

HPLC β -环糊精手性流动相添加剂的研究 V. 甲基 β -环糊精动态覆盖手性色谱固定相模型的提出^{*}

梁宏 D. G. Durham¹

(中国药科大学分析计算中心, 南京 210009; ¹ 罗伯特·戈登大学药学院, 英国阿伯丁 AB9 1FR)

摘要 在关于环糊精在色谱固定相吸附研究和在流动相中与对映体分子手性选择性包含研究的前期工作的基础上, 本文提出了一个新的基于环糊精手性选择性包含机理的动态覆盖手性固定相色谱容量因子的数学模型。此模型除可描述环糊精动态覆盖手性固定相的色谱行为外, 还可作为环糊精手性固定相及流动相添加剂的通用数学模型。

关键词 动态覆盖手性固定相; 甲基 β -环糊精; 容量因子; 数学模型; 包含; 手性分离

对于环糊精流动相添加剂的色谱系统的研究已有文献报道^[1~3], Zukowski 等人发现 β -环糊精的一些甲基化衍生物具有动态覆盖在固定相表面形成手性固定相^[2]。此后, 用动态覆盖手性固定相的方法进行手性分离已成为环糊精在手性色谱分离应用中的重要方面^[4,5]。文献提出了 β -环糊精甲基衍生物动态覆盖手性固定相的色谱模型^[2]如下(图 1)。

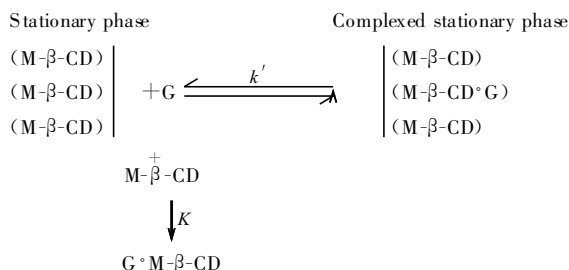


Fig 1. The equilibria system existing in methylated β -cyclodextrin dynamically coated chiral stationary phase proposed in reference^[2].

其中 $M-\beta-CD$ 代表甲基 β -环糊精, G 代表可被环糊精包含的客体分子, $G \cdot M-\beta-CD$ 为包含物, K 为包含稳定常数, k' 为色谱容量因子。对于这样一个色谱体系, 文献^[2]比照由胶束液相色谱中推导出的公式, 提出用下式来描述其容量因子 k' 与流动相中甲基 β -环糊精的浓度 $[M-\beta-CD]$ 的关系:

$$\frac{1}{k'} = A \cdot [CD] + \frac{1}{B} \quad (1)$$

其中 A 、 B 均为常数。实际上, 用公式(1)是不能正

确描述甲基化 β -环糊精动态覆盖手性固定相体系的。除了公式(1)中的 A 、 B 常数的物理化学意义不明确之外, 还有以下问题:

(1)图 1 中未能反映出甲基 β -环糊精与固定相之间的相互作用。实际上甲基 β -环糊精并非像图 1 中描述的那样完全覆盖了固定相的表面, 而是与固定相表面之间存在着吸附-解吸附的平衡。这已由前期研究工作所证明^[6]。

(2)根据公式(1), k' 与 $[M-\beta-CD]$ 只是单纯的倒数关系, $k' - [M-\beta-CD]$ 曲线不会有任何拐点, 但这与文献^[2]中的实际情况是不相符的。

(3)由于覆盖在固定相上与流动相中的甲基 β -环糊精对对映体的手性流出顺序的影响是相反的, 公式(1)不能反映动态覆盖在固定相表面甲基化 β -环糊精对容量因子的贡献, 因而不能很好地解释文献^[2]中随流动相中甲基化 β -环糊精浓度的增加而出现的手性流出顺序改变的现象。

本文在前期研究的基础上, 提出了一个新的甲基 β -环糊精动态覆盖手性色谱固定相的数学模型^[7], 很好地解决了上述问题并已用二甲 β -环糊精进行了验证。

1 模型的提出

文献证明了甲基 β -环糊精具有在固定相表面吸附的性质并测定了其吸附等温线^[5,6]。因此可以假设, 覆盖有甲基 β -环糊精的固定相(假设为

ODS)的表面可以划分为两部分:被甲基 β-环糊精包含覆盖部分和未被覆盖的裸露的固定相本身部分。

定义覆盖率为 τ

$$\tau = \frac{S_{CD}}{S_T} \tag{2}$$

S_{CD} 为被甲基 β-环糊精覆盖了了的固定相表面的面积, S_T 为固定相的总表面积。

$$S_T = S_{CD} + S_{ODS} \tag{3}$$

S_{ODS} 为未被甲基 β-环糊精覆盖的 ODS 固定相的表面积。

相应地, 总保留体积 V_T 也假设由两部分组成: V_{CD} : 由甲基环糊精覆盖了了的固定相产生的保留体积; 和 V_{ODS} : 由未被覆盖的 ODS 固定相产生的保留体积。因此可得下列 3 式:

