

# 薄层色谱法拆分几种 $\beta$ -受体阻滞剂药物的研究

## 应用化学专业

研究生 董海英

指导老师 梁冰

许多药物或生理上非常重要的化合物都是手性的，这些化合物的光学异构体在药理上有较大的差异，在某些情况下，其光学异构体也许会产生难以预料的副作用。因此，为提高药物活性，降低副作用以及指导药物生产和质量控制，提供光学纯化合物已成为生物化学和药理学的一个重大课题。1992 年 FDA 发布了手性药物指导原则，要求所有在美国上市的消旋体新药，均需提供详细报告，说明药物中所含对映体各自的药理作用、毒性和临床效果。因此，外消旋手性药物的拆分非常重要。

本文详细分析了手性拆分技术的发展趋势，综述了现有的手性拆分方法，分析了各种方法的利弊。深入研究了 D-10-樟脑磺酸铵作为薄层色谱流动相手性离子对添加剂拆分盐酸普萘洛尔对映体，通过单因素实验考察了展开体系、温度、预饱和时间、pH、手性离子对试剂浓度以及湿度等的影响，得到了拆分的最佳色谱条件；采用  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法拆分了盐酸普萘洛尔，并对拆分的流动相组成、配比和手性选择体固载量进行了考察，优化了分离条件，得到了拆分的最佳条件，并初步探讨了  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法拆分盐酸普萘洛尔的机理。

同时研究了 D-10-樟脑磺酸铵作为薄层色谱流动相手性离子对添加剂拆分酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体，讨论了展开体系、温度、预饱和时间、pH、手性离子对试剂浓度以及湿度对拆分的影响，分别得到了酒石酸美托洛尔和阿替洛尔的最佳分离条件；也深入讨论了  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法拆分酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体的条件如：展开体系，温度和手性选择体固载量等。

**关键词：**手性药物，拆分，手性离子对添加剂， $\beta$ -环糊精，薄层色谱，机

理, 普萘洛尔, 美托洛尔, 阿替洛尔

# Studies on the enantioseparation of several $\beta$ -receptor blocking drugs by TLC

Major: Applied chemistry

Postgraduate: Dong hai ying

Supervisor: Liang bing

Many drugs or necessary-physiological compounds are chiral, and the optical isomers of these compounds are very different in physiology, in some cases, perhaps the optical isomers have unexpected side-effects. So, in order to improve drug activity, decrease side-effect and process drug manufacturing and quality controlling, supplying optically pure compounds has become an important subject in biochemistry and pharmacology. Guidelines of chiral drugs, which was published by FDA in 1992, demanded that detailed reports of racemic new drugs should be provided before entering the market in USA, which should prove physiology effects, toxicity and clinical results of isomers in drugs. In a word, the enantioseparation of racemic drugs is very important.

The trend of development of chiral techniques was analyzed, and the forthcoming chiral separation methods and their advantages and disadvantages were reviewed detailedly in this paper. The enantioseparation of propranolol by TLC using D-10-camphor ammonium sulfonate as chiral ion-pair agent in the mobile phase was studied in depth. The effects of the mobile phase, temperature, pre-saturation time, pH, the concentration of ion-pair agent and humidity on separation were investigated by single-factor experiments, and the optimal chromatographic conditions were concluded; Secondly, resolution of propranolol hydrochloride enantiomers using  $\beta$ -cyclodextrin impregnated thin-layer chromatography was studied synchronously, the

makeup of the mobile phase and quantity of the impregnated chiral selectors were studied, the conditions of separation were optimized, then concluded the optimal conditions of separation.

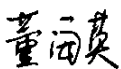
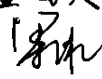
In the meantime, we studied the enantioseparation of metoprolol and atenolol by TLC using D-10-camphor ammonium sulfonate as chiral ion-pair agent in the mobile phase, discussed the effects of the mobile phase, temperature, pre-saturation time, pH, the concentration of ion-pair agent and humidity on separation, and concluded respectively the optimal separation conditions of metoprolol and atenolol; we also discussed the conditions of resolution of metoprolol and atenolol enantiomers using  $\beta$ -cyclodextrin impregnated thin-layer chromatography, such as the makeup of the mobile phase, temperature and quantity of the impregnated chiral selectors etc.

**KEY WORDS:** chiral drugs, resolution, chiral ion-pair agent,  $\beta$ -cyclodextrin, thin-layer chromatography, mechanism, propranolol, metoprolol, atenolol

## 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的，论文成果归四川大学所有，特此声明。

研究生签名   
导师签名   
2006 年 5 月

# 1 前言

## 1.1 手性与手性药物

手性的概念与不对称密切相关<sup>[1]</sup>。从原子到人都是不对称的,如人的左手和右手不能重叠,互为镜像;自然界存在的糖都是D-型的;氨基酸是L-型;蛋白质和DNA是右旋的;海螺的螺纹和缠绕植物都是右旋的。因此,我们的世界是不对称的,即手性是宇宙间的普遍特征,是自然界的本质属性之一。

如果有机化合物分子中的一个碳原子连接了4个不相同的原子或基团,则该化合物没有任何对称因素(如对称中心、对称面等),将有两个互为实物——镜像关系的对映体,于是该分子就具有手性,称为不对称分子。与四个不相同的原子或基团相连的碳原子称为手性碳原子或不对称碳原子。不对称C原子是最常见的手性原子。除此之外,S, N, P, B也可形成稳定的手性中心。此外,一些具有手性轴或手性面的分子(例如丙二烯型、联苯型或提篮型旋光化合物分子)或金属有机化合物分子(例如二茂铁衍生物)也是手性的<sup>[2,3]</sup>。旋光性不同的对映体在其名称前附加符号(+)-或d-,表示右旋;而附加符号(-)-或l-,则表示左旋。

手性是自然界普遍存在的现象,它与我们日常生活关系密切<sup>[4]</sup>。手性化合物在非手性环境中具有相同的性质,而在手性环境中则性质不同。虽然右旋和左旋异构体之间的原子排列只存在微小的差别,但人类新陈代谢由一系列相互衔接的化学反应组成,从分子水平来看,手性代表着生命过程中最本质的性质。氨基酸具有手性、小分子糖具有手性、多肽具有手性、蛋白质具有手性、多糖也具有手性,从而生物系统中不同的手性体在代谢与调节过程中具有明显不同的生理活性。而在药物领域里,含有手性中心的药物,称之为手性药物。当药物存在对映体时,其药性与药物分子的立体构型有密切关系。在手性药物进入生物体内后,由于人体细胞或身体可辨别出这种差别,且常常只能利用其中一种异构体(例如酵母只能使左旋葡萄糖发酵,人体内细胞也只能利用左旋氨基酸来制造蛋白质),故代谢途径和药理作用常常不同,生物活性和药效、毒副作用等也存在显著差异。近年临床实践反复证实了这一点,即:一种立体异构体有药效,而另一种则药效很小,甚至完全没有药效或有相反的药效。在药理研究

上<sup>[5]</sup>，将活性最高的立体异构体叫作 eutomer，而活性最低的异构体称为 distomer(希腊语，eu = good, Dis=bad)。在许多情况下，distomer 不但本身没有药效，还会部分抵消 eutomer 的药效，有时还会产生有毒的代谢产物或引起严重的副作用。

具体可从以下临床研究实例来说明<sup>[5,6]</sup>：

(一) 手性药物分子两种对映体的具有相同药效，但差别很大。

非巴比妥类静脉麻醉药依托咪酯(Etomidate, 甲苄咪唑)结构中含有手性碳原子，仅右旋体有效；广谱抗生素治疟药氯霉素，其 D-(-)-异构体具有杀菌作用，而 L-(-)-异构体则完全没药效；酮咯酸(Ketorolac)镇痛活性是阿司匹林的 800 倍，且消炎活性强于萘普生，其 S-异构体的消炎作用和镇痛作用较 R-异构体强 10 倍和 230 倍；倍他罗定( $\beta$ -Prodine)的镇痛作用约为阿法罗定( $\alpha$ -Prodine)的 6 倍；右旋丙氧酚(Propoxyphene, 达尔丰)是成瘾性很小的镇痛药，适用于由慢性疾病引起的疼痛，而左丙氧酚为一镇咳药。

(二) 手性药物分子两种对映体的药效相反。

哌西那朵(Picnadol)是具有独特混合作用的新型苯哌啶镇痛药，既有阿片激动活性，又有拮抗性，其(+)-异构体为激动剂，(-)-为拮抗剂。

(三) distomer 或其代谢产物有毒或引起严重副作用。

最典型的例子是“反应停”<sup>[7-9]</sup>(沙利度胺, Thalidomide)。20 世纪 50 年代中期，德国 Chemie Grunen Thal 公司以消旋体上市 Thalidomide，作为镇痛剂用于预防孕妇的恶心。1961 年发现，怀孕后 3 个月服用此药可引起胎儿的海豹畸形。据统计，由“反应停”致畸的案例，全世界达 17000 例以上，是 20 世纪最大的药害事件。1979 年，德国波恩大学研究人员对该药物进行了拆分，发现是 S 型对映体具有致畸作用，而只有 R 型对映体具有镇痛作用。惨痛的教训使人们认识到，药物必须注意他们不同的构型。

同样，在农药和除草剂、杀虫剂杀菌剂等领域，手性化合物由于具有对映体选择效应以及不同的生物降解速度而被关注，调味剂、香料、营养品等与人们日常生活息息相关的化学产品也受到重视。在处理有生物活性的物质如维生素、信息素、辅酶、药物产品以及一般天然存在的手性化合物时，对映体的分离和分析都是最重要的问题。总之，所有相关领域都开始关注手性化学这个主

题。

## 1.2 手性拆分的提出和意义

在药物领域,据调查目前市场销售与临床应用的化学合成药物中,有 75% 以上是外消旋体药物,即为两种光学异构体的等量混合物。为了用药安全有效,对手性化合物的各个异构体分别进行考察,了解其各自的生理活性是很有必要的。1992 年美国食品与药物监管局(FDA)的药物评价与研发中心(CDER)公布<sup>[10]</sup>了光学活性药物的发展纲要,要求新药的使用说明中必须明确量化每一种对映异构体的药效作用和毒理作用,并且当两种异构体有明显药效和毒理作用差异时,必须以光学纯药品形式上市。因此,手性药物的分离和鉴定在药物分析中就占有极其重要的地位,以便对药物进行质量控制,并为药物的药理、毒理研究提供分析手段。

FDA 的决定大大促进了手性药物的研制和开发,使得世界药物市场中的药物销售类型发生了巨大的变化,手性药物的销售额正以迅猛的势头不断增长<sup>[11]</sup>: 1993 年世界市场上出售的单一对映体形式的药物比 1992 年增长了 22%,而 1994 年又比 1993 年增长 27%,达 452 亿美元。现用于临床的原料药世界上总共有 3500 种~4000 种,其中约 50%是合成药物。在合成药物中,又约有 40%是外消旋体,而外消旋体合成药物在目前仍主要以外消旋体在临床使用。

总之,制备旋光纯手性对映体是非常重要的。因为:

- (1)不同的对映体具有不同的药理作用;
- (2)不同的对映体具有不同的生物活性;
- (3)FDA 严格提出了手性药物需制备成单体的原则;
- (4)与人们生活息息相关的化学品因具有手性,从而具有对映体选择效应以及不同的生物降解速度;
- (5)要研究和利用有生物活性的立体化合物异构体,也要获得对映体纯的手性化合物。

通过一般的化学反应来制备某种物质时,往往会得到左旋、右旋两种光学异构体各占一半的混合物。研究不对称合成技术耗费资金较大,手性合成虽可直接得到纯度较高的光学纯物质,但其产率普遍较低,且不易实现。相反,若



采用恰当的手性拆分技术, 就可以得到较高产量的对映异构体, 分离手性化合物从而得到单一旋光体是目前制备单一对映体最有效的方法, 手性拆分技术也就应运而生。

目前已经开发的制备对映纯化合物的方法, 主要有以下几种<sup>[5, 12-17]</sup>:

- (1)从天然光活性产物中获得, 这种天然来源即“手性池”(Chiral pool);
- (2)由天然手性化合物经化学改造成;
- (3)外消旋体化学拆分法。即用一种手性试剂把外消旋体混合物中的两个对映体转变成非对映异构体, 然后利用两种非对映体异构体的物理性质差异, 将其分开;
- (4)外消旋体生物拆分法。即用微生物(或酶)选择性地将两对映体之一转变成另一对映体化合物, 达到分离目的;
- (5)色谱分离法。即利用手性色谱柱直接分离对映体, 或由非手性色谱柱间接分离非对映异构体。目前主要的色谱拆分方法有气相色谱法(Gas Chromatography; GC)、液相色谱法(Liquid Chromatography; LC)、毛细管电泳(Capillary Electrophoresis; CE)、超临界色谱法(Supercritical Fluid Chromatography; SFC)、平面色谱法(Plain Chromatography)等等;
- (6)动力学拆分;
- (7)不对称合成。

随着对手性化合物研究和认识的不断深入, 人们对单一手性物质的需求量越来越大, 对其纯度的要求也越来越高。研究发展低成本、高效率的手性技术的重要性日益凸现, 为广大医药工业领域的研究者带来了巨大的挑战和机遇。广阔的应用前景和巨大的市场发展推动了探索新的更有效的获得单一手性化合物方法的研究。

### 1.3 主要的手性拆分技术及其研究进展

手性拆分技术主要包括: 结晶拆分法<sup>[2]</sup>、化学拆分法、动力学拆分法、酶拆分法、膜拆分法、色谱拆分法等。

### 1.3.1 结晶拆分法

#### (1)晶体机械拆分法(直接结晶拆分法)

如果对映体以晶体形式析出,并且不同构型对映体晶体有明显差异,则可借助于放大镜,将对映体晶体分别拣出,达到拆分的目的,此即机械拆分法。1848年,Louis Pasteur 用放大镜和镊子成功地分离了酒石酸钠铵盐的外消旋体,这项先驱性工作标志着手性分离的开始。

本方法由于比较繁琐,只能应用在两种对映体晶体可以被看出区别的那些外消旋体混合物,所以应用面较窄,不利于推广。

#### (2)接种结晶拆分法

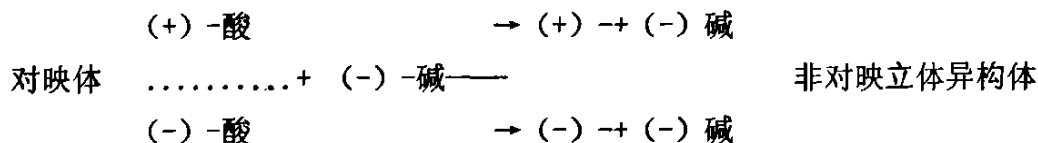
向外消旋体中加入某一对映体的微晶,该构型的对映体就可以优先结晶出来,且结晶量远大于种晶量。将晶体滤出后,滤液中就含有过量的另一对映体,将滤液升温后,加入外消旋体,冷却,接着放入含量较多的对映体的种晶,从而使该对映体自外消旋体混合物中析出。这种拆分方法只需要2种对映体的少量晶种即可完成。倘若外消旋体化合物比其对映体的溶解度大,那么也可以用任一纯对映体晶体接种,而使该对映体自外消旋化合物的饱和溶液中析出。

如果没有纯的对映体,还可考虑采用别的旋光化合物晶体做晶种来进行结晶拆分,这是近年来发展的所谓“干扰结晶拆分法”。如在外消旋的谷氨酸、酥氨酸、天门冬氨酸胺饱和溶液中分别加入少许的S-赖氨酸、S-谷氨酸、S-天门冬氨酸,使R-谷氨酸、R-酥氨酸、R-天门冬氨酸胺先结晶析出。

接种结晶拆分法工艺比较简单,成本相对较低,效果也较好。但合适的溶剂配比需要很多的探索实验来获得,操作时的投料量和温度等控制要求也相当严格。

### 1.3.2 化学拆分法

如果外消旋体分子含有如羧基、氨基、羟基和双键等某些活性基团,可让其与某一旋光活性化合物进行反应,生成两种非对映异构体,然后利用非对映异构体物理性质主要是溶解度上的差别,将2个非对映异构体分开<sup>[18, 19]</sup>。



本方法主要用于酸碱拆分，天然的麻黄碱、酒石酸、喹啉、樟脑磺酸等都是常用的拆分试剂。在羟基化合物和双键化合物的分离中，还可用手性试剂与金属离子形成的配位化合物做拆分试剂。

### 1.3.3 动力学拆分法

1858 年, Pasteur 发现用灰绿青霉霉发酵消旋酒石酸铵时, 右旋对映体的代谢要比左旋体快, 以此进行分离, 可得到光学活性化合物, 这大概是化学史上第一个动力学拆分例子, 又称经典动力学拆分 (Classical kinetic resolutions, CKR)。这种方法最大限制是, 最多只可能得到 50% 的理论产量。由于经济和环境的影响, 人们不仅仅需要生产高纯度的对映体, 也需要提高生产的理论产量, 在此条件下, 出现了动态动力学拆分<sup>[20]</sup> (Dynamic Kinetic Resolutions, DKR)。一个动态动力学拆分要想得到较高的 e.e. 值, 其反应选择性必须很高, 一般只有酶才有这样好的选择性, 从而将拆分技术引入了酶拆分<sup>[21]</sup>方法的研究。

### 1.3.4 酶拆分法

利用微生物的活细胞所含的酶或自细胞中分离出来的酶进行手性化合物的拆分即所谓酶拆分法<sup>[22]</sup>。酶拆分的独特作用是由于它们由 L-氨基酸组成, 其活性中心构成了一个不对称环境, 有利于识别外消旋体。在一定条件下, 酶可以催化 dl-体中的一个对映体发生某个反应成为不同的化合物, 从而使两个对映体彼此分开。一般而言, 适合拆分的酶应具有广泛的底物选择性、价格低、对拆分的酸碱环境以及有机溶剂耐受力强等特点。

Jeffrey H<sup>[23]</sup>等利用酶拆分了环氧卤丙烷, S Joly<sup>[24]</sup>等也对  $\beta$ -羟基酮进行了酶拆分研究。我国科研工作者也在相关领域作出了贡献<sup>[25-27]</sup>。

### 1.3.5 膜拆分法

手性拆分膜技术主要包括手性拆分液膜和手性拆分固膜两种<sup>[28, 29]</sup>。作为一种低能耗和易于工业放大的手性拆分技术,近年来随着单一手性物质需求的日益增长而得到了广泛的关注。

#### (1)液膜拆分法

主要分为支撑液膜法、乳化液膜法、厚体液膜法。

在支撑液膜中,具有手性选择能力的载体溶解于一定的液体溶剂之中,通过与某个对映异构体特异性的结合,将其从上相运输到下相,从而实现手性分离,具有只需少量手性选择剂的优点<sup>[30-32]</sup>。通常用于手性拆分的支撑液膜是将膜液(溶剂和手性选择剂)通过毛细管力吸附在多孔固体膜(液体的支撑膜)的孔道中,故又称为浸渍式液膜。

乳化液膜又称液体表面活性剂膜,是一种复乳。内相和外相是相溶的,而它们与膜相则互不相溶。膜相通常含有表面活性剂、萃取剂(载体)、溶剂与其他添加剂以控制液膜的稳定性、渗透性和选择性。也具有传输速度快、对极性溶剂容量大的优点,且由于表面活性剂的稳定效应,受表面活性介质破坏的影响较小,相对支撑液膜过程更稳定<sup>[33, 34]</sup>。

