



学 校 代 码 10459

学号或申请号 201212232690

密 级

# 郑 州 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

一类新刷型手性固定相的制备及其应用

作 者 姓 名：李连杰

导 师 姓 名：蒋登高 教授

学 科 门 类：工 学

专 业 名 称：化学工艺

培 养 院 系：化工与能源学院

完 成 时 间：2015 年 5 月

A thesis submitted to  
Zhengzhou University  
for the degree of Master

Preparation and Application of A New Class of Brush Chiral  
Stationary Phase

By Lianjie Li  
Supervisor: Prof. Denggao Jiang  
Chemical Technology  
School of Chemical Engineering and Energy  
May,2015

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者：李连杰

日期：2015年5月27日

## 学位论文使用授权声明

本人在导师指导下完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属郑州大学。根据郑州大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权郑州大学可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为郑州大学。保密论文在解密后应遵守此规定。

学位论文作者：李连杰

日期：2015年5月27日

## 摘要

由于手性药物对映体的生理活性和药理特性的不同,使得手性分离成为分离分析领域中的一个研究热点。高效液相色谱法具有简便、高效、快速和准确等优点,是目前手性药物分离与分析最常用的方法之一,而固定相是高效液相色谱分离分析技术的核心。

本文以硅胶为载体, KH-566 和 KH-550 为间隔臂, 以常用药物辛伐他汀和缬沙坦为手性选择剂, 采用键合法制备出了两种新的刷型手性固定相, 辛伐他汀为手性选择剂的手性固定相 (CSP-A) 和缬沙坦为手性选择剂的手性固定相 (CSP-B), 并通过热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对其进行了表征与分析, 所得数据表明两种新的刷型固定相的合成是成功的。

由辛伐他汀为手性选择剂制备的 CSP-A 成功的拆分了安息香、两种钙离子拮抗剂 (尼群地平和非洛地平) 和 9-苯基苯二烯-9-醇等四种对映体, 并把此固定相对安息香对映体的拆分结果与其他相关固定相的拆分结果进行了比较, 结果表明所制备的固定相优于相关固定相。同时还研究了正向反应和反向反应制备的固定相对相关对映体的拆分效果, 发现反向键合的固定相含碳量高, 但拆分效果并没有得到提高。

由缬沙坦为手性选择剂制备的 CSP-B 成功的拆分了塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种  $\beta$ -受体阻滞剂对映体, 并对拆分流动相的组分、组成比例及其流速进行了考察, 得到正己烷: 四氢呋喃是拆分三种  $\beta$ -受体阻滞剂较佳的流动相, 其较佳组成比例为正己烷: 四氢呋喃 (80:20), 较佳流动相流速为 1.0 ml/min。

关键词: 辛伐他汀; 缬沙坦; 刷型手性固定相; 手性分离



## Abstract

Since the chiral drug enantiomers of biological activities and pharmacological properties are different, the chiral separation becomes a research hot spot in the field of separation and analysis. The method of High performance liquid chromatography (HPLC) has the advantages of convenience, high efficiency, rapidness and accuracy, and is one of the most commonly used method of the chiral drug separation and analysis. The stationary phase is the core of high performance liquid separation and analysis technology.

Taking silica gel as the carrier, KH-566 and KH-550 as the linker, commonly used drug simvastatin and valsartan as chiral selectors, the two new brush chiral stationary phase was prepared in using bonding, simvastatin as chiral selectors of chiral stationary phase and valsartan as chiral selectors of chiral stationary phase, and by making use of TGA, FT-IR and elemental analyzers on the characterization and analysis, the obtained data showed that the synthesis of two new brush stationary phase achieved its original goals.

Four enantiomers are successfully separated by the simvastatin as chiral selectors of chiral stationary phase (CSP-A). They are benzoin, nitrendipine, felodipine and 9-phenylxanthen-9-ol. We compared the separation results of benzoin enantiomer by the simvastatin as chiral selectors of chiral stationary phase (CSP-A) and relevant stationary phase, the results show that the separation results of this chiral stationary phase is superior to the relevant stationary phase. We also studied the stationary phase was prepared by forward reaction and reverse reaction to relevant enantiomers' separation effect, and found the reverse bonded stationary phase with high carbon content, but the separation effect was not improved.

Three enantiomers are successfully separated by the valsartan as chiral selectors of chiral stationary phase (CSP-B). They are celiprolol, atenolol and propranolol. And components of the mobile phase, composition of the mobile phase and flow rate of the mobile phase were investigated. We got the results that n-hexane:tetrahydrofuran

is a better mobile phase for separating the three kinds of drugs and the better proportion of n-hexane:tetrahydrofuran is 80:20, and the better flow rate is 1.0 ml/min.

**Key words:** simvastatin, valsartan, brush chiral stationary phase, chiral separation

## 目录

摘要 .....	I
Abstract.....	II
目录 .....	IV
1 绪论 .....	1
1.1 手性化合物及手性分离的意义 .....	1
1.2 手性分离方法 .....	2
1.3 手性固定相的分类 .....	3
1.3.1 刷型手性固定相 .....	4
1.3.2 多糖类手性固定相 .....	7
1.3.3 蛋白质类手性固定相.....	9
1.3.4 环糊精类手性固定相.....	9
1.3.5 大环抗生素类手性固定相.....	10
1.3.6 手性配体交换类手性固定相.....	10
1.3.7 冠醚和杯芳烃类手性固定相.....	11
1.3.8 分子印迹手性固定相.....	12
1.4 本文的研究内容及意义 .....	13
2 CSP-A 的制备及其应用 .....	14
2.1 主要试剂与仪器 .....	14
2.2 CSP-A 的合成.....	15
2.2.1 硅胶的活化 .....	15
2.2.2 合成工艺路线 .....	16

2.2.3 合成工艺操作 .....	16
2.3 CSP-A 的表征与分析 .....	18
2.3.1 热重分析 .....	18
2.3.2 红外分析 .....	20
2.3.3 元素分析 .....	21
2.4 液相色谱的基本参数与色谱柱的装填 .....	22
2.4.1 液相色谱基本参数 .....	22
2.4.2 色谱柱的装填 .....	24
2.5 CSP-A 拆分能力的考察 .....	25
2.5.1 色谱柱的死时间考察 .....	25
2.5.2 CSP-A 对手性化合物的拆分 .....	26
2.6 本章小结 .....	32
3 CSP-B 的制备及其应用 .....	34
3.1 CSP-B 的合成 .....	34
3.1.1 合成工艺路线 .....	34
3.1.2 合成工艺操作 .....	34
3.2 CSP-B 的表征与分析 .....	35
3.2.1 热重分析 .....	35
3.2.2 红外分析 .....	36
3.2.3 元素分析 .....	38
3.3 色谱柱的装填 .....	38
3.4 CSP-B 拆分能力的考察 .....	38
3.4.1 色谱柱的死时间考察 .....	38
3.4.2 CSP-B 对手性化合物的拆分 .....	39

目录

---

3.5 本章小结 .....	43
4 结论 .....	45
参考文献 .....	46
致谢 .....	51
个人简历、在校期间发表的学术论文及研究成果 .....	52

# 1 绪论

## 1.1 手性化合物及手性分离的意义

一个分子若不能与其镜像叠合，即分子本身与其镜像不同，则此分子为手性分子。分子具有的这种性质称之为手性。手性化合物的化学组成相同，但其空间结构不同，互为镜像与实体的关系，因而我们称其为对映异构体（简称对映体）<sup>[1-3]</sup>。

手性化合物的折光率、相对密度、熔点、沸点及在一般溶剂中的溶解度都相同；并且在和非手性试剂作用时，它们的化学性质也相同。在有机化学中手性分子都具有旋光性，并且他们的旋光能力相等，只不过一个是右旋，而另一个是左旋。但在手性环境下，如生物体内分子间的相互识别与作用是通过空间构型来实现的，不同的对映体就可能表现出不同的性质<sup>[4]</sup>。

手性代表着生命过程中最本质的性质，多糖、氨基酸、多肽和蛋白质等都具有手性特性。生物系统中不同的手性化合物在新陈代谢过程中具有明显不同的生理活性，而且每一步反应都是在高度不对称的环境中进行的。手性药物是研究手性分离的最主要的动力，它在生物体内常常表现出不同的药理和药代特性，使用外消旋体药物（对映体等量存在的混合物）可能导致错误的药代行为和作用模式<sup>[5]</sup>。在外消旋体药物中，往往一种对映体有药效，而另外一种则具有毒副作用，或药效相反，或根本没有药效，如右旋甲状腺素钠可以用作降血脂药物，而左旋体则会对心脏造成严重的不良反应；抗菌药氧氟沙星的右旋体对人的肝肾功能会造成很大的损害；巴比妥酸盐 S-(-)-构型的对映体能够抑制神经活动，但 R-(+)-构型的对映体则具有兴奋作用；苯并吗啡烷的两个对映异构体都具有镇痛的作用，但 (-)-构型的异构体经常服用后会成瘾，而 (+)-构型的异构体服用后却不会有成瘾的副作用。因此，在 1992 年美国 FDA 做出了一个明确的规定，对于外消旋体药物必须分别给出左旋体和右旋体的药效及药动学的有关资料。

据统计显示，在 1800 多种的化学药物中，有 500 多种是天然的或合成的药物，而这 500 多种药物中有 98% 具有手性中心；其中合成药有 1300 多种，这其中的 500 多种药物为手性药物，并且这些手性药物中的大多数都是以外消旋体



的形式进行销售的<sup>[6-8]</sup>。1995年世界上单一手性药物的销售额为620亿美元,2000年达到1300亿美元,2005年的销售额则为1700亿美元。近年来,单一手性药物的销量仍在持续增长。现在,人们对药品高效低毒的特性的要求也越来越高,各国都非常重视对类似的上述手性药物的分离,生产单一对映体药物,避免手性药物或其代谢产物的毒副作用的危害。

## 1.2 手性分离方法

获得手性化合物的方法主要有以下三种:

### (1) 手性源合成法

由天然存在的手性化合物为原料制备其它手性化合物,其优点是:原料丰富,价廉易得,没有复杂的对映体拆分,所制成的手性化合物产品的纯度高。目前由于对手性药物的需求量不断增加,而天然存在的手性化合物的种类有限,无法满足人们对手性药物的需求。

### (2) 不对称合成法

通过化学反应可以在非手性分子中形成手性碳原子。不对称合成法在近二十年来得到很大的发展,并且已有大量的不对称合成的研究报告<sup>[9]</sup>,但这一方法还有一系列需要研究解决的问题,如产品的终产率较低、需要合适的手性催化剂、反应慢和产物分离提纯困难等,因此此方法较难应用于工业级制备手性化合物。

### (3) 外消旋体拆分法

外消旋体拆分方法主要分为两大类:一类是非色谱拆分法,包括晶体接种拆分法、机械拆分法、化学拆分法、生物拆分法以及膜拆分法等<sup>[10]</sup>;另一类为色谱拆分法,包括高效毛细管电泳、毛细管气相色谱、薄层色谱、高效液相色谱、高速逆流色谱、超临界流体色谱以及模拟移动床色谱等<sup>[11]</sup>。非色谱拆分方法经过多年的研究和发展已经较为成熟,但是这些方法在应用方面却有较大的局限性,不仅操作起来复杂耗时,而且在做微量分离分析与检测纯度方面也有诸多不足之处。色谱拆分法具有十分优秀的识别能力,不仅可以简便快捷的对物质进行定性和定量分析,而且可以规模性制备产品,以及能够对微量级物质进行测定,因而成为目前发展最快、应用最广的手性拆分方法。色谱拆分方法中的高效液相色谱法因为其柱容量较大,也不会因高温而使溶质构型发生变化

和失去生物活性，而成为实验室和工业规模对映体制备和分离的最有效方法之一<sup>[12]</sup>。

高效液相色谱手性拆分的主要方法可以分为两种：间接拆分和直接拆分。间接拆分主要是手性衍生化法，此方法是将两个手性对映体在预处理中进行柱前衍生化，使其成为一对非对映体，然后根据它们的理化性质的不同，用液相色谱法在普通色谱柱（非手性柱）上实现分离。此方法的优点是可以用普通的色谱柱进行分离、分离条件简单且分离效果好；另外，衍生化后检测的灵敏度也得到提高。缺点是有一定的特性条件限制，如手性化合物必须有能被衍生化的官能团，还要有高光学纯度的衍生化试剂以及各对映体衍生化的速率不同。直接拆分主要包含两种方法：手性流动相法和手性固定相法。手性流动相法是将手性添加剂加到流动相中，与溶质的对映体生成一对非对映体络合物，利用普通色谱柱进行拆分。该方法的优点是不需要对手性化合物进行柱前衍生化且对色谱柱填料没有特殊的要求；缺点是溶质的检测会受到所选择的添加剂的影响，另外，只能拆分有限的化合物。手性固定相法是把手性化合物制备成固定相，对手性对映体进行直接拆分。此方法不需要把手性对映体转变成非对映体，适用于各种手性化合物的拆分而且高效方便，是目前最通用的手性分离方法之一。它的缺点是需要依据被分离样品的性质选择合适的手性柱，尽管如此，手性固定相法在对手性化合物进行拆分方面仍具有很大的优势。

### 1.3 手性固定相的分类

近二十多年来，高效液相色谱手性固定相法直接对手性化合物进行拆分的技术发展迅速，此方法广泛应用于生命化学、有机中间体、医药和农药等许多现代领域中的手性分离分析和光学纯度检测分析，并成为目前非常重要的分析手段<sup>[13-16]</sup>。手性固定相是高效液相色谱的核心物质，它对手性拆分的结果起着至关重要的作用。目前研发出的可用于 HPLC 的手性固定相的种类已达上千种，200 多种 HPLC 手性固定相已经商品化<sup>[17-19]</sup>。根据对手性固定相的研究，国际上把手性固定相划分为多种类型，主要包含以下几类：①刷型手性固定相；②多糖类手性固定相；③蛋白质类手性固定相；④环糊精类手性固定相；⑤大环抗生素类手性固定相；⑥手性配体交换类手性固定相；⑦冠醚和杯芳烃类手性固定相；⑧分子印迹手性固定相等。

### 1.3.1 刷型手性固定相

刷型手性固定相 (brush-type CSP) 是 HPLC 手性固定相中非常重要的一类, 这类 CSP 一般通过一定的间隔臂, 连接一个单分子层的手性有机分子到硅胶载体上而制得。其化学结构的特点是手性中心附近最少包含有以下功能团之一:

- (1) 能够发生偶极-偶极相互作用的极性键或基团;
- (2) 能够形成氢键的基团或原子;
- (3)  $\pi$ -碱性或  $\pi$ -酸性的芳香基团, 在手性识别过程中能够发生  $\pi$ - $\pi$  作用;
- (4) 能提供范德华相互作用、立体排斥和 (或) 构型控制的较大的非极性基团。

刷型手性固定相与其它类型的手性固定相相比有很大优势<sup>[20]</sup>: (1) 经久耐用, 此类固定相是手性选择剂通过共价键固定在硅胶载体上, 所以不易流失、可承受过载的样品量、可使用强极性溶剂进行洗脱、柱子可完全再生以及可适用于超临界流体色谱等; (2) 高色谱性能, 基质上手性分子的键合密度大, 在较大的进样量情况下固定相的性能不随之改变; (3) 宽线性范围, 从分析到制备都能够使用; (4) 广泛的溶剂适宜性, 在正反相色谱条件下都可使用; (5) 已分离的对映体的流出顺序可以颠倒。

刷型手性固定相的手性识别机理: 必须满足同时有三个相互作用点, 并且其中至少一个是由立体化学决定的, 这个原理是由 Dalglish<sup>[21]</sup>提出的, 可用图 1.1 加以说明。

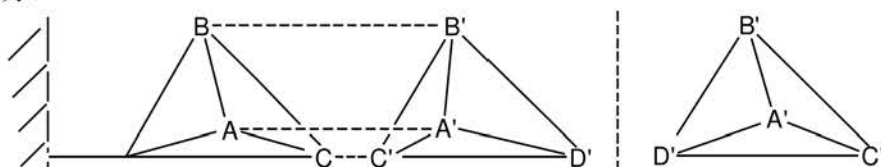


图 1.1 三点作用原理

手性识别材料中含有的 A、B、C 三个作用点, 能够与溶质相对应的 A'、B'、C' 三个点发生相互作用, 虽然溶质中的对映体必有两个点能与手性识别材料发生相互作用, 但是只有一种对映体能够同时发生三点相互作用, 而另一个则不能。只有通过手性识别材料与对映体的三维空间分子发生的“三点作用”, 才能产生立体的选择性。能同时与手性识别材料发生三点相互作用的对映体, 如果第三点发生的是相互吸引的作用则被保留的时间较长; 若第三点发生的是相互排斥的作用则被保留的时间较短。“三点作用”的作用力可以是偶极-偶极相互作用、氢键、范德华力、包合作用以及立体阻碍作用等。