$$V_T = V_{CD} + V_{ODS} \tag{4-1}$$

$$V_{OT} = V_{0CD} + V_{0ODS} \tag{4-2}$$

$$V'_T = V'_{CD} + V'_{ODS} \tag{4-3}$$

其中 V' 为有效保留体积, V_0 为死体积。应当注意到, 由于柱效的关系, $\tau = V_{CD}/V_T$ 或 $\tau = V'_{CD}/V'_T$ 都是不成立的。但式(5-1)、(5-2)是合理的, 因为死体积是与柱效无关的。

$$\tau = \frac{V_{0CD}}{V_{OT}} \tag{5-1}$$

或
$$1 - \tau = \frac{V_{0ODS}}{V_{OT}} \tag{5-2}$$

按定义, 总定量因子 k'_T 可由式(6)表示

$$\begin{aligned} k'_T &= \frac{V'_T}{V_{OT}} \\ &= \frac{V'_{CD} + V'_{ODS}}{V_{OT}} \\ &= \frac{V'_{CD}}{V_{OT}} + \frac{V'_{ODS}}{V_{OT}} \\ &= \frac{\tau \cdot V'_{CD}}{V_{0CD}} + \frac{(1 - \tau) \cdot V'_{ODS}}{V_{0ODS}} \\ &= \tau \cdot k'_{CD} + (1 - \tau) \cdot k'_{ODS} \end{aligned} \tag{6}$$

由式(6)明显可见, 此色谱体系的保留行为由两部分构成: 在甲基 β-环糊精完全覆盖所形成的手性固定相上的保留 k'_{CD} 和在未覆盖的固定相上的保留 k'_{ODS} 。其情形恰似两根色谱柱串联在一起使用的情况, 但这两根色谱柱的总长度是固定的, 而其两根色谱柱各自的长度受 T 的影响而变化, 其占总长度的比例分别为 τ 和 $1 - \tau$ 。 τ 的改变不会影响到 k'_{CD} 和

k'_{ODS} 值, 因为容量因子不受柱长的影响。

在未被覆盖的 ODS 固定相上的保留行为实质上是与没有环糊精吸附现象的环糊精流动相添加剂的色谱系统中的保留行为是一样的。参照环糊精流动相添加剂的色谱模型^[1,8], 可用下面的图 2 来描述在未被覆盖的 ODS 固定相部分所涉及的平衡。

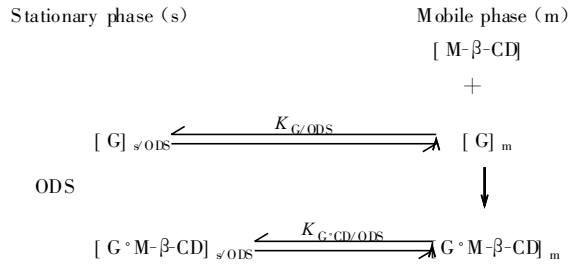


Fig 2. The equilibria system existing in the uncoated part on ODS surface with methylated β-cyclodextrin in the mobile phase.

其中 $K_{G/ODS}$ 和 $K_{G \cdot CD/ODS}$ 分别代表客体分子及其环糊精包合物在流动相中与在未被覆盖的 ODS 固定相之间的平衡常数。则

$$K_{G/ODS} = \frac{[G]_{(s/ODS)}}{[G]_m} \tag{7-1}$$

$$K_{G \cdot CD} = \frac{[G \cdot CD]_{(s/ODS)}}{[G \cdot CD]_m} \tag{7-2}$$

$$K = \frac{[G \cdot CD]_m}{[G]_m \cdot [CD]_m} \tag{7-3}$$

由容量因子的定义, k'_{ODS} 为 G 在未被覆盖的 ODS 固定相部分上的总量与其在流动相中的总量的比值。

$$\begin{aligned} k'_{ODS} &= \frac{C_{G(s/ODS)}}{C_{Gm}} \\ &= \frac{[G]_{(s/ODS)} + [G \cdot CD]_{(s/ODS)} \cdot \Phi_{ODS}}{[G]_m + [G \cdot CD]_m} \end{aligned} \tag{8}$$

