

# 纤维素三醋酸酯手性固定相分离药物对映体

黄慕斌 孙 健 王吉顺\* 李高兰 亓海录 王建鹏 沈耀生

(山东大学化学系, \* 实验中心, 济南 250100)

**摘要** 用非均相乙酰化方法合成微晶纤维素三醋酸酯制备手性柱和手性薄层板用于 HPLC 和 TLC, 用 95% 乙醇或 95% 乙醇和缓冲液(pH 10)的混合物为流动相分离特罗格尔碱、甲喹酮、氯美扎酮和氯喹对映体, 讨论了流动相组成、pH、温度对分离对映体的影响。实验结果表明 CTA 手性板对流动相的组成和 pH 的变化较敏感, TLC 流动相极性一般较 HPLC 流动相的极性大。上述 4 种对映体的 HPLC 分离度均达到 0.6 以上; TLC 分离度均达到 1.1 以上。

**关键词** 对映体; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 纤维素三醋酸酯; 手性固定相

纤维素由 D-吡喃型葡萄糖为重复单元, 通过  $\beta$ -1,4 糖甙键连接而成<sup>[1~4]</sup>。由于纤维素存在手性单元, Fukunara 等<sup>[5]</sup>和 Huynk 等<sup>[6]</sup>曾用纤维素作为手性吸附剂, 直接分离氨基酸对映体。Hesse 和 Hagel<sup>[7,8]</sup>对微晶纤维素采用非均相乙酰化方法制备成纤维素三醋酸酯(cellulose triacetate, 简称 CTA)分离了特罗格尔碱(Troeger's base)。随后又出现多种其他纤维素衍生物, 如纤维素三苯甲酸酯(cellulose tribenzoate, CTB)<sup>[9]</sup>、纤维素三苯氨基甲酸酯(cellulose triphenylcarbamate, CTPC)<sup>[10,11]</sup>以及这些衍生物的苯环上不同取代基或不同位置取代的多种衍生物<sup>[9~13]</sup>作为高效液相色谱手性固定相分离多种类型的对映体。

近年来 Lepri 等<sup>[14,15]</sup>用 CTA 板分离了丙酸衍生物、醇、芳香胺、内酯、氨基酸衍生物等多种对映体。本文自行合成了 CTA, 用 HPLC 及 TLC 方法直接分离了 4 种药物对映体, 提供了简便的拆分和检测方法。

## 材 料 和 方 法

**仪器与试剂** Varian 5060 型高效液相色谱

仪, UV-100 型紫外检测器(检测波长: 254 nm), HP3390A 积分仪(惠普), 681 磁力搅拌器, LB801 型超级恒温槽, 岛津 IR-450 型红外光谱仪。

微晶纤维素(E. Merck), 特罗格尔碱(Troeger's base, Aldrich), 甲喹酮(methaqualone, 锦州制药厂), 氯美扎酮(chlormezanone, 东北第六制药厂), 氯喹(chloroquine, 购于济南中心医院), 1,3,5-三特丁基苯(1,3,5-tri-tertbutylbenzene, Sigma), 其他试剂均为分析纯。

纤维素三醋酸酯的合成及手性柱和手性板的制备 按文献<sup>[3,6]</sup>方法制备纤维素三醋酸酯, 反应结束后离心分离沉淀, 用甲醇洗涤数次, 30℃ 烘干, 研磨成细粉。经元素分析及红外光谱证明乙酰化完全。取 CTA(45~50  $\mu$ m) 4 g 加适量 95% 乙醇, 在水浴中加热 1 h。用乙醇作匀浆剂装入 300 mm  $\times$  4 mm ID 不锈钢柱中, 备 HPLC 用。取 CTA(小于 40  $\mu$ m) 1 g 加 0.5% 的羧甲基纤维素钠 4 ml 和荧光粉 15 mg, 加入少量 95% 乙醇, 在电磁搅拌器上搅拌 1 h, 常规法铺板(10 cm  $\times$  2.5 cm), 空气中晾干备 TLC 用。