在刷型手性固定相的研究和发展过程中, Pirkle 研究团队的贡献是重要

和杰出的。他们所制备的刷型手性固定相主要有三代。Pirkle 等人通过核磁共振研究了单个对映异构体与各种外消旋体形成的络合作用，并对此产生的化学位移的不等价性进行了进一步的分析，认为所形成的络合物中含有可以提高其稳定性等手性相互作用的  $\pi$ - $\pi$  重叠，根据这一理论制备出了第一个  $\pi$ -碱性的 (R)-2,2,2-三氟-1-(9-蒎基)乙醇<sup>[22]</sup>刷型手性固定相(如图 1.2 所示)，称之为第一代刷型手性固定相；并成功拆分了大量的  $\pi$ -酸性外消旋体化合物，其中大部分是含有 3,5-二硝基苯基 (3,5-DNB)的衍生物<sup>[23]</sup>。后来，Pirkle 提出了设计刷型手性固定相的互为反作用原则，它对刷型手性固定相的研究和发展具有非常重要的指导意义，互为反作用原则：如果一个固定的化合物 A 的对映体之一能在另一个化合物 B 的对映体之间进行手性拆分的话，那么反之亦然<sup>[24]</sup>。基于互为反作用原则，Pirkle 研究团队先后合成了亮氨酸、缬氨酸、R-苯基甘氨酸的 DNB 衍生物，并制备成手性固定相，构成了第二代刷型手性固定相。第二代刷型手性固定相基本上全是氨基酸的衍生物，它们能拆分很多带有烷基、醚基或氨基取代的给电子芳香环的对映体。第二代刷型手性固定相在手性化合物的拆分方面取得了令人瞩目的成就，尤其是图 1.3 所示的几类对映体在第二代刷型手性固定相上非常容易被拆分开<sup>[6]</sup>。后来，在对比第二代刷型手性固定相对不同种类的手性对映体的识别能力时发现，第二代刷型手性固定相对含有 N-芳基- $\alpha$ -氨基酸酯与 2-羧基-2-烷基吡啶结构的物质有很好的拆分效果<sup>[25]</sup>，然后基于互为反作用原则，合成了如图 1.4 所示的手性固定相<sup>[26]</sup>，称为第三代刷型手性固定相。第三代刷型手性固定相对  $\pi$ -酸性的手性化合物有很好的拆分效果。研究人员对其做了进一步的研究，发现了许多规律，如固定相的手性识别能力随芳基碱性的增强和手性中心附近烷基的体积增大而提升，但随着与载体连接的碳链的变长和酰基基团的增大却会使手性识别能力降低<sup>[27-28]</sup>。

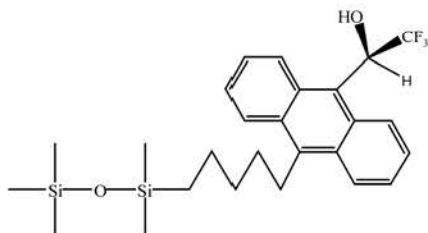


图 1.2 (R)-2,2,2-三氟-1-(9-蒎基)乙醇刷型手性固定相

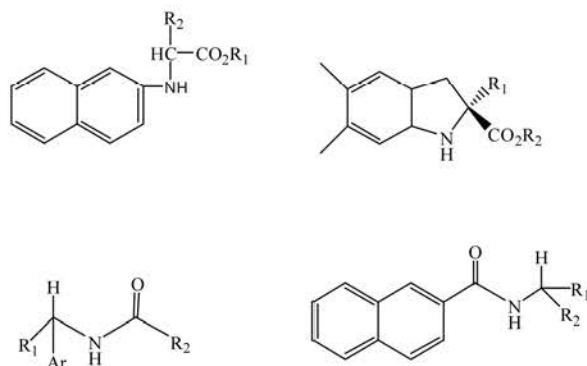


图 1.3 易被 Pirkle 型第二代手性固定相拆分的对映体

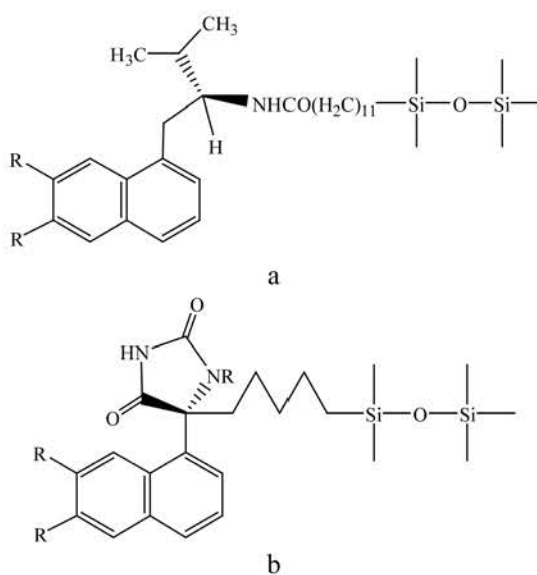


图 1.4 第三代刷型手性固定相的两个典型代表 (a: N-酰化-1-芳基氨基烷型 CSP, R=H, CH<sub>3</sub>; b: 5-芳基己内酰脲型 CSP, R=H, CH<sub>3</sub>)

Pirkle 在对刷型手性固定相的研究过程中，还提出了“直接目标设计”的思想，即依据刷型手性固定相的拆分机理，针对某一类待拆分的外消旋化合物的结构特征，合成出最有效的固定相用于拆分此类手性化合物，如 Pirkle 等针对非甾体类解热镇痛药合成出了 Whelk-01 手性固定相。起初合成此固定相时，是先把萘普生键合到硅胶上，并用它拆分了一系列手性化合物，然后再在拆分效果最好的对映体的结构上稍做改变，进而制备出了 Whelk-01 手性固定相，其结构如图 1.5 所示。萘普生及与之有类似结构的多种非甾体类解热镇痛药在这种固定相上都能够很好的被拆分。此后进一步的研究表明，该种固定相的拆分效果具有广泛性，并成为了一种使用非常广泛的手性固定相，尤其适合手性碳原子链含

有羧基的手性化合物<sup>[29-32]</sup>。

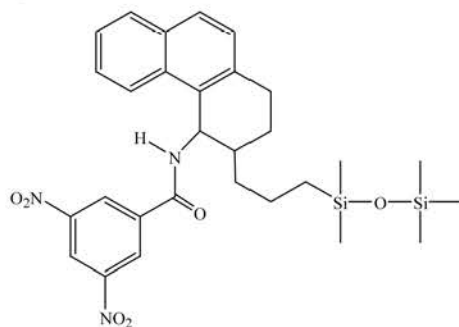


图 1.5 Whelk-01 手性固定相

除了 Pirkle 研究团队开发的经典刷型 CSP 外，其它研究团队也开发出一些刷型 CSP，如 Gasparini<sup>[33]</sup>等人合成的基于 1,2-反-环己二胺的 CSP；Oi<sup>[34-35]</sup>等人将  $\alpha$ -萘乙基与氨基酸通过脲键相连合成的 CSP；Hoffmann<sup>[36-37]</sup>等人把奎宁及结构类似物固载到载体上制备出刷型 CSP；Tambute<sup>[38]</sup>等人通过三种不同的方式把光学纯 1-(4-甲氧基萘)甲基苯基氧化磷键合到硅胶上得到含手性磷原子的 CSP。

此外，很多研究者还合成出了大量有效的刷型手性固定相，如只靠氢键作用的 CSP，含有多个手性中心的 CSP 等等<sup>[39]</sup>，这些固定相对刷型 CSP 的进一步研究和发展提供了非常有价值的参考。

### 1.3.2 多糖类手性固定相

多糖类手性固定相中最主要的手性识别剂是纤维素和直链淀粉及其衍生物。纤维素和淀粉都具有光学活性，它们都是天然的手性识别材料，虽然能分离某些手性化合物，但其分离性能较差，不能得到理想的拆分效果。经过化学改性后它们的手性拆分能力便得到了非常大的提高；另外，其廉价易得；因而吸引着众多研究者致力于研究这类手性固定相。

1973 年, Hesse 和 Haget<sup>[40]</sup>首先在多相反应条件下制备出了微晶纤维素三乙酸酯, 然后直接用作手性固定相, 并成功拆分了 Tröger 碱。后来, Okamoto 把微晶纤维素三乙酸酯利用物理方法涂敷到硅胶上, 由此制成的手性固定相得到了很好的手性拆分效果。多糖类衍生物的合成主要是通过酯化或醚化的方法来完全取代葡萄糖结构单元上的羟基, 根据所引入的官能团的不同, 其衍生物主要分为苯甲酸酯和苯基氨基甲酸酯等两大类<sup>[41]</sup>。

多糖类手性固定相的制备方法主要有以下三种:



(1) 整体成球法: 此法不需要硅胶作载体, 而是直接把纤维素衍生物做成凝胶颗粒当作固定相使用。Francotte<sup>[42]</sup>等开发出了纤维素三苯基甲酸酯类微球型固定相, 日本 Daicel 公司基于 Francotte 的研究进一步制备出了纤维素和直链淀粉的三苯基氨基甲酸酯类衍生物微球型固定相。此类固定相的制作方法简单, 制备成本低, 固定相的柱载量高, 但是它的使用寿命短, 分析速度较慢。

(2) 涂敷法: 将多糖衍生物溶于有机溶剂中, 然后把溶剂蒸发完或通过溶剂沉淀法把多糖衍生物涂敷在载体上。此法由 Okamoto<sup>[43]</sup>等提出并发展起来, 此类固定相以硅胶为载体而使得其机械强度和柱效都得到很大地改善。涂敷法在很大程度上促进了多糖类衍生物手性固定相的发展, 但多糖类衍生物涂敷型手性固定相由于衍生物自身的溶解性, 而使流动相溶剂体系在使用上有一定的限制, 如流动相为四氢呋喃、三氯甲烷等溶剂时, 纤维素衍生物往往会被溶解或溶胀。

(3) 化学键合法: 多糖衍生物通过间隔臂键合在载体上或使衍生物发生交联而固载在载体上。由此法制成的手性固定相解决了流动相受限制的问题, 避免了手性识别剂的流失, 并在一定程度上扩大了流动相的使用范围。虽然键合型固定相具有明显的优点, 但其手性识别能力却常常略低于涂敷型固定相, 这可能是将多糖衍生物分子键合在载体表面时引入的间隔臂影响到了衍生物原有的空间结构<sup>[44]</sup>。

在高效液相色谱手性分离柱中, 多糖类手性固定相无疑是目前使用最为广泛的, 约 90% 的手性化合物能够在此类手性分离柱中被识别出来<sup>[45]</sup>。迄今为止合成出的多糖类手性固定相非常多, 表 1.1 列出了一部分已经商品化的多糖类手性固定相。

表 1.1 液相色谱中商品化的多糖类手性固定相

名称	商品名
纤维素三乙酸酯	Chiralcel OA
纤维素三肉桂酸酯	Chiralcel OK
纤维素三苯甲酸酯	Chiralcel OB
纤维素三(4-甲基苯甲酸酯)	Chiralcel OJ
纤维素三(4-甲基苯基氨基甲酸酯)	Chiralcel OG
纤维素三(苯基氨基甲酸酯)	Chiralcel OC
纤维素三(4-氯苯基氨基甲酸酯)	Chiralcel OF
纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)	Chiralcel OD

### 1.3.3 蛋白质类手性固定相

蛋白质是一类复杂的高分子化合物，它含有具有手性特异性的亚单位 L-氨基酸，能特异性地结合小分子，因此对手性分子具有很强的识别能力。在蛋白质的研究过程中，研究人员发现了许多重要的应用，如固定化的蛋白质可以用在固相酶催化、亲和色谱及免疫分析等方面；随着高效液相色谱手性分离技术的发展，固定化的蛋白质也被用作高效液相色谱手性固定相用来拆分手性化合物。目前，蛋白质手性固定相在对映体的分析方面有较多的应用，但能用作高效液相色谱手性识别材料的蛋白质的种类数目有限。由于蛋白质对对映体的高选择性和在手性化合物识别中宽的应用范围，致使许多研究人员进一步研究和发展此类手性固定相。到现在已制备出牛血清白蛋白 (BSA)、源自鸡蛋蛋白的卵类黏蛋白 (OMCHI)、 $\alpha_1$ -酸糖蛋白 (AGP)、纤维素水解酶 I (CBH I)、抗生物素蛋白 (AVI) 等手性固定相，且已经商品化。

蛋白质手性固定相通常在反相色谱条件下使用，溶质分子不需要衍生化，尤其适用于生化样品。此类固定相的立体选择性和稳定性好，而且柱效高。但它的选择性受流动相的影响颇大，影响因素包括温度、缓冲液的组成、pH 等；由于蛋白质分子的体积比较大，因此其固载量比较低，进而致使其柱容量较低，适用于分析而不适宜于制备性分离<sup>[46-47]</sup>；另外，制备成本太高。上述原因限制了这类手性固定相的广泛应用。

### 1.3.4 环糊精类手性固定相

环糊精 (Cyclodextrin, CD) 是一类由不同数目的吡喃葡萄糖单元以 1,4-糖苷键相连并互为椅式构象的环状寡糖化合物，所含葡萄糖单元的数目通常为 6-12 个，然而具有现实意义的是含有 6、7、8 个葡萄糖单元的分子，即为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -环糊精。环糊精分子的结构呈笼状，由于存在向内的  $\alpha$ -1,4-糖苷键而使得腔内的电子云密度较高，使其具有疏水性，而腔外羟基的存在使其具有亲水性<sup>[48]</sup>，这样就促使客体分子全部或部分进入环糊精的空腔内，进而发生包合作用，产生手性识别能力。由于每个葡萄糖单元含有 5 个手性中心，于是环糊精上众多的手性中心为手性拆分创造了良好的不对称环境，因而主体化合物具有良好的立体选择性，从而增强了手性识别能力。环糊精衍生物手性固定相是在环糊精表面的羟基上引入不同的基团，使手性相互作用增强，提高其手性识别能力，进而使其应用更为广泛。1965 年 Solms<sup>[49]</sup> 等人第一次合成出了环糊精聚合物，

作为 HPLC 手性固定相，结果含硝基苯酚和氯代苯甲酸结构的对映体、芳香酸、核酸、香料等手性化合物都能很好的在此手性固定相上被拆分，但此固定相的机械强度差而且柱效不高。1983 年 Fujimura 团队第一次以酰胺键把环糊精固载到硅胶载体上，这种手性固定相解决了机械强度差和柱效低的缺点。然而，此手性固定相稳定性差，易水解<sup>[50]</sup>。在此研究基础之上，Armstrong<sup>[51]</sup>通过醚键形式合成出固定相，解决了上述固定相的缺点，进一步提高了其手性识别能力，这一方法至今仍被采用。目前，CD 类手性固定相已有多种被制备成商品柱，成功地应用于手性化合物的分离<sup>[52]</sup>。

### 1.3.5 大环抗生素类手性固定相

1994 年 Armstrong<sup>[53]</sup>等人首次使用大环抗生素制备手性识别材料，并分别在正相和反相色谱条件下成功拆分了一系列对映体，自此在手性分离这一领域开辟了一个新的研究热点。以大环抗生素为原料制作而成的手性识别材料具有以下特点：(1) 其相对分子质量一般在 600-2200 之间，含有众多的立体活性中心和官能团，能与手性分子之间产生多重作用；(2) 其结构中不仅含有疏水基团，还含有亲水基团和大量的可离解化基团，这些基团的存在使它们在水中具有良好的选择性。大环抗生素能够应用于毛细管电泳、高效液相色谱和薄层色谱等，并成功地拆分了多种手性化合物，此类固定相具有独特的优势，是一类很值得深入研究的手性固定相。抗生素类手性识别材料的优点如下：(1) 柱容量高，既可用于分析，也可用于制备；(2) 其结构可精确测定，可以对其手性识别机理进行深入研究；(3) 在正相、反相和极性有机相色谱条件下都可使用，适用于各类物质的手性分离。

大环抗生素类手性固定相的手性选择剂主要有利福霉素、糖肽、多肽和氨基糖苷，其中糖肽类应用最多且最为广泛。已经商品化的糖肽类 HPLC 手性分离柱有 Chirobiotic T(替考拉宁)、Chirobiotic R(瑞斯西丁素 A)、Chirobiotic V(万古霉素)、Chirobiotic A(阿伏帕星)。大环类抗生素手性固定相自合成以来，已成功拆分了醇、氨基酸及其衍生物、肽及多种药物<sup>[54]</sup>。

