

键合型邻乙酰水杨酸纤维素酯手性固定相的合成及应用

李 杨^{1*}, 封 华², 蒋登高³

(1. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003; 2. 郑州市妇幼保健院,
河南 郑州 450003; 3. 郑州大学化工与能源学院, 河南 郑州 450001)

摘要:将邻乙酰水杨酸纤维素酯通过间隔臂——2-(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷键合于硅胶之上,制得键合型手性固定相 CSP1,考察了其与传统纤维素衍生物制得的涂敷型手性固定相在拆分效果方面的异同,并探讨了其差异的原因与机理。为了印证间隔臂中环己基对于手性拆分的作用,本文又将 CSP1 与间隔臂中不具有环己基的键合型手性固定相 CSP2 进行了拆分对比,进一步证实了间隔臂中环己基的作用。结果表明,键合型手性固定相比涂敷型固定相在拆分咪唑类药物方面具有优势,这种优势一方面来自于流动相范围的扩大,另一方面是由于间隔臂中环己基对纤维素表面结构的修饰作用。

关键词:邻乙酰水杨酸纤维素酯;手性固定相;间隔臂;键合

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713 (2016)08-0739-06

Preparation and application of covalently bonded cellulose acetylsalicylate chiral stationary phases

LI Yang^{1*}, FENG Hua², JIANG Denggao³

(1. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;

2. Women and Infants Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China;

3. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The chemical bonded cellulose acetylsalicylate chiral stationary phase (CSP1) was obtained by fixing cellulose derivative on silica gel with beta-(3,4-epoxycyclohexyl) ethyl trimethoxy silane as space arm. The resolution mechanism and feasibility of CSP1 were studied by comparing CSP1 with coated chiral stationary phase prepared by cellulose acetylsalicylate. The role of cyclohexyl group in the space arm was also verified by comparing CSP1 with CSP2 which had no cyclohexyl group in the space arm. Based on the chromatographic results, the immobilized chiral stationary phase exhibited better chiral resolving abilities than coated stationary phase for imidazoles. It is due to, on the one hand, more types of mobile phases used, on the other hand, the modified cellulose by cyclohexyl group.

Key words: cellulose acetylsalicylate; chiral stationary phase; space arm; bond

邻乙酰水杨酸纤维素酯涂敷于氨基硅胶之上制得的涂敷型纤维素衍生物类手性固定相在前文^[1]的表述中表现出了良好的手性拆分效果,具有良好的应用前景。但由于涂敷型固定相对于流动相的要求较高——凡是能将纤维素衍生物溶胀或溶解的溶剂均不能作为流动相使用^[2,3],在一定程度上限制了邻乙酰水杨酸纤维素酯在手性固定相方面的应用,因此,本文设计开发了不受流动相种类限制的键合型邻乙酰水杨酸纤维素酯手性固定相,以正己

烷-四氢呋喃为流动相考察其手性分离能力,并与涂敷固定相进行相关比较,以期得到满意的结果。

文献^[4]报道,纤维素三(环己基氨基甲酸酯)的手性识别能力与纤维素三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)相当,其中的环己基展现出了不亚于苯基的拆分能力。因此,本文采用具有环己基基团的 2-(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷作为间隔臂,非选择性键合制备键合型手性固定相 CSP1,既起到链接的作用又起到了修饰作用,以达到增强键合型手性

固定相的拆分能力的目的。为了更直观地考察环己基对纤维素的修饰作用,本文还以不具有环己基的环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷作为间隔臂,采用上述相同的键合方法制备了键合型手性固定相 CSP2,并与 CSP1 进行比较,探索间隔臂中环己基基团对于手性拆分的作用,力求为该类纤维素衍生物用于手性色谱柱的制备提供进一步的实验理论依据,也为以后的产品开发奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂

FT-IR 红外光谱仪 (Thermo Nicolet370, 美国); HPLC 工作站 (LC-30A, 日本岛津公司); 配置 SPD-M20A 二极管阵列检测器。

微晶纤维素 (聚合度 $DP \approx 100$, Merck 公司); 邻乙酰水杨酰氯、2-(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷 (KH-566)、环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷

