2}/(\text{min})$	$k_1$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
80:20	4.377	5.378	1.289	1.838	1.426	0.775
85:15	5.778	7.503	2.049	2.959	1.444	1.072
89:11	7.520	9.974	2.968	4.263	1.436	1.369
90:10	9.518	12.899	4.023	5.807	1.443	1.525
95:05	19.837	28.128	9.468	13.843	1.462	2.202

随着流动相中异丙醇含量的减少,对映体的保留因子  $k$  随之增大,选择因子  $\alpha$  变化不显著,  $R_s$  明显变大。这也与通常正相条件下 OJ-H 柱的实验现象一致。根据结果,在下面考察柱温的影响时,采用正己烷-异丙醇(90:10, v/v)为流动相。

图 2 为使用两手性柱拆分 FEL 的谱图,其中各峰对应的异构体按照文献[11]的出峰顺序推测。

### 2.2 柱温对手性拆分效果的影响

使用 OJ-R 柱在  $15 \sim 40\ ^\circ\text{C}$  的柱温条件下,使用 OJ-H 柱在  $11 \sim 40\ ^\circ\text{C}$  的柱温条件下分别对 FEL 进行手性拆分,结果如图 3 所示。

从图 3 中可以看到,随着温度的升高,两柱的选择性均先升高后降低,都存在 1 个最大值(见图

3b);但在实验的温度范围内,  $R_s$  均单调升高(见图 3c),这与两柱的柱效随着温度的升高而明显升高有关。图 3c 还显示出 OJ-H 柱的分离相对更好(该图仅显示  $R_s$  大于 1.0 时的结果,在低温区域  $R_s$  均小于 1.0)。

图 3b 中, OJ-R 柱和 OJ-H 柱对 FEL 的分离选择性都出现了转折,显示手性拆分机理在特定温度处发生了变化,导致保留过程对应的热力学参数的改变。在 OJ-R 柱上约在  $19\ ^\circ\text{C}$  时发生转折,因此可将柱温分为两个线性区域:  $20 \sim 40\ ^\circ\text{C}$  为高温区域,  $15 \sim 19\ ^\circ\text{C}$  为低温区域;而在 OJ-H 柱上约在  $14\ ^\circ\text{C}$  时发生转折,同样也可将柱温分为两个线性区域:  $15 \sim 40\ ^\circ\text{C}$  为高温区域,  $11 \sim 14\ ^\circ\text{C}$  为低温区域。由此计算

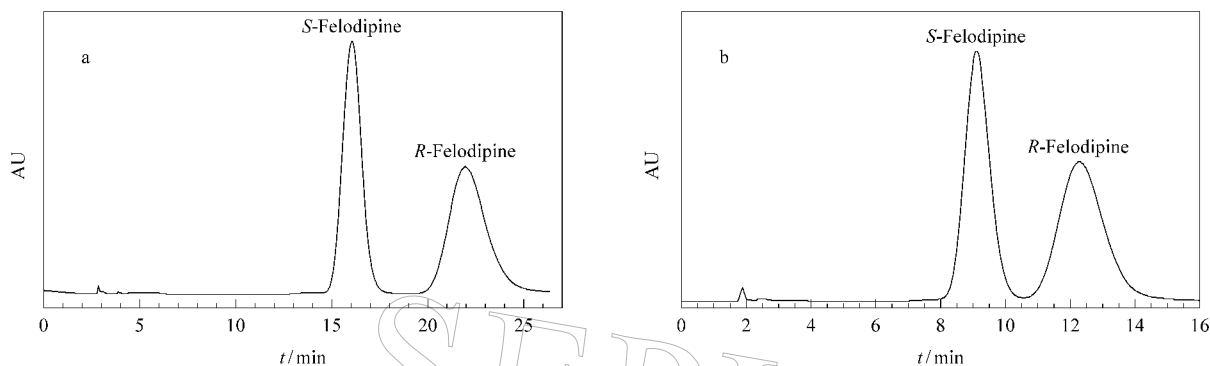


图 2 在 (a)OJ-R 柱和 (b)OJ-H 柱上 FEL 拆分的典型色谱图

Fig. 2 Chromatograms of FEL enantioseparated by ( a ) the OJ-R column and ( b ) the OJ-H column