厚体液膜采用一层相对较厚的不混溶的流体将料液相与接收相分开,膜相不需支撑,而借助不可混溶性与其它相分开<sup>[35]</sup>。

Coelhoso<sup>[36]</sup>等研究了液膜拆分的机制,并建立了液膜拆分的模型。

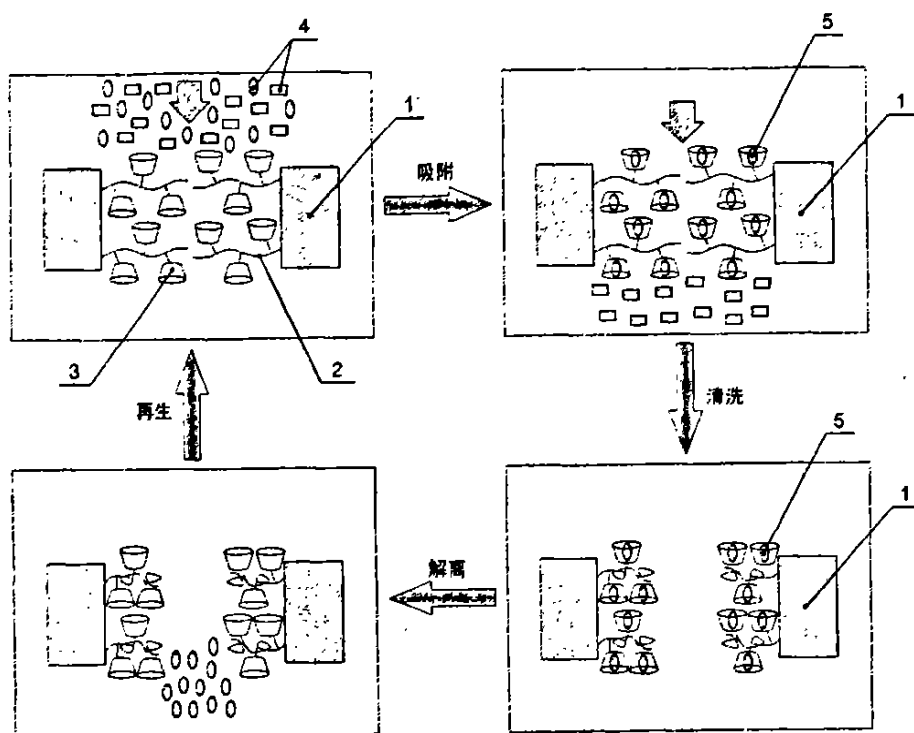


图 1.1 膜拆分图示 (专利号: CN1431035A)

## (2) 固膜拆分法

分为选择扩散型手性固膜法和选择吸附型手性固膜法。而选择扩散型手性固膜法又包括了具有手性选择性并能自身支撑的高聚物固膜<sup>[37]</sup>、由不能自身支撑而具有手性选择性的高聚物<sup>[38]</sup>和非选择性支撑层组成的非对称复合固膜<sup>[39]</sup>；选择吸附型手性固膜包括了采用接枝或浸渍等方法将手性选择剂固定在多孔基材上的手性固膜<sup>[40]</sup>、将环糊精等手性选择剂混合溶解于制膜液而制成的无孔高分子手性膜<sup>[41]</sup>、采用分子印迹技术制备的具有手性识别功能的高分子膜<sup>[42]</sup>。

## 1.3.6 色谱拆分法

色谱法是目前最常用的手性拆分方法，可采用两种主要途径即直接法和间接法实现拆分。

所谓间接法，即将对映体与纯的手性试剂反应，生成两个非对映异构体，然后用常规色谱方法分离。该方法分离的是对映体的衍生物而不是原对映体，

涉及非对映异构体的形成。间接法的优点是:可使用价格便宜,柱效高的非手性柱(如 ODS 柱);可选用具有各种发色团或较强荧光发射基团的手性试剂。不足之处有:对映体必须含有能与手性试剂反应的基团;衍生物反应操作复杂、费时,且容易造成组分的损失;对手性试剂的纯度、储存和反应过程中的稳定性要求较高;两个对映体的衍生化反应速度应当一致;生成的非对映体应当易分解为原来的对映体。

在直接法中,又分为采用手性固定相和手性流动相添加剂两种操作。手性固定相法基于样品与键合到载体表面的手性选择剂(又称手性识别剂)间形成暂时的非对映络合物的能量差异或稳定性不同而达到分离。手性流动相添加剂法则是通过对映体与添加到流动相的手性物质分子形成一对非对映的络合物,由于非对映络合物的稳定性、在流动相中溶剂化作用或络合物与固定相的键合等性质的差异而得到分离。与间接法相比,直接法避免了繁琐的衍生化操作,具有较大优势。目前市场上气相色谱法、高效液相色谱法及超临界流体色谱法设计所使用到的手性固定相已有许多成品出售,其应用日益广泛。但手性固定相的价格相对较高,在一定程度上限制了它的使用。新的手性固定相和手性流动相仍不断出现。

色谱分离法因其优秀的分辨能力,成为应用最广的手性拆分方法,尤其在分离分析和纯度检测方面应用更广。目前手性拆分属于色谱研究领域的最热点和最前沿,在这方面有大量的文献报道。

各种不同的手性固定相具有不同的分离模式,从理论上讲,不管选择何种固定相,分离何种对映体,手性分离或手性识别都必须满足同时有三个相互作用点。这些作用中至少一个是由立体化学决定的,这个原理是 1952 年首次由 Dalgleish 提出,即著名的“三点作用原理”<sup>[43]</sup>。

近年来利用毛细管电泳拆分手性化合物的报道日益增多,尤其是使用环糊精及其衍生物为手性选择剂的报道占主要部分,其他如冠醚、低聚糖、蛋白质、大分子抗生素等也有手性拆分能力。但毛细管电泳的样品处理量太小,不适用于制备。

计算机发展很迅速,它在分析中的应用在不断深入,从而带动着分析仪器的发展,缩短了更新换代的时间,出现了多种智能化、微型化的自动分析仪器。

同时,使用计算机技术指导手性拆分的研究也由 Armstrong<sup>[46]</sup>提出,并已运用到研究中。

#### (1)气相色谱法(Gas Chromatography, GC)

手性气相色谱拆分法<sup>[45]</sup>是手性色谱学的重要分支,是以 GC 为基础,引入新的不对称中心,使对映体的性质产生差异,进而被拆分,包括间接拆分法和手性固定相拆分法。间接拆分法<sup>[46, 47]</sup>主要采用纯的手性衍生化试剂进行柱前衍生化,将被拆分的外消旋体衍生化成非对映体混合物进行拆分;手性固定相拆分法是利用分子间可形成氢键(如氨基酸衍生物)、包合物(如  $\beta$ -CD 及其衍生物、冠醚等)、配位键(如萜烯衍生化的金属共价化合物)的手性选择体制备固定相进行拆分。前两种固定相的拆分依据是手性分子与手性固定相形成非对映异构体,由于非对映异构体保留作用力不同,实现手性分离;后者是基于对映体分子中的活性部位(双键、和杂原子等),与金属配位化合物中的金属离子在色谱柱内快速建立可逆的配位平衡,由于金属配位化合物手性固定相中的手性配基在空间的有序排列,使对映体靠近金属离子的难易有别,在通过多次的配位与交换以后,就可以达到对映体的分离。

气相色谱手性固定相的发展过程经历了由作用力简单、单一手性中心的氢键型手性固定相向具有多种作用力、多手性中心复杂型手性固定相的发展过程,以环糊精衍生物类固定相<sup>[48]</sup>研究的最多。在实践中,常将上述三类固定相与聚硅氧烷固定液或毛细管壁进行交联。

#### (2)毛细管电泳拆分法(Capillary Electrophoresis, CE)

利用毛细管电泳进行手性拆分不是基于电泳分离的原理,而是依靠色谱原理,采用构建手性分离的环境的方法,使对映异构体与手性选择剂作用<sup>[49]</sup>。通过三种方法来构建手性环境,即使用手性添加剂、使用手性填充毛细管或使用手性涂层毛细管柱。其中手性填充或手性涂层毛细管需要特别的制作技术,推广有一定难度。添加剂法只需向电泳缓冲液中加入合适的手性试剂,经过一定的分离条件优化即能实现手性分离,是一种简便实用的方法。

手性拆分机理包括主-客体作用、络合作用(或配体交换)、相分配、离子交换等,核心是手性识别作用,这种识别作用导致迁移差异,产生分离。适合于毛细管电泳的手性添加剂有:环糊精及其衍生物、大环抗菌素(主要包括糖肽类

大环抗菌素)、手性冠醚(要采用 C-18-冠-6-4-羧酸)、手性杯芳烃(如杯 4、杯 6 芳烃的氨基酸衍生物)、非环寡糖和多糖(如  $\alpha$ -(1, 4)-D-葡聚糖、右旋糖苷、糊精、二乙基氨基乙基右旋糖苷等)、氨基酸(如用组氨酸-铜金属络合物、天冬酰苯丙氨酸甲酯-铜等来分离氨基酸对映体)、蛋白质(如牛血清蛋白、人血清蛋白、 $\alpha$ -酸糖蛋白、卵粘蛋白、纤维素酶, 肽及肽库也被用做筛选新的手性选择剂)、表面活性剂(如胆汁酸类)。

毛细管电泳手性分离有两种基本策略:构建手性分离环境或手性消除<sup>[50]</sup>。让对映体与手性试剂进行化学反应,可以使之转变成非对映体,然后采用普通 CE 办法进行分离,即为手性消除。由于手性消除反应需要昂贵的手性反应试剂,而且产物手性可能不得恢复,所以多数人不愿意采用这种方法拆分对映体。而将手性物质引入到 CE 分离通道构建手性分离环境,在该环境下样品通过手性相互作用来改变迁移速度,最终可获得分离,本方法不触及样品本身,相对简单、快速、高效、发展空间大,已被普遍采用并迅速发展。

近年来,采用毛细管电泳进行手性拆分的研究很多<sup>[51-59]</sup>,国内外都进行了大量的研究。不过,由于毛细管电泳可分析的样品量极少,从而限制了它在拆分领域的放大化生产等实际应用,一般只适宜开发为分析方法。

### (3)超临界流体拆分法(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)

超临界流体是一种在临界压力和临界温度以上相区内的流体,这个相区的流体的物理特性介于液体和气体之间。超临界流体的粘度与气体相近,比液体低得多,可显著减少过程阻力;超临界流体的密度与液体相似,有很强的溶解能力,适于分离难挥发和热稳定性差的物质。

以超临界流体作为流动相进行手性药物拆分的色谱法就是超临界流体拆分法<sup>[60]</sup>。SFC 具有以下优点<sup>[61]</sup>:SFC 比 HPLC 分析时间短,单位时间内具有更高的分离度;SFC 可在比 GC 操作温度低的条件下进行手性分离,可有效避免药物消旋化和手性固定相分解;SFC 既可使用 HPLC 检测器,也可使用 GC 检测器(如质谱、氢火焰离子化检测器),有利于手性药物中痕量组分的检测和定性分析。

所以,SFC 在手性药物对映体分离的应用中具有高效、快速、操作条件易于变换等特点,不过,温度、流动相密度和组成对 SFC 手性分离系统的立体选择及分离度有较大影响。



#### (4) 高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC 法在手性药物拆分中的应用比 GC, SFC 等拆分法广泛的多<sup>[62]</sup>, 是药物质量控制、立体选择性的药理学和毒理学研究的重要手段<sup>[63, 64]</sup>, 分为衍生化(CDR)法、手性流动相添加剂(CMPA)法及手性固定相(CSP)法。

##### ① 手性衍生化拆分法

手性衍生化拆分又称间接拆分<sup>[65]</sup>, 要求手性化合物对映体的化学结构中应具有易于衍生化的基团(如氨基、羧基、羟基或巯基等), 手性试剂和反应产物的化学和手性性质均稳定, 且手性试剂化学和光学纯度较高, 手性试剂和反应产物在衍生化反应和色谱条件下应较稳定, 衍生化后生成的非对映体在色谱分离时可实现高柱效。本方法操作较复杂, 且存在一个潜在的问题:用手性试剂进行衍生化时, 有可能使化合物的立体结构发生转变<sup>[66, 67]</sup>。

在色谱系统中, 分离非对映体的差速迁移与非对映体分子的手性结构、手性中心所连接的基团和色谱系统的分离效率(包括溶质分子与固定相和流动相之间的作用力, 如氢键、偶极-偶极、电荷转移和疏水性等)有关。衍生后的产物构型差异越大, 分离越容易。

② 手性流动相添加剂(CMPA)法<sup>[68]</sup>分为手性包含复合法、手性配合交换法、手性离子对色谱法。

手性包含复合法经常采用环糊精(CD)和手性冠醚、杯芳烃等作为手性流动相添加剂。环糊精对疏水性和亲水性药物对映体都具有很强的包合作用, 已用于分离氨基酸及其衍生物、巴比妥类、哌嗪类镇痛药、伪麻黄碱、去甲羟基安定等。采用的固定相<sup>[69, 70]</sup>常有 ODS, CN, C8、苯基、硅胶等。

将手性金属配合剂加入 HPLC 流动相中形成三元非对映体配合物, 此配合物与固定相发生立体选择性吸引或排斥反应, 因结构稳定性和能量差异而使对映体得以分离, 称为手性配合交换法。配合交换系统使用水性流动相和疏水性固定相, 洗脱顺序与反相 HPLC 一致, 溶质疏水性增加, 保留时间延长, 并可采用 UV 进行检测。常用的手性配合试剂有氨基酸及其衍生物, 配位金属包括  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  等。

在 HPLC 流动相中加入反离子, 使之与流动相中对映体生成非对映的具有不同稳定性和分配性质的离子对复合物, 与固定相发生静电、疏水或氢键作用后,

产生差速迁移而分离,称为手性离子对色谱法。

### ③ 手性固定相(CSP)法

CSP 法即将手性试剂化学键合到固定相上,拆分时,固定相上键合的手性试剂与药物对映体在 CSP 表面形成非对映体对复合物,由于其稳定常数不同而获得分离,分离效率和洗脱顺序取决于复合物的相对强度。

CSP 的主要类型有蛋白质键合相<sup>[71, 72]</sup>、多糖类键合相<sup>[73, 74]</sup>、手性聚合物键合相<sup>[70]</sup>、环糊精键合相和 Pirkle 型手性固定相<sup>[75]</sup>、大环抗体类<sup>[76]</sup>等。

### (5)薄层色谱拆分法(Thin Layer Chromatography, TLC)

薄层色谱是平面色谱的一种,为最简便的色谱技术之一。薄层色谱拆分法具有操作方便、使用设备较简单、分离效率较高、分析速度快、色谱参数较易调整等优点,在对映体分离中具有实际意义<sup>[77, 78]</sup>。

用 TLC 拆分手性药物的方法也主要有三种:手性试剂衍生化(CDR)法、手性流动相添加剂(CMPA)法、手性固定相(CSP)法。

色谱前用手性选择性试剂与对映体进行衍生化,被测定的多数为苯丙胺类、 $\beta$ -阻断剂、氨基酸及抗炎药物等,生成的衍生物可在正相或反相硅胶薄层上获得分离。

正相或反相薄层色谱中,还可在流动相中添加手性选择剂进行对映体分离。在硅胶键合相薄层板上,用 $\beta$ -CD 以及其衍生物、牛血清蛋白、大环抗菌素万古霉素等做流动相添加剂进行拆分的研究都有报导<sup>[79, 80]</sup>。

在手性固定相上进行对映体分离, HPLC 法比 TLC 法应用广泛些,主要因为用于薄层的手性固定相具有很高的紫外背景,只能用于具有荧光或有色的样品。但薄层色谱手性固定相制备加工相对方便,且实验时操作简单,所以至今仍在手性拆分领域有重要用途,国内外研究也很热门<sup>[81-89]</sup>。手性固定相主要有手性固定相(Chiral Stationary Phase, CSP)及手性涂布相(Chiral Coated Phases, CCP)两类。

手性拆分是获得光学物质的主要途径,薄层色谱法操作方便,设备简单,对样品适应性广,可用于各类化合物的分离、精制、鉴定和定量,具有分离效率高、分析速度快、结果直观、色谱参数易调整,能快速更换流动相、能同时处理多个样品等特点,已在化学、化工、生化、医药、卫生等各个领域广泛使

用。而且，样品分离后，可根据斑点在薄层上的位置、颜色深浅及大小与随行对照品比较，可简便、快速地近似估算样品中待测成分的含量，此谓薄层色谱半定量；也可在测出待测物质对照品在薄层上的检出灵敏度后，对样品中的该成分进行限量检查；间接定量(洗脱测定法)和直接定量(原位薄层扫描法)是薄层定量的两种较好的办法，已广泛应用于中药的分析检测中。可以预见，薄层色谱拆分法必将成为手性拆分的重要手段之一，在光学异构体的分离、分析及光学纯度的测定中发挥重要的作用。

#### (6)模拟移动床法(simulated moving bed, SMB)

为了克服通常液相制备色谱不能连续操作以及大量溶剂浪费等弱点，Broughton 于20 世纪60 年代提出了模拟移动床色谱技术。所谓模拟移动床色谱就是在色谱分离中模拟出固定相和流动相相对于进样口的循环流动。这样，两种具有不同保留值的组分就会被固定相和流动相分别带向进样口两边，从而得到分离<sup>[113]</sup>。为达到这一目的，模拟移动床色谱由许多较短的色谱柱首尾相连而成。模拟移动床技术最早运用于石油工业之中，近年来在大规模手性药物拆分领域中得到了广泛的应用。如采用SMB 技术可达到每年从外消旋体中分离出10 000kg( *R* ) - 3 - 氯- 1 - 苯基丙醇的规模，它是抗抑郁药( *R* ) - 氟西汀(fluxoxetine)的中间体。如今怎样在保持较高效率的前提下提高手性药物的分离量，是模拟移动床色谱在手性药物拆分领域的研究中所面临的主要问题。

表1.1模拟移动床色谱在工业拆分中的应用实例

外消旋体	固定相	流动相	纯度/%	产率 g. d-1	文献
1-苯基乙醇	Chiracel OD	正己烷-异丙醇	98.7	4.7	<sup>114</sup>
EMD53986	Chitalpak AD	甲醇	88	86	<sup>115</sup>
Guaifenesine	Chiracel OD	庚烷-乙醇	99.5	32.4	<sup>116</sup>
联苯酚	DNBPC-Silica	庚烷-异丙醇	97	38.6	<sup>117</sup>

## 1.4 研究目的与内容

### 1.4.1 本文的研究内容

本文拟研究以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂添加到多种流动相体系中，在普通硅胶 GF<sub>254</sub>板上分离普萘洛尔、美托洛尔、阿替洛尔等 $\beta$ -受体阻滞剂

类药物，讨论三种药物的分离条件，如展开体系、温度、预饱和时间、pH、手性离子对试剂浓度以及湿度等对拆分的影响，确定最佳的分离条件。

本文拟研究 $\beta$ -环糊精固载固定相在普通硅胶 GF<sub>254</sub>板上分离普萘洛尔、美托洛尔、阿替洛尔等 $\beta$ -受体阻滞剂类药物的方法。讨论温度、 $\beta$ -环糊精含量以及展开体系等分离条件对拆分的影响，确定最佳分离条件。

#### 1.4.2 本研究的意义

分离手性化合物从而得到单一旋光体是目前制备单一对映体最有效的方法。近 20 多年来，手性技术的发展很有局限，拆分费用昂贵的现状尚未得到解决。开发操作相对简便、费用低的拆分方法，可有效降低制备对映体药物的成本。手性离子对试剂添加流动相薄层色谱方法以及手性选择体固载相薄层色谱拆分法操作简单方便，拆分效果理想，必将在拆分领域得到重视并有长足进展。本文研究的手性离子对试剂添加流动相薄层色谱拆分方法以及手性选择体固载相薄层色谱拆分法，可为进一步研究该方法提供了可靠的实验数据，建立的模型可提供一定的理论支持。