(KH-560)、三氟化硼乙醚溶液 (阿拉丁试剂公司, 上海); 硅胶 (粒径为 $5 \mu\text{m}$, 孔径为 12 nm , 日本 Daiso 公司); 无水 *N,N*-二甲基乙酰胺 (DMAc)、氯化锂、无水吡啶 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 四氢呋喃、异丙醇和正己烷 (色谱纯, Merck 公司); 二乙胺 (DEA)、三氟乙酸 (TFA) (纯度为 99%, 天津市光复精细化工研究所)。

11 种手性药物 (纯度均为 99.5%): 氯苯那敏 (chlorpheniramine)、妥洛特罗 (tulobuterol)、特布他林 (terbutaline)、异丙肾上腺素 (isoproterenol)、丙谷胺 (proglumide)、替瑞酰胺 (tiropramide)、*N*-苯甲酰基-DL-酪氨酸二正丙胺 (*N*-benzoyl-DL-tyrosyl-*N',N'*-dipropylamide)、特拉唑嗪 (terazosin)、噻康唑 (tioconazole)、益康唑 (econazole)、咪康唑 (miconazole) (中国食品药品检定研究院提供), 其结构式见图 1。

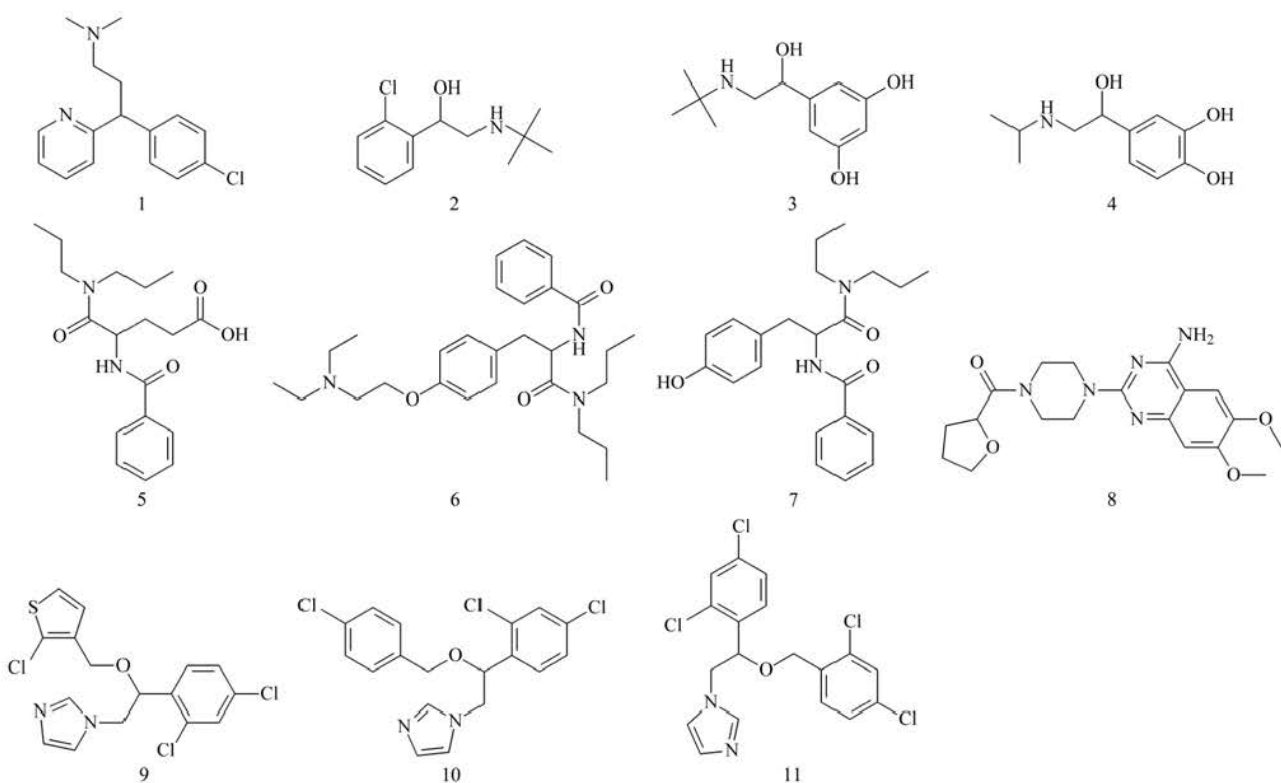


图 1 手性药物 1~11 的结构式

Fig. 1 Structures of the chiral drugs 1~11

1. chlorpheniramine; 2. tulobuterol; 3. terbutaline; 4. isoproterenol; 5. proglumide; 6. tiropramide; 7. *N*-benzoyl-DL-tyrosyl-*N',N'*-dipropylamide; 8. terazosin; 9. tioconazole; 10. econazole; 11. miconazole.