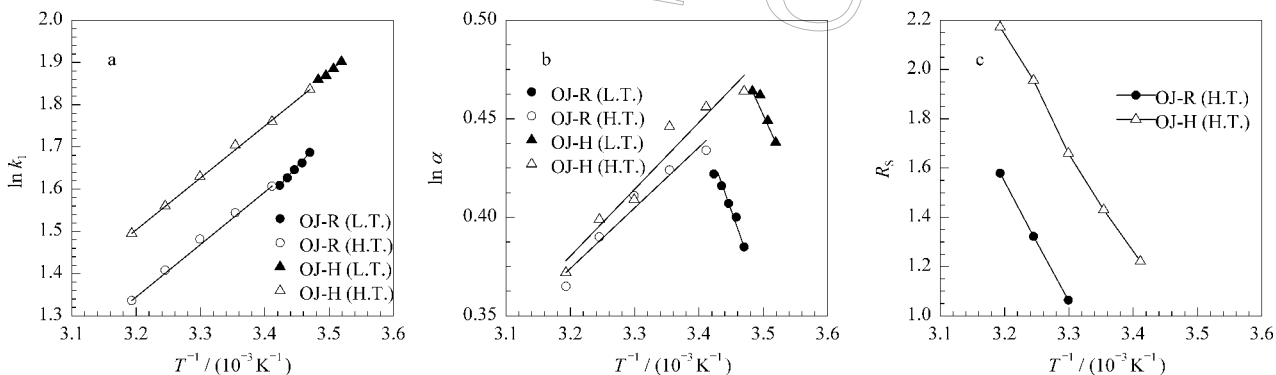


图 3 不同温度下 FEL 在 OJ-R 柱和 OJ-H 柱上的分离结果

Fig. 3 Effects of temperature on chiral separation of FEL using the OJ-R column and the OJ-H column

L. T. means low temperature ; H. T. means high temperature.

相应温度(  $T$  )区域内 FEL 拆分的 van 't Hoff 方程 (  $\ln k = -\Delta H / (RT) + \Delta S^*$  ,  $\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^0) / (RT) + \Delta(\Delta S^0) / R$  , 其中  $R$  是气体常数 ) , 各区域都呈线性关系 , 说明在各区域实验的范围内焓变之差 (  $\Delta(\Delta H^0)$  ) 和熵变之差 (  $\Delta(\Delta S^0)$  ) 为定值 , 对映选择机制不变<sup>[12,13]</sup> , 从 van 't Hoff 方程求得的热力学参数列于表 2。

热力学参数中 ,  $\Delta H^0$  值越负 , 说明溶质与固定相的作用越强 , 与固定相的结合在能量上越有利 ; 在 OJ-H 柱低温区的  $\Delta H_r^0$  绝对值较小 , 说明溶质与固定相的作用较弱。在高温区无论是 OJ-R 柱和 OJ-H 柱上  $\Delta(\Delta H^0)$  和  $\Delta(\Delta S^0)$  都为负 , 说明手性拆分为焓驱动。在 OJ-R 柱上  $\Delta(\Delta H^0)$  的绝对值为 2.60

kJ/mol( 约 0.62 kcal/mol ) , OJ-H 柱上  $\Delta(\Delta H^0)$  的绝对值为 2.85 kJ/mol( 约 0.68 kcal/mol ) , 均在 0.5 至 1.0 kcal/mol 区间 , 表明手性识别可能来自于弱的  $\pi$ - $\pi$  相互作用和弱的氢键作用产生的立体阻碍作用。而在低温区域两根柱上的  $\Delta(\Delta H^0)$  和  $\Delta(\Delta S^0)$  都为正 , 说明手性拆分为熵驱动 , 选择因子随柱温的升高而升高。在 OJ-R 柱上  $\Delta(\Delta H^0)$  的绝对值为 6.20 kJ/mol( 约 1.48 kcal/mol ) , OJ-H 柱上  $\Delta(\Delta H^0)$  的绝对值为 6.32 kJ/mol( 约 1.51 kcal/mol ) 均大于 1.0 kcal/mol , 显示手性拆分可能受到额外的强  $\pi$ - $\pi$  作用或强氢键作用的影响<sup>[13,14]</sup>。综上所述 , 可以认为在本实验的正相条件下 , OJ-R 柱和 OJ-H 柱对 FEL 的拆分机理没有本质的区别。

表 2 在 OJ-R 和 OJ-H 柱上 FEL 进行拆分时对应的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of chiral separation of FEL using the OJ-R column and the OJ-H column