## 2 手性离子对试剂添加流动相薄层色谱拆分普萘洛尔

### 2.1 引言

临床上广泛应用的普萘洛尔, 结构如图 2.1, 是一种重要的受体阻滞剂, 一直以外消旋体的形式入药。动物实验表明, S(-) 普萘洛尔对受体的阻滞程度比 R(+) 普萘洛尔约大 100 倍; R(+) 普萘洛尔不仅对受体的阻滞作用较小, 还有避孕作用, 可作为一种有效的避孕药<sup>[90]</sup>。因此, 以消旋体入药的普萘洛尔不仅治疗心脏系统疾病的功效不佳, 还有一定的副作用。将外消旋普萘洛尔拆分为手性纯化合物, 并作为两种不同的药物分别入药, 是提高我国普萘洛尔药品质量的有效途径。目前用于拆分普萘洛尔对映体的方法主要集中在 HPLC 和 TLC。李乃宣<sup>[91]</sup>等人建立了一种以 Nova-Pak CN-HP 氰基柱为固定相, 以二氯甲烷/乙醇为流动相, 添加 MBPCE 为手性离子对试剂的高效液相色谱法。于金刚<sup>[92]</sup>等采用  $\beta$ -环糊精涂敷薄层色谱在室温下分离了普萘洛尔对映体。徐莉<sup>[93]</sup>等用三-(3, 5-二硝基苯甲酰基) 纤维素薄层色谱分离了普萘洛尔等六种药物对映体。

D-10-樟脑磺酸铵(图 2.1)应用于对映体的拆分已有报道, 徐秀珠<sup>[94]</sup>等运用离子对色谱以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂, 在二醇柱(Lichrospher100-DIOL)高效液相色谱上分离了普萘洛尔, 黄慕斌<sup>[95]</sup>等以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂在硅胶 HF254 板上分离了拉贝乐克和倍他乐克。Duncan<sup>[96]</sup>在二醇板和高效硅胶板以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂分离了苯丙醇胺对映体。但还未见有将 D-10-樟脑磺酸铵应用于薄层色谱分离普萘洛尔对映体的报道。我们发现, 以 D-10-樟脑磺酸铵作为手性离子对试剂添加到二氯甲烷-甲醇流动相中, 在普通硅胶 GF254 板上, 可分离普萘洛尔对映体。在研究了展开剂体系, 温度, 预饱和时间, 离子对试剂 pH, 样品 pH, 离子对试剂浓度以及湿度的影响的基础上, 提出了薄层色谱法拆分普萘洛尔对映体的新方法。

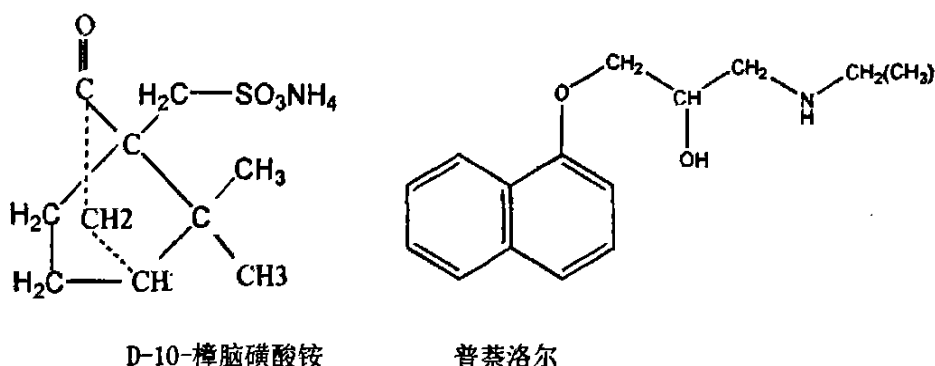


图 2.1 D-10 樟脑磺酸铵和普萘洛尔结构式

## 2.2 实验试剂与设备

### 2.2.1 实验仪器

展开缸 (250mL 广口瓶); DZF—6050 真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); JY2002 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); 玻璃毛细管点样器 (华西医科大学仪器厂); 风华电冰箱; SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 布氏漏斗; 舒美 KQ2200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); OLYMPUS (X230) 数码相机; 平面色谱数字图像处理软件 (四川大学化工学院梁冰教授实验室研制); 紫外分光光度计 (TU-1901, 北京普析通用仪器有限公司); 旋光仪 (Autopol IV 型, 美国 RUDOLPH 公司)。

### 2.2.2 试剂及药品

硅胶 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工有限公司); D-10-樟脑磺酸 (CR; 上海华东师范大学化工厂); 羧甲基纤维素钠 (AR; 上海三浦化工有限公司); 浓氨水 (AR; 重庆精细化工厂); 广泛 pH 试纸 (1-14); 精密 pH 试纸 (5.5-9.0) (9.5-13.0); 甲醇 (AR; 天津博迪化工有限公司); 二氯甲烷 (AR; 天津博迪化工有限公司); 95%乙醇 (AR; 上海有机化工试剂研究所); 香草醛 (AR; 成都科龙化工试剂厂); 浓硫酸 (AR; 成都市欣海兴化工试剂厂); 正丁醇 (AR, 天津市博迪化工有限公司); 丙酮 (AR, 上海有机化工试剂研究所); 氯仿 (AR, 成都长联化工试剂有限公司); 无水乙醇 (AR, 成都科龙化工试剂厂); 异丙醇 (AR, 天津市博迪化工有限公司) 乙酸乙酯 (AR, 天津市博迪化工有限公司)。

盐酸普萘洛尔片（湖北华中药业有限公司，标示量为 10 mg/片）。

## 2.3 实验研究

### 2.3.1 药品溶液配制

参考中国药典（2005 年版）测定盐酸普萘洛尔片中的普萘洛尔含量的样品溶液制备方法，取盐酸普萘洛尔片 10 粒（称重 0.711g），置于研钵中碾碎，用 20mL95%乙醇溶解配成 5mg/mL 溶液，超声溶解 1h，抽滤，滤液作为样品溶液。

### 2.3.2 薄层板制备

5g/L 羧甲基纤维素钠溶液的制备：羧甲基纤维素钠 1g，溶解于 200m 热水中，在烧杯中搅匀直至完全溶解，冷却后置于冰箱中备用。

铺板：按 12ml 羧甲基纤维素钠水溶液(5g/L)加入 4g 硅胶 GF<sub>254</sub>的比例，配好乳状液后，在 2.5cm×10cm 的玻璃板上均匀涂布，厚度约为 500-600 μm。室温下自然晾干，置于烘箱内，105-110℃下活化 30-60min，取出置于干燥器中备用。

### 2.3.3 展开剂配制

准确称取 0.0985g D-10-樟脑磺酸，溶于 25mL 甲醇中，滴加浓氨水调节 pH，得到浓度为 17mmol/L 的 D-10-樟脑磺酸铵溶液，再用甲醇将其稀释数倍得到离子对试剂溶液备用。

准确吸取 0.3mL 上述离子对试剂溶液至展开缸中，加入甲醇和二氯甲烷使其体积为 3mL。

### 2.3.4 显色剂配制

取 1.00g 香草醛溶于 100mL 浓硫酸中备用。

### 2.3.5 点样和展开

用玻璃毛细管点样器吸取约 1.5μL 样品溶液，在活化好的板子上点样，点好后放入干燥器中放置 10min，以便溶剂完全挥发，及除去吸收的水分。移取展开剂 3ml 置于在 8℃下恒温 1hr 的展开缸中，并放入点好样的薄板，不接触展开

剂的条件下预饱和 30 分钟后将板子接触展开剂开始展开，展开距离为 8cm，取出，晾干，置于紫外灯下观察展开后的斑点。然后将板子浸入香草醛硫酸溶液中显色。相机照相，用 Photoshop 和平面色谱数字图像处理软件处理。

## 2.4 结果与讨论

### 2.4.1 显色定位方法的选择

比较了盐酸普萘洛尔对映体拆分后以①紫外灯（254nm）②碘熏③硫酸香草醛<sup>[93]</sup>三种方法显色的结果。表明三种方法均可以显示两个斑点，且斑点大小位置都一致，但在紫外灯（254nm）下显示的荧光猝灭斑点比较模糊，照相效果不清晰，而碘熏显色的效果也不如硫酸香草醛，而且碘熏显色的毒性较大。盐酸普萘洛尔片为常规片，所含的是比较常见的辅料，如淀粉，硬脂酸镁等，这些辅料均不溶于醇和水，在制样时已被滤除，且香草醛不会与它们显色，故选用硫酸香草醛显色。出现的两个紫红色斑点显示普萘洛尔对映体获得拆分

### 2.4.2 展开体系及比例的选择

以 D-10-樟脑磺酸铵作为流动相中手性离子对添加剂，分别以不同比例的丙酮/二氯甲烷，无水乙醇/二氯甲烷，正戊醇/二氯甲烷，乙酸乙酯/二氯甲烷，乙酸乙酯/丙酮/二氯甲烷，正丁醇/二氯甲烷，甲醇/二氯甲烷，氯仿/二氯甲烷等为展开剂进行试验。结果（表 2.1）表明只有以甲醇/二氯甲烷为展开剂时，拆分得到的两斑点清晰，大小一致，没有拖尾。

表 2.1 几种展开体系对普萘洛尔拆分的情况

展开剂	展开比例	展开剂 极性	斑点描述
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/丙酮	0.3/1.85/0.85	3.73	1 个斑点，拖尾，
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/丙酮	0.3/1.90/0.8	3.69	1 个斑点，拖尾，
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/丙酮	0.3/1.95/0.75	3.66	1 个斑点，拖尾，



酮				Rf=0.149
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.19/1.51	3.77	两斑点, 拖尾,	
水乙醇				
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.20/1.50	3.765	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.21/1.49	3.762	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.22/1.48	3.757	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.23/1.47	3.753	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.24/1.46	3.749	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.25/1.45	3.744	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.26/1.44	3.74	两斑点, 拖尾,	
水乙醇			Rf1=0.209, Rf2=0.48	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/无	0.3/1.28/1.42	2.731	一个斑点, 拖尾	
水乙醇				
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/乙	0.3/1.14/1.56	3.85	一个斑点, 靠近原点	
酸乙酯				
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/乙	0.3/1.16/1.54	3.84	一个斑点, 靠近原点,	
酸乙酯			Rf=0.055	
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/乙	0.3/1.18/1.52	3.83	一个斑点, 靠近原点	
酸乙酯				
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/氯	0.3/1.45/1.25	3.56	一个斑点,	
仿				
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/氯	0.3/1.5/1.2	3.54	一个斑点, Rf=0.112	
仿				

D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/氯仿	0.3/1.55/1.15	3.53	一个斑点
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.78/1.92	3.67	两个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.8/1.9	3.66	两个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.81/1.89	3.66	两个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.83/1.87	3.65	一个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.85/1.85	3.648	一个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.9/1.8	3.63	一个斑点, 拖尾
D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/异丙醇	0.3/0.95/1.75	3.62	一个斑点, 拖尾



图 2.2 D-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/丙酮 (0.3/1.95/0.75) 展开体系对拆分的影响

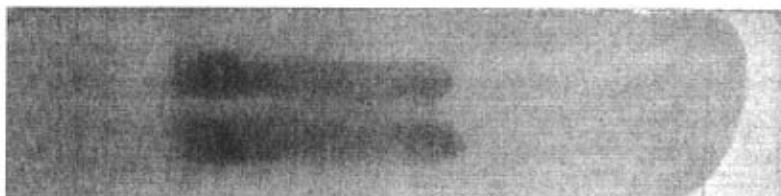


图 2.3 D-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/无水乙醇 (0.3/1.26/1.44) 展开体系对拆分的影响



图 2.4 D-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/乙酸乙酯 (0.3/1.16/1.54) 展开体系对拆分的影响



图 2.5 D-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/氯仿 (0.3/1.50/1.20) 展开体系对拆分的影响



图 2.6 D-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/异丙醇 (0.3/0.78/1.92) 展开体系对拆分的影响

表 2.2 D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/甲醇展开体系对普萘洛尔拆分的影响

D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/甲醇比例	展开剂极性	斑点个数及 Rf 值
0.3/2.7/0	3.1	1 个, 0.126
0.3/2.65/0.05	3.137	1 个, 0.189
0.3/2.6/0.1	3.174	1 个, 0.297
0.3/2.55/0.15	3.211	1 个, 0.320
0.3/2.5/0.2	3.248	1 个, 0.242
0.3/2.45/0.25	3.285	1 个, 0.255
0.3/2.4/0.3	3.322	1 个, 0.328
0.3/2.35/0.35	3.359	1 个, 0.175
0.3/2.3/0.4	3.396	1 个, 0.250
0.3/2.25/0.45	3.433	1 个, 0.364
0.3/2.2/0.5	3.470	1 个, 0.406

0.3/2.15/0.55	3.507	1 个, 0.314
0.3/2.1/0.6	3.544	2 个, 0.299; 0.516
0.3/2.05/0.65	3.581	2 个, 0.192; 0.377
0.3/2.0/0.7	3.619	2 个, 0.157; 0.452
0.3/1.95/0.75	3.656	2 个, 0.179; 0.401
0.3/1.9/0.8	3.693	2 个, 0.260; 0.632
0.3/1.85/0.85	3.730	2 个, 0.299; 0.683
0.3/1.8/0.9	3.767	2 个, 0.222; 0.669
0.3/1.75/0.95	3.804	2 个, 0.212; 0.668

D-10-樟脑磺酸铵作为流动相中手性离子对添加剂, 以不同配比的二氯甲烷-甲醇混合液为流动相对盐酸普萘洛尔分离如表 2.2 所示。实验表明当二氯甲烷与甲醇体积比为 2.6 (1.95/0.75) 时, 两斑点大小一致, 分离效果最好 (图 2.7)。

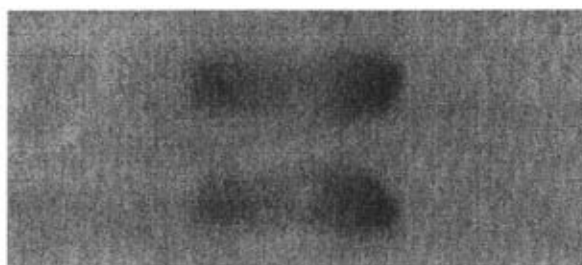


图 2.7 二氯甲烷/甲醇 (1.95/0.75, V/V)

#### 2.4.3 温度及其预饱和时间的影响

比较了室温 (28℃)、8℃和-17℃时温度对拆分效果的影响, 如图 2.8。结果表明室温 (28℃) 下对映体没有得到分离, 而 8℃时斑点比较清晰, -17℃时, 两个斑点虽然距离更远, 但是拖尾比较严重, 且斑点大小不一致, 所以选择 8℃作为展开的最佳温度。图 2.9 是由图 2.8 经过平面色谱数字图像处理软件得到的色谱曲线图。



图 2.8 温度对拆分的影响

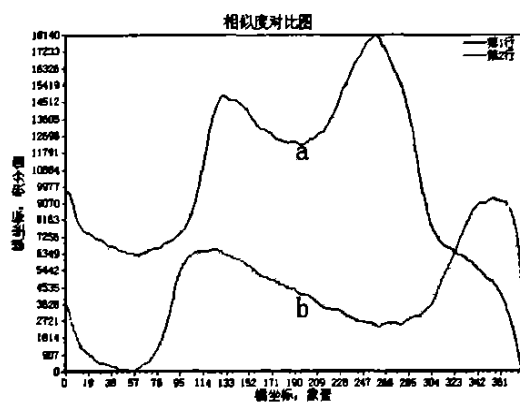


图 2.9 温度影响曲线(a: 8°C, b: -17°C)

进一步比较在冰箱 (8°C) 下预饱和 15min, 30min, 45min, 60min, 90min, 120min 的影响。结果表明放置时间越短, 斑点分得越开, 但是拖尾较严重。放置时间越长, 斑点靠的较近。故预饱和时间选择为 30min。

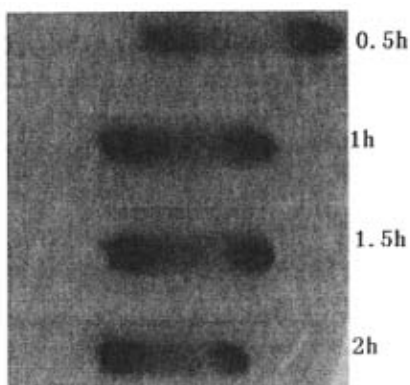


图 2.10 饱和时间对拆分的影响

#### 2.4.4 pH 的影响

##### 1) 展开剂中离子对试剂 pH 的影响

手性离子对添加剂对分离效果的影响比较大,故考察了手性离子对添加剂 pH 分别为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 时对拆分效果的影响。结果表明手性离子对添加剂 pH 在 6.5-10.0 范围内,普萘洛尔均能得到拆分,但是只有当手性离子对添加剂 pH=8.0 时,两个斑点大小基本一致,颜色均为紫红色,分离效果最好。

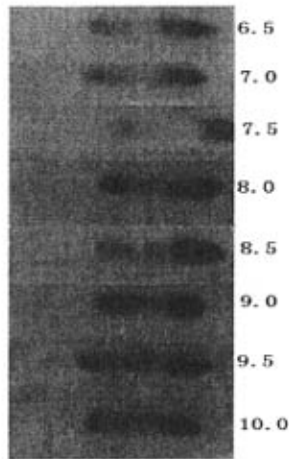


图 2.11 离子对试剂 pH 对拆分的影响

## 2) 样品溶液 pH 的影响

比较盐酸普萘洛尔溶液 pH 分别为 6.5, 7.0, 8.0 的影响,结果如图 2.12。当样品 pH 为 7.0 时,两斑点大小的差异比其他两个 pH 的斑点差异要小,而 pH 为 6.5 和 8.0 时,虽然也出现了两个斑点,但是第 2 个斑点没有第 1 个斑点清晰。故选样品溶液的 pH 为 7.0。

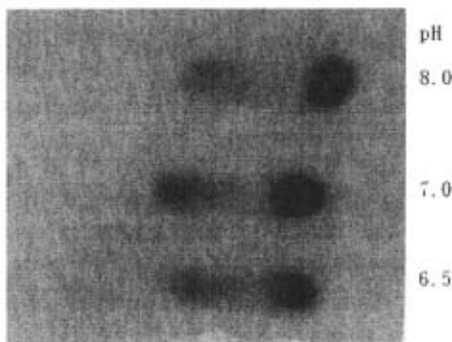


图 2.12 样品 pH 对拆分的影响

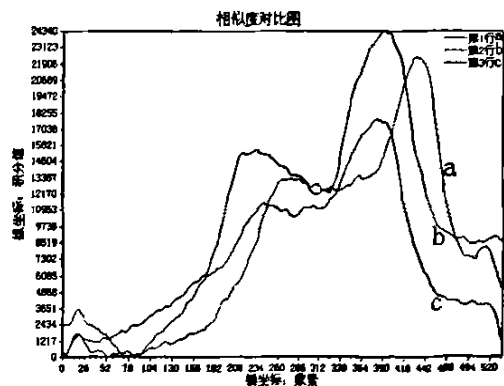


图 2.13 样品 PH 影响曲线 (a: 8.0; b: 7.0, c: 6.5)

## 2.4.5 手性离子对添加剂浓度的影响

由于手性离子对添加剂要与对映体生成非对映异构体，其浓度变化对于分离就有影响。变化 D-10-樟脑磺酸铵溶液的浓度，分别为 0.17, 0.34, 0.51, 0.68, 0.85, 1.02mmol/L，结果如图 2.13。当浓度为 0.85mmol/L 时，两个斑点大小基本一致，均为紫红色，而浓度小于 0.85mmol/L 时，两斑点颜色均出现墨绿色拖尾，浓度大于 0.85 mmol/L，两个斑点大小明显不一致。故选择手性离子对添加剂浓度为 0.85mmol/L。