1.2 键合型手性固定相的合成

1.2.1 酯化衍生纤维素的合成

在搅拌条件下,将在 80°C 真空干燥 6 h 的纤维素 1 g 加入 70 mL 无水 DMAc 中于 130°C 回流搅拌 5 h;冷却至室温,加入 3 g 无水 LiCl;搅拌至纤维素

完全溶解后,重新升温至 100°C ,加入无水吡啶 15 mL、7.4 g 的邻乙酰水杨酰氯,反应 24 h 后,用大量甲醇沉淀、洗涤、过滤, 40°C 真空干燥过夜,得纤维素衍生物即邻乙酰水杨酸纤维素酯 (ACE) 5.6 g,合成过程见图 2。

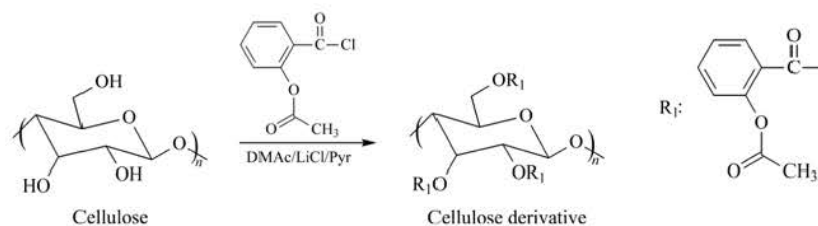


图2 纤维素衍生物的制备过程
Fig. 2 Synthesis of cellulose derivative

1.2.2 环氧基团修饰硅胶

将3 g 硅胶与无水甲苯 160 mL 加入烧瓶中,氮气保护下加热回流,除去硅胶吸附的水。然后缓缓加入带有环氧基团的修饰剂(分别为 KH-566 和 KH-560)5 mL 与吡啶 1 mL,并加热至 105 ℃,回流。

反应完成后抽滤,洗涤,减压干燥后得环氧基团修饰的硅胶 KHS1 (KH-566 修饰)或 KHS2 (KH-560 修饰)(见图3中第一步反应)。经热重分析,KHS1 键合量为 6.4% (质量分数),KHS2 键合量为 6.1% (质量分数)。

