

孔道中杂合 β -环糊精的有机-无机手性固定相的制备及手性分离性能

李来生* 马海萍 陈红 方奕珊
(南昌大学分析测试中心 南昌 330047)

摘要 制备了 β -环糊精-6-单取代氨基乙基氨基丙基三甲氧基硅烷手性单体(β -CD siloxane),以该手性单体和1,2-双(三乙氧基硅基)乙烷(BTEE)为硅源,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)为模板,采用水热合成法直接制得孔道中含有环糊精的手性介孔材料。再对该产物进行苯基异氰酸酯化得到杂合 β -环糊精的有机-无机介孔分离材料(β -CD PMOs)。在反相-HPLC及正相-HPLC条件下,分别考察该填料柱对常见含氮碱性药物对映体的拆分效果。结果表明,不管在反相或正相分离模式下,采用常见的流动相在pH=4.15条件实现了11个碱性药物的手性分离,手性选择因子(α)最高可达2.42。孔道中直接杂合 β -环糊精的手性固定相制备方法简便、快速和成本低,进一步优化成孔条件后有一定应用前景。

关键词 手性液相色谱固定相,有机-无机杂化材料, β -环糊精,手性药物拆分

中图分类号:O657

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2012)04-0410-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2012.00248

近20年来,采用手性固定相的高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)已成为手性药物分离和测定的有效手段^[1]。色谱法手性拆分是基于固定相上键合的手性配体与对映体的选择性相互作用实现分离的。手性配体主要有微晶纤维素类、环糊精衍生物、多糖衍生物、蛋白质类、大环抗生素和配体交换剂类等。近年来,Armstrong等^[2]开发的环糊精衍生物键合硅胶固定相,由于能在反相、正相和极性有机相模式下分离广泛的手性客体而倍受青睐。一些环糊精衍生物键合硅胶固定相柱已被商品化。随着手性药物尤其心血管类手性药物的需求量不断增加^[3],开发新型手性配体及键合基质手性分离材料,建立快速手性分离方法,对手性药物质量控制和用药安全具有重要意义^[4]。

由于介孔材料具有大比表面和高度有序孔结构,作为新型的固定相基质材料已引起广泛关注。其中有机-无机介孔(PMOs)功能化材料^[5]因其对酸碱稳定性($1 < \text{pH} < 14$)好,渗透性能优良,将手性有机配体杂合到基质的孔道中,所得的分离材料具有负载量高和配体分布均匀,可避免传统复杂键合反应和后处理过程,有望成为HPLC新型的固定相。朱桂茹等^[6-7]将含手性环己二胺的单硅氧烷与1,2-双(三甲氧基硅基)乙烷(BTME)水解共聚,得到了孔道中直接含手性环己二胺的有机-无机介孔材料,作为手性拆分柱成功地分离了非衍生化的氨基酸对映体和R/S-1,1'-联-2-萘酚对映体。

本文首先合成 β -环糊精-6-单取代氨基乙基氨基丙基三甲氧基硅烷手性单体,以该手性单体和1,2-双(三乙氧基硅基)乙烷(BTEE)为硅源,通过水热法制备了孔道中含 β -环糊精,二氧化硅骨架中杂合了乙基的新型手性有机-无机介孔分离材料(CDPMO),再用苯基异氰酸酯修饰后用其作为液相色谱手性固定相,在反相或正相模式下测试对11种有机碱手性药物对映体拆分效果。