HODS 为相比(即固定相与流动相体积比)。按定义又可得 G 与其环糊精包合物 $G \cdot M-\beta-CD$ 的容量因子分别为:

$$K'_{G/ODS} = \frac{[G]_{(s/ODS)}}{[G]_m} \cdot \text{HODS} = K_{G/ODS} \cdot \Phi_{ODS} \tag{9-1}$$

$$\begin{aligned} K'_{G \cdot CD/ODS} &= \frac{[G \cdot CD]_{(s/ODS)}}{[G \cdot CD]_m} \cdot \Phi_{ODS} \\ &= K_{G \cdot CD/ODS} \cdot \Phi_{ODS} \end{aligned} \tag{9-2}$$

将式(9)和式(7-3)代入式(8), 可得到式(10)

$$k'_{ODS} = \frac{k'_{G/ODS} + k'_{G \cdot CD/ODS} \cdot [CD]_m}{1 + K \cdot [CD]_m} \tag{10}$$

在此要特别明确的是,应当将客体分子的环糊精包合物 $G \cdot CD$ 在 ODS 固定相表面的吸附与客体分子被覆盖在 ODS 固定相表面的环糊精所包含区分开来。

图 2 的 $[M-\beta-CD]_{s/ODS}$ 及式(10)中的 $k'_{G \cdot CD/ODS}$ 属客体分子的环糊精包合物在 ODS 固定相表面的疏水性吸附;而涉及本身吸附(或覆盖)在固定相表面的甲基环糊精与客体分子的包含将在下面予以讨论。

对于表面已为甲基 β -环糊精所饱和覆盖固定相部分所涉及的平衡体系,可由图 3 来表述。

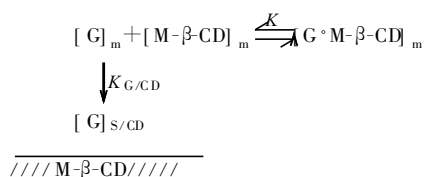


Fig 3. The equilibria system existing in the methylated β -cyclodextrin covered stationary phase with methylated β -cyclodextrin in the mobile phase.

其中 K 的表述与式(7-3)相同,另有

$$\begin{aligned}
 k' &= \frac{\tau \cdot k'_{G/CD}}{1 + K \cdot [CD]_m} + \frac{(1 - \tau) \cdot (k'_{G/ODS} + k'_{G \cdot CD/ODS} \cdot K \cdot [CD]_m)}{1 + K \cdot [CD]_m} \\
 &= \frac{\tau \cdot k'_{G/CD} + (1 - \tau) \cdot (k'_{G/ODS} + k'_{G \cdot CD/ODS} \cdot K \cdot [CD]_m)}{1 + K \cdot [CD]_m}
 \end{aligned} \quad (15)$$

2 讨论

1)式(15)为甲基 β -环糊精动态覆盖手性固定相的容量因子的数学模型。其中包括了所有在此色谱体系中所涉及的化学(色谱)平衡常数。甲基 β -环糊精与固定相之间的作用没有直接以常数的形式反映出来,而以覆盖率 τ 的形式表现出来。 τ 的变化不影响式(15)中的各常数而只影响两种保留行为[式(10)和式(14)]在总保留行为中所起作用的比率。

2)实质上,覆盖率 τ 是甲基 β -环糊精在固定相上吸附等温线的一种表达,在一定的色谱条件下, τ 的大小由流动相中甲基 β -环糊精浓度控制。由于篇幅的限制,覆盖率的计算及式(15)的实验验证将在后续文献中报道。

3)由式(15)可见,当 τ 值为零时(表示甲基 β -环糊精不在固定相表面吸附),不能产生动态覆盖手性固定相,其保留机理也就应与单纯的环糊精流

$$K_{G/CD} = \frac{[G]_{s/CD}}{[G]_m} \quad (11)$$

按定义有

$$k'_{CD} = \frac{[G]_{(s/CD)}}{[G]_m + [G \cdot CD]_m} \cdot \Phi_{CD} \quad (12)$$

同样,

$$k'_{G/CD} = \frac{[G]_{(s/CD)}}{[G]_m} \cdot \Phi_{ODS} = K_{G/CD} \cdot \Phi_{CD} \quad (13)$$

将式(13)和式(7-3)代入式(12),可得

$$\begin{aligned}
 k'_{CD} &= \frac{k'_{G/CD} \cdot [G]_m}{[G] + K \cdot [G]_m \cdot [CD]_m} \\
 k'_{CD} &= \frac{k'_{G/CD}}{1 + K \cdot [CD]_m}
 \end{aligned} \quad (14)$$