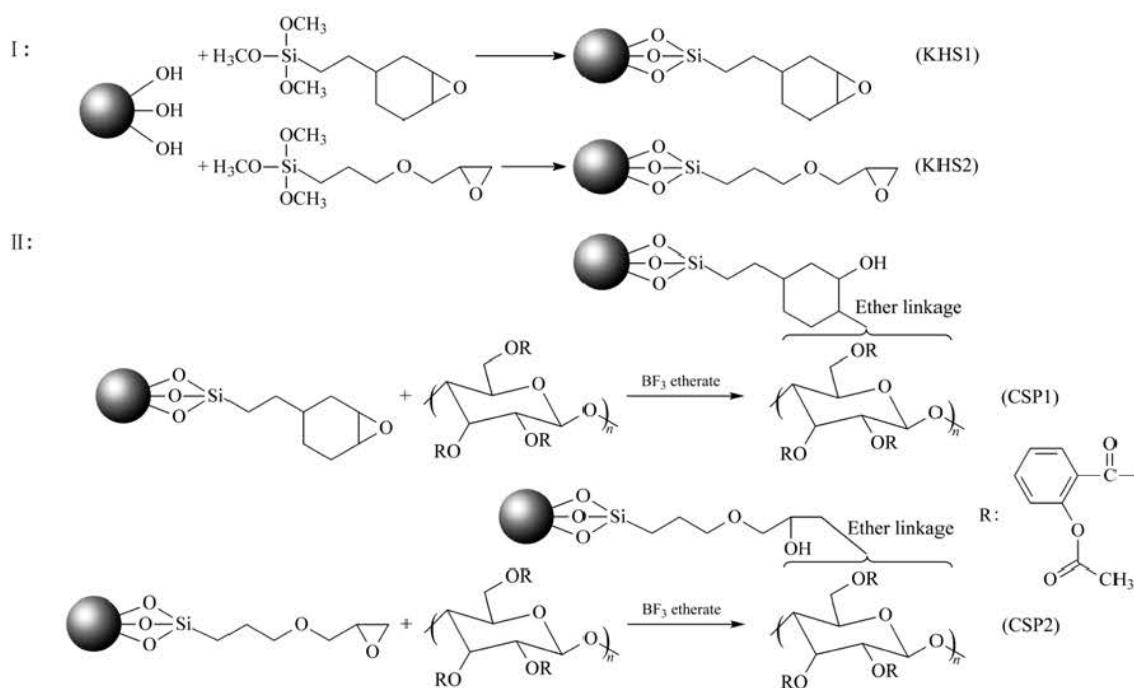


图3 纤维素衍生物的键合
Fig. 3 Immobilization of cellulose derivatives

1.2.3 键合反应

由于反应率的原因,纤维素的羟基有相当一部分不能衍生化,这些残留的羟基将被用来作为间隔臂的结合位点。称取1 g 纤维素衍生物 ACE 溶于四氢呋喃中,旋转涂敷在3 g 的环氧基团修饰硅胶(KHS1 或 KHS2)表面。将涂敷后的硅胶置于无水甲苯中,搅拌,并缓缓加入微量的 BF_3 乙醚溶液,作为醚化反应的催化剂^[5],在 85 ℃ 条件下反应 8 h,反应结束后,过滤,固体先用 300 mL 甲苯洗涤,再用大量吡啶洗去未键合的衍生物,最后用适量丙酮、甲醇按顺序洗涤,真空干燥后即得键合型手性固定相 CSP1 或 CSP2 (见图3中第二步反应)。经热重分析,CSP1 键合量为 24.6% (质量分数)、CSP2 键

合量为 23.8% (质量分数)。

1.3 色谱条件

装柱:取色谱柱空柱管(150 mm×4.6 mm,郑州英诺生物科技有限公司),将制备的固定相填料 CSP1 和 CSP2 以正己烷-异丙醇(80:20, v/v)为匀浆液及填充液,采用匀浆法分别装柱即得。检测条件:柱温 30 ℃;检测波长 190~400 nm (在各手性药物的最大吸收波长处检测,无最大吸收者,以 220 nm 波长测定);以正己烷-醇或正己烷-四氢呋喃为流动相(针对酸性或碱性药物可添加少量的二乙胺或三氟乙酸^[6])。流速为 1 mL/min,以 1,3,5-三叔丁基苯测定死时间(t_0),均以流动相溶解手性药物,质量浓度约为 80 mg/L,进样量 20 μL。以下列参

数考察拆分能力:保留因子 $k = (t - t_0)/t_0$, 其中 t_0 为死时间, t 为单一映体的保留时间; 分离因子 $\alpha = k_2/k_1$; 分离度 R_s 由色谱软件自动计算。

2 结果与讨论

2.1 固定相的红外表征

CSP1 及其合成中间产物的红外光谱图见图 4。虽然图 4 中硅胶的基底影响不可避免, 但仍能清晰地鉴别其合成过程。KH-566 修饰的硅胶与键合型固定相 CSP1 均比硅胶多出了 2937 cm^{-1} 和 2859 cm^{-1} 饱和 C-H 伸缩振动峰, 证明了对硅胶的修饰是成功的; 键合型固定相中 1744 cm^{-1} 峰可归属于酯基中 C=O 的伸缩振动峰, 1462 cm^{-1} 和 1548 cm^{-1} 是苯环骨架振动的特征吸收峰, 由此可证明, CSP1 的合成过程是可行的。CSP2 的合成及红外分析与此类似, 不再赘述。