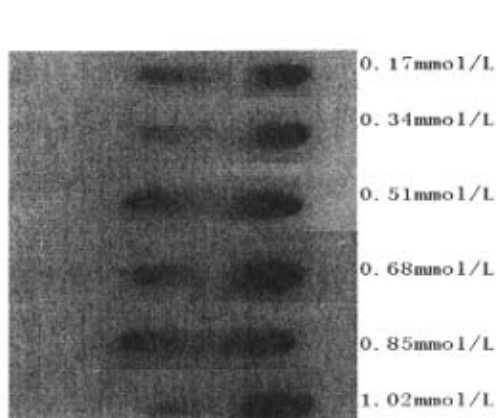


图 2.14 浓度对拆分的影响

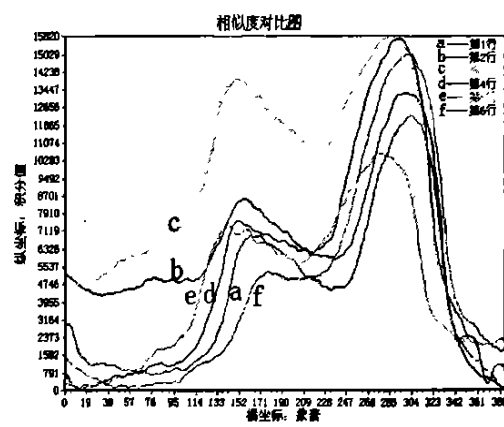


图 2.15 浓度影响曲线

(a:0.17, b:0.34, c:0.51, d:0.68, e:0.85, f: 1.02mmol/L)

## 2.4.6 薄板吸潮的影响

薄板吸潮的程度极大地影响薄板的活性。操作中薄板不可避免地要暴露在空气中吸潮而造成一定程度的失活。故实验考察了薄板在空气中暴露时间的影响。将点好样并在干燥器中干燥好的板子分别在空气中暴露 10s, 5min, 10min, 30min 后放入展开缸展开，结果如图 2.15。空气中暴露时间为 10s 的拆分效果最好，两斑点大小基本一致，均为紫红色。随着空气中暴露时间的延长，第 2 个斑点逐渐消失，第一个斑点出现墨绿色拖尾。因此，实验操作时，薄板在空气中暴露的时间越短越好。

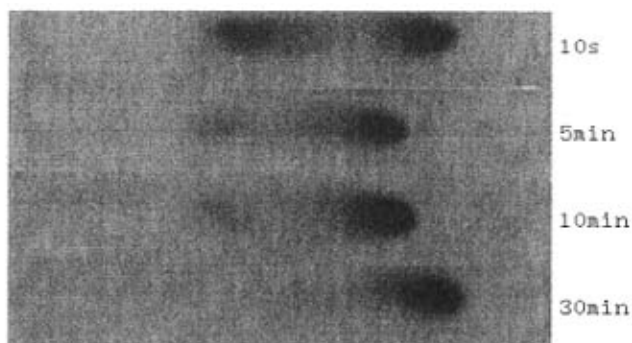


图 2.16 薄板在空气中放置时间的影响

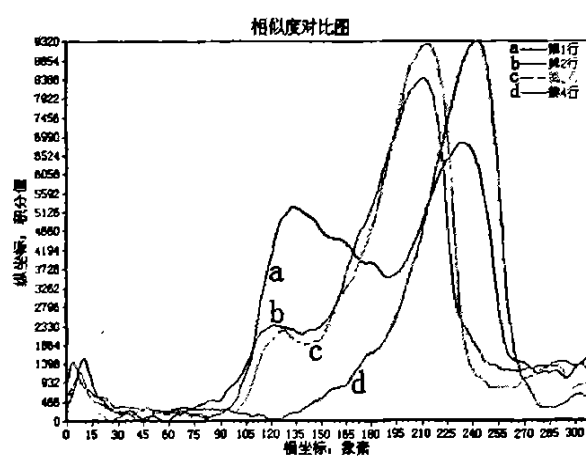


图 2.17 空气中放置时间影响曲线

(a: 10s, b: 5 min, c: 10 min, d: 30min)

#### 2.4.7 色谱重现性

综合上述实验结果得出薄层色谱分离普萘洛尔的最佳条件为 D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.85mmol/L, pH=8.0) / 二氯甲烷/甲醇 (0.3/1.95/0.75, V/V/V), 在冰箱 (8℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 7.0。按照最佳条件, 同时在一个展开缸中背对背展开两块薄板 (5×10cm), 每块薄板点三个点, 结果如图 2.18 所示。



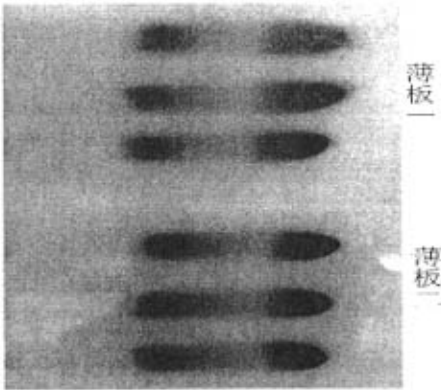


图 2.18 最佳拆分条件下的薄层色谱重现性

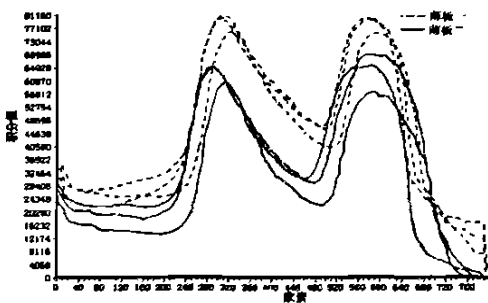


图 2.19 最佳条件下重现性实验的色谱曲线

表 2.3 重现性实验数据 RSD 数据

斑点	峰面积	一板峰面积均值 及 RSD	二板峰面积均值 及 RSD	两板峰面积均 值及 RSD
1-1	4969743			
1-2	4952729	4871639, 3.2%		
1-3	4692444			5286745, 6.7%
2-1	5538493			
2-2	6287863		5701850, 9.2%	
2-3	5279193			

由表 2.3 我们可以计算出，薄板 1 的峰面积积分值的  $RSD_1=3.2\%$ ，薄板 2 的

$RSD_2=9.2\%$ ，两块薄板综合的  $RSD=6.7\%$ 。

#### 2.4.8 分离的普萘洛尔两斑点的紫外吸收光谱

按照最佳条件：D-10-樟脑磺酸铵溶液（0.85mmol/L，pH=8.0）/二氯甲烷/甲醇（0.3/1.95/0.75，V/V/V），在冰箱（8℃）下预饱和 30min，样品 pH 为 7.0，在 20×10cm 上带状点样层析后，用显色剂将薄层板的一端约 1 厘米的宽度沿展开方向涂渍显色，然后将与两显色斑点对应的未显色的两带区分别刮下，用甲醇超声溶解 30min 后，先以滤纸-漏斗过滤，再经微孔滤膜过滤。滤液分别测定紫外如图 2.20 所示

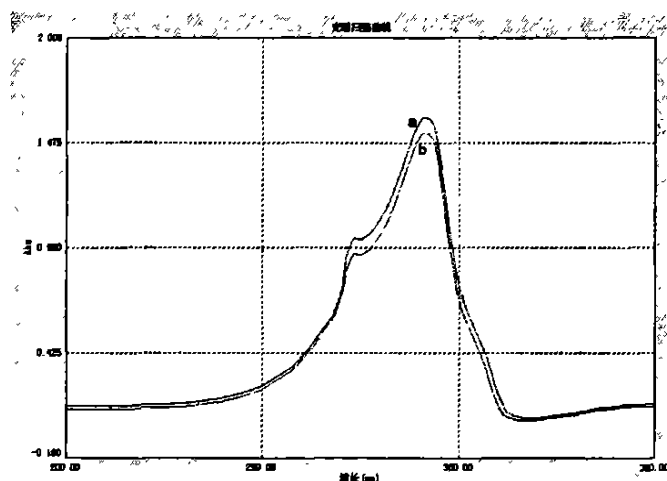


图 2.20 普萘洛尔两斑点紫外吸收图

（a：离溶剂前沿较近的斑点；b：离溶剂前沿较远的斑点）

从分离的普萘洛尔紫外光谱图可以看出，两斑点的紫外吸收图形完全一致，说明它们为同一化合物。最大吸收都出现在 290nm，与药典记载相吻合。结合硫酸香草醛的特征显色足以证明所分离出的两个斑点就是普萘洛尔对映体。

#### 2.4.9 旋光度证明

对 2.4.8 中制备得到的溶液测定旋光度（表 2.4）。距离原点较近的斑点为右旋（+）普萘洛尔对映体，距离溶剂前沿较近的斑点为左旋（-）普萘洛尔

对映体。

表 2.4 普萘洛尔斑点的旋光度数据

斑点	数值
离溶剂前沿较近的斑点	-0.009
离溶剂前沿较远的斑点	+0.001

## 2.5 盐酸普萘洛尔对映体的分离机理

D-10-樟脑磺酸铵和普萘洛尔结构如图 2.1 所示,手性识别的产生是由于 D-10-樟脑磺酸铵分子与普萘洛尔对映体分子在空间上能很好地结合,作用较为充分,能生成稳定的非对映异构离子对,其在有机流动相和固定相中的分配有较大的差异而导致的。

## 2.6 小结

在较低温度(8℃)下,以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂,在二氯甲烷/甲醇的体系中普萘洛尔对映体可以得到分离。该方法简便,经济,易行。为进一步建立普萘洛尔对映体的分析测定方法打下了基础。

### 3 手性离子对试剂流动相-薄层色谱分离美托洛尔和阿替洛尔

#### 3.1 前言

美托洛尔 (metoprolol) 是一种选择性的  $\beta$ -受体阻滞剂, 化学名为 1-[4-(2-甲基乙基) 苯氧基]-3-异丙氨基丙醇-(2) 酒石酸盐。结构如图 3.1。美托洛尔是具 1 个手性碳原子的手性分子。临床主要用于治疗轻、中度高血压、稳定性心绞痛及心律失常。据文献报道, (-)-美托洛尔对离体心脏的抑制效应是 (+)-美托洛尔的 33 倍, 而美托洛尔右旋体改变眼内压效应则比左旋药物高。这也许是因为光学异构体的差异影响了药物分布、代谢或与受体的结合, 故拆分美托洛尔对映体的工作有着重要的理论与实际意义。对于美托洛尔对映体的拆分, 文献报道有离子对色谱法、毛细管电泳法、手性衍生化法、手性固定相等。衍生化使实验变得繁琐, 一般情况下手性柱也较为昂贵。毛细管电泳及质谱相对来说仪器价格较昂贵, 普及度不高。

阿替洛尔 (atenolol, (+) 4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)-amino] propoxy] benzeneacetamide) 作为一种  $\beta$ -受体阻断药, 结构如图 3.1, 能与去甲肾上腺素能神经递质或肾上腺素受体激动剂竞争  $\beta$ -受体, 从而拮抗其  $\beta$  型拟肾上腺素作用, 临床上常用于治疗心绞痛和高血压, 通常以消旋体给药, 但阿替洛尔 S (-)-对映体的  $\beta$ -受体阻断作用比 R (+)-对映体强。所以 R(+), S (-)-阿替洛尔的手性拆分在药效学和药动学的研究中都具有重要意义。关于阿替洛尔的拆分, 文献报道有高效液相手性固定相法、毛细管电泳法、手性衍生化法以及三-(3, 5-二硝基苯甲酰基) 纤维素 (CTNB) 薄层色谱法等。同样, 衍生化的实验操作比较繁琐, 手性柱和毛细管电泳等的仪器价格较昂贵, 普及度不高。

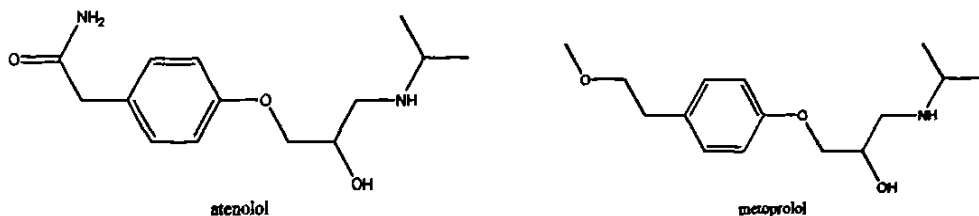


图 3.1 阿替洛尔和美托洛尔的结构

## 3.2 实验仪器及试剂

### 3.2.1 实验仪器

展开缸 (250mL 广口瓶); DZF—6050 真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); JY2002 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); 玻璃毛细管点样器 (华西医科大学仪器厂); 风华电冰箱; SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 布氏漏斗; 舒美 KQ2200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); OLYMPUS (X230) 数码相机; 平面色谱数字图像处理软件 (四川大学化工学院梁冰教授实验室研制); 紫外分光光度计 (TU-1901, 北京普析通用仪器有限公司); 旋光仪 (Autopol IV 型, 美国 RUDOLPH 公司)。

### 3.2.2 试剂及药品

硅胶 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工有限公司); D-10-樟脑磺酸 (CR; 上海华东师范大学化工厂); 羧甲基纤维素钠 (AR; 上海三浦化工有限公司); 浓氨水 (AR; 重庆精细化工厂); 广泛 pH 试纸 (1-14); 精密 pH 试纸 (5.5-9.0) (9.5-13.0); 甲醇 (AR; 天津博迪化工有限公司); 二氯甲烷 (AR; 天津博迪化工有限公司); 95%乙醇 (AR; 上海有机化工试剂研究所); 氯仿 (AR, 成都长联化工试剂有限公司); 无水乙醇 (AR, 成都科龙化工试剂厂); 乙酸乙酯; 异丙醇; 丙酮; 乙腈; 碘 (AR, 成都科龙化工试剂厂); 茚三酮 (AR, 成都科龙化工试剂厂)

酒石酸美托洛尔片 (常州四药制药有限公司, 标示量为 50 mg/片); 阿替洛尔片 (天津市中央药业有限公司, 标示量为 25 mg/片)

## 3.3 实验研究

### 3.3.1 药品溶液配制

参考中国药典 (2005 年版) 测定酒石酸美托洛尔片中的美托洛尔含量和阿替洛尔片中阿替洛尔含量的样品溶液制备方法, 取酒石酸美托洛尔片 5 粒 (称重 0.711g), 置于研钵中碾碎, 用 100mL95%乙醇溶解配成 2.5mg/mL 溶液, 超声溶解 1h, 抽滤, 滤液作为美托洛尔样品溶液。取阿替洛尔片 10 粒 (称重 0.711g), 置于研钵中碾碎, 用 50mL95%乙醇溶解配成 5mg/mL 溶液, 超声溶解 1h, 抽滤, 滤液作为阿替洛尔样品溶液。

### 3.3.2 薄层板制备

5g/L 羧甲基纤维素钠溶液的制备：羧甲基纤维素钠 1g，溶解于 200m 热水中，在烧杯中搅匀直至完全溶解，冷却后置于冰箱中备用。

铺板：按 12ml 羧甲基纤维素钠水溶液(5g/L)加入 4g 硅胶 GF<sub>254</sub>的比例，配好乳状液后，在 2.5cm×10cm 的玻板上均匀涂布，厚度约为 500-600 μm。室温下自然晾干，置于烘箱内，105-110℃下活化 30-60min，取出置于干燥器中备用。

### 3.3.3 展开剂配制

准确称取 0.0985g D-10-樟脑磺酸，溶于 25mL 甲醇中，滴加浓氨水调节 pH，得到浓度为 17mmol/L 的 D-10-樟脑磺酸铵溶液，再用甲醇将其稀释数倍得到离子对试剂溶液备用。

准确吸取 0.3mL 上述离子对试剂溶液至展开缸中，加入甲醇和二氯甲烷使其体积为 3mL。

### 3.3.4 显色剂的配制

准确称取茚三酮 1.25g，加入 50mL 丙酮，配成 2.5%的茚三酮/丙酮溶液。

### 3.3.5 点样和展开

用玻璃毛细管点样器吸取约 1.5μL 样品溶液，在活化好的板子上点样，点好后放入干燥器中放置 10min，以便溶剂完全挥发，及除去吸收的水分。移取展开剂 3ml 置于在 8℃下恒温 1hr 的展开缸中，并放入点好样的薄板，不接触展开剂的条件下预饱和 30 分钟后将板子接触展开剂开始展开，展开距离为 8cm，取出，晾干，置于碘缸中显色。相机照相，用 Photoshop 和平面色谱数字图像处理软件处理。

## 3.4 结果与讨论

### 3.4.1 显色定位方法的选择

酒石酸美托洛尔片和阿替洛尔片均为常规片，所含的是比较常见的辅料，

如淀粉，硬脂酸镁等，这些辅料均不溶于醇和水，在制样时已被滤除。

比较了美托洛尔和阿替洛尔对映体拆分后以①紫外灯（254nm）②碘熏③茚三酮丙酮溶液<sup>[4]</sup>三种方法显色的结果。表明紫外灯（254nm）、碘熏和茚三酮丙酮溶液均可以显示两个斑点，且斑点大小位置都一致，但在紫外灯（254nm）下显示的荧光猝灭斑点由于样品浓度过低比较模糊，照相效果不清晰，而茚三酮丙酮溶液显色后的紫红色斑点也比较模糊，也不利于照相。因此，选择碘熏显色。

### 3.4.2 展开体系的选择

参照 D-10-樟脑磺酸作为手性离子对试剂拆分盐酸普萘洛尔对映体的条件，以二氯甲烷/甲醇作为展开剂拆分美托洛尔和阿替洛尔，结果如表 3.1，

表 3.1 D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/甲醇对美托洛尔和阿替洛尔拆分的影响

D-10-樟脑磺酸/ 二氯甲烷/甲醇 比例	展开剂极性	美托洛尔斑点及 Rf 值	阿替洛尔斑点及 Rf 值
0.3/2.7/0	3.1	1 个, 0.059	2 个, 0, 0.0625
0.3/2.65/0.05	3.137	1 个, 0.15	2 个, 0, 0.075
0.3/2.6/0.1	3.174	1 个, 0.1875	2 个, 0, 0.0875
0./2.55/0.15	3.211	1 个, 0.2	2 个, 0, 0.0875
0.3/2.5/0.2	3.248	2 个, 0.013, 0.218	2 个, 0, 0.0875
0.3/2.45/0.25	3.285	2 个, 0.026, 0.143	2 个, 0.0125, 0.1
0.3/2.4/0.3	3.322	2 个, 0.020, 0.0875	2 个, 0.025, 0.125
0.3/2.35/0.35	3.359	2 个, 0.024, 0.183	2 个, 0.025, 0.1375
0.3/2.3/0.4	3.396	2 个, 0.025, 0.3125	2 个, 0.05, 0.2375
0.3/2.25/0.45	3.433	2 个, 0.033, 0.178	2 个 0.0625, 0.175
0.3/2.2/0.5	3.470	2 个, 0.071, 0.188	2 个, 0.0625 0.225
0.3/2.15/0.55	3.507	2 个, 0.013, 0.295	2 个, 0.075, 0.175
0.3/2.1/0.6	3.544	2 个, 0.075, 0.25	2 个, 0.05, 0.1625
0.3/2.05/0.65	3.581	2 个, 0.075, 0.275	2 个, 0.075, 0.1625

0.3/2.0/0.7	3.619	2 个, 0.076, 0.275	2 个, 0.0875 0.175
0.3/1.95/0.75	3.656	2 个, 0.078, 0.25	2 个, 0.0875 0.1875
0.3/1.9/0.8	3.693	2 个, 0.088, 0.215	1 个, 0.1875
0.3/1.85/0.85	3.730	2 个, 0.098, 0.216	1 个, 0.225
0.3/1.8/0.9	3.767	1 个 0.219	1 个, 0.25
0.3/1.75/0.95	3.804	1 个 0.2115	1 个, 0.275

由表 3.1, 我们可以看出, 以 D-10-樟脑磺酸铵/二氯甲烷/甲醇作为展开剂时, 美托洛尔和阿替洛尔均可得到拆分。当二氯甲烷体积含量在 61.7%-83.3% 范围内时, 美托洛尔可以拆分得到两个斑点; 而当二氯甲烷体积含量在 65%-83.3% 范围内时, 阿替洛尔也可以拆分得到两个斑点。当二氯甲烷与甲醇体积比为 3.2 (2.06/0.64) 时, 酒石酸美托洛尔分离效果最好。当二氯甲烷与甲醇体积比为 11.3 (2.48/0.22) 时, 阿替洛尔分离效果最好。