样品制备和色谱条件 HPLC 流动相为 95% 乙醇, 进样量 10  $\mu$ l, 用 1,3,5, 三特丁基苯测定死时间。

薄层点样 1~3  $\mu\text{l}$ , 上行展开后空气中晾干, 于紫外灯下观察样品斑点(红色)。

## 结果和讨论

### 1 手性柱分离药物对映体

CTA 柱上用 95% 乙醇为流动相, 在不同温度下分离特罗格尔碱、甲喹酮、氯美扎酮、氯喹 4 种对映体, 分离数据列入表 1。特罗格尔碱和甲喹酮的色谱图见图 1。

Tab 1 Separation of drug enantiomers on CTA column (mobile phase: 95% ethanol)

Sample	$k'_1$	$k'_2$	$\alpha$	Flow rate ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R_s$
Methaqualone	1.82	3.34	1.84	0.3	16	0.705
Troeger's base	1.84	2.59	1.65	0.4	40	0.887
Chlomezanone	4.00	5.13	1.28	0.4	25	0.614
Chloroquine	0.85	2.29	2.09	0.3	16	0.674

$k'_1$  and  $k'_2$  indicate the first and second enantiomers eluted.

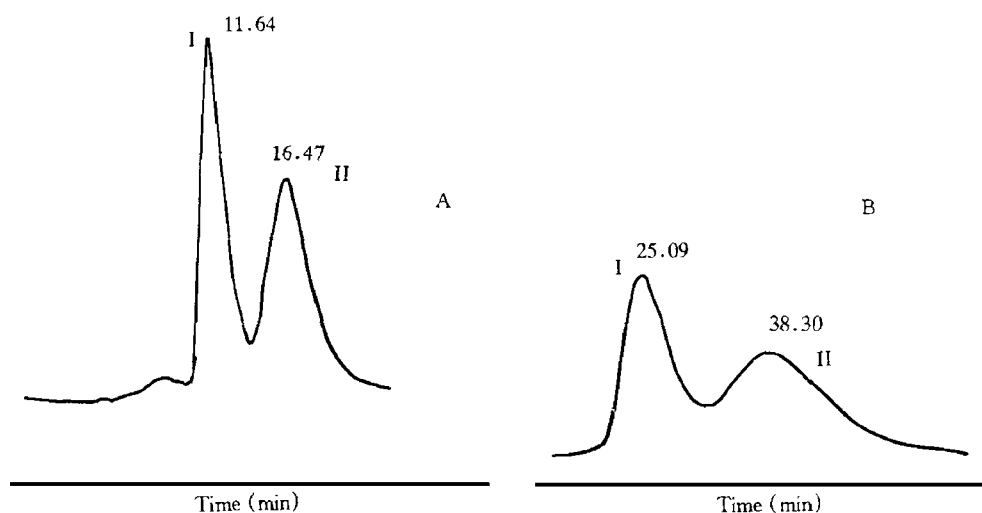


Fig 1 Chromatograms of drug enantiomers on CTA column. A. Troeger's base; B. Methaqualone. I and II indicate the first and second enantiomers eluted.

**1.1 pH 的影响** Isaksson 等<sup>[1]</sup>和 Rizzi<sup>[2]</sup>曾对 CTA 柱的物理和化学性能进行过系统研究, 例如流速、流动相配比、pH、温度等对  $k'$  和  $\alpha$  值的影响。一般认为 96% 乙醇为流动相可以取得好的分离效果, pH 5~10 对  $k'$  和  $\alpha$  值的影响较小, 除非被测物在 pH 改变时会引起某些基团的变化, 如萘福泮(nefopam)分子中 N 原子上质子化或去质子化, 从而引起构象或电荷的变化使  $k'$  和  $\alpha$  值有较大的变化。本文结果特罗格尔碱和氯美扎酮的  $k'$  和  $\alpha$  值基本不受流动相 pH 的影响, 与文献<sup>[1]</sup>报道一致。此柱可以在 pH 5~10 范围内使用。