2.2 CSP1 的拆分能力考察

作为键合固定相使用的 CSP1, 在选择流动相组分时, 本应正相反通用, 但考虑到邻乙酰水杨酸中邻位酯基在水中的缓慢水解, 因此, 该色谱柱不能以水作为流动相组分。表 1 为涂覆型手性固定相 CSPT (见参考文献^[1]) 与键合型手性固定相 CSP1 在最佳色谱条件下对 11 种药物拆分结果的比较, 图 5 为 CSP1 成功拆分的色谱图。

由表 1 可知, CSP1 在能够耐受四氢呋喃作为流动相时, 还表现出了一些不同于涂敷型手性固定相的手性识别能力。5~8 号手性药物在 CSP1 上无法得到拆分, 对比四者在涂敷型手性固定相上的良好拆分效果, 这应是纤维素有序的空间构象在键合过程中被改变所导致的。手性药物 1~4 虽然在两种固定相上均能得到拆分, 但 CSP1 上的保留因子明显高于涂敷型手性固定相, 分析应是两种原因造成

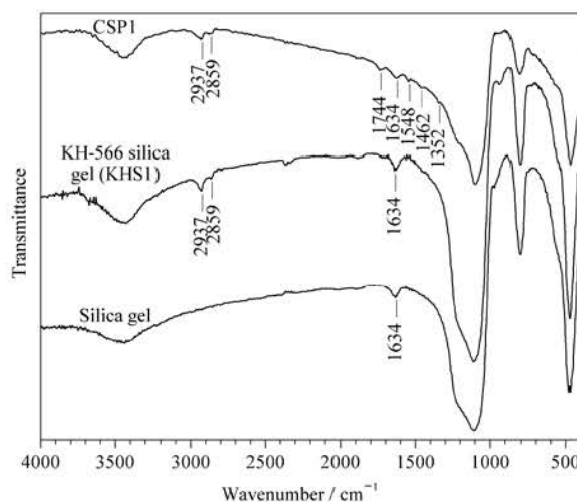


图 4 硅胶、KH-566 修饰硅胶与 CSP1 的红外光谱图
Fig. 4 IR spectra of silica gel, KH-566 silica gel and CSP1

的: 1) 键合型手性固定相上纤维素空间构象改变, 使得非手性作用力增强, 延迟洗脱; 2) CSP1 的硅胶表面只是与纤维素衍生物进行化学键合, 没有被纤维素层全面覆盖, 因此, 裸露的硅羟基较多, 会对目标化合物产生显著的非手性作用力, 从而迟滞洗脱。

值得注意的是, 手性药物 9~11 在涂敷型手性固定相上未表现出拆分迹象, 但在 CSP1 上, 采用正己烷-四氢呋喃作为流动相, 却获得了良好的拆分效果, 这就是键合型手性固定相的优势所在——流动相的选择范围广泛。四氢呋喃作为强溶解性溶剂, 在涂敷型手性固定相上一般是禁止使用的, 因为几乎所有的纤维素衍生物都能被四氢呋喃溶解或溶胀, 从而导致色谱柱失效。但键合型手性固定相的强化学稳定性却能够允许多种流动相的使用, 包括四氢呋喃。正是由于流动相选择范围的拓宽, 才使得 9~11 手性药物在 CSP1 上获得手性分离。

表 1 手性药物 1~11 在 CSPT、CSP1 上手性拆分能力的比较
Table 1 Enantioseparation of chiral drugs 1~11 on CSPT and CSP1

Drug	CSPT				CSP1			
	Mobile phase	k_1	α	R_s	Mobile phase	k_1	α	R_s
1	N/I=90/10 ¹⁾	2.04	1.41	5.9	N/T=95/5 ¹⁾	9.26	1.54	2.9
2	N/I=85/15 ¹⁾	2.26	1.46	4.4	N/I=90/10 ¹⁾	2.44	1.14	2.4
3	N/I=85/15 ¹⁾	1.09	1.43	3.0	N/I=90/10 ¹⁾	1.26	2.04	0.9
4	N/I=85/15 ¹⁾	2.04	1.38	2.9	N/T=90/10 ¹⁾	6.04	1.04	1.0
5	N/I=80/20 ²⁾	4.73	1.13	3.2	N/T=85/15 ²⁾	5.61	1.00	0.0
6	N/I=80/20 ²⁾	5.94	1.05	1.3	N/T=85/15 ²⁾	8.58	1.00	0.0
7	N/I=80/20 ²⁾	9.99	1.07	2.1	N/T=85/15 ²⁾	21.68	1.00	0.0
8	N/I=80/20 ¹⁾	1.09	1.80	6.5	N/T=85/15 ¹⁾	2.27	1.00	0.0
9	N/I=90/10 ²⁾	2.42	1.00	0.0	N/T=85/15 ²⁾	7.44	1.33	0.8
10	N/I=90/10 ²⁾	2.36	1.00	0.0	N/T=85/15 ²⁾	8.62	1.29	1.1
11	N/I=90/10 ²⁾	2.50	1.00	0.0	N/T=85/15 ²⁾	10.10	1.29	1.3