Column	Temperature/ °C	$\Delta H_r^0 /$ ( kJ/mol )	$\Delta S_r^* /$ ( J/( mol · K ) )	$r_s^{\#}$	$\Delta H_r^0 /$ ( kJ/mol )	$\Delta S_r^* /$ ( J/( mol · K ) )	$r_R^{\#}$	$\Delta(\Delta H^0) /$ ( kJ/mol )	$\Delta(\Delta S^0) /$ ( J/( mol · K ) )	$r_\alpha^{\#}$
OJ-R	20-40	-10.39	-2.64	0.9983	-12.96	-3.27	0.9959	-2.60	-5.27	0.9762
	15-19	-13.33	-3.88	0.9982	-7.13	-0.90	0.9959	6.20	24.73	0.9855
OJ-H	15-40	-10.20	-2.42	0.9992	-13.05	-3.13	0.9974	-2.85	-5.95	0.9743
	11-14	-9.99	-2.33	0.9927	-3.67	0.79	0.9892	6.32	28.88	0.9681

#  $r_s$  ,  $r_R$  and  $r_\alpha$  are correlation coefficients of  $\ln k = -\Delta H / (RT) + \Delta S^*$  ( for  $R$  and  $S$  ) and  $\ln \alpha = -\Delta(\Delta H^0) / (RT) + \Delta(\Delta S^0) / R$  , respectively.

### 3 结语

本研究分别用 OJ-R 和 OJ-H 两种手性色谱柱对 FEL 进行了直接拆分。在实验条件下, 温度升高时两柱都存在选择性的极大值, 在 OJ-R 柱上, van 't Hoff 图约在 19 °C 发生转折, 而在 OJ-H 柱上, van 't Hoff 图约在 14 °C 发生了转折。但由于柱效随着温度明显升高,  $R_s$  均单调升高, 表明升高温度有利于两柱的手性拆分, 且 OJ-H 柱的拆分效果更好。比较两种手性色谱柱拆分的机理, 在高温区域其均为焓驱动, 在低温区域均为熵驱动。可以认为, 本实验的正相条件下 OJ-R 柱和 OJ-H 柱对 FEL 的拆分机理没有本质的区别。

致谢: 感谢 Daicel 药物手性技术(上海)有限公司潘立瑞博士提供有关手性柱的信息。

#### 参考文献:

[ 1 ] Cancelliere G, D 'Acquarica I, Gasparrini F, et al. *Pham Sci Tech Today*, 1999, 2( 12 ): 484

[ 2 ] Chen L R. *Chiral Separation by Liquid Chromatography*. Beijing: Science Press ( 陈立仁. 液相色谱手性分离. 北京: 科学出版社 ), 2006

[ 3 ] Han X Q, Wei Y, Liu Y H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* ( 韩小茜, 魏燕, 刘艳华, 等. 色谱 ), 2008, 26 ( 5 ): 631

[ 4 ] Chen Y Q, Ma Z, An F, et al. *Chinese Journal of Chromatography* ( 陈玉青, 马郑, 安芳, 等. 色谱 ), 2008, 26( 5 ): 643

[ 5 ] Huang H, Jin J Y, Lee W. *Chinese Journal of Chromatography* ( 黄虎, 金京玉, 李元宰. 色谱 ), 2009, 27( 4 ): 467

[ 6 ] Gu Y, Wang G J, Sun J G. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences* ( 顾轶, 王广基, 孙建国. 华西药科学杂志 ), 2006, 21( 4 ): 372

[ 7 ] Karlsson A, Pettersson K, Hernqvist K. *Chirality*, 1995, 7 ( 3 ): 147

[ 8 ] Boatto G, Nieddu M, Faedda M V, et al. *Chirality*, 2003, 15 ( 6 ): 494

[ 9 ] Chen Z Y, Yao T W, Zeng S. *Chinese Pharmaceutical Journal* ( 陈仲益, 姚彤炜, 曾苏. 中国药科学杂志 ), 2007, 42( 7 ): 544

[ 10 ] Soons P A, Roosemalen M C M, Breimer D D. *J Chromatogr B*, 1990, 528 : 343

[ 11 ] Lindmark B, Ahnoff M, Persson B A. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 27 : 489

[ 12 ] O 'Brien T, Crocker L, Thompson R, et al. *Anal Chem*, 1997, 69( 11 ): 1999

[ 13 ] Weng W, Yao B X, Chen X Q, et al. *Progress in Chemistry* ( 翁文, 姚碧霞, 陈秀琴, 等. 化学进展 ), 2006, 18( 7/8 ): 1056

[ 14 ] Kusters, E, Loux V, Schmid E. *J Chromatogr*, 1994, 666 ( 1/2 ): 421