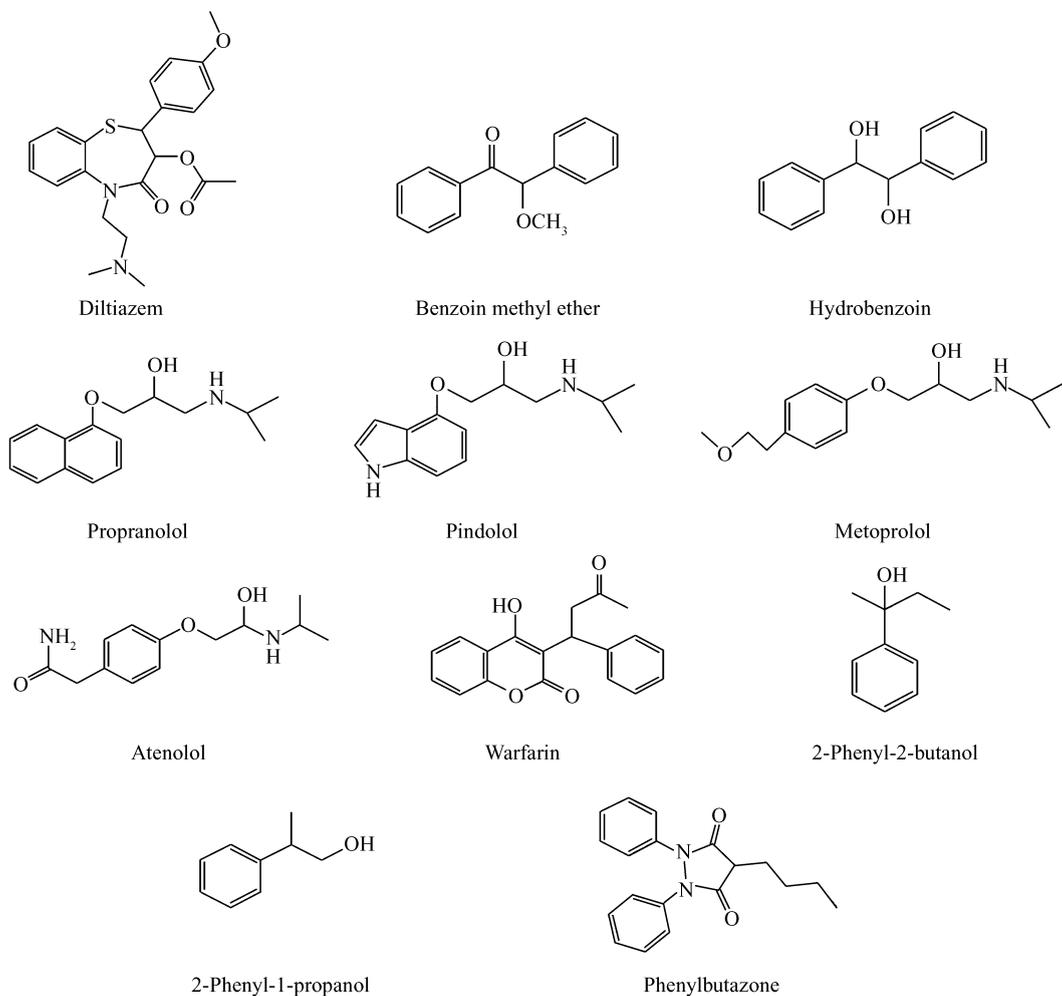
1 实验部分

1.1 仪器和试剂

配有2996二极管阵列检测器的ZQ-4000/2695型液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司); Nicolet-5700型傅里叶变换红外光谱仪(美国Nicolet公司);XRD DI SYSTEM多功能X射线衍射仪(英国Bede公司);Vario EL III型元素分析仪(德国Elementar公司);AUTOSORB-6B型全自动比表面和孔

径分布测定仪(美国 Quantachrome 公司);Quanta 200F 型环境扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);DF-2 集热式磁力搅拌器(金坛市城西春兰实验仪器厂);KQ-100DE 型数控超声清洗器(江苏昆山超声波清洗器厂)。

实验所用普萘洛尔(propranolol)等手性药物均购自 Sigma 公司(结构如 Scheme 1 所示)。 β -环糊精(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司);*N*-(氨乙基)-3-氨丙基三甲氧基硅烷(Aldrich 公司);1,2-双(三乙氧基硅基)乙烷(BTEE, Sigma 公司);对甲苯磺酰氯(上海海曲化工有限公司);甲醇和乙腈均为色谱纯(Merck 公司);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,天津市大茂化学试剂厂);吡啶(分析纯,上海精析化工科技有限公司),用前加 KOH 重蒸除水;三乙胺及其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);水为二次蒸馏水。



1.2 孔道中含 β -CD的有机-无机介孔材料(CDPMO)的制备

1.2.1 单取代 β -环糊精-对甲苯磺酸酯(β -CDTS)的制备 参考文献[8]方法,向 500 mL 圆底三颈烧瓶中加入 250 mL 二次蒸馏水,室温磁力搅拌下分批加入 60 g β -CD 后,2 min 内滴加 20 mL 8.25 mol/L NaOH 溶液。待环糊精完全溶解后,继续搅拌 1 h。然后慢慢加入对甲苯磺酰氯/乙腈溶液(10.10 g 溶于 30 mL 乙腈中)后,继续搅拌 2.5 h。过滤,滤液用 10% 盐酸调 pH 值至 8 左右,置冰箱中(4 $^{\circ}$ C)冷却过夜,析出大量白色晶体。抽滤,用二次蒸馏水重结晶 3 次,于干燥箱中 50 $^{\circ}$ C 真空干燥 16 h,得 16.5 g β -环糊精-对甲苯磺酸酯白色晶体,产率 24.2%。ESI-MS(m/z): $[M + H]^+$, 1289.12。