### 1.3.6 手性配体交换类手性固定相

手性配体交换技术已有四十多年的发展史，并且是第一个把光学异构体进行完全分离的高效液相色谱法。配体交换色谱 (LEC) 手性固定相是利用手性配

体、中心金属离子与被分离溶质形成的多元配合物的热力学稳定性的差异和动力学的可逆性来分离对应异构体的<sup>[55]</sup>。

配体交换色谱手性固定相分为两种：涂敷型和键合型。涂敷型固定相最早是由 Davankov<sup>[56]</sup>等研制而成的，他们把 N-n-烷基-L-羟基脯氨酸涂敷到反相色谱柱上，并分离了 7 种氨基酸对映体，得到了较好的拆分效果。此后，许多研究者相继制备出此类手性固定相。此类手性固定相有以下缺点<sup>[57]</sup>：（1）受检测条件的限制，不适用于未被衍生化的氨基酸；（2）受有机溶剂的影响较大；（3）使用寿命短。键合型固定相根据载体的不同分为以聚合物为载体手性配体交换色谱键合固定相和以硅胶为载体手性配体交换色谱键合固定相。1968 年，Davankov 等把 L-脯氨酸键合到苯乙烯-二乙烯苯树脂上，并把铜离子加入流动相中以形成铜离子配合物，最终成功拆分了氨基酸对映体。以聚合物为载体制备的固定相的柱容量大、稳定性好、适用于制备分离，然而，缺点是机械强度差；1981 年，Gübitz<sup>[58]</sup>等把氨基酸手性配体键合到硅胶载体上从而解决了前者机械强度差的问题。在上述研究基础之上，研究人员制备出了许多手性配体交换色谱手性固定相，已经商品化的手性固定相如表 1.2 所示。

表 1.2 液相色谱中已商品化的配体交换类手性固定相

手性选择剂	商品名称
缬氨酸-Cu <sup>2+</sup>	Chiral ValCu
氨基酸-Cu <sup>2+</sup>	Chirapak WM
羟脯氨酸-Cu <sup>2+</sup>	Chiral HyproCu
	Nucleosil chiral-I
脯氨酸-Cu <sup>2+</sup>	Chiral ProCu
	Chirapak WH

在手性识别技术中手性配体交换技术是最早具有实际应用意义的识别技术，但由于后来刷型、多糖类、蛋白质类和环糊精类等等手性固定相的出现和发展，而使得进一步研究和发​​展此类固定相的现实意义减少。但是在此基础之上发展而来的基本观点对于探讨手性分离领域的拆分机理具有非常积极的意义。

### 1.3.7 冠醚和杯芳烃类手性固定相

冠醚是一类具有空腔的大环聚醚化合物，此类物质结构为王冠状，环的外沿是亲脂性乙撑基，内沿是富电子的杂原子，如 O、S、N 等。手性冠醚根据插入到冠醚中的不同的手性单元可分为三类：(1) 插入糖分子的手性冠醚；(2) 插入联萘单体的手性冠醚；(3) 以酒石酸为基体的手性冠醚。这三类手性冠醚只有后两种被成功地应用到手性拆分中。含有联萘单体的手性冠醚是由 Gram 提出的，他把二-(1,1'-联萘)-22-冠-6 固载到硅胶载体或聚苯乙烯载体上制成手性固定相。此固定相能有效拆分外消旋  $\alpha$ -氨基酸对映体及其衍生物<sup>[59-60]</sup>，但其拆分能力还有待提高。Lehn 研究小组合成了 (+)-(18-冠-6)-2,3,11,12-四羧酸，它是首个含酒石酸单元的手性冠醚<sup>[61]</sup>，此材料在毛细管电泳中应用较早，直到 1998 年 Machida<sup>[62-63]</sup>等人才首次将此化合物用作液相色谱固定相的手性选择剂。目前，此类手性固定相主要是用来拆分伯胺、氨基酸及其衍生物，但是由于冠醚类物质有剧毒，因而在使用范围上受到了一定的限制<sup>[64]</sup>。

在碱性条件下甲醛与对位取代的苯酚反应可以合成出杯芳烃化合物。杯芳烃分子的结构独特，是一类环状缩合物，具有类似冠醚和环糊精的洞穴结构，杯芳烃的洞穴内部区域有高度集中的苯环电子云，杯的上缘是强极性的羟基，杯的下缘是亲脂性的烃基。杯芳烃的结构还具有以下特点<sup>[65]</sup>：(1) 易于衍生化；(2) 杯芳烃的空腔大小可以调节；(3) 能够和中性有机分子、离子型化合物等通过超分子作用形成主客体配合物；(4) 热稳定性好、熔点高以及非挥发性。此类主体化合物具有良好的识别能力，它在液相色谱中的应用较晚，直到 1993 年才有相关报道<sup>[66]</sup>。它在液相色谱中的应用主要是作为流动相添加剂或制成键合型固定相和涂敷型固定相。

### 1.3.8 分子印迹手性固定相

大多数手性识别材料在分离能力和洗脱顺序上的预见性有限，而分子印迹聚合物作为新一代的手性识别材料在这方面有了很大进步。分子印迹技术是通过待分离的分子与功能单体之间所产生的特定的相互作用而形成复合物；然后加入引发剂、交联剂，并在一定条件下使它们发生聚合反应，得到固体的分子印迹聚合物；最后用化学或物理的方法移除包埋在聚合物里的分子，最终获得对印迹分子的空间结构和多个作用点有记忆功能的分子印迹聚合物<sup>[6]</sup>。这类手性固定相的机械稳定性和化学稳定性都较好，而且对被分离分子的识别有专一性，但它的不足之处是柱效低、柱容量较小<sup>[67-68]</sup>。

## 1.4 本文的研究内容及意义

随着人们对高效低毒的手性药物需求量的增长，对手性药物对映体的分离已迫在眉睫。高效液相色谱法所具有的简便、高效、快速和准确等优点，使其在手性药物的研究与开发过程中发挥着非常重要的作用。色谱柱是 HPLC 手性分离的核心部件，于是研究和发展新型实用的手性固定相是手性分离的重中之重，这促使了研究人员研究和开发出更具广泛性或针对性强的高效液相色谱手性固定相。

本文所制备的手性固定相所用载体是硅胶，但硅胶表面含有大量的硅羟基，它们对手性拆分不利，必须对其进行修饰。硅胶表面改性剂有很多，据文献报道已制备成的刷型手性固定相多采用  $\gamma$ -氨丙基三乙氧基硅烷 (KH-550) 作为修饰硅胶表面的偶联剂<sup>[69]</sup>，此改性剂末端具有活泼氨基，因而比较容易进行反应。本实验除选用 KH-550 作为偶联剂外还选用了  $\beta$ -(3,4-环氧环己烷)乙基三甲氧基硅烷 (KH-566) 偶联剂。KH-566 与 KH-550 相比含有类似苯环结构的环己烷，且末端含有环氧基团，易发生开环反应，此物质的这些特性可能对手性拆分过程产生一定的影响。

在前人的研究基础上，本文以两种常用药物为手性选择剂，制备出了一类新刷型手性固定相：

(1) 以硅胶为载体，KH-566 为间隔臂，辛伐他汀为手性选择剂，合成出了一种新的含多个手性中心的刷型手性固定相 (CSP-A)，并对其拆分能力进行了考察。

(2) 以硅胶为载体，KH-550 为间隔臂，缬沙坦为手性选择剂，合成出了一种新的刷型手性固定相 (CSP-B)，并对其拆分能力进行了考察。



## 2 CSP-A 的制备及其应用

### 2.1 主要试剂与仪器

表 2.1 实验试剂

名称	级别	生产厂家
硅胶(5 um, 110 Å, 300 m <sup>2</sup> /g)	色谱级	郑州英诺生物有限公司
β-(3,4-环氧环己烷)乙基三甲氧基硅烷	纯度 99%	阿达玛斯试剂
γ-氨丙基三乙氧基硅烷	纯度 99%	阿拉丁试剂
辛伐他汀	纯度 99%	河南辅仁药业
缬沙坦	纯度 99%	河南辅仁药业
氯化钙	分析纯	阿拉丁试剂
吡啶	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
四氢呋喃	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
甲苯	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
丙酮	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
甲醇	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
1-乙基-(3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺 盐酸盐	纯度 98%	阿拉丁试剂
N,N-二异丙基乙胺	纯度 99%	阿拉丁试剂
1-羟基苯并三唑	纯度 98%	阿拉丁试剂
三氟化硼乙醚络合物	纯度 BF <sub>3</sub> 46.5%	阿拉丁试剂
正己烷	色谱级	Merck 试剂
异丙醇	色谱级	Merck 试剂
甲醇	色谱级	Merck 试剂
乙醇	色谱级	Merck 试剂
1,2-二氯乙烷	色谱级	Merck 试剂
四氢呋喃	色谱级	Merck 试剂

实验中所用水均为去离子水。

表 2.2 实验仪器

设备	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津公司
元素分析仪	JSB-2A	南京第四分析仪器有限公司
热重分析仪	TG-500	美国 Waters 公司
傅立叶变换红外光谱仪	FT-IR370	美国 Thermo 公司
循环水式真空泵	SHZ-D	巩义市英峪予华仪器厂
真空干燥箱	DEF-6020	上海精宏实验设备有限公司

## 2.2 CSP-A 的合成

本实验以硅胶为载体， $\beta$ -(3,4-环氧环己烷)乙基三甲氧基硅烷(KH-566)为间隔臂，辛伐他汀为手性选择剂，合成出了一种新的含有多个手性中心的刷型手性固定相。其中 KH-566 末端含有环氧基团，易于进行开环反应，而辛伐他汀含有多个手性中心且结构较好。辛伐他汀的手性中心附近含有疏水基团、萘环（能形成  $\pi$ - $\pi$  作用）、能形成氢键和偶极-偶极作用的基团等官能团；另外，辛伐他汀分子也会产生位阻作用。两种对映体分子中的一种构型能与固定相分子中的位阻基团形成位阻作用，位阻作用会对手性识别过程中分子间的作用力的形成造成阻碍，使其在手性固定相上形成的有效吸附作用减弱，从而在手性拆分过程中被优先洗脱出来；另外一种构型的分子由于其自身的空间构型适宜，进而位阻效应不明显，使手性识别过程中所需的分子间作用力易于形成，从而有利于“三点相互作用”的形成。因此，辛伐他汀可以作为手性选择剂来拆分一些手性化合物。此外，利用热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对合成的手性固定相进行了表征与分析。然后用匀浆法将合成的固定相装柱，通过对五种对映异构体的分离实验考察了此手性固定相的拆分能力，五种对映体分别是：安息香、三种钙离子拮抗剂（氨氯地平、尼群地平和非洛地平）和 9-苯基苯二烯-9-醇。

### 2.2.1 硅胶的活化

硅胶的表面不仅被硅羟基覆盖，而且含有许多金属离子。硅羟基和所含的金属离子会产生不利于拆分的吸附，进而在 HPLC 分离的过程中产生负效应。另外，未经活化的硅胶含有大量的 Si-O-Si 键，为使硅胶易于改性就必须提高硅胶表面的硅羟基量，使 Si-O-Si 键断裂形成游离的 Si-OH 基<sup>[69]</sup>。活化的目的就是要除去其表面的金属离子、活化表面的硅羟基，以利于对其表面进行化学改性。把待活化的硅胶加入到浓度为 1 mol/L 的盐酸中，用电动搅拌搅拌数小时，抽虑，再用去离子水洗涤。由于所用硅胶存在颗粒大小不一的情况，用去离子水洗涤后自然放置一段时间，待绝大部分都沉淀在底部后倒掉漂浮在上面的以除去小颗粒，抽虑过程中我们再倒掉沉在底部的较大的颗粒，促使所使用的硅胶颗粒大小一致。这样所装填的色谱柱在拆分过程中便不易产生沟流现象，进而可以提高柱效。用去离子水洗涤至中性，然后放在 110℃ 的干燥箱中干燥数小时，最后在 60℃ 的真空干燥箱中过夜，最后得到活化硅胶。

### 2.2.2 合成工艺路线

以辛伐他汀为手性选择剂，KH-566 为间隔臂，硅胶为载体，合成 CSP-A 的工艺路线如图 2.1 所示。

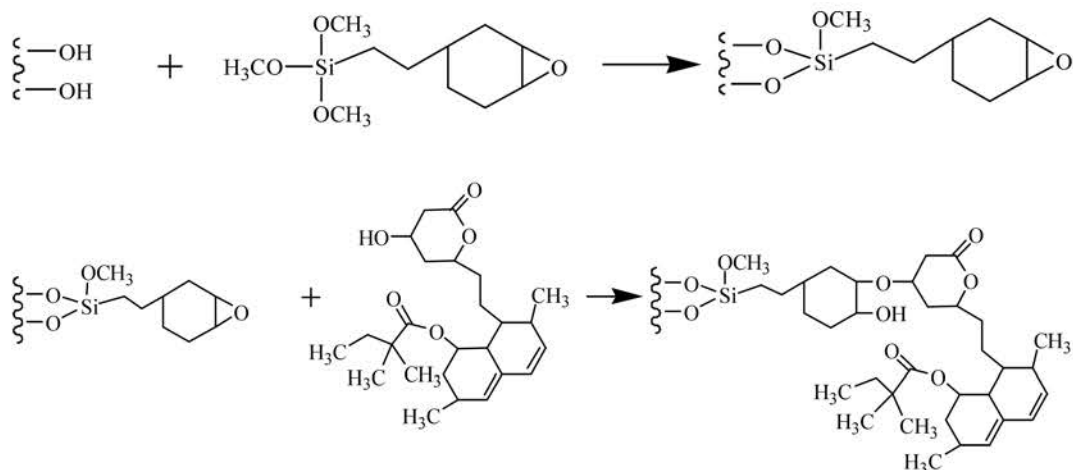


图 2.1 CSP-A 的合成工艺路线

### 2.2.3 合成工艺操作

#### (1) 硅胶改性反应

将 5 g 干燥过的活化硅胶和 100 ml 无水甲苯加入三口烧瓶中，用电动搅拌进行搅拌(搅拌速度不能太高，否则硅胶会被打碎)，待搅拌均匀后加入 7.5 ml 的 KH-566 和 0.5 ml 的催化剂吡啶，在 100℃ 下反应 5 h。产物冷却到室温后，用砂芯漏斗抽滤，然后依次用甲苯、甲醇、水和丙酮洗涤，放置于 60℃ 的真空干燥箱中过夜，得到改性硅胶。反应在氮气保护条件下进行。

我们对此步的合成条件进行了优化：①在相同温度和反应时间下，考察了不同反应物配比对所得产物含碳量的影响。图 2.2 为不同反应物配比对反应产物含碳量的元素分析图。由图 2.2 可知，硅胶与 KH-566 的加入量的比值为 1:1.5 时 KH-566 的键合量最高。

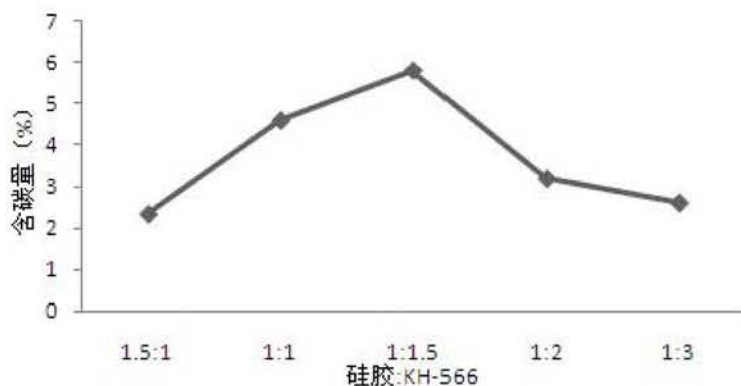


图 2.2 不同反应物配比对反应产物含碳量的影响

②在偶联剂的加入量和温度相同的情况下，考察了不同反应时间下 KH-566 键合量的不同。图 2.3 为反应时间与反应产物含碳量的元素分析图。由图 2.3 可知，反应时间为 5 h 时 KH-566 的键合量最高，即反应时间为 5 h 是该反应的最佳时间。

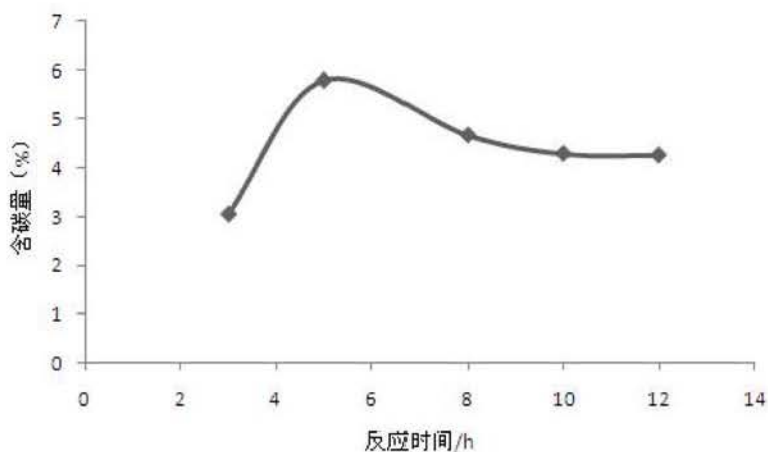


图 2.3 反应时间对反应产物含碳量的影响

## (2) 改性硅胶与辛伐他汀反应

将第一步反应得到的改性硅胶和 100 ml 无水甲苯加入到三口烧瓶中，待搅拌均匀后加入 2.5 g 辛伐他汀和适量的催化剂三氟化硼乙醚络合物，在 85℃ 下反应 8 h。产物冷却到室温后，用砂芯漏斗抽滤，然后用甲苯、甲醇、丙酮洗涤，放置于 60℃ 的真空干燥箱中过夜，得到目的产物 CSP-A。反应在氮气保护条件下进行。