至此,已分别完成了对未被覆盖的固定相部分的保留行为[式(10)]和甲基 β -环糊精饱和覆盖了的固定相部分的保留行为[式(12)]的表述。将式(10)与式(14)代入式(6),可得甲基 β -环糊精动态覆盖手性固定相的容量因子的数学模型:

动相添加剂的情形一样^[1]。将 $\tau = 0$ 代入式(15)可得到式(10),其数学模型表达完全与单纯的环糊精流动相添加剂一致。当固定相表面完全为甲基 β -环糊精所包含覆盖时 $\tau = 1$, 将其代入式(15)可得式(14),其情形相当于同时使用环糊精固定相和环糊精流动相添加剂。将式(14)等式两边取倒数可得式(16):

$$\frac{1}{k'_{CD}} = \frac{1}{k'_{G/CD}} + \frac{K \cdot [CD]_m}{k'_{G/CD}} \quad (16)$$

将式(16)与式(1)相比较可以得出式(1)中 A、B 常数的化学物理意义,同时可以证明式(1)只有在甲基 β -环糊精包含覆盖($\tau = 1$)的情况下才能成立。若此时流动相添加剂浓度为零($[CD] = 0$),而 τ 值仍为 1,则 $k' = k'_{G/CD}$,相当单纯用环糊精固定相的情形了。因此式(15)可被视为是一个通用的数学模型,当 τ 和 $[CD]$ 满足一定取值条件时,此模型可推广应用于解释环糊精固定相及流动相添加剂的保留行为。

4)式(16)可以解释实际色谱过程中出现的 k' -[M- β -CD] 曲线具有拐点和分析物的手性流出顺序会随流动相中[M- β -CD] 增加而发生变化的现象。因而比现有文献[1] 所用的模型[式(1)] 更为准确地描述甲基 β -环糊精动态覆盖手性固定相的色谱行为。

参 考 文 献

1 Sybilska D, Zukowski J. Chapter 7. Cyclodextrin additives. In: Krstulovic AM. *CHIRAL SEPARATIONS BY HPLC applications to pharmaceutical compounds*. Chichester: Ellis Horwood Limited. 1989, 147174

2 Zukowski J, Sybilska D, Bojarski J. Application of α - and β -cyclodextrin and heptakis (2, 6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin as mobile phase components for the separation of some chiral barbiturates into enantiomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1986, **364**: 225

3 Horvth C, Melander W, Melander J. *et al.* Measurement of association constants for complexes by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr.*, 1980, **26**: 371

4 Pawlowska M, Zukowski J. Dynamic generation of chiral stationary phase in HPLC systems. *J High Res Chromatogr C &C*, 1991, **14**: 138

5 Zukowski J, Nowakowski R. Dynamically generated chiral stationary phase systems with β -cyclodextrin derivatives. *J Liq Chromatogr.*, 1989, **12**(9): 1545

6 Liang HX, Durham DG. An investigation of β -cyclodextrin chiral mobile phase Additive in HPLC. I The adsorption of β -cyclodextrin and its methylates derivative onto ODS stationary phase. 中国药科大学, 1997, **28**(1): 31

7 Durham DG, Liang H. The behaviour of dimethyl- β -cyclodextrin as a mobile phase additive for chiral discrimination in reversed phase HPLC. *J Pharm Pharmacol.*, 1994, **46**(suppl)

8 梁宏, Durham DG. HPLC β -环糊精手性流动相添加剂的研究 III β -环糊精手性选择性包含稳定常数的简化计算及验证. 中国药科大学学报, 19997, **28**(4): 218

The Investigation of β -Cyclodextrins as Chiral Mobile Phase Additive in HPLC V. A Proposal of a Mathematical Model for a Dynamically Coated Chiral Stationary Phase with Methylated β -cyclodextrin

Liang Hongxi, DG Durham¹

The Analytical and Computer Centre, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009,
¹Schools of Pharmacy, The Robert Gordon University, Aberdeen U.K. AB9 1FR

Abstract On the basis of previous works for the research of the adsorption of cyclodextrins onto the stationary phase and of the enantioselective inclusion complexation in the mobile phase, a new mathematical model of the capacity factor in the dynamically coated chiral stationary phase, which is based on a mechanism of near-tioselective inclusion complexation by cyclodextrin, was proposed. Besides being used for describing the chromatographic behaviour for the cyclodextrin dynamically coated chiral stationary phase, this model can be also used as a general model for both cyclodextrin chiral stationary phase and mobile phase additive. The experimental verification for this model will be reported in a separated paper.

Key words Dynamically coated chiral stationary phase; Methylphenobarbitone; Capacity factor; Mathematical model; Inclusion complexation; Chiral separation