1.2.2 β -环糊精-6-单取代氨乙基氨丙基硅氧烷(β -CD-硅氧烷)的制备 将 2.58 g 干燥 β -环糊精-对甲苯磺酸酯(2.0 mmol)加到 50 mL 的圆底烧瓶中,加入 15 mL 除水的 DMF,在室温 N_2 气保护下搅拌溶解。

滴加 0.50 mL *N*-(氨乙基)-3-氨丙基三甲氧基硅烷(约 2.3 mmol), 80 °C 搅拌反应 24 h, 得到淡黄色透明溶液。减压蒸除 DMF 及未反应的硅氧烷, 得到 2.25 g 淡黄色固体 β -环糊精-6-单取代氨乙基氨丙基硅氧烷, 产率 85%。

1.2.3 孔道中含 β -CD 的有机-无机介孔材料(CDPMO)的制备 在 100 mL 圆底烧瓶中加入 1.5 g CTAB、27 mL 蒸馏水、8 mL 无水乙醇及 16 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 40 °C 下搅拌得到透明溶液 A, 冷却至室温; 将上述反应中得到的 β -CD-硅氧烷手性单体(1.7 mmol) 先溶于 2 mL 无水乙醇, 再加入 1.7 mL BTEE(4.6 mmol), 搅拌溶解得到硅氧烷混合液 B。室温搅拌下将 B 液加到 A 液中, 加毕搅拌 30 min 成透明溶液。将其转入内衬聚四氟乙烯的水热合成反应釜中, 80 °C 下静置晶化 16 h。放冷后过滤, 得到的固体产物室温下凉干。将 1.0 g 产物与 200 mL 无水乙醇和 1.72 mL 浓盐酸混合, 50 °C 搅拌 6 h 去除模板剂, 过滤, 滤出物用无水乙醇反复洗涤后 50 °C 真空干燥 6 h。

取 2.9 g 上步干燥后的固体, 加 50 mL 新蒸的吡啶, 在磁力搅拌下慢慢滴加 10 mL 苯基异氰酸酯后, 90 °C N_2 气保护下搅拌反应 24 h。放冷过滤, 并用吡啶洗涤固体 2 次。再用甲醇索氏抽提 24 h 后, 50 °C 真空干燥 10 h, 得 CDPMO 产品。

1.3 色谱柱制备及色谱测试条件

CDPMO 手性柱(150 mm \times 4.6 mm i. d.), 以异丙醇为匀浆剂, 甲醇为顶替剂, 采用匀浆恒压装柱法制得, 填充压力 41.4 MPa。反相色谱流动相由乙腈/甲醇/乙酸三乙铵缓冲溶液(TEAA, pH=4.15) 按一定体积比配制, 流速一般为 0.5 mL/min; 正相色谱流动相由不同体积比的正己烷/异丙醇/三氟乙酸(*n*-Hexane/IPA/TFA) 制成。柱温均为 25 °C。被拆分手性化合物用甲醇配成 100 g/L 的储备溶液, 于冰箱中避光保存, 使用前用流动相适当稀释后进样, 进样量一般为 10 μ L; 二极管阵列检测波长范围为 200 ~ 280 nm。用保留因子(k')、选择性因子($\alpha = k'_2/k'_1$) 和分离度(R_s) 评价手性分离性能, 柱子的死时间用 $NaNO_3$ 溶液测定。

2 结果与讨论

2.1 孔道中含 β -CD 的 CDPMO 的制备

采用共缩聚法直接制备孔道中含环糊精配体的 PMOs 材料, 不涉及复杂的键合反应, 环糊精即被均匀地杂合到介孔内壁, 手性配体负载量有一定的提高, 有利于改进其手性分离选择性。

首先合成 β -CD-单硅氧烷手性单体, 再用 *N*-(氨乙基)-3-氨丙基三甲氧基硅烷为偶联试剂, 使 CD 配体与硅胶表面保持适当的距离, 有利于充分发挥配体的手性识别作用。为了制备有序孔道含 CD 的大比表面积 PMOs 球形颗粒材料, 本文按文献^[6-7] 报道的硅源比、溶剂比和模板剂制备。