本文还用了相反的反应过程合成了此手性固定相，称为反向反应；上述两步反应过程本文称为正向反应。反向合成过程如下：将 6 ml KH-566 和 10 g 的辛伐他汀加入三口烧瓶中，然后再加入 100 ml 无水甲苯和适量的催化剂三氟化硼乙醚络合物，在 85℃ 下反应 8 h。反应结束后减压蒸馏除去反应溶剂，然后将 5 g 干燥好的活化硅胶加入其中，再加入 0.5 ml 的催化剂吡啶，在 100℃ 下反应 5 h。产物冷却到室温后，用砂芯漏斗抽滤，然后依次用甲苯、甲醇、水和丙酮洗涤，最后放置于 60℃ 的真空干燥箱中过夜，得到终产物 CSP-A。反应在氮气保护条件下进行。

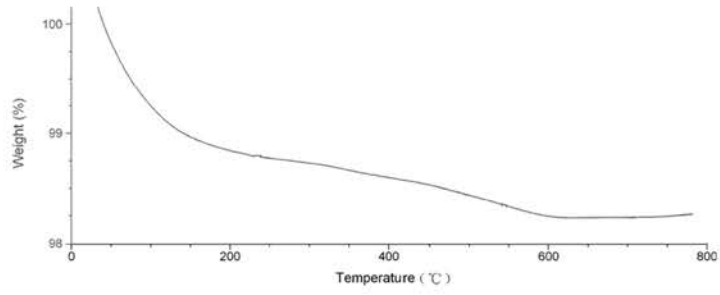
由于偶联剂 KH-566 和三氟化硼乙醚络合物易水解，且水解速率比反应速率快。因此所有反应均是在无水条件下进行的，所用的试剂甲苯和吡啶都经过回流除水才能使用；另外，反应容器也需经过充分干燥才能使用。

## 2.3 CSP-A 的表征与分析

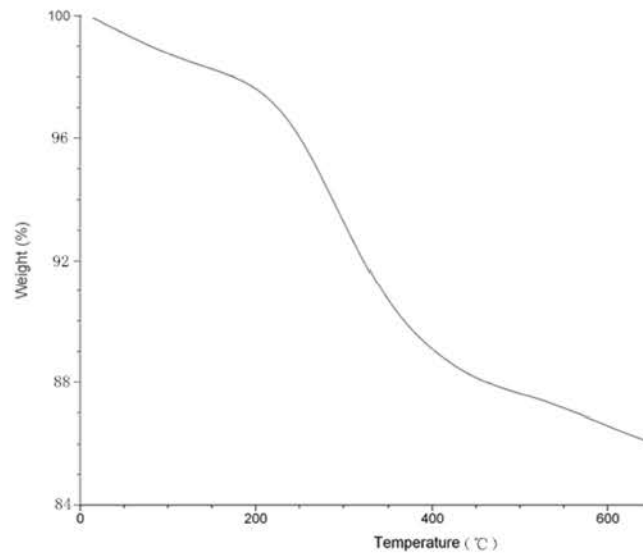
### 2.3.1 热重分析

空白硅胶和反应产物的热重结果，如图 2.4 所示。

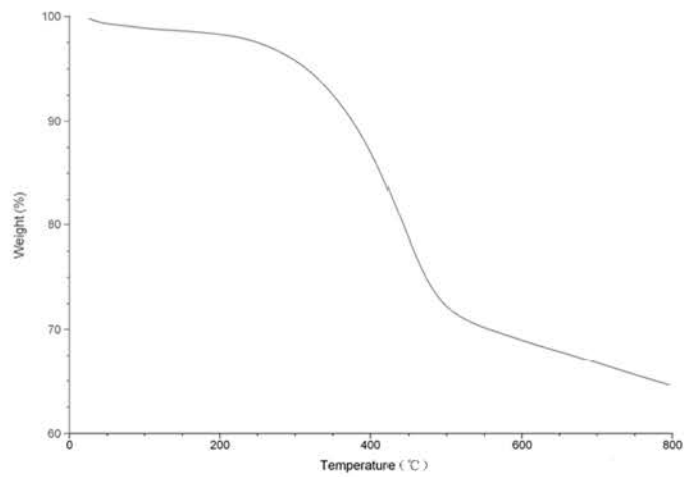
由图 2.4 中 a 图可知空白硅胶的热失重是 1.18%，b 图可知改性硅胶的热失重 12.05%，因而可以确定键合上的 KH-566 的热失重为 10.87%，说明 KH-566 成功地键合到硅胶上。通过 c 图可得 CSP-A 的热失重为 22.20%，说明辛伐他汀也成功地键合上了。



a



b



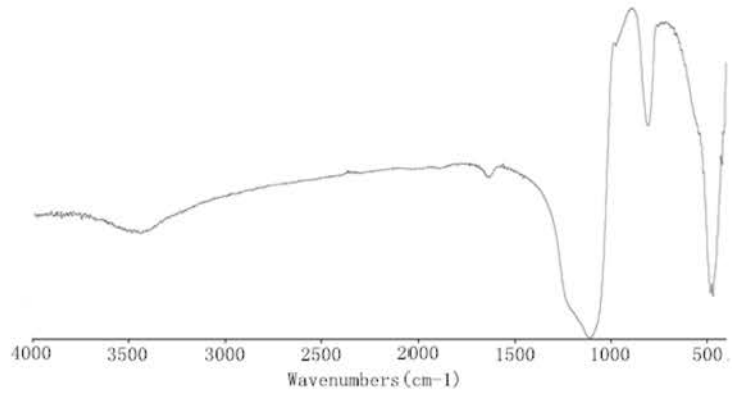
c

图 2.4 热重图 (a: 空白硅胶; b: 改性硅胶; c: 目的产物 CSP-A)

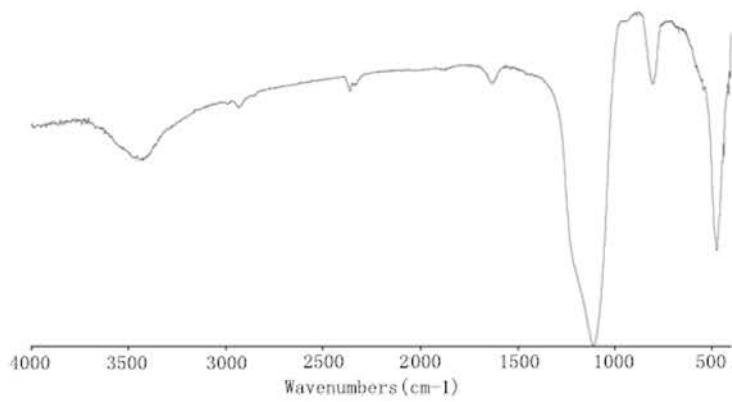


### 2.3.2 红外分析

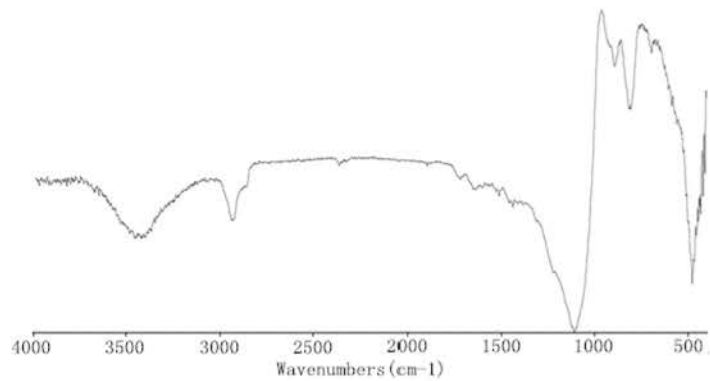
空白硅胶和反应产物的红外光谱图，如图 2.5 所示。



a



b



c

图 2.5 红外光谱图 (a:空白硅胶; b:键合 KH-566; c:键合辛伐他汀)

Si-O 键的伸缩振动峰为  $1100\text{ cm}^{-1}$ , 而环醚的 C-O-C 的伸缩振动峰为  $1150\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ , 由图 a 和图 b 可以看出 Si-O 键的伸缩振动峰掩盖了环醚的 C-O-C 的伸缩振动峰; 图 b 中  $2935\text{ cm}^{-1}$  附近为  $\text{-CH}_2\text{-}$  伸缩振动峰; 由图 a 和图 b 证明 KH-566 成功键合上去了; 图 c 中  $2940\text{ cm}^{-1}$  附近为  $\text{-CH}_3$  伸缩振动峰,  $690\text{ cm}^{-1}$  和  $900\text{ cm}^{-1}$  是芳环的面外弯曲振动; 证明辛伐他汀成功键合上去了。

### 2.3.3 元素分析

用元素分析仪对反应产物做了进一步的表征, 结果见表 2.3。

表 2.3 元素分析结果

反应	C%	H%
正向第一步反应	5.79	0.93
正向第二步反应	15.92	2.41
反向终产物	27.54	3.69

由元素分析结果可知, KH-566 和辛伐他汀都成功键合上去了。

硅胶表面的硅羟基浓度理论上约为  $8.3\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , 但是因为存在空间位阻, 其表面的硅羟基最多有 50% 能参加反应, 即能被反应掉的硅羟基的最大浓度为  $4.15\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。以下的计算过程均参考王冲<sup>[70]</sup>的计算方法。若键合反应按照单分子层计算, 则正向第一步反应产物的理论含碳量 C% 可以按下面的公式计算:

$$C\% = \{ [4.15 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{m}^2 \times A_s (\text{m}^2/\text{g}) \times (2/3) \times N_c \times M_c (\text{g}/\text{mol}) ] / 1 (\text{g}) \} \times 100$$

其中: C%: 单分子层键合后键合相的含碳百分数;

$A_s$ : 所用硅胶的比表面积,  $A_s = 300\text{ m}^2/\text{g}$ ;

$M_c$ : 碳原子的相对原子质量;

$N_c$ : 键合配体的碳原子数;  $N_c = 8$ ;

因而, 计算得单分子层键合所含碳的理论百分数为 7.97%, 而实验所测得的含碳量为 5.79%。结果表明 KH-566 的键合量还有待提高。

通过含碳量可以计算出表面所键合的官能团的浓度, 此参数是硅胶表面反应掉的硅羟基的浓度, 计算公式为:

$$\alpha_p = C\% \times 1 \text{ g} / (M_c \times N_c \times A_s)$$

由上面的数据可得正向第一步反应键合掉的硅羟基浓度为  $2.01\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , 据文献报道单分子层硅羟基能发生反应的浓度一般为  $2\text{-}4\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$ <sup>[71]</sup>。我们通过计算得到的正向第一步反应产物的数据符合上述理论值, 说明该反应是按照单分

子层键合的。

衡量硅胶基质键合固定相的重要指标包含有固定相表面的残余硅羟基的活性。我们用表面覆盖率来表征硅胶表面硅羟基的反应程度，其定义为硅胶表面反应掉的硅羟基与能发生键合反应的硅羟基的百分比。计算公式为：

$$B\%=[\alpha_{\beta}/\alpha_{OH}]\times 100$$

$\alpha_{OH}$  为  $4.15 \text{ umol/m}^2$ ， $\alpha_{\beta}$  为  $2.01 \text{ umol/m}^2$  把上述数据代入计算公式得表面覆盖率为 48.43%。

正向第二步反应产物的理论含碳量为 23.88%，而实验测得的含碳量为 15.92%。说明辛伐他汀的键合率较低，还有待提高，可能是由于硅胶空间位阻的存在、键合基团的碳链较长和反应基团的体积较大等因素阻碍了反应的进行，使其键合率较低。由反向反应终产物测得的含碳量计算被键合的硅羟基的浓度为  $2.32 \text{ umol/m}^2$ ，表面覆盖率为 55.90%。

由元素分析数据可知，反向反应终产物的含碳量比正向反应终产物的高，可能是由于正向反应是先让 KH-566 和硅胶反应，而键合上去的 KH-566 的量较低，再加上是固液反应、辛伐他汀的分子量大且上面只有一个羟基可以进行反应，进而造成第二步键合量较低；而反向反应是先让足量的 KH-566 与辛伐他汀反应，然后再与硅胶反应，这样促使了手性选择剂键合量的提高。最终使其含碳量和被键合的硅羟基的浓度得到提高，使硅胶表面覆盖率得到提高。

## 2.4 液相色谱的基本参数与色谱柱的装填

### 2.4.1 液相色谱基本参数

#### (1) 死时间 $t_M$ 、保留时间 $t_R$ 和调整保留时间 $t'_R$

死时间是指不被固定相吸附的组分，从进样开始到出现浓度最大值时所需的时间，死时间与色谱柱的空隙体积成正比，以  $t_M$  表示，常用分钟 (min) 作为时间单位。对色谱柱死时间的测定主要是在实验中用无保留的组分来测量，如反相色谱的死时间常用尿嘧啶或某些无机盐来测定，而正相色谱的死时间常用三叔丁基苯来测定。

保留时间是指被测样品从进样开始到出现浓度最大值时所需的时间，以  $t_R$  表示，常用分钟 (min) 作为时间单位。样品的保留时间是由色谱实验过程中的热力学因素决定的。在一定的色谱条件下，具体的样品会有一定的保留时间，所以

通过保留时间可以对物质作定性分析。

调整保留时间是指扣除死时间后的保留时间，以  $t'_R$  表示，计算公式为：

$$t'_R = t_R - t_M$$

### (2) 容量因子 $k$

在一定的温度和压力下，在固定相和流动相之间达到平衡状态时，组分在两相中的质量比称为容量因子，以  $k$  表示，计算公式为：

$$k = m_S / m_M = t'_R / t_M$$

$m_S$  是平衡时组分在固定相中组分的质量； $m_M$  是平衡时组分在流动相中组分的质量。

在液相色谱中容量因子与固定相、流动相的性质和柱温有关，而与流动相的流速和色谱柱的尺寸无关。

### (3) 分离因子 $\alpha$

在色谱分离实验中某组分 2 的容量因子（或调整保留时间）与组分 1 的容量因子（或调整保留时间）的比值称为分离因子，以  $\alpha$  表示，计算公式为：

$$\alpha = k_2 / k_1 = t'_{R(2)} / t'_{R(1)}$$

$\alpha$  是色谱定性分析中一个重要的参数，它描述了固定相对被拆分物质的分离能力。 $\alpha$  值与对映体在流动相和固定相中的分配性质以及柱温有关，即使色谱柱的柱长、柱径尺寸、流动相流速及填充情况发生变化，但  $\alpha$  值仍保持不变<sup>[72]</sup>。分离因子  $\alpha$  值的大小在本质上说明了固定相与两组分之间的相互作用力的不同；也说明了固定相的选择性， $\alpha$  值越大，柱的选择性越好，其分离效果越好。

### (4) 分离度 $R_s$

分离度是判断在一定的色谱条件下，色谱柱对相邻两组分的分离效能的指标，以  $R_s$  表示，计算公式为：

$$R_s = 2 \times [t_{R(2)} - t_{R(1)}] / (Y_1 + Y_2) = 1.18 \times [t_{R(2)} - t_{R(1)}] / [Y_{1/2(1)} + Y_{1/2(2)}]$$

式中的  $Y_1$  与  $Y_2$  是相对应组分的色谱峰的峰底宽度， $Y_{1/2(1)}$  和  $Y_{1/2(2)}$  色谱峰的半峰宽度，其单位和保留值相同。

$R_s$  值越大就表明相邻的两组分被分离的越好。当  $R_s < 1$  时，色谱峰有重叠，则表示两个组分没有完全分离；当  $R_s = 1$  时，其分离程度可达 98%；当  $R_s = 1.5$  时，其分离程度则可达 99.7%，此时我们就认为两组分达到了基线分离。

对于多组分混合物的分离与分析，为了能够进一步分析拆分结果，提高其分离度。我们可以通过色谱分离基本方程式找到提高分离效能的基本途径，方

程式如下:

$$R_s = \sqrt{n} / 4 \times [(\alpha - 1) / \alpha] \times [k / (1 + k)]$$

此方程把柱效、分离因子与容量因子等参数联系起来。式中 $\sqrt{n} / 4$ 代表柱效项,  $(\alpha - 1) / \alpha$ 代表柱选择性项,  $k / (1 + k)$ 代表容量因子项。通过上述三项参数可以得到提高分离度的三种途径: ①增加塔板数, 即增加色谱柱的长度或提高柱效; ②改变容量因子, 可以通过改变流动相组分的配比来改变容量因子的大小, 如在正反相色谱条件下改变流动相的极性。③提高选择性, 可以调节流动相的 pH 值、柱温等色谱条件或者改变固定相的性质来达到此目的。