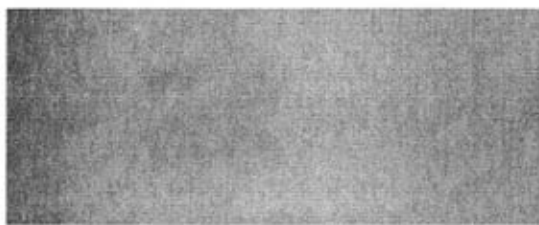


图 3.2 D-10-樟脑磺酸/二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.06/0.64) 展开剂拆分美托洛尔



图 3.3 D-10 樟脑磺酸/二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.48/0.22) 展开剂拆分阿替洛尔

以 D-10-樟脑磺酸铵作为流动相中手性离子对添加剂, 分别以不同比例的丙酮/二氯甲烷, 无水乙醇/二氯甲烷, 正戊醇/二氯甲烷, 乙酸乙酯/二氯甲烷, 乙酸乙酯/丙酮/二氯甲烷, 正丁醇/二氯甲烷, 异丙醇/二氯甲烷, 氯仿/二氯甲烷等为展开剂进行试验。结果表明, 这些展开体系的展开效果均不如甲醇/二氯



甲烷的理想，因此选择甲醇/二氯甲烷作为展开剂。

表 3.2 不同展开体系对美托洛尔和阿替洛尔的拆分情况

展开剂	美托洛尔斑点情况	阿替洛尔斑点情况
D-10-樟脑磺酸/丙酮 /二氯甲烷	0.3/0.64/2.06, 2 个斑点, 距离太近	0.3/0.22/2.48, 2 个斑点, 一个在起点
D-10-樟脑磺酸/氯仿 /二氯甲烷	0.3/1.08/1.62, 2 个斑点, 一个在起点	0.3/0.44/2.26, 2 个斑点, 一个在起点
D-10-樟脑磺酸/乙醇 /二氯甲烷	0.3/1.63/1.07, 1 个斑点, 拖尾	0.3/0.32/2.38, 2 个斑点, 一个在起点
D-10-樟脑磺酸/乙酸 乙酯/二氯甲烷	0.3/0.8/1.9, 2 个, 一个在起点	0.3/0.24/2.46, 1 个斑点
D-10-樟脑磺酸/异丙 醇/二氯甲烷	0.3/1.5/1.2, 2 个斑点, 一个在起点	0.3/0.45/2.25, 2 个斑点, 一个在起点
D-10-樟脑磺酸/正丁 醇/二氯甲烷	0.3/1.5/1.2, 一个斑点	0.3/0.45/2.25, 2 个斑点, 一个在起点
D-10-樟脑磺酸/丙酮 /乙酸乙酯/二氯甲烷	0. /0.57/0.27/1.86, 2 个斑点, 一个在起点	0.3/0.12/0.28/2.3, 一个斑点位于起点
D-10-樟脑磺酸/正戊 醇/二氯甲烷	0.3/1.63/1.07, 一个斑点	0.3/0.58/2.12, 2 个斑点, 一个在起点

### 3.4.3 温度的影响

比较了室温 (28℃), 8℃和-17℃时温度的影响, 如图 3.4, 3.5。结果表明在三个温度段美托洛尔均可获得拆分, 但是随着温度的降低, 前面斑点的颜色越来越淡, -17℃时几乎没有。只有在室温 (17℃) 下, 斑点的大小和颜色才比较一致, 故选用室温 (17℃) 作为美托洛尔的拆分温度。阿替洛尔的斑点在室温 (17℃) 下的斑点也是最好, 而随着温度的降低, 两个斑点距离越来越近, 因此同样选择室温 (17℃) 作为阿替洛尔的拆分温度

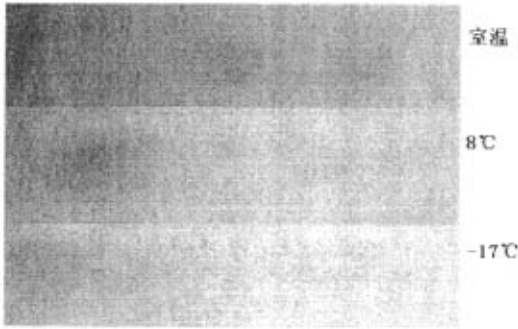
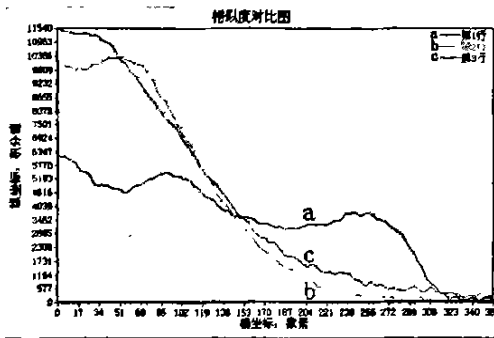


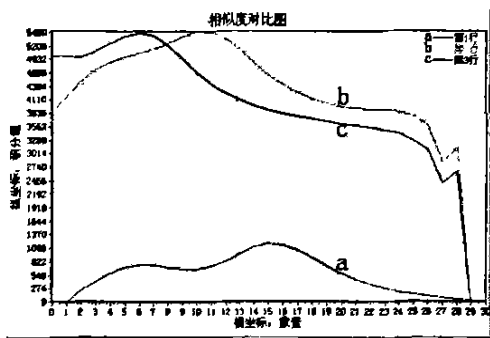
图 3.4 温度对美托洛尔的影响



图 3.5 温度对阿替洛尔的影响



美托洛尔



阿替洛尔

图 3.6 温度影响曲线 (a: 室温; b: 8℃; c: -17℃)

### 3.4.4 pH 的影响

#### 1) 样品 pH 的影响

比较美托洛尔和阿替洛尔溶液 pH 分别为 6.5, 7.0, 8.0 的影响, 如图 3.7, 3.8。当美托洛尔溶液 pH 为 8.0 时, 两个斑点大小和颜色均一致, 而样品 pH 为 6.5 和 7.0 时, 虽然也出现两个斑点, 但前面的斑点颜色比较淡, 因此选择美托洛尔溶液样品的 pH 为 8.0。而阿替洛尔样品溶液 pH 在 7.0, 8.0, 9.0 变化时, 均可拆分出两个斑点, 但是当 pH 为 7.0 时, 斑点大小基本一致, 所以选择阿替洛尔样品的 pH 为 7.0。

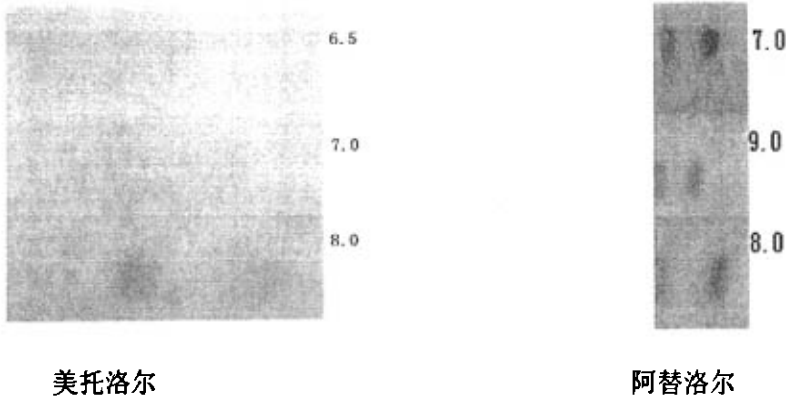
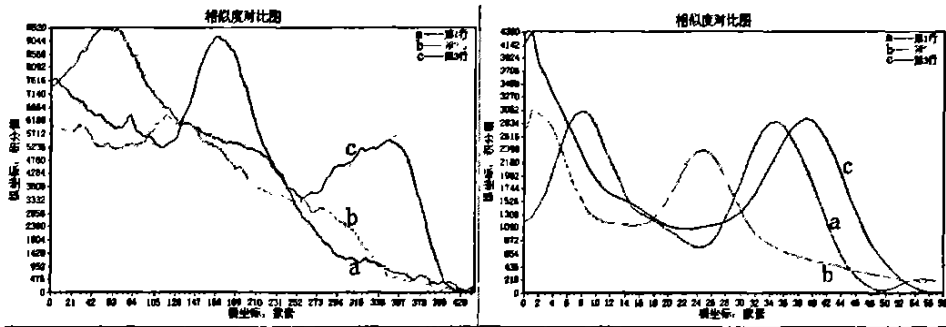


图 3.7 样品 pH 的影响

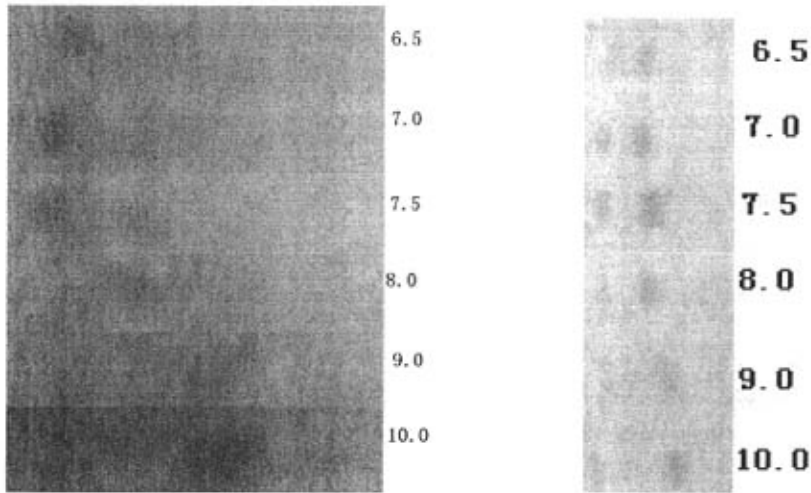


美托洛尔 (a: 6.5, b: 7.0, c: 8.0)      阿替洛尔 (a: 7.0, b: 9.0, c: 8.0)

图 3.8 pH 影响曲线

## 2) 展开剂中离子对试剂 pH 的影响

手性离子对添加剂对分离效果的影响比较大, 故考察了手性离子对添加剂 pH 分别为 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0 时对拆分效果的影响。结果表明手性离子对添加剂 pH 在 6.5-7.5 范围内, 美托洛尔均能得到拆分, 但是只有当手性离子对添加剂 pH=7.5 时, 两个斑点大小基本一致, 分离效果最好。当 pH 大于 7.5 时美托洛尔不能得到拆分。因此选择 pH=7.5 作为美托洛尔分离时离子对试剂的 pH。而手性离子对添加剂 pH 在 6.5-10.0 范围内, 阿替洛尔均能得到拆分。而且随着 pH 的增大, 两斑点的距离逐渐增大, 但是靠近原点的斑点逐渐变淡, 综合考虑斑点分离程度和两斑点的一致性, 选择 pH=7.5 作为阿替洛尔分离时离子对试剂的 pH。



美托洛尔

阿替洛尔

图 3.9 离子对试剂 pH 对拆分的影响

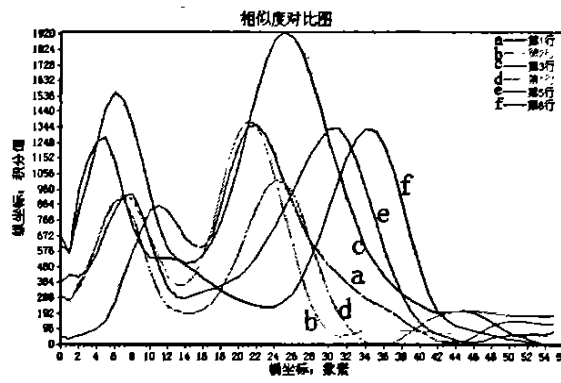


图 3.10 离子对试剂 pH 对阿替洛尔拆分的影响曲线

(a: 6.5, b: 7.0, c: 7.5, d: 8.0, e: 9.0, f: 10.0)

### 3.4.5 手性离子对添加剂浓度的影响

由于手性离子对添加剂要与对映体生成非对映异构体，其浓度变化对于分离就有影响。变化 D-10-樟脑磺酸铵溶液的浓度，分别为 0.17, 0.34, 0.51, 0.68, 0.85, 1.02mmol/L，结果如图 3.11。虽然在这些浓度时，美托洛尔都可以得到拆分，但是当浓度为 0.17 mmol/L 时，两斑点大小基本一致。相似度曲线的两个积分峰也基本一致。阿替洛尔在这些浓度值时也可以得到拆分，当浓

度为 0.17 mmol/L 时，斑点大小也基本一致。因此选择 D-10-樟脑磺酸铵溶液的浓度为 0.17 mmol/L 作为美托洛尔和呵替洛尔拆分时手性离子对添加剂的浓度。

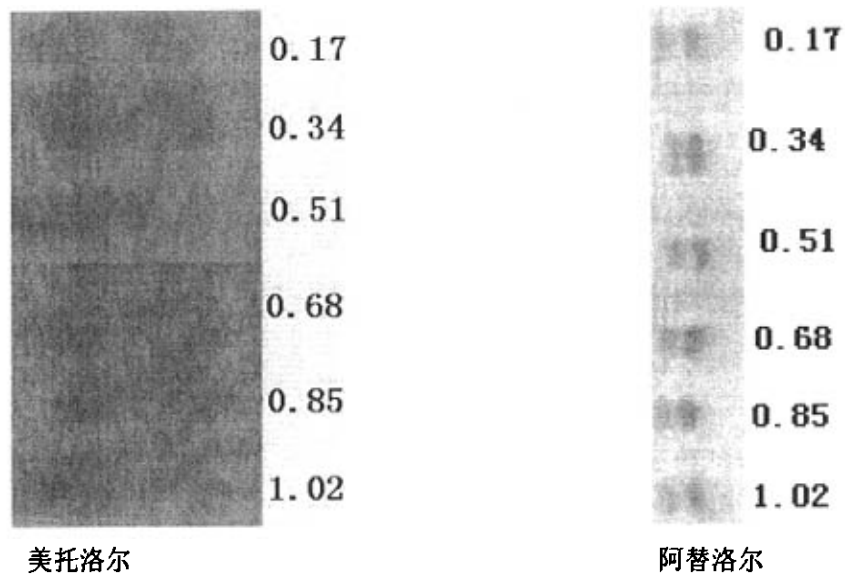


图 3.11 浓度对拆分的影响

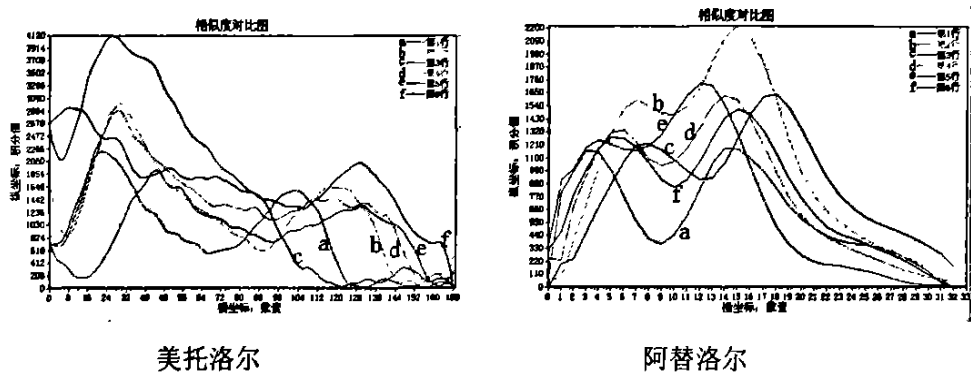


图 3.12 浓度影响曲线

(a: 0.17, b: 0.34, c: 0.51, d: 0.68, e: 0.85, f: 1.02mmol/L)

3.4.6 重现性

综合上述实验结果得出薄层色谱分离美托洛尔的最佳条件为 D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.17mmol/L, pH=7.5) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.06/0.64, V/V/V), 室温 (17℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0; 薄层色谱分离美托洛尔的最佳

条件为 D-10-樟脑磺酸铵溶液（0.17mmol/L，pH=7.5）/二氯甲烷/甲醇（0.3/2.48/0.22，V/V/V），室温（17℃）下预饱和 30min，样品 pH 为 7.0。按照最佳条件，在薄板（10×10cm）上点四个点跑板，结果如下：

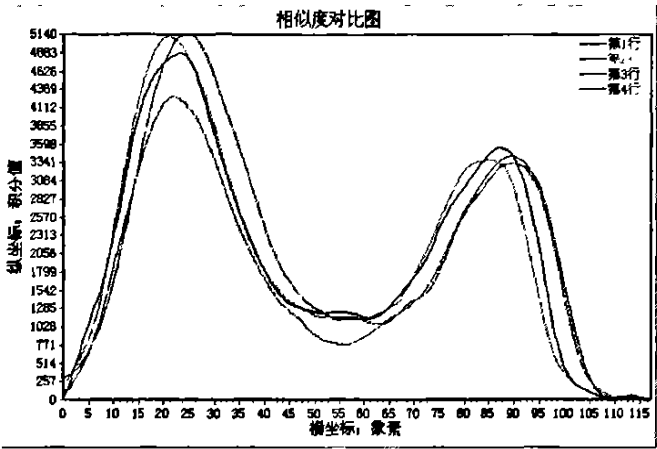
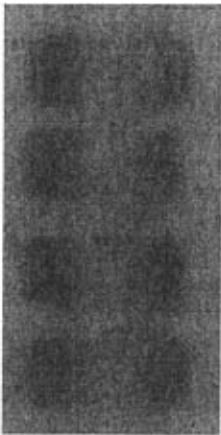


图 3.13 美托洛尔薄层拆分同板重现性

图 3.14 美托洛尔同板重现性曲线

表 3.3 美托洛尔同板重现性 RSD 数据

峰号	峰 1 面积	Rf1	峰 2 面积	Rf2
1	100461	0.21	55372	0.74
2	96637	0.18	58130	0.74
3	97274	0.20	55951	0.75
4	97992	0.19	53038	0.75
均值	98091		55622.75	
RSD	1.7%		3.76%	



图 3.15 阿替洛尔薄层拆分同板重现性

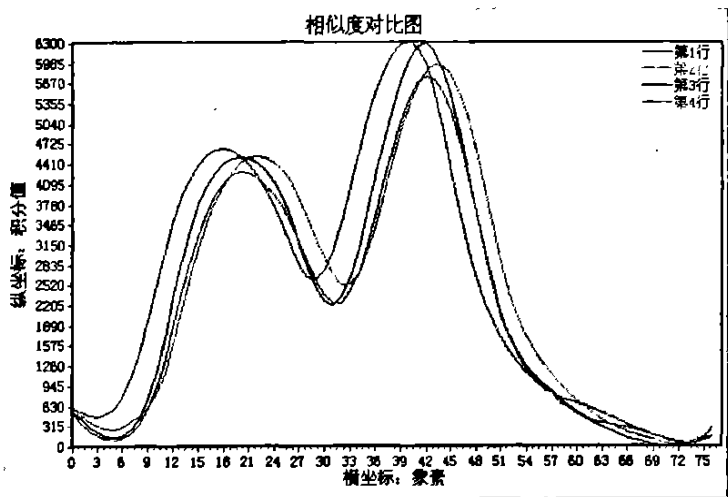


图 3.16 阿替洛尔同板重现性曲线

表 3.4 阿替洛尔同板重现性 RSD 数据

峰号	峰 1 面积	Rf1	峰 2 面积	Rf2
1	38899	0.23	43483	0.52
2	37190	0.29	41444	0.56
3	40236	0.26	44314	0.55
4	38096	0.26	41709	0.55
均值	38605.25		42737.5	
RSD	3.35%		3.25%	

由表 3.3, 3.4 可以看出, 美托洛尔和阿替洛尔均获得拆分, 美托洛尔拆分斑点的 RSD 分别为 1.7%, 3.76%; 阿替洛尔拆分斑点的 RSD 分别 3.35%, 3.25%, 重现性较好。