由于 β -CD-单硅氧烷是固体, 其与双硅酯(BTEE) 的互溶性较差, 必须选用共溶溶剂以利于生成有

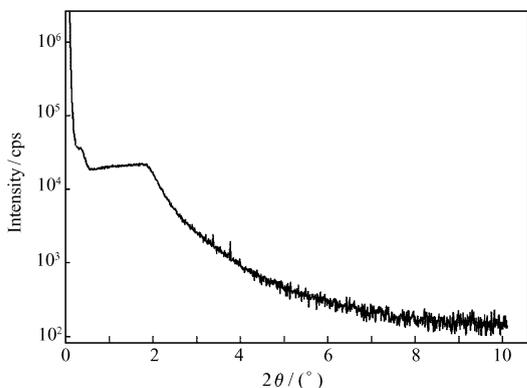


图1 CDPMO 硅材料的 XRD 衍射谱

Fig. 1 X-ray diffraction pattern of CDPMO

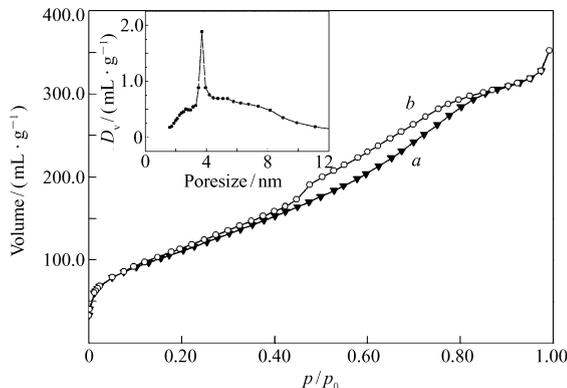


图2 CDPMO 硅材料的氮吸附-脱附等温线

Fig. 2 Nitrogen adsorption-desorption isotherms curves of CDPMO

a. adsorption; b. desorption

序的基质材料。为此,比较了 DMF、DMSO 和乙醇的共溶效果,发现乙醇可提高两种硅酯的互溶性。但合成产物的有序度仍不够高(图 1),可能是由于 CD 体积较大影响 CD 与 BTEE 在 CTAB 胶束上的自组装过程,有待改进 CD 配体兼容性来提高材料的有序性。

图 2 为 CDPMO 硅材料的氮吸附-脱附等温线,氮吸附和脱附量从 p/p_0 0.4 ~ 0.8 范围逐渐增大。按 BJH 法得到孔径分布曲线,表明大多数孔径为 3.4 nm 左右(图 2 插图),稍大于相关文献报道值^[6],其多点 BET 比表面积为 725 m²/g。

2.2 CDPMO 固定相的结构表征

合成 CDPMO 的红外光谱上出现了 2 933 和 2 895 cm⁻¹ 吸收峰,于骨架中乙基和间隔基上的亚甲基的 ν_{CH} 谱带。1 685 cm⁻¹ 处出现典型的酰胺羰基 $\nu_{C=O}$ 伸缩振动谱带,1 604、1 554、1 500 和 1 439 cm⁻¹ 处的苯环骨架 $\nu_{C=C}$ 振动耦合谱带,1 118、1 122 和 1 024 cm⁻¹ CD 上的 ν_{C-O} 和材料基质中的 ν_{Si-O} 伸缩振动峰簇,表明 CDPMO 中存在苯基异氰酸酯衍生化的 CD。

合成 CDPMO 的扫描电子显微镜图为表面光滑的粒径 5 ~ 10 μ m 的球(图 3)。为便于估算材料中的 CD 的键合量,由对苯基异氰酸酯衍生化前的固定相的 N 含量仅由环糊精硅氧烷提供,故可通过其进行元素分析(C 18.93%, H 5.01%, N 2.54%)中 N 含量估算 CD 键合量为 0.94 μ mol/m²。因为骨架中嵌有的乙基会增大 C 含量。