CSPT: the coated column in Ref. [1]. R_s : resolution; N: *n*-hexane; I: isopropanol; T: tetrahydrofuran. 1) containing 0.1% (v/v) diethylamine (DEA); 2) containing 0.1% (v/v) DEA and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA).

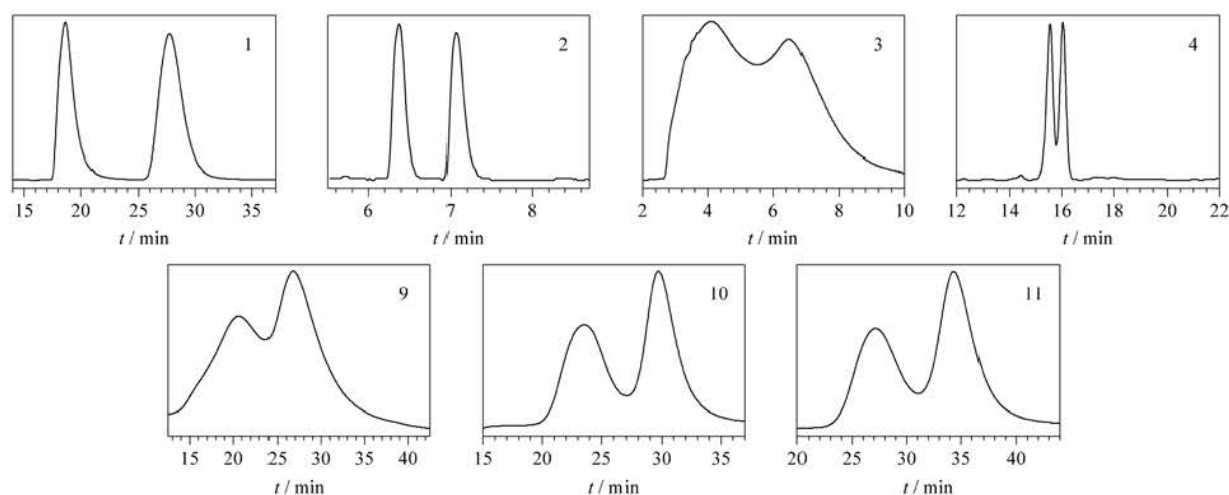


图 5 手性药物 1~4、9~11 在 CSP1 上的分离谱图

Fig. 5 Enantioseparation chromatograms of chiral drugs 1~4 and 9~11 on CSP 1

2.3 CSP1 与 CSP2 的比较

表 2 为 CSP2 的拆分结果,图 6 为 CSP2 的成功拆分色谱图。由结果可知,1~4 号药物在 CSP1 与 CSP2 上均可得到拆分,且 3 号药物在 CSP2 上的拆分效果明显优于在 CSP1 上,这应是 3 号药物与 CSP2 更加匹配的缘故。但两种固定相在拆分 9~11 号药物时表现出了显著差别,相对于在 CSP1 上的良好分离,9~11 号药物在 CSP2 上均未表现出拆分迹象,这与间隔臂的不同有很大关系。如前言中所述,纤维素-三(环己基氨基甲酸酯)手性固定相的拆分能力与范围几乎与著名的 OD 柱相当。而咪唑类抗真菌药物(如 9~11 号)在 OD 柱上有良好的拆分先例^[7],因此,可以认为除了流动相的因素外,9~11 在 CSP1 上良好的拆分结果与间隔臂中的环己基对纤维素的修饰也有很大关系。KH-566 这种间隔臂不仅起到了键合固定相的作用,而且也是作为一种纤维素的结构调控基团而存在的,它的作用并不是任何一种间隔臂都能替代的。