#### 2.4.2 色谱柱的装填

色谱柱是高效液相色谱仪的核心部件之一, 现代液相色谱技术的发展也与色谱柱的装填技术的发展是分不开的。本实验所用的高效液相色谱柱是自己装填的。色谱柱装填技术是影响色谱柱分离能力的因素之一, 高效液相色谱柱的装填好坏对之后的拆分效果有很大的影响。色谱柱的装填是要获得一个均匀且紧密的床层, 因为床层不均匀会产生较大的涡流扩散, 而使出峰明显展宽; 另外, 若填料装填的不紧密严实, 在进行长时间的分离实验时会被冲塌, 进而影响对手性化合物的分离。在分离过程中没装填好的色谱柱要达到较好的分离效果则需较长的时间。所以色谱柱的装填质量对其拆分能力的影响非常大。目前色谱柱装填的方法有干法和湿法两种。

干法装填的应用范围较窄, 仅适用于 ID 为 120-530  $\mu\text{m}$  的熔融石英毛细管柱或填料的粒径大于 20  $\mu\text{m}$  的液相色谱柱。本实验所使用的固定相填料的颗粒小于 10  $\mu\text{m}$ , 且本实验所用的固定相是键合型的, 由于键合型的固定相填料往往会带有静电, 因此, 我们合成的固定相填料不适用于干法填装。

本实验采用湿法(即匀浆法)装填色谱柱, 即用一种适宜的溶剂或是混合溶剂来作为分散介质, 通过超声震荡使填料均匀的悬浮分散于介质中, 然后经高压通过顶替液把制备好的匀浆液填充到色谱柱中, 进而制成紧密且均匀的高效液相色谱柱。匀浆法装填过程表面上看着简单, 实际上要注意许多细节。装填的重要条件是能够得到稳定的匀浆液, 匀浆液中的固定相填料不发生絮凝、沉降和附聚等现象。在此过程中匀浆液浓度要适中, 浓度过高所用的分散介质不能使固定相充分润湿, 也不能使固定相非常均匀的分散在介质中, 这样可能导致色谱柱中的填料分布不均匀; 匀浆液浓度过稀, 会致使所需的匀浆槽体积

变大, 可能导致填料过程中固定相发生分层的现象, 使色谱柱装填的不均匀紧密, 进而容易发生沟流现象。在装填固定相时还要仔细观察匀浆液底部是否有大颗粒的固定相, 避免倒入而造成固定相填充的不均匀紧密; 另外, 色谱柱也容易被冲塌。

在装柱过程中还应考虑到填装的是反相色谱柱还是正相色谱柱, 若装填的是反相色谱柱则应选择弱极性的溶剂, 而装填的若是正相色谱柱则应选择强极性的溶剂。这样一来不仅避免了颗粒的板结, 而且保证了填料能被很好的润湿, 以使固定相填料能够均匀地分散在介质中。装柱过程中匀浆液的配置也很关键, 匀浆液的种类和比例有很多种, 应根据填料的不同选取所需的匀浆液。

(1) 匀浆液的制备, 匀浆液的浓度一定要适中, 跟据研究表明湿法装柱中所用的匀浆液的浓度有一个较佳值, 其浓度在 5%-15% 范围内较佳<sup>[73-74]</sup>。本实验所配的匀浆液浓度为 10%, 以甲醇为分散介质, 通过超声震荡使填料均匀的分散在介质中, 直到无凝聚和分层的现象为止。但超声震荡的时间不宜过长, 因为长时间的超声震荡可能会使固定相颗粒破碎。

(2) 空色谱柱管的清洗, 完美的空色谱柱管的内壁应是光滑无摩擦的, 因此清洗色谱柱管时应非常小心, 避免磕碰内壁致其有划痕, 否则在实验过程中会使流动相产生沟流现象, 进而产生拖峰的现象, 更严重的是单种纯物质也可能出现两个色谱峰, 而对拆分结果的分析造成很大的影响。清洗过程先用去离子水冲洗柱管, 再用丙酮淋洗, 最后烘干。

(3) 装柱操作, 将之前准备好的色谱柱用螺纹连接到匀浆槽的下端, 然后将匀浆液倒入匀浆槽中, 迅速的将匀浆槽连接到色谱装柱机上。以甲醇为顶替液, 在 37 MPa 下以脉冲的形式装填色谱柱。装填完成后取下色谱柱, 然后观察色谱柱上端填料是否平整, 若平整再接上色谱柱头, 并标记出流动相流动方向, 色谱柱装填完成。

## 2.5 CSP-A 拆分能力的考察

### 2.5.1 色谱柱的死时间考察

死时间是对色谱柱性能考察的一个必要参数。色谱柱的死时间  $t_M$  用 1,3,5-三叔丁基苯来测定, 测定是在流动相为正己烷: 异丙醇 (90:10) 的条件下进行, 进一针 1,3,5-三叔丁基苯, 得到的保留时间为 1.30 min, 此保留时间即为此色谱柱

的死时间。

### 2.5.2 CSP-A 对手性化合物的拆分

为考察所制备的 CSP-A 的拆分能力, 对五种手性化合物进行了拆分, 手性化合物分别为安息香(benzoin)、氨氯地平(amlodipine)、尼群地平(nitrendipine)、非洛地平(felodipine)和 9-苯基苯二烯-9-醇(9-phenylxanthen-9-ol), 五种手性化合物的结构如图 2.6 所示。

#### (1) 安息香的拆分实验

我们用了四种不同的流动相对安息香对映体进行了手性拆分。由实验得到它的较佳的流动相组成为正己烷: 甲醇: 1,2-二氯乙烷 (50:25:25), 柱温为室温, 检测波长为 220 nm, 流动相流速为 1.0 ml/min。拆分色谱图如图 2.7 所示, 已达到完全分离。

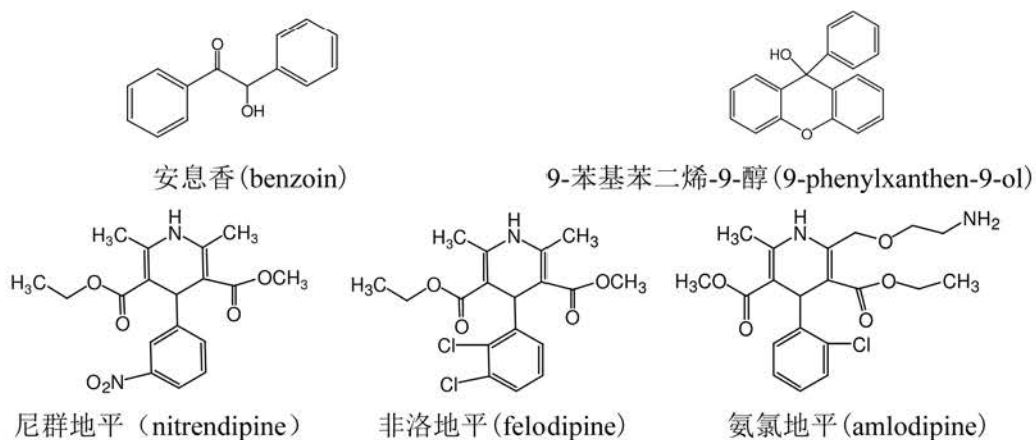


图 2.6 五种手性化合物的结构

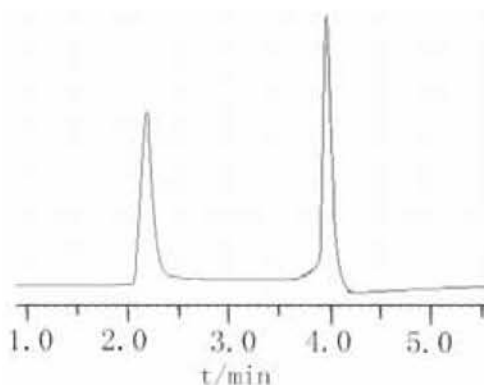


图 2.7 安息香拆分色谱图



安息香对映体在正己烷：异丙醇、正己烷：乙醇和水：甲醇三种流动相中没能被拆分开。可能因为异丙醇和乙醇是单一的极性溶剂，而甲醇与 1,2-二氯乙烷经过不同比例的混合可以得到单一极性溶剂得不到的极性，致使甲醇与 1,2-二氯乙烷与对映体形成的氢键作用力较强，进而造成甲醇与 1,2-二氯乙烷混合物在此色谱柱中对安息香对映体的区分能力比异丙醇和乙醇的强。在反相流动相水：甲醇中没被拆分开的原因可能是对映体在此流动相中与手性选择剂间不能形成氢键作用力。

安息香是一种很常见的药物，我们把此对映体在 CSP-A 上的拆分结果与其他研究人员制备的手性固定相对其拆分结果进行了对比讨论。本实验所制备的手性固定相对安息香对映体的拆分分离因子为 3.04，并且用时两分钟就将其完全分开。陈小明<sup>[41]</sup>制备的纤维素类手性固定相中的 CSP-6、CSP-7 和 CSP-10 对安息香对映体进行了拆分，分离因子分别为 1.09、1.00 和 1.00；徐贝佳<sup>[75]</sup>制备的 CDMPC、CTB 和 CTMB 三种纤维素类手性固定相对安息香对映体进行了拆分，分离因子分别为 1.44、1.20 和 1.14；秦峰<sup>[44]</sup>制备的 CDMPC 和 CTMB 纤维素类固定相对其进行了拆分，分离因子为 1.27 和 1.24。通过对比拆分结果可知，本实验制备的 CSP-A 比上述几个人制备的纤维素类 CSP 的拆分效果好，可能是因为本实验制备的 CSP 不存在类似纤维素的手性空腔，主要是利用与溶质之间的吸引作用来发挥手性识别能力的；另外，对比固定相的结构可知，CSP-A 与对映体能形成较强的  $\pi$ - $\pi$  作用而促使手性化合物较好的分离。沈利斌<sup>[76]</sup>制备的 N-噁唑啉苯基丙烯酰胺型手性固定相对其进行了拆分，分离因子为 1.20 和 1.06，对比二者固定相的结构可知，本实验合成的固定相的手性中心较多且空间位阻作用和  $\pi$ - $\pi$  作用较强，因此拆分效果优于 N-噁唑啉苯基丙烯酰胺型手性固定相。经过对比可知，本实验所制备的手性固定相在流动相正己烷：甲醇：1,2-二氯乙烷（50:25:25）中对安息香对映体的拆分效果优于上述几位研究人员所制备的手性固定相。

## (2) 三种钙离子拮抗剂的拆分实验

首先我们用不同比例的正己烷：异丙醇流动相对三种钙离子拮抗剂（氨氯地平、非洛地平和尼群地平）进行了手性拆分，但它们都没能被拆分开。然后在正己烷：异丙醇流动相中加入了添加剂三乙胺，以正己烷：异丙醇：三乙胺为流动相对三种钙离子拮抗剂对映体进行了手性拆分。色谱分离在室温下进行，检测波长为 220 nm，流动相流速为 1.0 ml/min。分离结果见表 2.4，拆分色谱图



如图 2.8 所示。

表 2.4 三种钙离子拮抗剂的拆分结果

对映体	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
氨氯地平	20.18	1.25	-
非洛地平	14.15	1.15	1.04
尼群地平	16.13	1.07	0.85

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_s$ : 分离度 (resolution)  
 流动相=正己烷: 异丙醇: 三乙胺 (90:10:0.1)

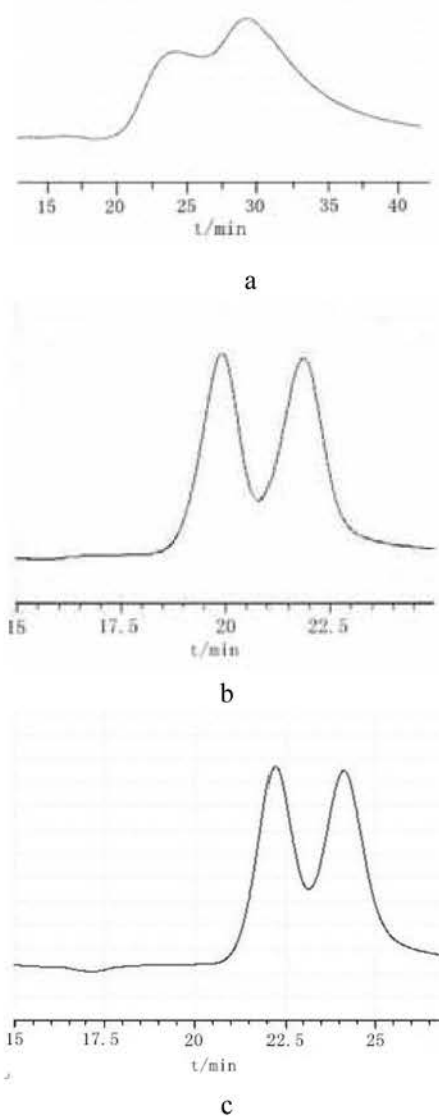


图 2.8 三种钙离子拮抗剂拆分色谱图 (a: 氨氯地平; b: 非洛地平; c: 尼群地平; 流动相为正己烷: 异丙醇: 三乙胺 (90:10:0.1))

此分离实验在流动相中添加了三乙胺后才使手性药物得到较好的分离，可能是因为添加三乙胺后抑制了手性药物与固定相载体上残留的硅羟基之间的非手性作用，促使其与固定相间的相互作用顺利进行；另外，三种钙离子拮抗剂显碱性，添加三乙胺后也有利于其被分离。通过分离实验最终在流动相为正己烷：异丙醇：三乙胺（90:10:0.1）中拆分开了非洛地平和尼群地平两种手性药物。

由表 2.4 和图 2.8 可以看出非洛地平和尼群地平能被有效拆分，而氨氯地平拆分效果较差。三个药物的手性中心附近都含有苯环且苯环上含有吸电子基团，即  $\pi$ -酸性芳香基团；虽然尼群地平苯环上硝基的吸电子能力比氯原子吸电子能力强，但非洛地平苯环上含有两个氯原子，所以在手性拆分过程中非洛地平与手性选择剂之间形成的  $\pi$ - $\pi$  作用强于尼群地平，进而非洛地平被分离效果稍好于尼群地平。氨氯地平的苯环上只有一个吸电子氯，吸电子能力不如硝基；另外，其侧基结构比较大，非手性作用力对拆分影响较大；因而氨氯地平被拆分效果不如非洛地平和尼群地平。

### (3) 9-苯基苯二烯-9-醇的拆分实验

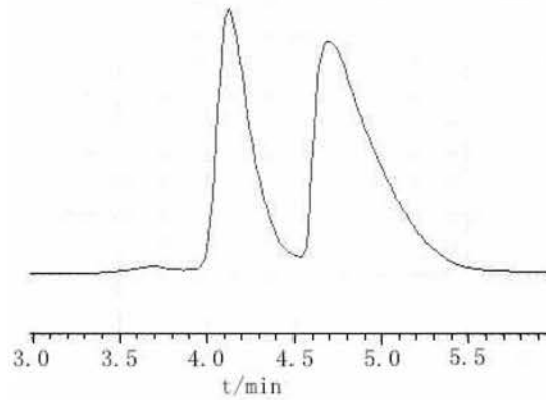
本实验用了四种不同的流动相对 9-苯基苯二烯-9-醇对映体进行了手性拆分。色谱分离在室温下进行，检测波长为 220 nm，流动相流速为 1.0 ml/min。分离结果见表 2.5，拆分色谱图如图 2.9 所示。

此对映体能在 CSP-A 上得到较好的拆分效果是因为在手性中心附近有能形成氢键的基团和  $\pi$ - $\pi$  作用的苯环。由图 2.9 可知此对映体在流动相组成为正己烷：乙醇时，拆分效果最好；在正己烷：甲醇：1,2-二氯乙烷中拆分效果较好；但在正己烷：异丙醇和水：甲醇中 9-苯基苯二烯-9-醇对映体没被拆分开。可见在三种正相流动相中异丙醇没有区分能力，乙醇的洗脱能力和区分能力比甲醇：1,2-二氯乙烷混合物的强。在反相水：甲醇中甲醇对此对映体没有区分能力。

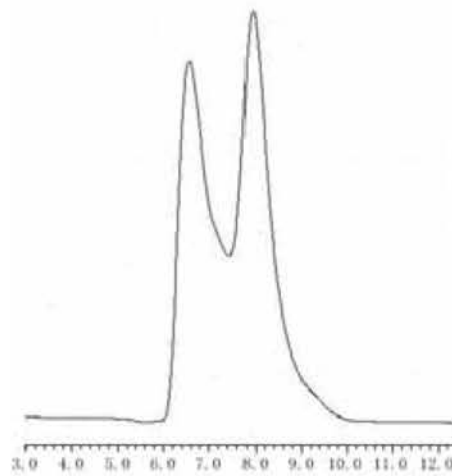
表 2.5 9-苯基苯二烯-9-醇在 CSP-A 上的拆分结果

流动相	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
正己烷：异丙醇（90:10）	5.95	-	-
正己烷：乙醇（90:10）	2.17	1.20	0.91
正己烷：甲醇：1,2-二氯乙烷（80:10:10）	4.05	1.26	0.78
水：甲醇（90:10）	4.71	-	-

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_s$ : 分离度 (resolution)



a



b

图 2.9 9-苯基苯二烯-9-醇拆分色谱图 (a: 正己烷: 乙醇 (90:10); b: 正己烷: 甲醇: 1,2-二氯乙烷 (80:10:10))