3.4.7 分离的美托洛尔和阿替洛尔两斑点的紫外光谱图

分别按照美托洛尔和阿替洛尔拆分的最佳条件: D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.17mmol/L, pH=7.5) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.06/0.64, V/V/V), 室温 (17℃)下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0; D-10-樟脑磺酸铵溶液(0.17mmol/L, pH=7.5) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.48/0.22, V/V/V), 室温 (17℃) 下预饱和 30min, 样

品 pH 为 7.0。在  $20 \times 10 \text{ cm}$  薄板上跑板，用碘熏显色并记录斑点位置。待碘挥发完后分别将斑点刮下，美托洛尔用 95% 乙醇超声溶解 30min，阿替洛尔用乙醇超声溶解 30min 后，分别先以滤纸-漏斗过滤，再用微孔滤膜过滤，滤液测定紫外光谱如图 3.17，3.18 所示：

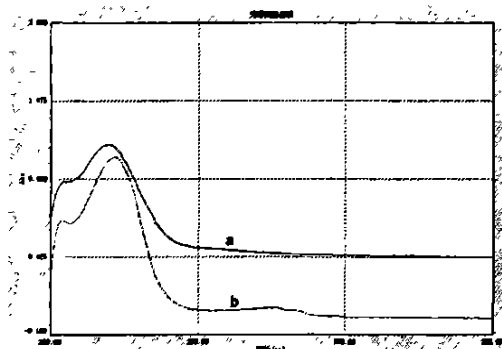


图 3.17 美托洛尔两斑点紫外吸收

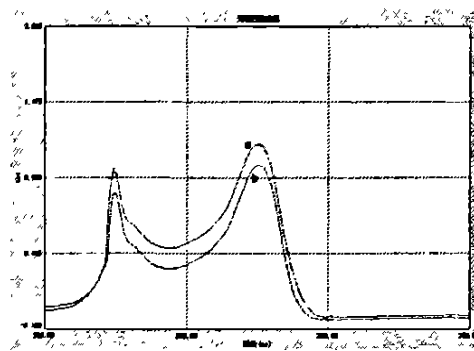


图 3.18 阿替洛尔两斑点紫外吸收

(a: 均代表离原点较近的斑点; b: 均代表离溶剂前沿较近的斑点)

从二者的紫外吸收图可以看出，美托洛尔两斑点均出现在 224nm，与药典描述的相吻合，且两斑点的紫外吸收图基本一致，可以证明所分离的两个斑点就是美托洛尔对映体。阿替洛尔两斑点也均在 227nm 和 276nm 出现最大吸收，与药典描述一致，两斑点的紫外吸收图同样基本一致，也可以证明所分离的两个斑点就是阿替洛尔对映体。

### 3.4.8 旋光度证明

对 2.4.8 中制备得到的溶液测定旋光度 (表 3.5)。距离原点较近的斑点分别为右旋 (+) 美托洛尔和右旋 (+) 阿替洛尔对映体，距离溶剂前沿较近的斑点为左旋 (-) 美托洛尔和左旋 (-) 阿替洛尔对映体。



表 3.5 美托洛尔、阿替洛尔斑点旋光度数据

斑点	旋光度数值
美托洛尔离溶剂前沿较近斑点	-0.003
美托洛尔离溶剂前沿较远斑点	+0.008
阿替洛尔离溶剂前沿较近斑点	-0.001
阿替洛尔离溶剂前沿较远斑点	+0.013

### 3.5 结论

在室温（17℃）下，以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂，在二氯甲烷/甲醇体系中美托洛尔和阿替洛尔对映体均得到了拆分，且重现性较好。该法简便、经济、易行。

### 3.6 三种药物的拆分比较

普萘洛尔、美托洛尔、阿替洛尔三种  $\beta$ -受体阻滞剂药物，以 D-10-樟脑磺酸铵作为手性离子对试剂添加到薄层色谱流动相（甲醇/二氯甲烷）中，均可以得到拆分。手性识别的产生是由于 D-10-樟脑磺酸铵分子与三者对映体分子在空间上能很好地结合，作用较为充分，能生成稳定的非对映异构离子对，其在有机流动相和固定相中的分配有较大的差异而导致的。而阿替洛尔的拆分效果不如普萘洛尔和美托洛尔，可能由于结构中存在酰胺结构，与 D-10-樟脑磺酸铵的结合不是很好而导致的。

## 4 手性选择体固载薄层色谱法拆分盐酸普奈洛尔、美托洛尔和阿替洛尔对映体

### 4.1 引言

糊精(CD)是由6、7或8个D-葡萄糖单元通过 $\alpha$ -1,4糖苷键结合而成的环形的、非还原性的低聚寡糖,分别用 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 表示,它们都是晶体,无吸湿性,能够工业化生产。

在CD分子中,糖单元都采用<sup>4</sup>C<sub>1</sub>椅式构象,并且自我旋转形成环形/中空的截面圆锥形结构,一系列的水溶性或非水溶性化合物都能进入这个空穴形成包合络合物。 $\beta$ -CD是使用最多的CD,由于各种原因,如价格、适用性、普通的溶剂分子都能包含的空穴的几何形状等,它占生产和消费CD的95%。

$\beta$ -环糊精(Cyclodextrin, CD)是由环糊精葡萄糖基转移酶(CGT)作用于淀粉所产生的7个葡萄糖单元以1,4-糖苷键结合而成的环状低聚糖筒状化合物,它具有一定尺寸的疏水性空腔和亲水性外沿,能作为“宿主”包络“客体”形成特殊结构的包合物,因而具有一定的立体选择和识别性能。项生昌等曾利用这一特性研究了CD与甲基橙、苯基甘氨酸、苯甲醛等疏水性苯基及其衍生物的超分子化合物的制备及主客体相互作用,并利用这些基础数据成功地进行了氨基酸的不对称合成和苯氯代衍生物的分离提纯<sup>[97-101]</sup>。在分子化合物和硅胶上固载化的环糊精作为立体选择剂,广泛用于气相色谱<sup>[102]</sup>、高效液相色谱<sup>[103]</sup>和高效毛细管电泳<sup>[104]</sup>。 $\beta$ -环糊精及其衍生物作为HPLC手性流动相添加剂已用于多种手性化合物对映体的分离<sup>[105, 106]</sup>。

分离分析手性药物对映体,目前多采用具有手性固定相(CSP)高效液相色谱法<sup>[107, 108]</sup>,采用手性选择体涂敷薄层色谱分离分析手性药物对映体的研究较少<sup>[109, 110]</sup>。液相色谱CSP合成困难且价格昂贵,相对而言,手性选择体涂敷薄层色谱选择范围也较宽,且操作相对简单,分离分析手性药物对映体纯度具有很好发展前景。于金刚曾采用涂敷型TLC薄板法成功拆分了 $\beta$ -肾上腺素能激动剂药物盐酸克伦特罗<sup>[111, 112]</sup>。

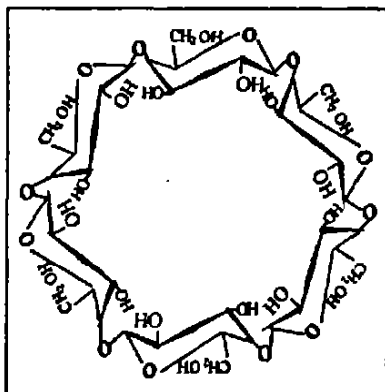


图4.1 环糊精结构

本实验研究了将 $\beta$ -CD, 作为手性选择剂固载于TLC板, 分离了盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体, 并考察了流动相组成及配比、手性选择剂固载量、拆分温度等对分离的影响, 优化了实验条件。实验结果表明,  $\beta$ -CD 固载薄层色谱可有效拆分盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体, 且样品拆分后斑点大小一致, 效果较好。

## 4.2 实验试剂及仪器

### 4.2.1 主要试剂

$\beta$ -环糊精 B. R. 北京奥博星生物技术责任有限公司; 硅胶 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工有限公司); 羧甲基纤维素钠 (AR; 上海三浦化工有限公司); 甲醇 (AR; 天津博迪化工有限公司); 二氯甲烷 (AR; 天津博迪化工有限公司); 95%乙醇 (AR; 上海有机化工试剂研究所); 香草醛 (AR; 成都科龙化工试剂厂); 浓硫酸 (AR; 成都市欣海兴化工试剂厂); 正丁醇 (AR, 天津市博迪化工有限公司); 丙酮 (AR, 上海有机化工试剂研究所); 氯仿 (AR, 成都长联化工试剂有限公司); 碘 (AR, 成都科龙化工试剂厂); 无水乙醇 (AR, 成都科龙化工试剂厂); 异丙醇 (AR, 天津市博迪化工有限公司); 乙酸乙酯 (AR, 天津市博迪化工有限公司)。

盐酸普萘洛尔片 (湖北华中药业有限公司, 标示量为 10 mg/片); 酒石酸美托洛尔片 (常州四药制药有限公司, 标示量为 50 mg/片); 阿替洛尔片 (天津市中央药业有限公司, 标示量为 25 mg/片)。

#### 4.2.2 主要仪器

展开缸 (250mL 广口瓶); DZF—6050 真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); JY2002 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); 玻璃毛细管点样器 (华西医科大学仪器厂); 风华电冰箱; SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 布氏漏斗; 舒美 KQ2200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); OLYMPUS (X230) 数码相机; 平面色谱数字图像处理软件 (四川大学化工学院梁冰教授实验室研制)。

### 4.3 实验研究

#### 4.3.1 对映体溶液的配制

分别参考中国药典 (2005 年版) 测定盐酸普萘洛尔片中的普萘洛尔含量, 以及测定酒石酸美托洛尔片中美托洛尔和阿替洛尔片中阿替洛尔含量的样品溶液制备方法, 取盐酸普萘洛尔片 10 粒 (称重 0.711g), 置于研钵中碾碎, 用 20mL 95% 乙醇溶解配成 5mg/mL 溶液, 超声溶解 1h, 抽滤, 滤液作为盐酸普萘洛尔样品溶液。取酒石酸美托洛尔片 5 粒 (称重 0.711g), 置于研钵中碾碎, 用 100mL 95% 乙醇溶解配成 2.5mg/mL 溶液, 超声溶解 1h, 抽滤, 滤液作为美托洛尔样品溶液。取阿替洛尔片 10 粒 (称重 0.711g), 置于研钵中碾碎, 用 50mL 95% 乙醇溶解配成 5mg/mL 溶液, 超声溶解 1h, 抽滤, 滤液作为阿替洛尔样品溶液。

#### 4.3.2 环糊精的重结晶

取 35.25g  $\beta$ -CD 至 250 mL 烧杯中, 加入 150 mL 蒸馏水, 电炉加热煮沸, 并不断搅拌至  $\beta$ -CD 完全溶解, 空气中放至室温, 冰箱 (-17℃) 冷藏过夜, 次日过滤, 滤液用 200mL 冷却蒸馏水洗涤两次, 抽滤至干, 滤饼于真空 (110℃) 下干燥, 得重结晶  $\beta$ -CD 30.26g, 收率为 85.9%

#### 4.3.3 制备手性选择体固载薄层色谱板

分别准确称取一定量的用蒸馏水重结晶的  $\beta$ -CD, 加入到 40mL 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液中, 搅拌至手性选择体完全溶解后, 继续称取 15.00g 硅胶 GF<sub>254</sub>

加入其中，搅拌约半小时，赶走气泡并使硅胶均匀分散到梭甲基纤维素钠水溶液中。采用倾注法铺制 10cm × 2.5cm 硅胶薄层板。室温下空气中放置过夜，晾干后转移入干燥箱于 105℃ 下活化干燥 1h，转移入干燥器保存备用。

#### 4.3.4 显色方法

盐酸普萘洛尔采用硫酸-香草醛显色，酒石酸美托洛尔和阿替洛尔均采用碘熏显色。

### 4.4 结果与讨论

#### 4.4.1 展开体系的影响

以 1.0g  $\beta$ -CD 固载 15.0g 硅胶 GF<sub>254</sub> 制备的薄层色谱板作拆分实验考察了包括甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯、氯仿与二氯甲烷两两混合的混合溶剂以及不同体积配比的甲醇/氯仿、乙酸乙酯/石油醚混合溶剂进行拆分。结果表明，甲醇/二氯甲烷混合溶剂可使盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔均实现分离，样品斑点拖尾轻微，分离效果较好，所以本试验选用甲醇/二氯甲烷混合溶剂作展开剂。

表 4.1 不同展开体系拆分的斑点情况

展开剂	普萘洛尔斑点情况	美托洛尔斑点情况	阿替洛尔斑点情况
丙酮/二氯甲烷	一个斑点，位于原点	一个斑点	一个斑点，位于原点
无水乙醇/二氯甲烷	一个斑点	两个斑点，拖尾严重	一个斑点
正戊醇/二氯甲烷	一个斑点	一个斑点	一个斑点
乙酸乙酯/二氯甲烷	一个斑点，位于原点	一个斑点	一个斑点，位于原点
正丁醇/二氯甲烷	一个斑点	一个斑点	一个斑点
氯仿/二氯甲烷	一个斑点	一个斑点，位于原点	一个斑点
异丙醇/二氯甲烷	一个斑点	一个斑点，拖尾严重	一个斑点

		重	
乙酸乙酯/丙酮/ 二氯甲烷	一个斑点	一个斑点, 位于原 点	一个斑点, 位于原 点
乙腈/二氯甲烷	一个斑点	一个斑点	一个斑点
正丁醇/乙腈	一个斑点, 拖尾严重	一个斑点	一个斑点
	重		
异丙醇/乙腈	一个斑点	一个斑点, 拖尾严重	一个斑点
		重	

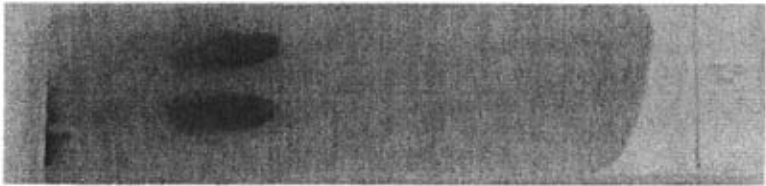


图 4.2 正丁醇/乙腈 (2.5/0.5) 展开体系对普萘洛尔的拆分影响

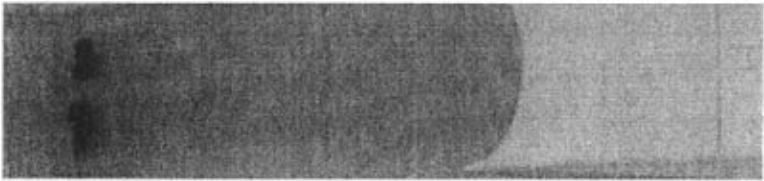


图 4.3 乙酸乙酯/二氯甲烷 (2.8/0.2) 展开体系对普萘洛尔的拆分影响



图 4.4 乙酸乙酯/二氯甲烷 (1.35/1.65) 展开体系对美托洛尔的拆分影响

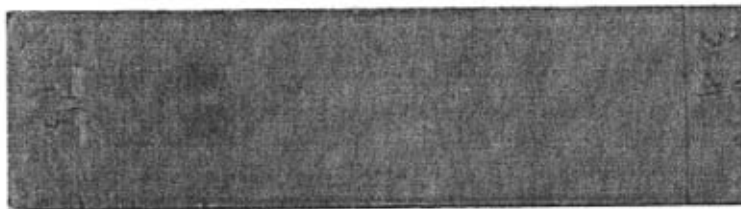


图 4.5 异丙醇/二氯甲烷 (2.25/0.75) 展开体系对美托洛尔的拆分影响



图 4.6 丙酮/二氯甲烷 (1.5/1.5) 展开体系对阿替洛尔的拆分影响

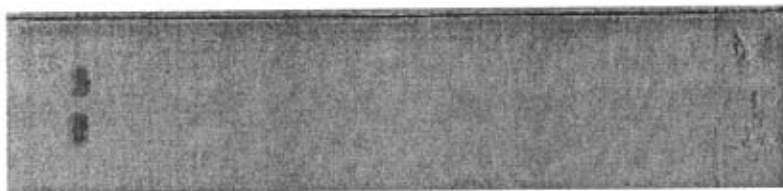


图 4.7 无水乙醇/二氯甲烷 (2.5/0.5) 展开体系对阿替洛尔的拆分影响

#### 4.4.2 展开比例的影响

以  $\beta$ -CD 固载薄层色谱作拆分实验, 考察不同体积比甲醇/二氯甲烷混合展开剂对分离效果的影响, 结果如表 4.2 所示。结果表明, 甲醇/二氯甲烷混合展开剂中甲醇体积百分比位于 54.7%~66.7% 时, 普萘洛尔均可实现分离, 且分离度  $R$  均大于 1.5, 即可实现基线分离。比较实验结果中 TLC 色谱图, 选择展开剂条件为  $V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=1.64/1.36$  时, 斑点大小均一, 无拖尾现象, 分离效果较好。而当甲醇/二氯甲烷混合展开剂中甲醇体积百分比位于 26.7%~33.3% 时, 美托洛尔均可得到分离, 但是当  $V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=0.87/2.13$  时, 分离效果最好。当甲醇/二氯甲烷混合展开剂中甲醇体积百分比位于 43.3%~63.3% 时, 阿替洛尔均可得到分离, 但是当  $V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=1.5/1.5$  时, 分离效果最好。

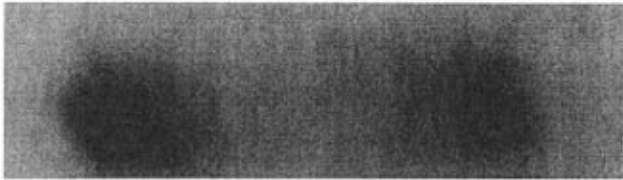


图 4.8 甲醇/二氯甲烷=1.64/1.36 对普萘洛尔的拆分影响



图 4.9 甲醇/二氯甲烷=0.87/2.13 对美托洛尔的拆分影响

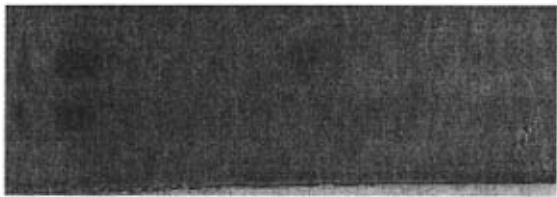


图 4.10 甲醇/二氯甲烷=1.5/1.5 对阿替洛尔的拆分影响

表 4.2 甲醇/二氯甲烷对普萘洛尔、美托洛尔和阿替洛尔的拆分情况

甲醇/二氯甲 烷比例	展开剂极性	普萘洛尔斑点情况	美托洛尔斑 点情况	阿替洛尔斑 点情况
2.9/0.1	5.03	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.8/0.2	4.97	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.7/0.3	4.9	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.6/0.4	4.83	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.5/0.5	4.77	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.4/0.6	4.7	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.3/0.7	4.63	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.2/0.8	4.57	一个斑点	一个斑点	一个斑点
2.1/0.9	4.50	一个斑点	一个斑点	一个斑点



2.0/1.0	4.43	一个斑点	一个斑点	一个斑点
1.9/1.1	4.37	两个斑点	一个斑点	两个斑点
1.8/1.2	4.30	两个斑点	一个斑点	两个斑点
1.7/1.3	4.23	两个斑点	一个斑点	两个斑点
1.64/1.26	4.19	两个斑点	一个斑点	两个斑点
1.6/1.4	4.17	两个斑点	一个斑点	两个斑点
1.5/1.5	4.1	一个斑点	一个斑点	两个斑点
1.4/1.6	4.03	一个斑点	一个斑点	两个斑点
1.3/1.7	3.97	一个斑点	一个斑点	两个斑点
1.2/1.8	3.90	一个斑点	一个斑点	一个斑点
1.1/1.9	3.83	一个斑点	一个斑点	一个斑点
1.0/2.0	3.77	一个斑点	两个斑点	一个斑点
0.9/2.1	3.70	一个斑点	两个斑点	一个斑点
0.87/2.13	3.68	一个斑点	两个斑点	一个斑点
0.8/2.2	3.63	一个斑点	两个斑点	一个斑点