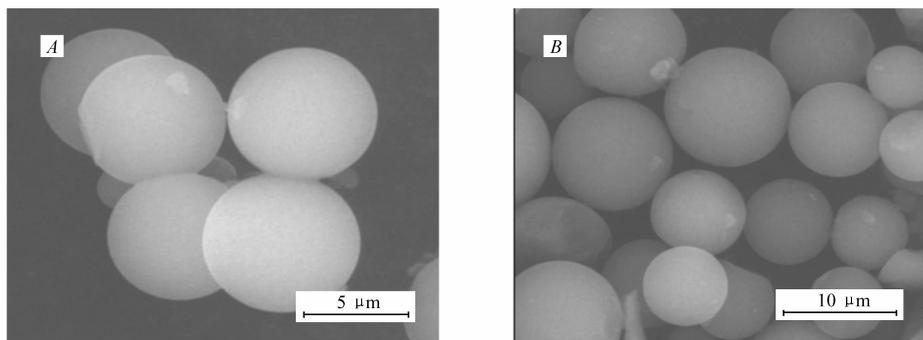


图 3 CDPMO 扫描电子显微镜影像

Fig. 3 SEM images of CDPMO

2.3 CDPMO 固定相的色谱性能

Armstrong 等^[9-11]认为衍生化 β -CD 固定相除可延伸 β -CD 的疏水空腔,还可在孔道中引入更多的芳香基(π - π 作用),极性氢键或极性堆积部位(与溶质上的极性基团起束缚作用),大体积非极性基团(立体排阻作用)等活性位点,可增强环糊精的手性识别能力,从而使其对更广泛的化合物具有对映体选择性。苯基异氰酸酯是最常用的衍生化试剂,本实验也对合成的 CDPMO 进行苯基异氰酸酯化处理,以增强其手性识别能力。

用该衍生化 CDPMO 填料柱在反相 HPLC(RP-HPLC)条件下,采用常用的 MeOH/ACN/TEAA 做流

表 1 反相条件下手性化合物的 HPLC 分离

Table 1 Enantioseparations of chiral compounds under RP-HPLC

Chiral compounds	k'_1	k'_2	α	R_s	Mobile phases
Diltiazem	2.23	4.10	1.84	1.59	MeOH:0.1% TEAA = 15:85, 0.5 mL/min
Benzoinmethylether	2.02	3.51	1.75	1.43	ACN:0.1% TEAA = 30:70, 0.5 mL/min
Hydrobenzoin	1.73	2.81	1.62	1.37	ACN:0.1% TEAA = 30:70, 0.5 mL/min
Propranolol	0.71	1.72	2.42	1.80	ACN:0.1% TEAA = 30:70, 0.5 mL/min
Pindolol	0.65	1.06	1.63	1.23	MeOH:0.1% TEA = 40:60, 0.6 mL/min
Metoprolol	0.63	0.98	1.56	1.15	ACN:0.1% TEAA = 25:75, 0.6 mL/min
Atenolol	0.55	0.88	1.60	1.26	ACN:0.1% TEAA = 30:70, 0.6 mL/min
Warfarin	0.71	1.52	2.14	2.33	ACN:0.1% TEAA = 30:70, 0.5 mL/min

Mobile phase volume ratio; buffers: pH = 4.15; detection wavelength: 200 ~ 280 nm; injection volume: 10 μ L.

动相,成功地分离了8种常见的手性药物。在相近的pH值条件下,其手性选择因子(α)可达1.56~2.42(表1)。在正相HPLC(NP-HPLC)条件下,以*n*-hexane/IPA/TFA为流动相,拆分了非甾体抗炎镇痛药保泰松等3种手性化合物。对保泰松的对映体选择性因子(α)为2.34(表2)。证明共聚缩合法制备的CDPMO同样适用于正相色谱。

表2 手性药物的正相HPLC分离

Table 2 Enantioseparations of chiral compounds under NP-HPLC

Chiral compounds	k'_1	k'_2	α	R_s	Mobile phases
2-phenyl-2-butanol	1.03	1.66	1.61	1.33	<i>n</i> -hexane:IPA = 80:20
2-phenyl-1-propanol	0.98	1.48	1.55	0.72	<i>n</i> -hexane:IPA:TFA = 90:10:0.1
phenylbutazone	2.61	6.12	2.34	2.25	<i>n</i> -hexane:IPA:TFA = 90:10:0.1

Mobile phase volume ratio; detection wavelength:240~280 nm; injection volume:10 μ L.