**1.2 温度的影响** 结果显示甲喹酮和氯美扎

酮的  $k'$  和  $\alpha$  值随温度的增加而减小; 特罗格尔碱的温度效应不同于前二者, 随温度的增加  $k'$  值明显减小, 但  $\alpha$  值和分离度明显增加。溶胀的 CTA 手性柱的分离机理还不十分明了, 一般认为<sup>[1~3,5,6]</sup>对映体不是简单的吸着在某一葡萄糖单元上, 而是插入两个单元之间的手性空腔中, 形成一种包含复合物而达成分离, 纤维素的微晶结构对光学拆分起主要的作用, 被测物的保留与被测物和手性空腔之间的匹配有关。

### 2 手性薄层分离药物对映体

药物对映体在 CTA 薄层板上的分离数据列入表 2。氯美扎酮和氯喹的薄层色谱分离见图 2。

**Tab 2 Separation of the drug enantiomers on CTA thin layer plate**

Sample	R <sub>f1</sub>	R <sub>f2</sub>	a	R <sub>s</sub>	Temperature (°C)	Mobile phase
Troeger's base	0.37	0.54	1.80	2.25	44	95% ethanol—water(4:1)
Methaqualone	0.27	0.39	1.44	1.22	0	95% ethanol—buffer(pH 10)(2:1)
Chlomezanone	0.23	0.35	1.52	1.15	25	95% ethanol
Chloroquine	0.05	0.18	3.60	2.40	25	95% ethanol—water(6:1)

a = R<sub>f2</sub>/R<sub>f1</sub>; R<sub>s</sub> = 2 × (distance between spots)/sum of the width of the two spots. R<sub>f1</sub> and R<sub>f2</sub> indicate the first and second enantiomers eluted.

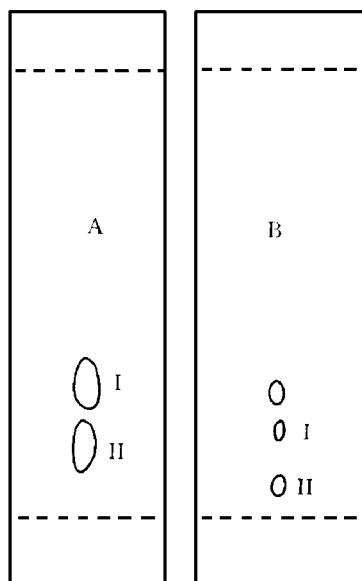


Fig 2 Chromatograms of drug enantiomers on CTA plate. A. Chlomezanone; B. Chloroquine. \* Impurity. I and II indicate the first and second enantiomers eluted.

表 2 中数据可以看出, 各对映体分离时的流动相组成和配比是不同的, 虽然在 HPLC 中各对映体的分离都以 95% 乙醇为流动相, 但在 TLC 中仅氯美扎酮对映体以 95% 乙醇为流动相而被分离, 甲喹酮对映体则在碱性条件下分离。以水代替缓冲液则由于拖尾而分离不理想。氯喹在乙醇和水(6:1)时得到分离, 而用 pH10 的缓冲液代替水时, 反而不能分离, 原因有待探讨。特罗格尔碱的对映体最易分离, 乙醇和水的比例在 8:1~2:1 之间都可以分离(图 3), 在 4:1~7:1 斑点更集中, 分离度更好, 当用 95% 乙醇和流动相中水含量大于 50% 时不能达到分离(R<sub>f</sub> 太小)。