#### 4.4.3 温度的影响

比较 8℃, -17℃, 及室温(15℃)下  $\beta$ -CD 固载固定相拆分普萘洛尔、美托洛尔和阿替洛尔的情况, 可以发现在三个温度下普萘洛尔、美托洛尔和阿替洛尔均可得到拆分, 随着温度的降低, 斑点之间的距离虽然越来越远, 但是也越来越不对称, 因此选择室温(15℃)作为  $\beta$ -CD 固载固定相拆分普萘洛尔、美托洛尔和阿替洛尔的最佳实验温度。

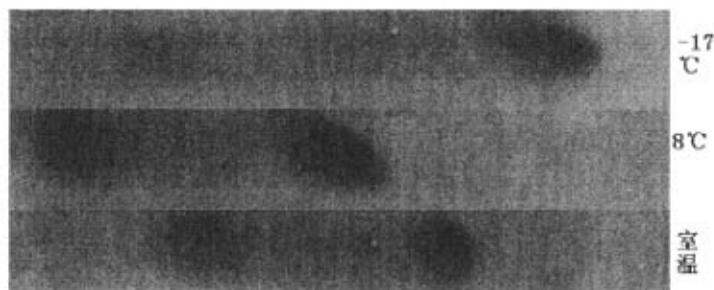


图 4.11 温度对普萘洛尔拆分的影响

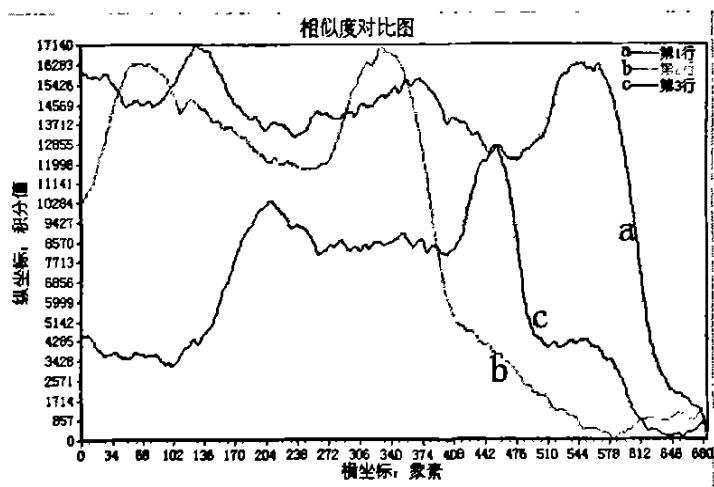


图 4.12 温度对普萘洛尔拆分的影响曲线 (a: -17°C, b: 8°C, c: 室温)

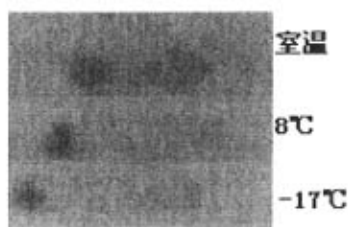


图 4.13 温度对美托洛尔拆分的影响

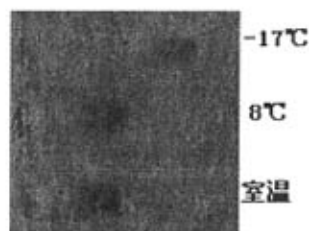


图 4.14 温度对阿替洛尔拆分的影响

#### 4.4.4 $\beta$ -CD 固载量的影响

分别考察 0.25g, 0.375g, 0.5g, 0.75, 1.00g, 1.5g  $\beta$ -CD 固载 15.0g

硅胶 GF<sub>254</sub> 制备的薄层色谱板作拆分盐酸普萘洛尔对映体实验, 选择流动相为混合溶剂甲醇/二氯甲烷(V/V=1.64/1.36), 室温下展开。实验结果(图 4.15)表明, 随着  $\beta$ -CD 固载量的增加, 分离度 R 逐渐增大。但是由于  $\beta$ -CD 的水溶性不好, 当固载量增大时, 展开后的薄板会出现少许晶体, 不利于显色。当  $\beta$ -CD 固载量为 0.75g 时, TLC 色谱图显示分离后的样品点大小最均匀, 对显色影响也不是很大, 所以选择条件为 0.75g  $\beta$ -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 来制备薄层色谱板, 即硅胶/ $\beta$ -CD (20: 1, m/m) 铺板。

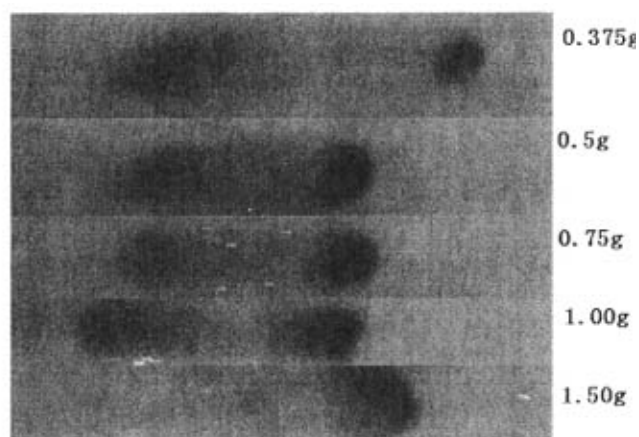


图 4.15  $\beta$ -CD 固载量对普萘洛尔拆分的影响

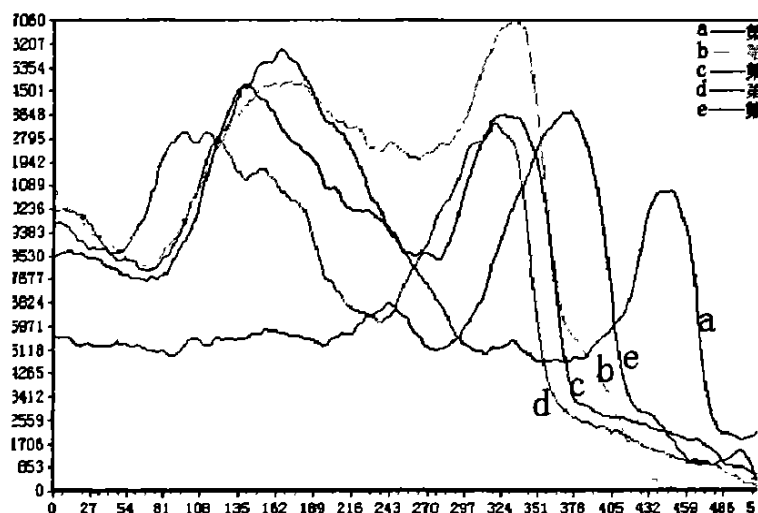


图 4.16  $\beta$ -CD 固载量对普萘洛尔拆分影响曲线

(a: 0.375g, b: 0.5g, c: 0.75, d: 1.00g, e: 1.5g)

#### 4.4.5 重现性

综合上述实验结果得出  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱分离盐酸普萘洛尔的最佳条件为甲醇/二氯甲烷 (1.64/1.36, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0; 美托洛尔的最佳条件为甲醇/二氯甲烷 (0.87/2.13, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 7.0; 阿替洛尔的最佳条件为甲醇/二氯甲烷 (1.5/1.5, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0。按照最佳条件, 分别在薄板 ( $\beta$ -CD/GF254: 1/20, m/m; 10×10cm) 上点四个点跑板, 结果如图 4.17:

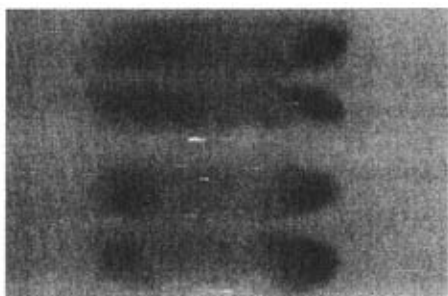


图 4.17 普萘洛尔薄层拆分同板重现性

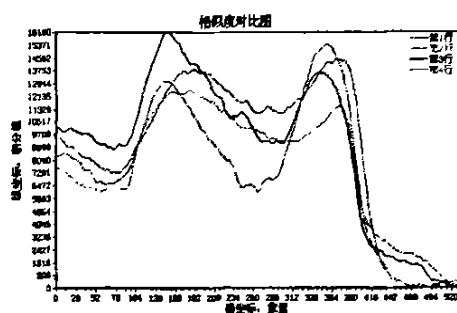


图 4.18 普萘洛尔同板重现性曲线

表 4.3 普萘洛尔同板重现性 RSD 数据

编号	峰 1 面积	峰 2 面积	Rf1	Rf2
1	554839	605719	0.28	0.68
2	573807	698914	0.27	0.67
3	573835	631991	0.28	0.68
4	630016	61755	0.27	0.66
RSD	5.58%	6.82%		



图 19 美托洛尔薄层拆分同板重现性



图 20 阿替洛尔薄层拆分同板的重现性

表 4.4 美托洛尔同板重现性 RSD 数据

编号	峰 1 面积	峰 2 面积	Rf1	Rf2
1	12759	5478	0.24	0.62
2	13135	5805	0.26	0.63
3	12400	5684	0.26	0.62
4	12977	5391	0.26	0.62
RSD	2.48%	3.38%		

表 4.5 阿替洛尔同板重现性 RSD 数据

编号	峰 1 面积	峰 2 面积	Rf1	Rf2
1	11417	25847	0.14	0.83
2	11213	18713	0.1	0.83
3	11017	22052	0.14	0.82
4	11354	19205	0.14	0.82
RSD	1.58%	15.7%		

## 4.5 分离机理

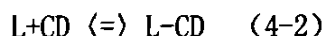
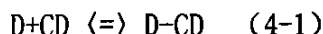
### 4.5.1 环糊精作手性选择体拆分对映体机制

环糊精(Cyclodextrin, CD)是由 6, 7, 8 或更多个 D-吡喃葡萄糖单元通过  $\alpha$ -1, 4 糖苷键键连而成的“去顶锥筒”状分子, 分别是  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD。由于它们的 6-位伯羟基均位于“去顶锥筒”空腔的小口端, 2-及 3-位仲羟基均位于“去顶锥筒”空腔的大口端, 所以环糊精具有一定的亲水性, 同时空腔内表面只有氢原子和带孤电子对的糖苷氧原子, 故具有疏水性。构成环糊精的 D-吡喃葡萄糖单元具有右旋的立体构型, 这些独特的结构使得它们与有机型客体分子复合时, 可产生良好的识别性能。

### 4.5.2 环糊精拆分盐酸普萘洛尔对映体机制

色谱分离技术中, 采用环糊精作 TLC 流动相添加剂分离对映体是因为环糊精可导致试样分子受到不同的吸附或滞留作用而获得分离。

环糊精分离两个对映体(D, L)的基本机理是: 设 CD 与两个对映体形成稳定的包合物, 如下列两个平衡表达所示<sup>[46]</sup>:



式(4-1)、(4-2)中, D, L 分别代表两个对映体。

当温度等实验条件一定时, TLC 分离试样有如下公式:

$$\frac{R_f}{1-R_f} = \left(\frac{V_b}{W_g}\right) \cdot \left(\frac{1}{K'}\right) \cdot (K_b \cdot [CD] + 1) \quad (4-3)$$

式(4-3)中,  $V_b$  是流动相的体积,  $W_g$  是薄层板上吸附的重量,  $k'$  是试样在流动相和固定相中的分配系数,  $K_b$  是环糊精与试样在流动相中按 1:1 包结复合时的平衡常数, 可用于判断相应条件下环糊精对试样分子的识别能力的参数。

从式(4-3)可知, 流动相中环糊精的浓度 $[CD]$ 越大, 试样受到的包结次数越多, 相应的  $R_f$  也越大, 所以, 流动相中环糊精浓度足够大是对映体获得分离的关键因素。同时, 当流动相组成和配比变化时,  $k'$  与  $K_b$  也会发生变化, 试样的  $R_f$  值也随之变化, 因此也是 TLC 分离对映体的重要影响因素

Armstrong 等<sup>[46]</sup>采用  $\beta$ -CD 作 HPLC 手性流动相添加剂拆分手性药物, 并通过计算机模拟, 认为 (+)-R-, (-)-S-普萘洛尔对映体手性碳上羟基处于同样位置, 与 CDs 上 C-3 位羟基生成最适氢键。主要差别在于仲氨基位置, (+)-R-普萘洛尔与  $\beta$ -CD 上 2, 3 位仲羟基更易生成氢键, 所以成键更牢固, 作 TLC 分离展开时, 距溶剂前沿较远, (-)-S-普萘洛尔相对则距溶剂前沿较近, 实现分离。

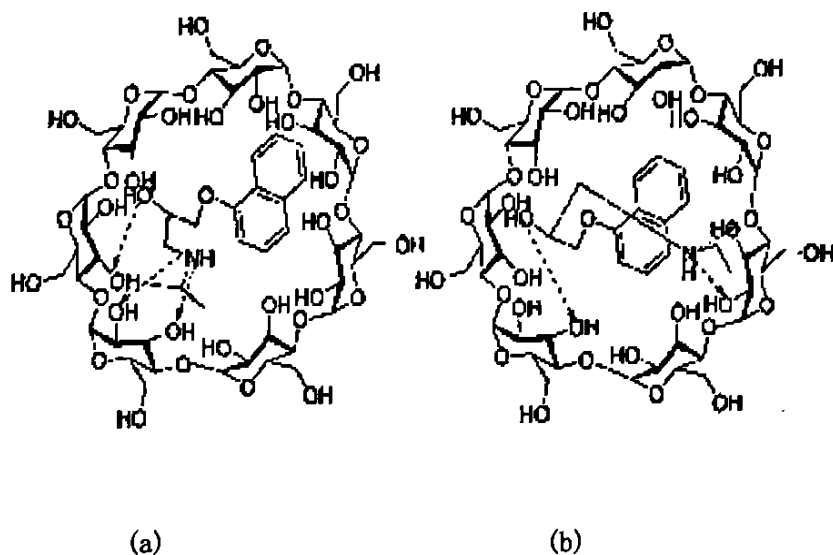


图 21 Armstrong 等计算机模拟 (+)-R-普萘洛尔, (-)-S-普萘洛尔与  $\beta$ -CD 分子间作用力模型

(a) (+)-R-普萘洛尔      (b) (-)-S-普萘洛尔

#### 4.6 实验中需要注意的问题

制备手性选择体硅胶薄层板时, 如果不预先将  $\beta$ -CD 溶解在羧甲基纤维素钠水溶液中, 加入硅胶 GF<sub>254</sub> 后搅拌时,  $\beta$ -CD 则不会均匀分散到硅胶中, 铺制的 TLC 薄板不一致, 拆分时效果不好, 且无法平行比较拆分结果。所以在制备薄板时, 必须注意手性选择体在羧甲基纤维素钠水溶液中完全溶解后, 再加入硅胶 GF<sub>254</sub>, 并充分搅拌使其分布均匀。最好在超声波清洗器中超声 10-20min, 以除掉混合产生的气泡。铺板时, 小心振荡涂有调制好的硅胶的玻璃板, 尽量多振荡, 以使铺制的 TLC 薄板平整均匀, 从而在作拆分试验时, 具有良好的重现性。

#### 4.7 结论

采用  $\beta$ -CD (重结晶) 固载硅胶 GF<sub>254</sub> (20: 1, m: m), 采用二氯甲烷/甲醇展开体系, 在室温下可拆分盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体, 该方法简便、易行, 为进一步采用  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法拆分手性药物提供了一定的理论基础。



## 5 结论与展望

### 5.1 结论

本文系统地研究了薄层色谱法包括手性流动相添加剂液相色谱法和手性选择体固载薄层色谱法拆分手性药物,对所得到的实验数据进行了总结,并分析探讨了手性拆分机制。得到了以下结论:

采用 D-10-樟脑磺酸铵作为薄层色谱流动相添加剂,拆分了盐酸普萘洛尔对映体。优化了色谱条件,得到了 D-10-樟脑磺酸铵作为流动相手性添加剂的薄层色谱法拆分盐酸普萘洛尔对映体的最佳色谱条件: D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.85mmol/L, pH=8.0) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/1.95/0.75, V/V/V), 冰箱 (8℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 7.0。同时研究了 D-10-樟脑磺酸铵作为薄层色谱流动相添加剂,拆分酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体的影响因素,得到了酒石酸美托洛尔拆分的最佳色谱条件: D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.17mmol/L, pH=7.5) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.06/0.64, V/V/V), 室温 (17℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0; 阿替洛尔拆分的最佳色谱条件: D-10-樟脑磺酸铵溶液 (0.17mmol/L, pH=7.5) /二氯甲烷/甲醇 (0.3/2.48/0.22, V/V/V), 室温 (17℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 7.0。

研究采用手性选择体  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法分别拆分了盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体,得到了盐酸普萘洛尔拆分的最佳条件: 甲醇/二氯甲烷 (1.64/1.36, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0; 美托洛尔的最佳条件: 甲醇/二氯甲烷 (0.87/2.13, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 7.0; 阿替洛尔的最佳条件: 甲醇/二氯甲烷 (1.5/1.5, V/V), 室温 (15℃) 下预饱和 30min, 样品 pH 为 8.0。其中薄板均按照硅胶 GF254 与  $\beta$ -环糊精质量比 20:1 的比例铺板。并初步探讨了  $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法拆分盐酸普萘洛尔的分离机制。

### 5.2 展望

本实验主要研究了以 D-10-樟脑磺酸铵作为薄层色谱流动相添加剂,拆分盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体的新方法,结果显示三种药物

均得到了较好的拆分，在今后的研究工作中，需要将以下几方面作为工作重点：

①进行柱色谱放大实验时可能遇到的难点和解决方案；

②进行旋光度确定实验时，需要收集更多量的对映体，尽量将浓度增大，以比旋光度作为旋光度确定的依据。

本实验还初步研究了用手性选择体 $\beta$ -环糊精固载薄层色谱法分别拆分盐酸普萘洛尔、酒石酸美托洛尔和阿替洛尔对映体的方法，三种药物也获得了拆分，但是在今后的实验中，需要改进以下内容：

① $\beta$ -环糊精的水溶性不好，室温下有时会析出晶体，考虑采用某种 $\beta$ -环糊精的衍生物如：羟丙基- $\beta$ -环糊精作为手性选择体固载薄层色谱进行拆分；

② 进行柱色谱进行制备分离实验。

## 参考文献

- [1] Persson Bengt-Arne, Andersson Shalini. Unusual effects of separation conditions on chiral separations[J]. J Chromatogr A, 2001, 906: 195~203
- [2] 叶秀林. 立体化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999, 12~15
- [3] 张永敏. 物理有机化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001, 23~24
- [4] 向小莉, 袁黎明. 手性化合物[J]. 化学教育, 2003, (5): 3~6
- [5] 尤田耙. 手性化合物的现代研究方法[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993, 36~38
- [6] 李良智, 史大永, 刘均洪等. 手性药物的构型与药效活性[J]. 青岛化工学院学报, 2001, 22(2): 124~126
- [7] Aimar Christian, et Audit Christine O. Thalidomide-induced teratogenesis in the newt (*Pleurodeles waltl.*) [J]. Biol Cell, 1995, 84(1-2): 114
- [8] Matthews S James, McCoy Christopher. Thalidomide: A review of approved and investigational uses[J]. Clin Ther, 2003, 25(2): 342~395
- [9] Trent D Stephens, Carolyn J W Bunde, Bradley J Fillmore. Mechanism of Action in Thalidomide Teratogenesis[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59: 1489~1499
- [10] Anon. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs[J], U.S. Food and Drug Administration Guidance, Washington, DC, 1992, 67: 296~299
- [11] Israel Agranat, Hava Caner. Intellectual property and chirality of drugs[J]. DDT, 1999, 4(7): 313~321
- [12] 黄蓓, 杨立荣, 吴坚平. 手性拆分技术的工业应用[J]. 化工进展, 2002, 21(36): 375~380
- [13] 杨振云, 张贻亮. 手性工业[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(10): 469~475
- [14] 李雷鸣, 高连勋, 丁孟贤. 对映体制备性分离方法的进展[J]. 化学通报, 1997, (2): 12~21, 16
- [15] Karen W Phinney. Chiral separations[J]. Anal Bioanal Chem, 2002, 372: 22
- [16] Shalini Andersson, Stig G Allenmark. Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery[J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 54: 11~23
- [17] 蒋约珥. 液膜手性分离技术[J]. 精细与专用化学品, 2002, (14): 16~18