表 2 手性药物 1~4、9~11 在 CSP2 上的手性拆分
Table 2 Enantioseparation of chiral drugs
1~4, 9~11 on CSP 2

Racemate	CSP2			
	Mobile phase	k_1	α	R_s
1	N/T=95/5 ¹⁾	7.98	1.80	5.5
2	N/I=90/10 ¹⁾	3.13	1.23	1.5
3	N/I=90/10 ¹⁾	1.17	2.21	5.4
4	N/T=90/10 ¹⁾	8.17	1.06	1.4
9	N/T=85/15 ²⁾	8.02	1.00	0.0
10	N/T=85/15 ²⁾	8.96	1.00	0.0
11	N/T=85/15 ²⁾	13.38	1.00	0.0

R_s : resolution; N: *n*-hexane; I: isopropanol; T: tetrahydrofuran. 1) containing 0.1% (v/v) DEA; 2) containing 0.1% (v/v) DEA and 0.1% (v/v) TFA.

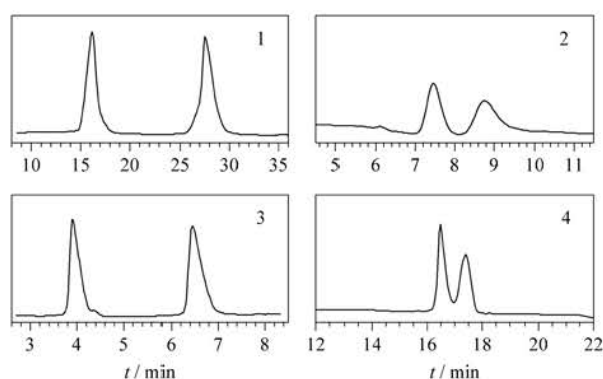


图 6 手性药物 1~4 在 CSP2 上的分离谱图

Fig. 6 Enantioseparation chromatograms of chiral drugs 1~4 on CSP 2

3 结论

将邻乙酰水杨酸纤维素酯通过 2-(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷作为间隔臂制成键合型手性固定相 CSP1 后,在拆分 1~8 号药物时效果不如涂敷型手性固定相 CSPT,这与学界普遍认为的键合型手性固定相在拆分效果方面不如涂敷型手性固定相是一致的。但 CSP1 在拆分 9~11 号这 3 个咪唑类药物时却表现出了良好的手性识别能力,这种能力除了邻乙酰水杨酸纤维素酯本身的因素外,还包括了间隔臂中环己基对纤维素的结构影响作用,以及流动相选择范围增大后,对药物洗脱和选择性的改进和提高作用。为了印证间隔臂中环己基的作用,本文还以不具有环己基的环氧丙氧丙基三甲氧基硅烷为间隔臂,仿照 CSP1 的制备方法制备了键合柱 CSP2,与 CSP1 针对 7 种手性药物进行了拆分对比,初步证明了环己基作为纤维素表面的修饰基团对 CSP1 的手性拆分能力具有一定的协助作用。

参考文献:

- [1] Li Y, Zhu J K, Feng H, et al. Chin J Anal Chem, 2015, 43 (8): 1162
- [2] Okamoto Y, Kaida Y. J Chromatogr A, 1994, 666 (1/2): 403
- [3] Zhao Y F, Song J X, Sun J Y, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32 (8): 832
赵允凤, 宋佳新, 孙嘉仪, 等. 色谱, 2014, 32 (8): 832
- [4] Shen J, Liu S, Li P, et al. J Chromatogr A, 2012, 1246 (13): 137
- [5] Chankvetadze B, Ikai T, Yamamoto C, et al. J Chromatogr A, 2004, 1042 (S1/2): 55
- [6] Wang M. Chinese Journal of Chromatography, 2014, 32 (2): 198
王敏. 色谱, 2014, 32 (2): 198
- [7] Tang L, Yu H N, Li C P, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2008, 28 (6): 917
唐岚, 于海宁, 李成平, 等. 药物分析杂志, 2008, 28 (6): 917