#### (4) 流动相流速对拆分效果的影响

在手性拆分实验中为了得到较佳的分离效果，我们检测了流动相流速对分离效果的影响。被分离的四种手性化合物在拆分最好的流动相中考察流速对拆分效果的影响。安息香、非洛地平、尼群地平和 9-苯基苯二烯-9-醇对应的被拆分最好的流动相分别为正己烷: 甲醇: 1,2-二氯乙烷 (50:25:25)、正己烷: 异丙醇: 三乙胺 (90:10:0.1)、正己烷: 异丙醇: 三乙胺 (90:10:0.1) 和正己烷: 乙

醇 (90:10)。拆分结果见表 2.6。

表 2.6 流动相流速对拆分效果的影响

对映体	0.5 ml/min			1.0 ml/min			1.5 ml/min		
	$k_1$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$\alpha$	$R_S$
安息香	0.74	3.11	4.21	0.68	3.04	4.14	0.56	2.93	4.05
非洛地平	14.62	1.17	1.08	14.15	1.15	1.04	14.03	1.06	0.82
尼群地平	16.18	1.09	0.81	16.13	1.07	0.85	15.99	1.08	0.64
9-苯基苯二烯 -9-醇	2.28	1.16	0.92	2.17	1.20	0.91	1.94	1.09	0.82

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_S$ : 分离度 (resolution)

实验结果发现, 随着流速的减小, 手性化合物在色谱柱上的保留时间增加; 当流动相的流速为 1.5 ml/min 时, 非洛地平、尼群地平和 9-苯基苯二烯-9-醇等三种手性化合物在色谱柱上的保留时间减小, 且分离度变小, 这是因为当流动相流速较大时, 手性化合物与固定相间的相互作用时间不足, 致使被分离化合物分离不充分。由于安息香的分离度大, 流速为 1.5 ml/min 时依然被分离的较好, 因此对于一些分离度比较大的手性化合物, 可以用较大的流速对其拆分, 以节省物质分离的操作时间。所以根据被分离的手性化合物的不同情况, 在分离实验中一定要选择适宜的流速; 就此色谱柱的拆分实验而言, 较佳的流动相流速为 1.0 ml/min。

(5) 本实验把反向反应制备的手性固定相用同样的方法装柱, 在正向反应制备的固定相拆分的较佳条件下, 对相应的手性化合物进行了手性拆分, 拆分对比结果见表 2.7。

表 2.7 拆分对比结果

对映体	正向制备的固定相			反向制备的固定相		
	$k_1$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$\alpha$	$R_S$
安息香	0.68	3.04	4.14	0.71	3.03	4.18
非洛地平	14.15	1.15	1.04	15.01	1.06	0.83
尼群地平	16.13	1.07	0.85	16.26	1.03	0.82
9-苯基苯二烯 -9-醇	2.17	1.20	0.91	2.32	1.17	0.87

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_S$ : 分离度 (resolution)

虽然反向反应键合的手性选择剂比正向反应的键合量高, 但由表 2.7 可知其拆分效果并没有比正向反应制备的固定相的效果好; 有些对映体被拆分效果还

不如正向的。可能是因为间隔臂的影响，间隔臂的键合量直接决定了手性选择剂的键合量，最终影响到所制备的手性固定相的拆分能力。一般间隔臂的键合量多了则手性选择剂的键合量也会增加，理论上固定相的手性拆分能力会相应的提高，但是由于硅烷偶联剂上的三甲氧基硅烷基团不会全部与硅胶上的硅羟基反应，键合上去的间隔臂的量大的话，那些未反应的三甲氧基基团可能会在以后的处理过程中水解，进而与手性对映体分子形成非手性的相互作用，削弱氢键作用、 $\pi$ - $\pi$ 作用和偶极-偶极作用等作用力，从而造成柱效或选择性的下降。另外，虽然反向反应中的 KH-566 和辛伐他汀反应后用减压蒸馏除去了绝大部分的溶剂，但后处理不是很彻底，还有少量的杂质在溶液里；由于空白硅胶的吸附能力强，因而可能会吸附一些杂质，在分离实验中影响到手性固定相与溶质分子间的相互作用力，进而影响到手性拆分。

## 2.6 本章小结

本章以常用药物辛伐他汀为手性选择剂，KH-566 为间隔臂，硅胶为载体，制备了一种新的含有多个手性中心的刷型手性固定相 (CSP-A)。通过对五种对映异构体的分离实验考察了此手性固定相的拆分能力，成功地拆分了安息香、尼群地平、非洛地平和 9-苯基苯二烯-9-醇等四种对映体。

通过热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对手性固定相进行了表征与分析。通过热重分析仪初步检测了每一步的反应结果，由结果可知反应都顺利的进行了；然后对反应产物进行红外分析，在  $2935\text{ cm}^{-1}$  附近和  $2940\text{ cm}^{-1}$  附近分别出现了  $-\text{CH}_2-$  伸缩振动峰和  $-\text{CH}_3$  伸缩振动峰； $690\text{ cm}^{-1}$  和  $900\text{ cm}^{-1}$  是芳环的面外弯曲振动；证明 KH-566 和辛伐他汀都成功键合上去了，成功制备了 CSP-A。对硅胶改性反应做了优化，得出在  $100^\circ\text{C}$  下硅胶与硅烷试剂的量为 1:1.5 和反应时间为 5 h 时键合量最高。最后通过元素分析得到了确切的键合量，正向反应第一步含碳量为 5.79%，第二步反应含碳量为 15.92%，反向反应产物含碳量为 27.54%，并通过公式计算得到了硅胶表面的覆盖率，其覆盖率分别为 48.43% 和 55.90%。

CSP-A 的拆分能力的考察：

(1) 用四种不同的流动相对安息香对映体进行了手性拆分，但只在流动相正己烷：甲醇：1,2-二氯乙烷 (50:25:25) 中被完全分离。把此手性固定相对安

息香对映体的拆分结果与其他相关手性固定相的拆分结果进行了比较, 结果表明本实验制备的刷型手性固定相优于相关手性固定相。

(2) 对三种钙离子拮抗剂的拆分。非洛地平 and 尼群地平在流动相正己烷: 异丙醇: 三乙胺 (90:10:0.1) 中被分离开, 且非洛地平被拆分效果稍好于尼群地平。两种药物能被拆分的原因可能是添加三乙胺后抑制了手性化合物与固定相的载体上残留的硅羟基之间的非手性作用, 促使其与固定相间的相互作用顺利进行; 另外, 三种钙离子拮抗剂显碱性, 添加三乙胺后也有利于其被分离。

(3) 用四种不同的流动相对 9-苯基苯二烯-9-醇进行了手性拆分。9-苯基苯二烯-9-醇只在正己烷: 乙醇和正己烷: 甲醇: 1,2-二氯乙烷中被有效分离; 乙醇对此对映体的洗脱能力和区分能力比甲醇: 1,2-二氯乙烷好。

(4) 流动相流速对拆分效果的影响。实验结果发现, 随着流动相流速的减小, 手性化合物在色谱柱上的保留时间增加; 若流速过快, 会导致被分离化合物分离不充分, 有的甚至没有被分离开。但是对于一些分离度比较大的, 可以用较大的流速对其拆分, 以节省物质分离的操作时间。本实验根据手性化合物被分离的情况, 确定较佳的流动相流速为 1.0 ml/min。

(5) 虽然反向反应键合的手性选择剂比正向反应的键合量高, 但是对比正向反应和反向反应制备的手性固定相对几种手性化合物的分离结果可知, 其拆分效果并没得到相应的提高, 甚至对有些药物的拆分效果还不如正向反应所制备的固定相。可能是因为间隔臂键合量的影响, 键合量过多那些未反应的三甲氧基基团可能会在以后的处理过程中水解, 进而与手性对映体分子形成非手性的相互作用, 削弱氢键作用、 $\pi$ - $\pi$  作用和偶极-偶极作用等作用力, 从而造成柱效或选择性的下降。另外, 可能是由于反应后处理不彻底, 载体硅胶吸附了一些杂质, 影响了后续的手性拆分。

### 3 CSP-B 的制备及其应用

#### 3.1 CSP-B 的合成

本实验以硅胶为载体， $\gamma$ -氨丙基三乙氧基硅烷（KH-550）为间隔臂，缬沙坦为手性选择剂合成出了一种新的刷型手性固定相（CSP-B）。KH-550 末端含有活泼的氨基，容易与其他官能团进行反应，在刷型手性固定相中有着广泛的应用；而缬沙坦的结构也较好，可以作为手性选择剂来拆分一些手性药物。此外，利用热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对合成的手性固定相进行了表征与分析。然后用匀浆法将合成的固定相装柱，通过对三种  $\beta$ -受体阻滞剂的分离实验考察了此手性固定相的拆分能力，三种  $\beta$ -受体阻滞剂分别是：塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔。

##### 3.1.1 合成工艺路线

以缬沙坦为手性选择剂，KH-550 为间隔臂，硅胶为载体，合成 CSP-B 的工艺路线如图 3.1 所示。

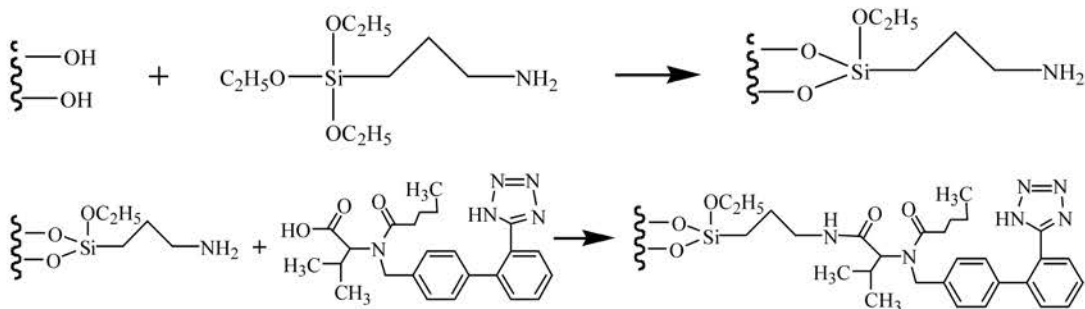


图 3.1 CSP-B 的合成工艺路线

##### 3.1.2 合成工艺操作

###### (1) 硅胶改性反应

将 5 g 干燥过的活化硅胶和 100 ml 无水甲苯加入三口烧瓶中，用电动搅拌进行搅拌(搅拌速度不能太高，否则硅胶会被打碎)，待搅拌均匀后加入 5 ml 的 KH-550 和 0.5 ml 的催化剂吡啶，在 110℃ 下反应 14 h。产物冷却到室温后，用砂芯漏斗抽滤，然后依次用甲苯、甲醇、水和丙酮洗涤，放置于 60℃ 的真空干燥箱中过夜，得到氨丙基硅胶，即改性硅胶。反应在氮气保护条件下进行。



### (2) 改性硅胶与缬沙坦反应

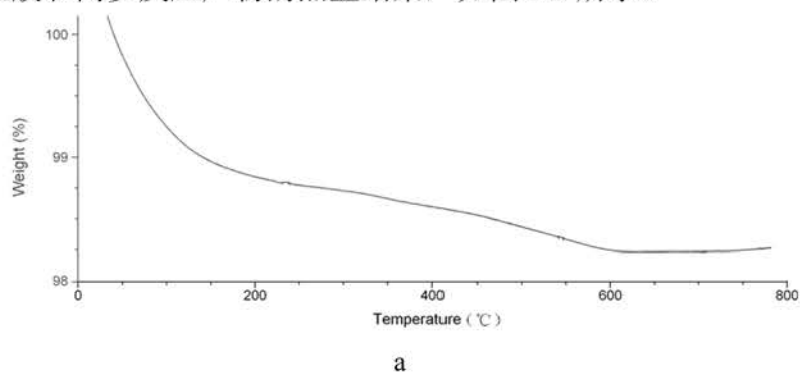
在室温下先后加入 4 g 氨丙基硅胶、120 ml 无水四氢呋喃、2 g 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) 和 3 ml N,N-二异丙基乙胺 (DIEA), 用电动搅拌充分搅拌, 待搅拌均匀后置于冰水浴中, 然后加入 2 g 缬沙坦和 1.5 g 1-羟基苯并三唑 (HOBt), 再在冰水浴中搅拌 2.5 h, 然后温度升至 30°C, 反应 24 h。反应结束后, 用砂芯漏斗抽滤, 并依次用 THF、甲苯、甲醇、丙酮洗涤, 得到终产物。反应在氮气保护条件下进行。

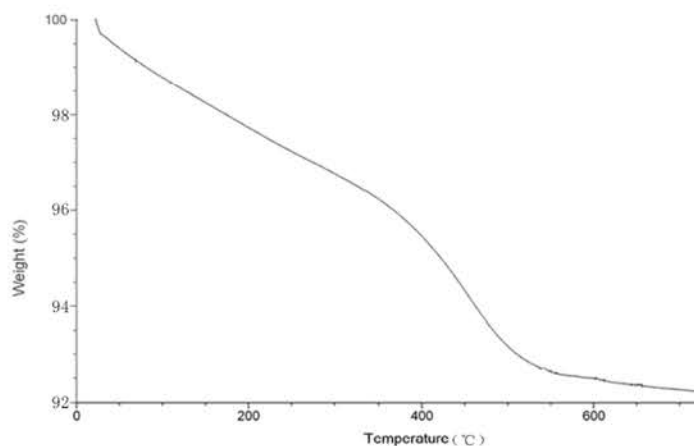
由于偶联剂 KH-550 易水解, 因此反应均是在无水条件下进行的。所用的试剂甲苯、吡啶和四氢呋喃都经过回流除水才能使用; 另外, 反应容器也需经过充分干燥才能使用。

## 3.2 CSP-B 的表征与分析

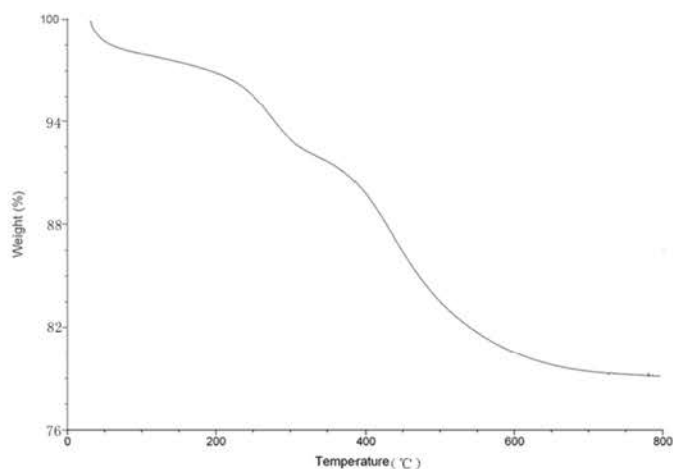
### 3.2.1 热重分析

空白硅胶和两步反应产物的热重结果, 如图 3.2 所示。





b



c

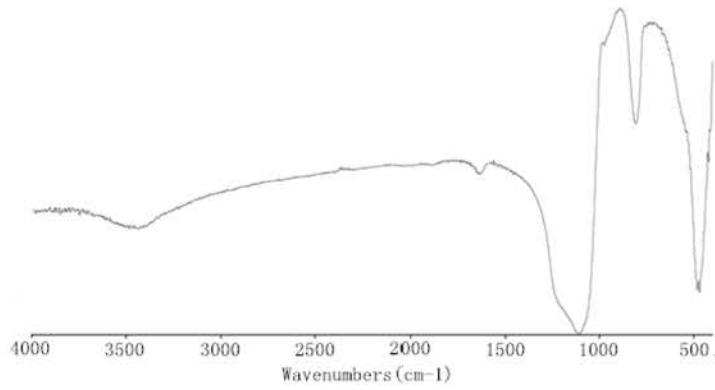
图 3.2 热重图 (a: 空白硅胶; b: 改性硅胶; c: 目的产物 CSP-B)

由图3.2可知空白硅胶的热失重是1.18%，改性硅胶的热失重是7.42%，因而可以确定键合上的KH-550的热失重约为6.24%，说明KH-550已经成功地键合到硅胶上。键合缬沙坦后的热失重是22.34%，说明缬沙坦也成功地键合上了。