- [18]杨晓弟, 马小玲, 方俊. 手性药物的化学拆分—形成和分离非对映体拆分法[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 1994, 22(2): 24~29
- [19]邓金根, 迟永祥, 朱瑾等. 化学拆分的新方法研究[J]. 合成化学, 1999, 7(4): 340~345
- [20]El Gihani, Moharem T, Williams Jonathan M J. Dynamic kinetic resolution[J]. Curr Opin Chem Biol, 1999, 3(1): 11~15
- [21]Allen JV, Williams MJ. Dynamic kinetic resolution with enzyme and palladium combinations[J]. Tetrahedron Lett, 1996, 37: 1859~1862
- [22]段钢, 陈家镛. 光学活性物质的工业生产方法[J]. 化工进展, 1995, (2): 32~36
- [23]Jeffrey H, Lutje Spelberg, Lixia Tang, et al. Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, (15): 1095~1102
- [24]S Joly, Mangalam S Nair. Studies on the enzymatic kinetic resolution of  $\beta$ -hydroxy ketones[J]. J Mol Catal B-Enzym. 2003, (22): 151~160
- [25]王道宾, 何炳林. 用固定化氨基酸化酶拆分 DL-一对氯苯丙氨酸[J]. 化学通报, 1994, (1): 50~52
- [26]徐诗伟, 徐清. 酶法拆分腈类制备光学活性 2-芳基丙酸[J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 184~187
- [27]辛嘉英, 李树本, 徐毅等. 膜反应器中萘普生甲酯的动态拆分[J]. 分子催化, 2001, 15(1): 42~46
- [28]谢锐, 褚良银, 曲剑波. 手性拆分膜的研究与应用新进展[J]. 现代化工, 2004, 24(4): 15~18
- [29]Alan Gabelman, Sun-Tak Hwang. Hollow fiber membrane contactors[J]. J Membrane Sci, 1999, (159): 61~106
- [30]Hadik Peter, Szab6 Lujza-P, Nagy Endre. D, L-lactic acid and D, L-alanine enantioseparation by membrane process[J]. Desalination, 2002, 148(1-3): 193~198
- [31]Keurentjes JTF, Nabuurs LJWM, Vegter EA. Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures[J]. J Membrane Sci, 1996, 113(2): 351~360
- [32]Maier Norbert M, Franco Pilar; Lindner Wolfgang. Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives[J]. J Chromatogr A, 1996, 906(1): 333
- [33]Pickering PJ, Chaudhuri JB. Enantioselective extraction of (d)-phenylalanine from racemic (d/l)-phenylalanine using chiral emulsion liquid membranes[J]. J Membrane Sci, 1997, 127(2): 115~130
- [34]Dzygiel Pawel, Wieczorek Piotr. Extraction of amino acids with emulsion liquid

membranes using industrial surfactants and lecithin as stabilizers[J]. J Membrane Sci, 2000, 172 (2): 223~232

[35]Krieg Henning M, Lotter Jeanette, Keizer Klaas, et al.Enrichment of chlorthalidone enantiomers by an aqueous bulk liquid membrane containing  $\beta$ -cyclodextrin[J]. J Membrane Sci, 2000, 167 (1): 33~45

[36]Coelhoso IM, Cardoso MM, Viegas RMC, et al. Transport mechanisms and modelling in liquid membrane contactors[J]. Separ Purif Technol, 2000, 19(3):183~197

[37]Aoki Toshiki, Ohshima Makoto, Shinohara Ken-ichi, et al. Enantioselective permeation of racemates through a solid (+)-poly (2-[dimethyl(10-pinanyl)silyl] norbornadiene) membrane[J]. Polymer, 1997, 38(1):235~238

[38]Thoelen C, De bruyn M, Theunissen E, et al. Membranes based on poly( $\gamma$ -methyl-L-glutamate): synthesis, characterization and use in chiral separations[J]. J Membrane Sci, 2001, 186 (2): 153~163

[39]Lee NH, Frank CW.Separation of chiral molecules using polypeptide-modified poly(vinylidene fluoride) membranes[J]. Polymer, 2002, 43(23): 6255~6262

[40]Randon J,Garnier F, Rocca JL,et al. Optimization of the enantiomeric separation of tryptophan analogs by membrane processes[J]. J Membrane Sci, 2000, 175(1):111~117

[41]龙远德, 黄天宝.  $\beta$ -环糊精聚合物膜拆分氨基酸对映体[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(6):884~886

[42]Yoshikawa Masakazu, Yonetani Kyoichi. Molecularly imprinted polymeric membranes with oligopeptide tweezers for optical resolution[J]. Polymer, 2002, 43(1-3):287~292

[43]Dalgliesh C E.The optical resolution of aromatic amino-acids on paper.Chromatography[J]. J Chem Soc, 1952, 137: 3940~3942

[44]Daniel W Armstrong, Timothy J Ward, R Douglas Armstrong, et al. Separation of drug stereoisomers by the formation of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes[J]. Science, 1986, 232: 1132~1135

[45]曾苏, 章立, 沈向忠, 等. 光学异构体的气相色谱拆分法[J]. 色谱, 1994, 12(4): 259~262

[46]Volker Schurig. Chiral separations using gas chromatography[J]. Trends AnalChem, 2002, 21( 9-10): 647~661

[47]Volker Schurig. Separation of enantiomers by gas chromatography[J]. J

Chromatogr A, 2001, 906:275~299

[48]Carlo Bicchi, Angela D'Amato, Patrizia Rubiolo. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields[J]. J Chromatogr A, 1999, 843: 99~121

[49]汪尔康. 21 世纪的分析化学[M]. 北京:科学出版社, 1999, 305~306

[50]陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2000, 103~118

[51]Zdenek Deyl, Ivan Miksik, F Tagliaro. Advances in capillary electrophoresis. Forensic Sci Int[J], 1998, 92: 89~124

[52]Jun Haginaka. Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using proteins as chiral selectors[J]. J Chromatogr A, 2000, 875: 235~254

[53]Hiroyuki Nishi. Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography[J]. J Chromatogr A, 1996, 735: 57~76

[54]Fang Wang, Morteza G Khaledi. Enantiomeric separations by nonaqueous capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 2000, 875: 277~293

[55]Salvatore Fanali. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors[J]. J Chromatogr A, 2000, 875: 89~122

[56]Bezhan Chankvetadze, Gottfried Blaschke. Enantioseparations in capillary electromigration techniques-- recent developments and future trends[J]. J Chromatogr A, 2001, 906, 309~363

[57]Hiroyuki Nishi, Shigeru Terabe. Optical resolution of drugs by capillary electrophoretic techniques[J]. J Chromatogr A, 1995, 694: 245~276

[58]Michael Laemmerhofer, Frantisek Svec, Jean MJ Freechet. Separation of enantiomers by capillary electrochromatography[J]. Trends Anal Chem, 2000, 19(11):676~698

[59]Gottfried Blaschke, Bezhan Chankvetadze. Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques[J]. J Chromatogr A, 2000, 875: 3~25

[60] Petersson P, Markides KE. Chiral separation performed by supercritical fluid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1994, 666: 381~394.

[61]马剑茵. 手性药物的色谱分离方法[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(4):199~202

[62]周志强, 张红雁, 于兆文等. 高效液相色谱法对外消旋药物的拆分[J]. 分析测试技术与仪器, 1998, 4(1): 1~7

[63]Francoise Bressolle, Michel Audran, Tuyet-Nga Pham, et al. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary

electrophoresis: basic principles and new developments[J]. J Chromatogr B, 1996, 687:303~336

[64] Patrick Piras, Christian Roussel, Johanna Pierrot-Sanders. Reviewing mobile phases used on Chiralcel OD through an application of data mining tools to CHIRBASE database[J]. J Chromatogr A, 2001, 906: 443~458

[65]曾苏. 高效液相色谱手性试剂衍生化法及其应用[J]. 色谱, 1994, 12(6):406~410

[66]Masayuki Nakano, Seiichi Kawahara. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of enantiomers of 5-dimethylsulphamoyl-6, 7-dichloro-2, 3-dihydrobenzofuran-2-carboxylic acid and its N-monodemethyl metabolite in monkey plasma and urine after chiral derivatization[J]. J Chromatogr Biomed Appl, 1991, 564(1): 235~241

[67]Eugene J Eisenberg, Weslia R Patterson, G Clare Kahn. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its O-desmethyl metabolite in human plasma after chiral derivatization[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1989, 493: 105~115

[68] Renato Lukac, Andrew J Clark, Syma Khalid, et al. Chiral discrimination immobile phases for HPLC[J]. J. Mol. Liq., 2002, 98-99:413~425

[69]Gorag S, Herenyi B.  $\alpha$ -Acid glycoprote in column in the high-performance liquid chromatographic analysis of some groups of chiral drugs[J]. J Pharm Biomed Anal, 1990, 8:841~848.

[70]Eto S, Noda H, Noda A. Chiral separation of barbiturates and hydantoins by reversed-phase high performance liquid chromatography using a 25 or 50mm short ODS catridge column viap-cyclodextrin inclusion complexes[J]. J Chromatogr, 1992, 579:253~258

[71]MC Millot. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis using immobilized proteins as chiral selectors[J]. J ChromatogrB, 2003, 797:131~159

[72]Britt-Marie Eriksson, Anita Wallin. Evaluation of the liquid-chromatographic resolution of indenoindolic racemic compounds on three protein-based chiral stationary phases[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 1995, 13 (4-5): 551~561

[73]Hassan Y Aboul-Enein. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases[J]. J Chromatogr A, 2001, 906:185~

- [74]Irma Kartoza, Martial Kanyonyo, Thierry Happaerts, et al. Comparative HPLC enantioseparation of new chiral hydantoin derivatives on three differenpolysaccharide type chiral stationary phases[J]. J Pharmaceut Biomed Analysis, 200227( 3-4): 457~465
- [75]Poul Vibholm Petersen, Jens Ekelund, Lars Olsen, et al. Chiral separations of  $\beta$ -blocking drug substances using the Pirkle-type  $\alpha$ -Burke 1 chiral stationary phase[J]. J Chromatogr. A, 1997, 757 (1-2): 65~71
- [76]Timothy J Ward , Alton B Farris III.Chiral separations using the macrocyclicantibiotics: a review[J].J ChromatogrA, 2001, 906 (1-2): 73~89
- [77]何丽一平面色谱方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2000, 110~119
- [78]朱全红, 邓芹英, 曾陇梅. 手性药物的薄层色谱拆分[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 155~158
- [79]郝爱友, 童林荟, 张复升.  $\beta$ -一环糊精为 TLC 流动相添加剂分离对映体[J]. 化学通报, 1996, (4):16~18
- [80]徐国珍. 薄层色谱分离酪胺酸异构体研究[J]. 食品研究与开发, 1998, 19(2):22~24
- [81]朱全红, 马果东, 邓芹英. 薄层色谱用苯基异氰酸酯衍生化的  $\beta$ -一环糊精键合固定相的制备及应用[J]. 分析化学, 2000, 28(3): 349~352
- [82]黄慕斌, 李高兰, 王晓.  $\beta$ -一环糊精键合相薄层板的制备及其性能初探[J]. 山东大学学报(自然科学版), 1994, 29(4): 427~430
- [83]项生昌, 郑建, 翁家宝等.  $\beta$ -一环糊精固载相薄层层析法拆分氨基酸 D, L-对映体的主客体作用研究[J]. 合成化学, 2001, 9(6): 499~502
- [84]余品香, 邓芹英, 王鹏.  $\beta$ -一环糊精色谱手性固定相的合成及性能表征[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 53~58
- [85]徐莉, 何建峰, 刘岚. 薄层色谱用纤维素苯甲酸酯类手性固定相的制备及色谱性能[J]. 分析测试学报, 2003, 22(2): 1~4
- [86]Yoko Nagata, Teruhito Iida, Masaki Sakai. Enantiomeric resolution of amino acids by thin-layer chromatography[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2001, 12: 105~108
- [87]Suedee R, Songkram C, Petmoreekul A, et al. Direct enantioseparation of adrenergic drugs via thin-layer chromatography using molecularly imprinted polymers[J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 1999, 19: 519~527
- [88] Mathur V, Kanoongo N, Mathur R, et al. Resolution of amino acid racemates on borate-gelled guaran-impregnated silica gel thin-layer chromatographic



- plates[J]. J Chromatogr A, 1994, 685(2):360~364
- [89] Bhushan R , Parshad Vineeta. Resolution of ( +)-ibuprofen using l-arginine-impregnated thin-layer chromatography[J]. J Chromatogr A , 1996 , 721(2):369~372
- [90] Alex D. Chirality~A cause for panic[J]. Chemistry in Britain, 1988, 24(9):847~848
- [91] 李乃宣, 阎秀芳, 肖如亭. HPLC 手性离子对试剂法拆分普萘洛尔对映体[J]. 应用化工. 2003, 32(2):48~50
- [92] 徐秀珠, 邹莉, 胡明华, 邵保海. 离子对色谱法分离氨基醇类对映体[J]. 分析化学研究简报. 2001, 29(11):1295~1298
- [93] 于金刚, 黄可龙, 刘素琴, 焦飞鹏, 彭霞辉. 手性选择体涂敷薄层色谱拆分盐酸普萘洛尔[J]. 分析实验室. 2006, 25(2) :59~62
- [94] 徐莉, 刘岚, 何建峰, 马果东, 邓芹英. 用三~(3, 5~二硝基苯甲酰基) 纤维素薄层分离对映体[J]. 中山大学学报(自然科学版) 2002, 41(5): 115~117
- [95] Huang M B, Li G L, Yang G S. Enantiomeric separation of aromatic amino alcohol drugs by chiral ion~pair chromatography on a silica gel plate[J]. J Liq Chromatogr, 1997, 20:1507
- [96] J D Duncan, D W Anstrung, A M Stalcup. Normal phase TLC separation of enantiomers using chiral ion interaction agents[J]. J Liq Chromatogr, 1990, 13:1091
- [97] 翁家宝, 邱建斌, 陈古镛. 分析化学[J], 1994, 22: 1085~ 1089
- [98] 郑瑛, 翁家宝, 周流芳等. 福建师范大学学报(自然科学版) [J], 1995, 11(4) : 52~55
- [99] 项生昌, 朱则善. 有机化学[J], 2000, 20(4) : 577~ 580
- [100] 项生昌, 郑瑛, 邹智敏等. 福建师范大学学报(自然科学版) [J], 1999, 15(1) : 67~70
- [101] 项生昌, 赵崇涛, 翁家宝等. 化学世界[J], 2000, 41(1): 30~ 33
- [102] Kong W, Schmidt N, Winz G, et al. J. HRC & CC. [J], 1988, 11: 621~ 625
- [103] Armstrong D. Anal. Chem. [J], 1987, 59: 84~ 91
- [104] Kenjiro H , Keiko T. , Masahito M. . J. Chromatogr. [J], 1986, 355: 383~391

- [105]Sybilska D , Zukowski J . Cyclodextrin additives Krstulovic A M. Chiral separation by HPLC application to pharmaceutical compounds[J]. Chichester : Ellis Horwood Limited , 1989. 147~172
- [106]马建国,朱霞萍,范杰平,等. 环糊精在色谱中的应用[J]. 华东地质学院学报,20003 , 26(1) :73~76
- [107]Park Jung Hag , Lee Joon Woo , Kwon Sang Hyun et al, Separation of racemic 2,4-dinitrophenyl amino acids on zirconia-immobilized quinine carbamate in reversed-phase liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2004 , 1050 : 151
- [108]Poul Vibholm Petersen , Jens Ekelund , Lars Olsen et al[J]. J Chromatogr A , 1997 , 757 : 65
- [109]Mathur V , Kanoongo N , Mathur R et al, Bead form of guaran gel for chromatographic column packing [J] . J Chromatogr A , 1994 , 685 : 360
- [110]Bhushan R , Parshad Vineeta A comparative study of HPLC and TLC separation of amino acids using Cu(II) ion [J]. J Chromatogr A , 1996 , 721 :369
- [111]于金刚,黄可龙,焦飞鹏等,  $\beta$ -环糊精固载硅胶薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体[J]. 色谱, 2005 , 23(4) : 431
- [112]于金刚,刘素琴,黄可龙等,酒石酸酯固载薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映异构体[J]. 色谱, 2005 , 23(6) : 687
- [113]Kempe M , Mosbach K. Synthesen auf der Basis von 2-Oxoglutar säure. IV. Regioselektive Synthese substituierter 2-(2-Methoxycarbonyl-2H-thiopyran-3-yl)glyoxylsäuremethylester [J]. J. Chromatogr. 1994 , 664 :276
- [114]Negawa M , Shoji F. Fundamental studies of expression under variable pressure [J]. J. Chromatogr. A , 1992 , 590(1) : 113
- [115]Schulte M , Ditz R , et al. Auslegung und Betrieb chromatographischer Trennprozesse [J]. J. Chromatogr. A , 1997 , 769 (5) : 93
- [116]Francotte E R , Richert P. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon  $\beta$ -1a for relapsing multiple sclerosis [J]. J. Chromatogr. A , 1997 , 769 (5) : 101
- [117]Pais L S , Loureiro J M , Rodrigues A E. Analysis of its epidemiological and

clinical characteristics [ J ] . Chem. Eng.Sci . 1997 , 52 (1) :245

## 攻读硕士学位期间发表的文章

董海英，梁冰，程德军. D-10-樟脑磺酸铵—薄层色谱法拆分普萘洛尔对映体. 华西药学杂志， 2007， 3:222~225

董海英，梁冰，程德军， 杨蓉. D-10-樟脑磺酸铵—薄层色谱法拆分普萘洛尔对映体的研究. 第五届全国制药工程科技与教育研讨会论文集， 2006， 11: 142~145

程德军，梁冰， 董海英， 杨蓉. 两次制备薄层色谱分离纯化杜仲叶中的绿原酸. 西南民族大学学报， 2007， 3.（拟发表）

## 致 谢

在论文完成之际，我首先要感谢三年来辛勤培育我的导师梁冰教授，从制定课题到实验完成，梁老师都尽心尽力，耐心地帮助我，给我最细致的指导。梁老师学识渊博、治学严谨、思路活跃，关注学术前沿，在整个课题研究及论文的完成过程中都一丝不苟、精益求精，令我折服。特别值得一提的是，在整个试验及论文接撰写过程中，梁老师都作为我们的良师益友，给我们以最多的尊重，开明的态度、启发式的教学给了我们许多锻炼机会，培养了我的自觉性与独立思考能力。在论文完成的过程中，我丰富了学识，更学到了许多论文以外的东西，独立工作能力有了极大的提高，对我今后的学习和工作打下坚实基础。

在此我谨向梁冰教授致以衷心的感谢。

同时我还要感谢实验室中李延芳老师、程德军、杨蓉、罗丹、王海龙等同学，他们在我的试验中帮助我解决遇到的问题，对试验进行改进，为我的论文提供更多的思路。特别感谢马玲、马玉山，他们在实验过程中协助我顺利完成论文内容，在此我也向他们表示感谢。

我还要感谢我的父母给予我的物质上和精神上的大力支持以及我的男朋友李朝政给予我的默默关怀和无私帮助。

最后我要感谢评审和答辩组的各位老师，感谢你们抽出宝贵的时间对我进行指导。也请你们对我的论文提出宝贵的意见和建议。