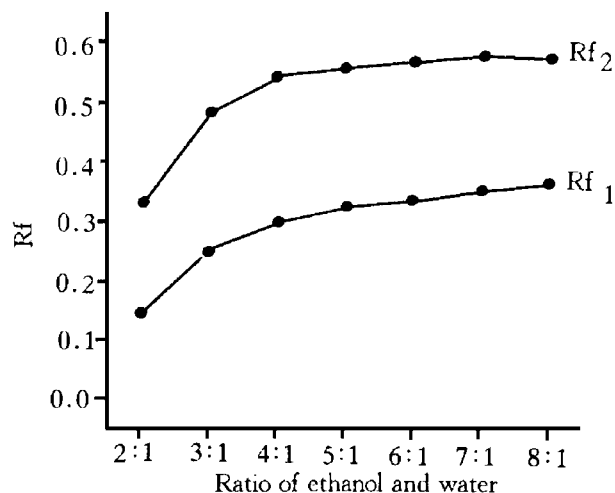


Fig 3 Dependence of R<sub>f</sub> values of Troeger's base on the proportion of ethanol and water in the mobile phase. R<sub>f1</sub> and R<sub>f2</sub> are the same as in Table 2.

从图 3 还可看出随流动相中水含量的增加, R<sub>f</sub> 值逐渐减小, 水含量大于 30% 时 R<sub>f</sub> 变化缓慢, 水含量小于 30% 时变化较明显, 但 ΔR<sub>f</sub> 值变化不大。

**2.1 pH 的影响** pH 变化对特罗格尔碱分离的影响见图 4, 与 HPLC 情况似乎有所不同。从 ΔR<sub>f</sub> 值看, 在 pH 3.7~11.6 范围内变化不大, 但从 R<sub>s</sub> 看, 在酸性和碱性时斑点更集中, 分离更好, 可能与分子中氮原子的质子化或去质子化有关。同时说明在 TLC 中 CTA 板的 pH 使用范围比 HPLC 可以更大些, 在 pH 3.7~11.6 时, 薄层板未出现裂纹等异常情况, 同时也显示 CTA 板上 pH 对分离的影响似乎比 CTA 柱更为敏感, 这可能与 CTA 板未经乙醇溶胀有关。

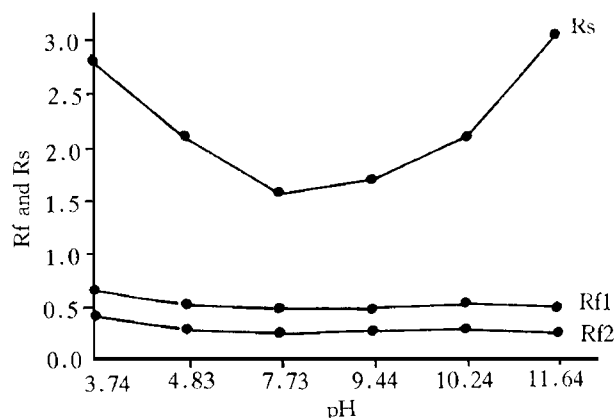


Fig 4 Dependence of Rf and Rs values of Troeger's base on pH of the mobile phase. Rf<sub>1</sub> and Rf<sub>2</sub> are the same as in Table 2.

**2.2 温度的影响** TLC 中温度对分离的影响与 HPLC 中基本一致, 特罗格尔碱的保留值随温度增加而减少(Rf 值变大), 分离度也随温度增加而增加, 主要是由于斑点较紧密, 更为集中, 可能由于温度提高有利于传质阻力的减少, 板效提高。所不同的是  $\alpha$  值随温度的增加而减小(HPLC 中, 在 30~60°C  $\alpha$  值随温度的增加而增加), 原因有待进一步探讨。甲喹酮在室温下不能分离, 应在 0°C (冰箱) 进行。特罗格尔碱、氯喹和氯美扎酮的对映体在室温都可以得到分离。

本文结果显示 CTA 既可以作为 HPLC 手性固定相, 也可以作为 TLC 的手性吸附剂, 直接分离对映体, 方法十分简便。分离可以通过调节流动相组成、pH、温度等得以改善。作为 TLC 吸附剂(未经溶胀)时, 对流动相配比、pH 的影响比经溶胀的 HPLC 手性固定相更为敏感。一般来说, TLC 流动相的极性要大于 HPLC 流动相的极性。