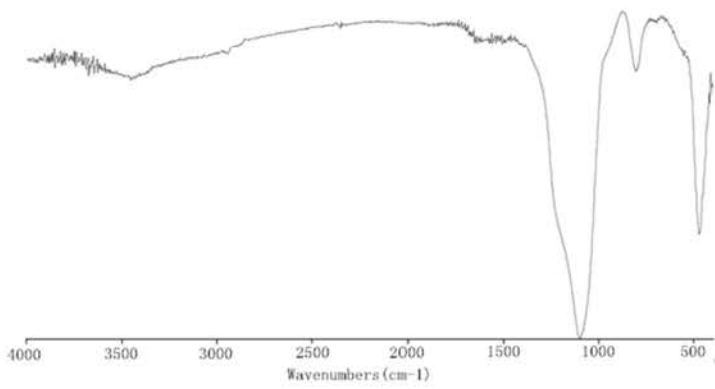
### 3.2.2 红外分析

空白硅胶和两步反应产物的红外光谱图，如图 3.3 所示。

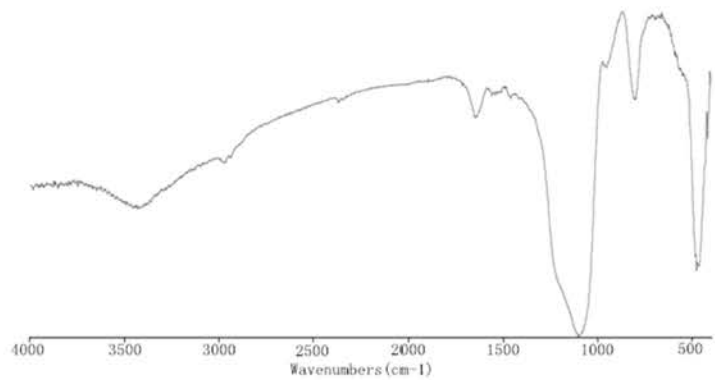
由图 3.3 可知在  $2950\text{ cm}^{-1}$  附近和  $2940\text{ cm}^{-1}$  附近分别出现了-NH-伸缩振动峰和-CH<sub>3</sub> 伸缩振动峰； $900\text{ cm}^{-1}$  是芳环的面外弯曲振动；证明 KH-550 和缬沙坦都成功键合上去了。



a



b



c

图 3.3 红外光谱图 (a:空白硅胶; b:键合 KH-550;c:键合缬沙坦)

### 3.2.3 元素分析

用元素分析仪对两步反应产物做了进一步的表征, 表征结果见表 3.1。

表 3.1 元素分析结果

反应	C%	H%	N%
第一步	2.57	0.69	0.96
第二步	13.21	1.73	3.52

由元素分析结果可知, KH-550 和缬沙坦都成功键合上去了。另外, 根据 2.3.3 节中的计算方法, 由第一步反应计算硅胶表面硅羟基被反应掉的浓度和表面覆盖率。键合配体的碳原子数为 3, 若键合反应按照单分子层计算, 计算得单分子层键合所含碳的理论百分数为 2.99%, 而实验所测得的含碳量为 2.57%。结果表明 KH-550 的键合率较高。由实验所测含碳量计算被键合的硅羟基浓度为 2.38  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , 其值在 2-4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  范围内, 说明此反应是依照单分子层反应的。通过计算表面覆盖率为 57.35%。

由第一步测得的含碳量可知第二步键合缬沙坦后的理论含碳量应为 23.13%, 而实验测得的含碳量为 13.21%, 可见缬沙坦的键合率较低。可能是由于硅胶空间位阻的存在、键合基团的碳链较长和反应基团的体积较大阻碍了反应的进行, 使其键合率较低。

## 3.3 色谱柱的装填

本实验也采用湿法(即匀浆法)装填色谱柱。当匀浆液制备好且空色谱柱管清洗好后, 用甲醇为顶替液, 在 37 MPa 下以脉冲的形式装填色谱柱。装填完成后取下色谱柱, 然后观察色谱柱上端填料是否平整, 若平整再接上色谱柱头, 并标记出流动相流动方向, 色谱柱装填完成。

## 3.4 CSP-B 拆分能力的考察

### 3.4.1 色谱柱的死时间考察

色谱柱的死时间  $t_M$  用 1,3,5-三叔丁基苯来测定, 测定是在流动相为正己烷: 异丙醇(90:10)的条件下进行, 进一针 1,3,5-三叔丁基苯, 得到的保留时间为 1.30 min, 此保留时间即为此色谱柱的死时间。

## 3.4.2 CSP-B 对手性化合物的拆分

为考察所合成的 CSP-B 的拆分能力, 对塞利洛尔 (celiprolol)、阿替洛尔 (atenolol) 和普萘洛尔 (propranolol) 等三种  $\beta$ -受体阻滞剂进行了拆分, 三种对映体的结构如图 3.4 所示。

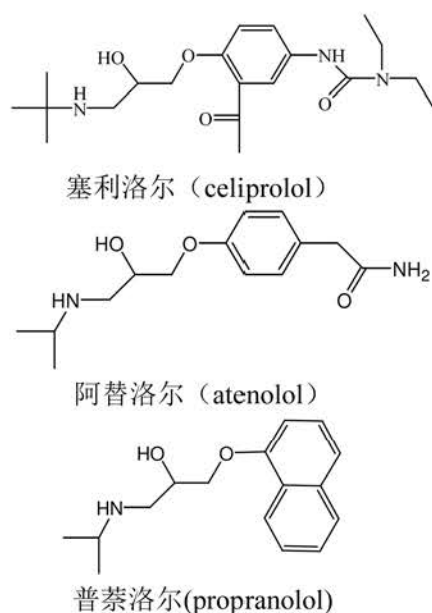


图 3.4 三种对映体的结构

(1) 本实验首先用正己烷: 异丙醇、正己烷: 异丙醇: 甲醇和正己烷: 四氢呋喃等三种流动相对塞利洛尔对映体进行了拆分。色谱分离在室温下进行, 检测波长为 220 nm, 流动相流速为 1.0 ml/min。拆分结果见表 3.2, 拆分色谱图如图 3.5 所示。

表 3.2 塞利洛尔在三种流动相中的拆分结果

流动相 (体积分数)	$k_1$	$\alpha$	$R_S$
正己烷: 异丙醇 (80:20)	13.71	-	-
正己烷: 异丙醇: 甲醇 (80:10:10)	3.01	0.21	-
正己烷: 四氢呋喃 (80:20)	3.18	3.40	9.5

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_S$ : 分离度 (resolution)

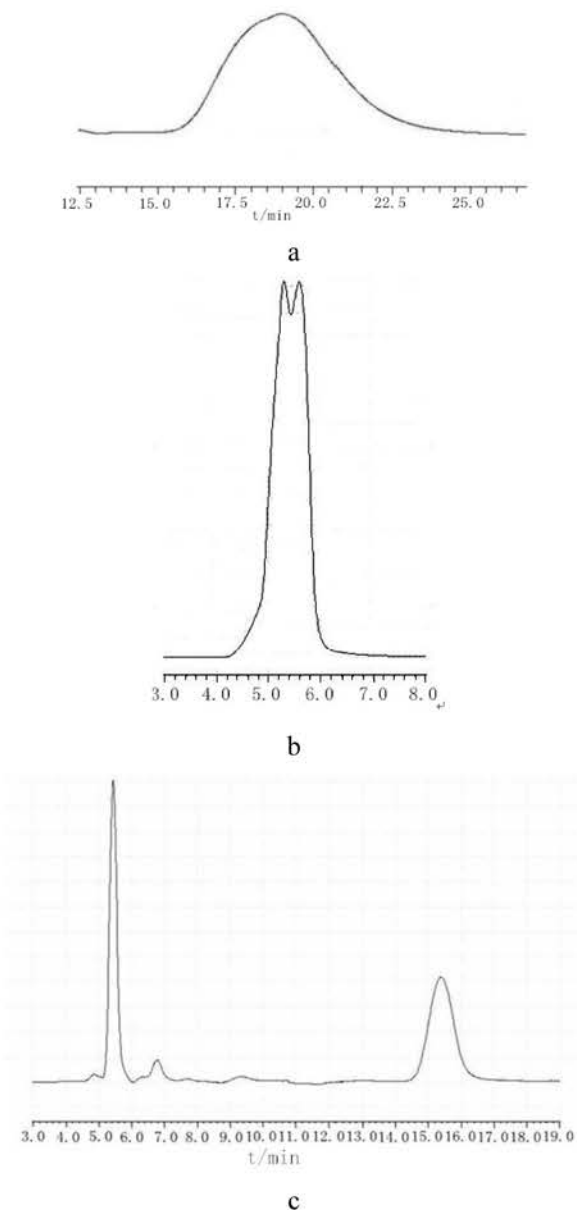


图 3.5 色谱图 (a: 正己烷: 异丙醇 (80:20); b: 正己烷: 异丙醇: 甲醇 (80:10:10); c: 正己烷: 四氢呋喃 (80:20))

由表 3.2 和图 3.5 可知, 塞利洛尔对映体在流动相正己烷: 四氢呋喃中的拆分效果很好, 而在另外两种流动相中没有被拆分开。结果表明异丙醇对塞利洛尔对映体没有区分能力, 异丙醇: 甲醇混合物的区分能力较差; 正己烷: 四氢呋喃是拆分三种  $\beta$ -受体阻滞剂的较佳流动相。

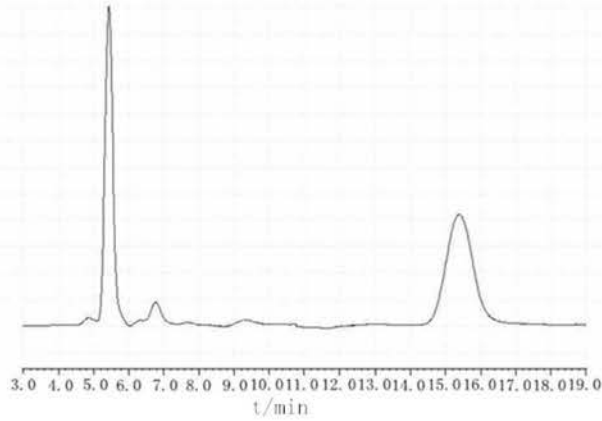
(2) 通过改变流动相正己烷: 四氢呋喃的组成比例对塞利洛尔、阿替洛尔

和普萘洛尔等三种  $\beta$ -受体阻滞剂进行了拆分。拆分结果见表 3.3。三种药物的较佳拆分色谱图如图 3.6 所示。

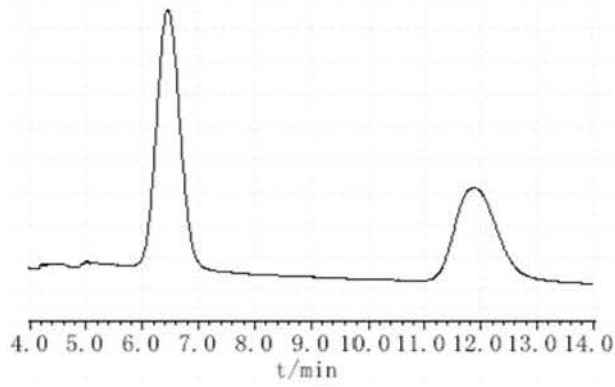
表 3.3 不同比例的流动相正己烷：四氢呋喃对三种  $\beta$ -受体阻滞剂的拆分结果

对映体	90:10			80:20			70:30		
	$k_1$	$\alpha$	$R_s$	$k_1$	$\alpha$	$R_s$	$k_1$	$\alpha$	$R_s$
塞利洛尔	3.57	3.29	7.62	3.18	3.40	9.53	3.31	3.41	7.85
阿替洛尔	4.83	1.72	4.58	4.07	1.91	7.11	3.72	1.64	4.35
普萘洛尔	5.11	1.23	0.97	4.34	1.24	1.06	4.06	1.26	0.89

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子(selectivity factor);  $R_s$ : 分离度 (resolution)



a



b



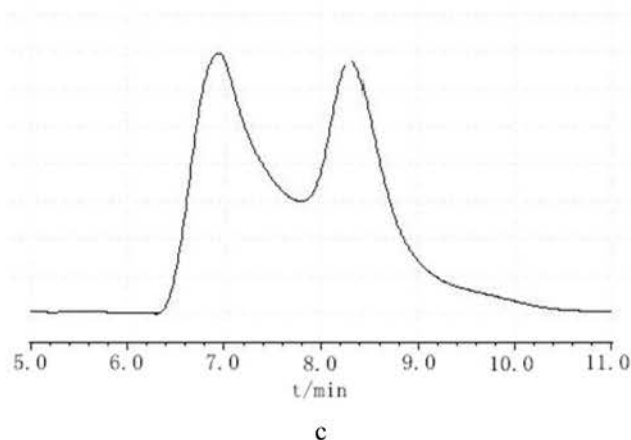


图 3.6 较佳拆分色谱图 (a: 塞利洛尔; b: 阿替洛尔; c: 普萘洛尔; 色谱条件: 流动相为正己烷: 四氢呋喃 (80:20), 柱温为室温, 检测波长为 220 nm, 流动相流速为 1.0 ml/min)

由表 3.3 和图 3.6 可知在流动相正己烷: 四氢呋喃中拆分塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种对映体的较佳比例为 80:20; 随着四氢呋喃的体积分数减少, 流动相的极性减小, 对映体与固定相之间的氢键作用力逐渐增强, 导致它们的容量因子增大, 保留时间延长。塞利洛尔对映体在流动相正己烷: 四氢呋喃 (80:20) 中的拆分效果最好; 阿替洛尔对映体也被完全分离, 但其分离因子小于塞利洛尔; 普萘洛尔对映体被拆分效果最差。拆分效果的不同可能是由三种手性药物对映体与固定相之间形成的偶极-偶极作用与氢键作用力的大小不同造成的。

### (3) 流动相流速对拆分效果的影响

本实验在流动相正己烷: 四氢呋喃 (80:20) 中用不同的流速拆分了塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种对映体, 以此考察了流动相流速对拆分效果的影响。拆分结果见表 3.4。

表 3.4 流动相流速对拆分效果的影响

对映体	0.5 ml/min			1.0 ml/min			1.5 ml/min		
	$k_1$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$\alpha$	$R_S$	$k_1$	$\alpha$	$R_S$
塞利洛尔	3.84	3.52	9.56	3.18	3.42	9.53	3.07	3.26	9.38
阿替洛尔	4.43	2.17	7.18	4.07	2.05	7.11	3.88	1.92	6.96
普萘洛尔	4.51	1.24	1.03	4.34	1.27	1.06	3.91	1.04	0.82

$k_1$ : 容量因子 (capacity factor);  $\alpha$ : 分离因子 (selectivity factor);  $R_S$ : 分离度 (resolution)

实验结果发现, 随着流动相流速的减小, 手性化合物在色谱柱上的保留时间增加; 当流动相的流速为 1.5 ml/min 时, 塞利洛尔和阿替洛尔在色谱柱上的保

留时间减小，且分离度变小，但还是达到了较好的分离效果；而普萘洛尔被拆分效果较差，这是因为当流动相流速较大时，普萘洛尔对映体与固定相间的相互作用时间不足，致使其分离不充分，以至于拆分效果不好。鉴于以上流动相流速对拆分效果的影响，根据被分离的手性化合物的不同情况，本实验确定最佳的流动相流速为 1.0 ml/min。

### 3.5 本章小结

本章以常用药物缬沙坦为手性选择剂，KH-550 为间隔臂，硅胶为载体，制备了一种新的刷型手性固定相。通过对三种对映异构体的分离实验考察了此手性固定相的拆分能力，成功地拆分了塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种对映体。

通过热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对手性固定相进行了表征与分析。首先通过热重初步检测了每一步的反应结果，由热重结果可知两步反应都顺利的反应了；然后对两步反应产物进行红外分析可知在  $2950\text{ cm}^{-1}$  附近和  $2940\text{ cm}^{-1}$  附近分别出现了-NH-伸缩振动峰和-CH<sub>3</sub> 伸缩振动峰； $900\text{ cm}^{-1}$  是芳环的面外弯曲振动；证明 KH-550 和缬沙坦都成功键合上去了，成功制备了 CSP-B。最后通过元素分析得到了确切的键合量，第一步反应含碳量为 2.57%，第二步反应含碳量为 13.21%，并通过公式计算得到了硅胶表面的覆盖率，其覆盖率为 57.35%。

CSP-B 的拆分能力的考察：

(1) 用三种不同的流动相对塞利洛尔对映体进行了手性拆分，得到流动相正己烷：四氢呋喃是拆分三种  $\beta$ -受体阻滞剂的较佳流动相。

(2) 通过改变流动相正己烷：四氢呋喃的组成比例对塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种对映体进行了拆分，得到较佳流动相比比例为 80:20。三种  $\beta$ -受体阻滞剂在此流动相中的拆分效果不同，可能是由三种手性药物对映体与固定相之间形成的偶极-偶极作用与氢键作用力的大小不同造成的。

(3) 流动相流速对拆分效果的影响。随着流动相流速的减小，手性化合物在色谱柱上的保留时间增加；当流动相的流速为 1.5 ml/min 时，塞利洛尔和阿替洛尔在色谱柱上的保留时间减小，且分离度变小，但还是达到了较好的分离效果；而普萘洛尔被拆分效果较差，这是因为当流动相流速较大时，普萘洛尔对映体与固定相间的相互作用时间不足，致使其分离不充分，以至于拆分效果不