3 结论

自制了 β -环糊精-6-单取代氨基乙基氨基丙基三甲氧基硅烷手性单体,采用水热法制得孔道中含有 β -CD的新型手性介孔分离材料(有机-无机杂化材料),再用苯异氰酸酯对产物中CD衍生化后得到CDPMO材料。用其制成填料柱在正相和反相HPLC条件下,采用常用流动相,实现了11种常见手性药物的对映体拆分。

参 考 文 献

- [1] CHEN Liren. HPLC Chiral Separations[M]. Beijing:Science Press of China,2006:105-136(in Chinese).
陈立仁. 液相色谱手性分离[M]. 北京:科学出版社,2006:105-136.
- [2] Zhong Q Q, He L F, Beesley T E, *et al.* Development of Dinitrophenylated Cyclodextrin Derivatives for Enhanced Enantiomeric Separations by High-performance Liquid Chromatography[J]. *J Chromatogr A*,2006,**1115**(1/2):19-45.
- [3] State Food and Drug Administration Information Center[EB/OL]. [2009-03-23]. http://www.cpi.gov.cn/cpi/jsp/preview_1.jsp?TID=20100323140954005591717(in Chinese).
国家食品药品监督管理局信息中心. 2009世界畅销药排行榜:立普妥夺冠[EB/OL]. [2009-03-23]. http://www.cpi.gov.cn/cpi/jsp/preview_1.jsp?TID=20100323140954005591717.
- [4] YOU Qidong, LIN Guoqiang. Chiral Drugs Research & Application[M]. Beijing:Chemical Industry Press,2003:241(in Chinese).
尤启冬,林国强. 手性药品研究与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2003:241.
- [5] Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, *et al.* Periodic Mesoporous Organosilicas (PMOs): Past, Present, and Future[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2006,**6**(2):265-288.
- [6] Zhu G R, Jiang D M, Yang Q H, *et al.* Trans-(1*R*,2*R*)-Diamino-cyclohexane Functionalized Mesoporous Organosilica Spheres as Chiral Stationary Phase[J]. *J Chromatogr A*,2007,**1149**:219-227.
- [7] Zhu G R, Zhong H, Yang Q H, *et al.* Chiral Mesoporous Organosilica Spheres: Synthesis and Chiral Separation Capacity [J]. *Microporous Mesoporous Mater*,2008,**116**:36-43.
- [8] Guo Z M, Jin Y, Liang T, *et al.* Synthesis, Chromatographic Evaluation and Hydrophilic Interaction/Reversed-phase Mixed-mode Behavior of a "Click beta-Cyclodextrin" Stationary Phase[J]. *J Chromatogr A*,2009,**1216**(2):257-263.
- [9] Han X X, Yao T L, Liu Y, *et al.* Separation of Chiral Furan Derivatives by Liquid Chromatography Using Cyclodextrin-based Chiral Stationary Phases[J]. *J Chromatogr A*,2005,**1063**(1/2):111-120.
- [10] Berkecz R, Ilisz I, Ivanov-Sztojokov A, *et al.* HPLC Enantioseparation of 1-(alpha-Aminobenzyl)-2-naphthol and 2-(alpha-Aminobenzyl)-1-naphthol Analogs on a beta-Cyclodextrin-based Chiral Stationary Phase[J]. *Chromatographia*,2007,**65**(5/6):337-341.
- [11] Wang Y, Young D J, Tan T T Y, *et al.* "Click" Immobilized Perphenylcarbamated and Permethylated β -Cyclodextrin Stationary Phases for Chiral High-performance Liquid Chromatography Application[J]. *J Chromatogr A*,2010,**1217**:5103-5108.

Preparation and Enantioseparation Performance of Organo-inorganic Silica Composite Chiral Stationary Phase Modified by β -Cyclodextrin

LI Laisheng^{*}, MA Haiping, CHEN Hong, FANG Yishan

(Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract β -CD-mono-6-(*N*-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxy silane was synthesized and used together with 1,2-bis(triethoxysilyl)-ethane(BTEE) as silica resources templated by cetyltriethyl-ammonium bromide (CTAB) for preparing mesoporous chiral materials *via* hydrothermal processes. After phenylcarbamated with phenyl isocyanate an organo-inorganic chiral silica composite(β -CD PMOs) was obtained, in which β -CD was incorporated to the wall of the channels while ethyl groups were located in the framework. The periodic mesoporous organosilicas(PMOs) was utilized as chiral stationary phase(CSP) for enantioseparation of some alkaline medicines containing nitrogen under reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and normal-phase high-performance liquid chromatography (NP-HPLC) conditions. The results showed that the enantioseparation of these medicines could be effectively achieved by β -CD PMOs using common mobile phases at the similar pH value(pH = 4.15). The maximal enantioseparation selectivity factor (α) was 2.42. In addition, excellent permeability and reproducibility facilitate the establishment of a new enantioseparation method for chiral medicines. The chromatographic data indicated that β -CD PMOs are promising for the enantioseparation of medicines.

Keywords chiral HPLC, organic-inorganic hybrid materials, β -cyclodextrin, enantioseparation of chiral medicines