### 参 考 文 献

1 Isaksson R, Erlandsson P, Hansson L, *et al.* Triacetylcellulose as a chiral stationary phase for HPLC. *J Chromatogr*, 1990, **498**:

257

- 2 Rizzi AM. Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen micro crystalline cellulose triacetate packing I. Influence of capacity factor, analyte structure, flow velocity and column loading. *J Chromatogr*, 1989, **478**:71
- 3 Rizzi AM. Band broadening in high-performance liquid chromatographic separations of enantiomers with swollen micro crystalline cellulose triacetate packing II. Influence of eluent composition, temperature and pressure. *J Chromatogr*, 1989, **478**:87
- 4 Francotte E, Wolf RM, Lohmann D, *et al.* Chromatographic Resolution of racemates on chiral stationary phases I. Influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate. *J Chromatogr*, 1985, **347**:25
- 5 Fukunara T, Lsoyama M, Yuasa S, *et al.* Resolution of six polar DL-amino acids by chromatography on native cellulose. *J Chromatogr*, 1987, **387**:562
- 6 Huynh TKX, Lederer M. Adsorption chromatography on cellulose. XI. Chiral separation with aqueous solution of CD as eluents. *J Chromatogr A*, 1994, **659**:191
- 7 Hesse G, Hagel R. Eine vollstandige Racemattrennung durch Elutions Chromatographie an Cellulose-triacetat. *Chromatographia*, 1973, **6**:277
- 8 Hesse G, Hagel R. Uber Inclusions-Chromatographia and Ein neues Retention-Sprinzip Für Benzolderivate. *Chromatographia*, 1976, **9**:62
- 9 Okamoto Y, Aburatani R, Hatada K. Chromatographic chiral resolution XIV. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phase. *J Chromatogr*, 1987, **389**:95

- 10 Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. Chromatographic resolution XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel. *J Chromatogr*, 1986, **363**:173
- 11 Okamoto Y, Kawashima M, Aburatani R, *et al.* Optical resolution of  $\beta$ -blockers by HPLC on cellulose triphenylcarbamate derivatives. *Chem Lett*, 1986, **8**:1237
- 12 邹公伟, 郑琦, 胡冠九, 等. 高效液相色谱中的纤维素生物手性固定相. 分析化学, 1995, **24**:466
- 13 Okamoto Y, Kaida Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phase. *J Chromatogr A*, 1994, **666**:403
- 14 Lepri L, Coas V, Desideri PG, *et al.* Reversed phase planar chromatography of enantiomeric compounds on triacetylcellulose. *J Planar Chromatogr*, 1994, **7**:376
- 15 Lepri L. Reversed phase plane chromatography of enantiomeric compounds on microcrystalline triacetatylcellulose. *J Planar Chromatogr*, 1995, **8**:467

## SEPARATION OF PHARMACEUTICAL ENANTIOMERS ON COLUMN AND THIN-LAYER PLATE OF CELLULOSE TRIACETATE

MB Huang, J Sun, JS Wang<sup>\*</sup>, GL Li, HL Qi, JP Wang and YS Shen

(*Department of Chemistry, <sup>\*</sup> Experimental Center, Shandong University, Jinan 250100*)

**ABSTRACT** Microcrystalline cellulose triacetate (CTA) was prepared by heterogeneous acetylation of microcrystalline cellulose and used as liquid chromatographic chiral stationary phase and chiral thin layer plate to separate pharmaceutical enantiomers. The racemic Troegor's base, mathaqualone, chlormezanone and chloroquine were separated on the CTA chiral column and on the CTA chiral plate. 95% ethanol and the mixtures of 95% ethanol and water with different ratio and different pH values were used as mobile phase. The influences of eluent composition, pH and temperature on the chiral separation were discussed. The experimental results indicate that the CTA chiral plate was more sensitive to eluent composition and pH than chiral column possibly because the chiral adsorbent was not swollen on the plate.

**KEY WORDS** Enantiomer; HPLC; TLC; Cellulose triacetate; Chiral stationary phase