好。鉴于以上流动相流速对拆分效果的影响，根据被分离的手性化合物的不同情况，本实验确定较佳的流动相流速为 1.0 ml/min。

## 4 结论

1、本文以常用药物辛伐他汀为手性选择剂，KH-566 为间隔臂，硅胶为载体，制备了一种新的含有多个手性中心的刷型手性固定相（CSP-A）；以常用药物缬沙坦为手性选择剂，KH-550 为间隔臂，硅胶为载体，制备了一种新的刷型手性固定相（CSP-B），并得到了两种固定相具体的合成条件。CSP-A 的合成条件为：①硅胶改性。以无水甲苯为溶剂，吡啶为催化剂，KH-566 与硅胶在 100℃ 下搅拌反应 5 h；②改性硅胶与辛伐他汀反应。以无水甲苯为溶剂，三氟化硼乙醚络合物为催化剂，改性硅胶与辛伐他汀在 80℃ 下搅拌反应 8 h。CSP-B 的合成条件为：①硅胶改性。以无水甲苯为溶剂，吡啶为催化剂，KH-550 与硅胶在 110℃ 下搅拌反应 14 h；②改性硅胶与缬沙坦反应。以无水四氢呋喃为溶剂，HOBt 为催化剂，改性硅胶与缬沙坦在 30℃ 下搅拌反应 24 h。

2、通过热重分析仪、红外分析仪和元素分析仪对所合成的两种手性固定相进行了表征和分析，结果表明，本实验的合成物与设计的目标产物一致，成功的制备了两种新的刷型手性固定相。

3、CSP-A 成功拆分了安息香、尼群地平、非洛地平和 9-苯基苯二烯-9-醇等四种对映体。把此固定相对安息香对映体的拆分结果与其他相关手性固定相对安息香对映体的拆分结果进行了对比，结果表明本文制备的刷型手性固定相的拆分效果优于其他相关固定相。同时还考察了正向反应和反向反应制备的固定相的拆分效果，发现反向反应得到的固定相的含碳量比正向的高，但其拆分效果却改善不大。

4、CSP-B 成功拆分了塞利洛尔、阿替洛尔和普萘洛尔等三种对映体。筛选考察了适于三种  $\beta$ -受体阻滞剂拆分的流动相组分、组成比例，结果发现正己烷：四氢呋喃是拆分三种  $\beta$ -受体阻滞剂的较佳流动相，较佳的流动相组成比例为正己烷：四氢呋喃（80:20）。进一步考察了流动相流速对分离效果的影响，较佳流动相流速为 1.0 ml/min。

### 对今后的工作建议

①本文制备的两种新的刷型手性固定相手性选择剂的键合量有待进一步提高；②以辛伐他汀为手性选择剂的固定相反向反应虽然键合量高但拆分效果不是太理想，需进一步探讨间隔臂的键合量和杂质对其拆分效果的影响。

## 参考文献

- [1] 陆雄鹰. 纤维素类手性固定相的研制与对安息香及反-2,3-二苯环氧乙烷的分离[D]. 浙江: 浙江大学, 2006
- [2] 陈平. 高效液相色谱手性分离[D]. 兰州: 西北师范大学, 2003
- [3] 侯经国, 邓启良, 邓晓蓉等. 纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)涂敷手性固定相的制备表征及评价[J]. 色谱, 2001, 19(2): 154~156
- [4] William H B, Christopher S F. Organic Chemistry[M]. USA: Sunders College Publishing, 1998
- [5] Brocks D R, Jamali F. Stereochemical aspects of pharmacotherapy[J]. Pharmacotherapy, 1995, 15 (5): 551~555
- [6] 袁黎明手性识别材料[M]. 北京: 科学出版社, 2010, 2~3
- [7] Kitahara T, Seung-Hyun K. Synthesis of Both the Enantiomers of 4-Methyl-1-nonanol, the Sex Pheromone of the Yellow Mealworm Proceedings of the Japan Academy[J]. Ser B, 1994, 70: 181~184
- [8] Kitahara T, Seung-Hyun K, Tamogami S, et al. Synthesis of Both Enantiomers of Methyl 3-methyloctanoate, Key Component for the Scent of African Orchids and Determination of their Absolute Configuration[J]. Nat prod Lett, 1994, 5(2): 157~164
- [9] 林国强, 陈耀全, 陈新滋等. 手性合成-不对称反应及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [10] Maier N M, Franco P, Lindner W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives[J]. J Chromatogr A, 2001, 906(1-2): 3~33
- [11] 傅若农. 色谱分析概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [12] 屈海涛. 纤维素苯基氨基甲酸酯类手性固定相的合成及手性识别能力研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2010
- [13] Ikai T, Okamoto Y. Structure Control of Polysaccharide Derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography[J]. Chem Rev, 2009, 109(11): 6077~6101
- [14] Okamoto Y J. Chiral polymers for resolution of enantiomers[J]. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 2009, 47: 1731~1739
- [15] Stringham R W. The use of polysaccharide phases in the separation of enantiomers[J]. Adv Chromatogr, 2006, 44: 257~290
- [16] Franeotte E. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. J Chromatogr A, 2001, 906: 379~397
- [17] Hassan Y, Aboul E. High-Performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases[J]. J Chromatogr A, 2001, 906: 185~193
- [18] 孟磊, 袁黎明. 纤维素及其衍生物作为高效液相色谱手性固定相的研究进展[J]. 化学试剂, 2001, 23(4): 220~223

- [19] Ye Y K, Slzingham R W, Wirth M J. Origin of enhanced chiral selectivity by acidic additives for a polysaccharide-based stationary phase[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057(1/2): 75~82
- [20] 周英珍, 单文志, 王兴涌. 刷型手性固定相及其在手性化合物分离中的应用[J]. *福建分析测试*, 2007, 16(3): 49~53
- [21] Dalgliesh C. *J Chem Soc*, 1952, 137:3940
- [22] Burlingame T G, Pirkle W H. The nonequivalence of physical properties of enantiomers in optically active solvents. Differences in proton magnetic resonance spectra. II[J]. *J Am Chem Soc*. 1966, 88(18): 4294~4294
- [23] 杨柳青, 何南. 手性药物的生物转化[J]. *中国新药杂志*, 2000, 9(12): 817~820
- [24] 陈晓楠. 第二代刷型手性固定相 DNB-Leucine CSP 合成及柱填充的研究[D]. 四川: 四川大学, 2005
- [25] W H Pirkle, C J Welch, M H Hyun. A chiral recognition model for the chromatographic resolution of N-acylated l-aryl-l-aminoalkanes[J]. *J Org Chem*, 1983, 38: 5022~5026
- [26] Pirkle W H, Hyun M H. Preparation and use of hydantion-based chiral stationary phases[J]. *J Chromatogr*, 1985, 322: 309~320
- [27] W H Pirkle, M H Hyun. A chiral stationary phase for the facile resolution of amino acids, amino alcohols and amines as the N-3,5-dinitrobenzoyl derivatives[J]. *J Org Chem*, 1984, 49(17): 3043~3046
- [28] M H Hyun, PhD Dissertation[D]. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, I-L, 1984
- [29] W H Pirkle, L J Brice, Salvatore Caccamese, et al. Facile separation of the enantiomers of diethyl N-(aryl)-l-amino-l-arylmethanePhos Phonates on a rational designed chiral stationary phase[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 721: 241~246
- [30] W H Pirkle, K Z Gan. Facile and predictable means of separating the enantiomers of 5-arylhydantoins[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 790(1-2): 65~71
- [31] R Ferretti, B Gallinella, F La Torre, et al. Direct enantiomeric resolution of diphosphine and diphosphine oxide ligands by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 795(2): 289~295
- [32] C Wolf, W H Pirkle. Enantioseparations by subcritical fluid chromatography at cryogenic temperatures[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 785(1-2): 173~178
- [33] Gasparrini F, Misiti D, Villani C, et al. High-performance liquid chromatography on chiral packed microbore columns with the 3,5-dinitrobenzoyl derivative of trans-1,2-diaminocyclohexane as selector[J]. *J Chromatogr A*, 1988, 457(0): 235~245
- [34] Oi N, Kitahara H. Enantiomer separation by HPLC with some urea derivatives of L-Valine as novel chiral stationary phases[J]. *J Chromatogr*, 1986, 9: 511~517
- [35] Oi N, Kitahara H, Aoki F. Direct enantiomer separations by high-performance liquid chromatography with chiral urea derivatives as stationary phases[J]. *J Chromatogr A*, 1995, 694: 129~134
- [36] Hoffmann C V, Pell R, Lämmerhofer M, et al. Synergistic effects on enantioselectivity of

- zwitterionic chiral stationary phases for separations of Chiral Acids, Bases, and Amino Acids by HPLC[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(22):8780~8789
- [37] Hoffmann C V, Reischl R, Maier N M, et al. Stationary phase-related investigations of quinine based zwitterionic chiral stationary phases operated in anion-, cation-, and zwitterion-exchange modes[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(7):1147~1156
- [38] Tambute A, Begos A, Lienne M, et al. New chiral stationary phases containing a phosphorus atom as an asymmetric centre:I. Synthesis and first chromatographic results[J]. *J Chromatogr*, 1987, 396:65~81
- [39] 侯经国, 周志强, 陈立仁等. 高效液相色谱手性拆分中的“刷型”手性固定相[J]. *色谱* 1997, 15(3):206~211
- [40] Hesse G, Hagel R. A complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate[J]. *Chromatographia*, 1973, 6:277~280
- [41] 陈小明. 纤维素衍生物手性固定相的制备及其手性对映体分离[D]. 大连: 中国科学院研究生院, 2003
- [42] Francotte E, Wolf R M. Chromatographic resolution on methylbenzoylcellulose beads-modulation of the chiral recognition by variation of the position of the methyl-group on the aromatic ring[J]. *J Chromatogr*, 1992, 595:63~75
- [43] Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel[J]. *J Am Chem Soc*, 1984, 106:5357~5359
- [44] 秦峰. 多糖衍生物类手性固定相的制备及其在高效液相色谱和毛细管电色谱中的应用[D]. 大连: 中国科学院研究生院, 2006
- [45] Yamamoto C, Okamoto Y. Optically active polymers for chiral separation[J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2004, 77:227~257
- [46] Cai Y, Yan Z H, Lv Y C, et al. High-speed countercurrent chromatography for purification of single-walled carbon nanotubes[J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19:1345~1348
- [47] Cai Y, Yan Z H, Zi M, et al. Preparative purification of single-walled carbon nanotubes by High-Speed countercurrent chromatography[J]. *J Liq Chromatogr&Rel Tech*, 2009, 3-2(3):399~406
- [48] 童林芸. 环糊精化学[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 10
- [49] Solms J, Egli R H. Resins with inclusion chambers having cyclic-dextrin-structures[J]. *Helv Chim Acta*, 1965, 48:1225~1228
- [50] 余光艳. 环糊精型手性固定相的制备及色谱拆分与保留机理研究[D]. 漳州: 漳州师范学院, 2011
- [51] 陈立仁. 液相色谱手性分离[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 107~108
- [52] Nowik W, Tchapl A. Separation of 9,10-anthraquinone derivatives: evaluation of functionalised stationary phases in reversed phase mode[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(23):3636~3647



- [53] Armstong D W, Tang Y B, Chen S S, et al. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 1473~1484
- [54] Beesley T E, Lee J T. Method development strategy and applications update for chirobiotic chiral stationary phases [J]. *J Liq Chromatogr&Rel Tech*, 2009, 32: 1733~1767
- [55] 丁国生, 黄晓佳, 刘莺等. 硅胶键合手性配体交换色谱固定相拆分  $\alpha$ -氨基酸 [J]. *分析测试学报*, 2003, 22 (6) : 32~35
- [56] Davankov V A, Bochkov A S, Kuranov A A, et al. Dealing with the ligand-exchange chromatography: Separation of unmodified  $\alpha$ -amino-acid enantiomers by reverse phase HPLC [J]. *Chromatographia*, 1980, 13(11) : 677~685
- [57] 赵敏. 配体交换和多糖类 CSPs 手性分离性能的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2012
- [58] 霍艳敏. L-脯氨酸配体交换色谱和四唑基亲和色谱固定相的制备及色谱性能 [D]. 西安: 西北大学, 2007
- [59] Sousa L R, Sogah G D Y, Hoffman D H, et al. Host-guest complexation. 12. Total optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography [J]. *J Am Chem Soc*, 1978, 100: 4569~4576
- [60] Sogah G D Y, Cram D J. Host-guest complexation. 14. Host covalently bound to polystyrene resin for chromatographic resolution of enantiomers of amino acid and ester salts [J]. *J Am Chem Soc*, 1979, 101: 3035~3042
- [61] Behr J P, Girodeau J M, Hayward R C, et al. Molecular receptors functionalized and chiral macrocyclic polyethers derived from tartaric acid [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1980, 63 (7) : 2096~2111
- [62] Machida Y, Nishi H, Nakamura K, et al. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 805 (1-2) : 85~92
- [63] Hyun M H, Jin J S, Lee W. A new HPLC chiral stationary phase for the direct resolution of racemic quinolone antibacterials containing a primary amino group [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 1998, 19 (8) : 819~821
- [64] 张俊俊. 多糖衍生物及 Pirkle 型手性固定相的制备及分离性能 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2013
- [65] 李来生, 达世禄, 冯玉琦等. 杯芳烃在液相色谱、毛细管电泳和电色谱中的应用进展 [J]. *化学进展*, 2005, 17 (3) : 523~530
- [66] Barc M, Kaszynska M S. Preparation and evaluation of 1,3-alternate 25,27-bis-(pentafluorobenzyloxy)-26,28-bis-(3-propyloxy)-calix[4]arene-bonded silica gel high performance liquid chromatography stationary phase [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (18) : 3954~3960
- [67] Andersson L I. Application of molecular imprinting to the development of aqueous buffer and organic solvent based radioligand binding assays for (S)-propranolol [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68: 111~117
- [68] Ansell R J, Kuah J K L, Wang D Y, et al. Imprinted polymers for chiral resolution of

- (±)-ephedrine,4:Packedcolumn supercritical fluid chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases[J]. J Chromatogr A, 2012, 1264: 117~123
- [69] 欧阳睿熙. 硅胶键合刷型手性固定相的制备与应用研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2011
- [70] 王冲. 分离生物大分子液相色谱填料的合成与评价[D]. 北京: 北京化工大学, 2008
- [71] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [72] 吴海波. 类寡肽手性固定相对映选择性的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013
- [73] Bristow P A. Packing. Performance and Penneality of larger and wider liquid chromatography column and their use in preparing samples for in dentification[J]. J Chromatogr, 1978, 149: 13~28.
- [74] Ravindranath B. Principles and Practice of chromatography[M]. Ellis Horwood Limited, 1989
- [75] 徐贝佳. 高效液相色谱手性固定相法分离药物对映体[D]. 浙江: 浙江大学, 2007
- [76] 沈利斌. N-噁唑啉苯基丙烯酰胺型手性固定相的制备及其手性拆分能力研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2007

## 致谢

本论文的工作是在导师蒋登高教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验方案的确立、实验操作以及毕业论文的撰写，都得到了蒋老师认真的指导与用心的培养。蒋老师渊博的学识，在学习和科研上给予了我帮助和指导，严谨的治学态度使我养成了良好的科研习惯与态度，丰富了自己的专业知识。蒋老师的敬业精神、对学生强烈的责任感和认真的工作作风使我受益匪浅，值得我一生去学习。另外，师母李老师在我的学习和生活中也给予了很大的帮助。在此谨向蒋老师和李老师表示衷心的感谢，并祝他们二老身体健康！

同时，黄明贤老师对我论文的选题、实验方案的确立以及论文的撰写也给予了很大的帮助。在此还要感谢课题组的其他老师，他们在整个科研实验中给予了宝贵的意见。在此真诚的感谢诸位老师！

整个实验能够顺利地完成也离不开在这一期间帮助和支持我的人：李杨师兄、田俊峰师兄、白银鸽师兄、高晓强师兄、张艳伟师姐、王影师姐、黄德友、王彦举、刘娟以及朱进科师弟。在此表示深深的感谢！

最后，还要特别地感谢我的家人，在整个求学的过程中，他们不仅给予了我精神上的支持，而且在物质上更是无私的支持，是他们无私的爱、支持和理解，给了我勇气与信心，让我坚定地前行，完成自己的梦想。

回首三年时光，实验过程中的苦恼与努力和生活中的辛苦与欢乐仍历历在目，这一经历使我终身难忘。在此毕业之际，我再次向所有关心与帮助我的人表示最真挚的感谢！

## 个人简历、在校期间发表的学术论文及研究成果

李连杰，男，1986年11月出生于河南省长葛市，2011年7月于河南科技学院获得工学学士学位。

在校期间发表的学术论文及研究成果：

- 1、李连杰，李杨，黄德友等. 近红外一致性检验模型快速鉴别苯妥英钠片[J]. 海峡药学，2014, 26 (5): 51~52
- 2、李杨，李连杰，黄德友等. 新水杨酸溶出度标准片的标定与评价[J]. 中国当代医药，2014, 21 (21)
- 3、李杨，黄德友，李连杰等. 顶空气相色谱法测定苯妥英钠中有机溶剂残留量[J]. 中国药师，2014, 17 (6): 1062~1063
- 4、李杨，李连杰，黄德友等. 2012年监督抽验的247批苯妥英钠片质量评价[J]. 药品评价，2014, 11 (4): 24~26
- 5、黄德友，李杨，李连杰等. 以氨基酸为手性源的手性固定相研究进展[J]. 科学时代，2014, 3