

分类号

密级

VDC

编号

中南大学

CENTRAL SOUTH UNIVERSITY

硕士学位论文

论 文 题 目 色谱法拆分几种手性药物的研究

学 科、专 业 无 机 化 学

研 究 方 向 生 物 无 机 化 学

研 究 生 姓 名 于 金 刚

导 师 姓 名 及

专 业 技 术 职 务 黄 可 龙 教 授

摘 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。深入研究了采用羟丙基- β -环糊精作高效液相色谱流动相手性添加剂拆分氯噻酮对映体,通过单因素实验考察了流动相中羟丙基- β -环糊精浓度、甲醇体积百分比、pH 值、三乙胺添加剂的影响以及柱温、流速等因素的影响,得到了拆分最佳的色谱条件;采用 β -环糊精、羟丙基- β -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;比较了手性选择体作薄层色谱流动相添加剂和固载薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体,研究结果表明,手性选择体固载薄层色谱法具有更好的手性识别能力,同时考察了拆分的实验条件,得到了手性选择体固载薄层色谱法拆分最佳分离条件。

在理论研究上,从分子间作用力的角度探讨了手性选择体固载薄层色谱实现拆分的作用模型;同时探讨了(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯固载薄层色谱板时,与硅胶表面的硅醇羟基之间形成氢键实现固载,形成手性固定相实现拆分的分子机制。

关键词 手性药物, 拆分, 高效液相色谱, 薄层色谱, 机理

ABSTRACT

The reason of development of chiral technologies was analyzed, and existing chiral separation methods and their advantages and disadvantages were reviewed detailedly in this paper. The enantiomers of three chiral drugs were separated individually using chromatographic methods. Firstly, the research of resolution of chlorthalidone enantiomers with high performance liquid chromatography using hydropropyl- β -cyclodextrin as mobile phase additive was further studied, the factors such as concentration of hydropropyl- β -cyclodextrin, percentage of methanol, additive of triethylamine in the mobile phase and the velocity of flow, temperature of chromatographic column and et. al. were investigated, the optimum chromatographic conditions of resolution were determined. Secondly, resolution of propranolol hydrochloride enantiomers using β -cyclodextrin and hydropropyl- β -cyclodextrin impregnated thin-layer chromatography was studied synchronously, makeup of the mobile phase and quantity of the impregnated chiral selectors were studied, the conditions of separation were optimized. Thirdly, resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers by thin-layer chromatography using chiral selectors as chiral mobile phase additive or using chiral selectors-impregnated thin-layer chromatography was contrasted, the conclusion was that the ability of resolution of enantiomers using chiral selectors-impregnated thin-layer chromatography was more excellent, the conditions of chiral separation were also studied and optimized.

On the study of mechanism of chiral separation, the molecular functionary model of resolution using chiral selectors-impregnated thin-layer chromatography was set up on the view of the action among the molecules. The model of resolution of chiral drugs using (2R,3R)-dialkyl tartrate impregnated thin-layer chromatography was discussed. The conclusion was that the hydrogen bonds formed between (2R,3R)-dialkyl tartrate and silica gel was the main acting force, chiral stationary phase was formed under the acting force, and chiral recognition was then achieved.

KEY WORDS chiral drugs, resolution, high performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, mechanism

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
第一章 文献综述.....	1
1.1 手性与手性药物.....	1
1.2 手性拆分的提出和意义.....	2
1.3 主要的手性拆分技术及其研究进展.....	4
1.3.1 结晶拆分法.....	4
1.3.2 化学拆分法.....	5
1.3.3 动力学拆分法.....	5
1.3.4 酶拆分法.....	6
1.3.5 膜拆分法.....	6
1.3.6 色谱拆分法.....	7
1.4 研究目的与内容.....	12
1.4.1 本文研究的内容.....	12
1.4.2 本研究的创新之处.....	12
1.4.3 研究意义.....	12
第二章 高效液相色谱法拆分氯噻酮对映体的研究.....	13
2.1 实验原料及仪器.....	14
2.1.1 主要原料.....	14
2.1.2 主要仪器.....	14
2.2 实验步骤.....	15
2.2.1 配制氯噻酮溶液.....	15
2.2.2 β -CD 重结晶.....	15
2.2.3 色谱分离条件.....	15
2.2.4 实验数据处理方法.....	15
2.3 结果与讨论.....	15
2.3.1 甲醇比例对分离度的影响.....	15
2.3.2 HP- β -CD 浓度与分离度的关系.....	17
2.3.3 pH 值对分离度的影响.....	18
2.3.4 柱温的影响.....	18
2.3.5 流速的影响.....	18
2.3.6 TEA 的影响.....	18
2.3.7 HP- β -CD 作流动相添加剂拆分氯噻酮的最佳条件.....	19
2.4 β -CD 作手性流动相添加剂拆分氯噻酮对映体.....	19
2.5 实验中遇到的问题和解决方法.....	20
2.6 本章小结.....	20

第三章 薄层色谱法拆分盐酸普萘洛尔对映体.....	21
3.1 实验试剂及仪器.....	22
3.1.1 主要试剂.....	22
3.1.2 主要仪器.....	23
3.2 实验步骤.....	23
3.2.1 配制盐酸普萘洛尔溶液.....	23
3.2.2 制备手性选择体固载薄层色谱板.....	23
3.2.3 薄层色谱分离盐酸普萘洛尔对映体.....	24
3.3 结果与讨论.....	24
3.3.1 β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体.....	24
3.3.2 HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体.....	27
3.4 最优条件下拆分盐酸普萘洛尔对映体的 TLC 色谱图.....	29
3.5 环糊精作手性选择体拆分对映体机制.....	29
3.5.1 对映体分离原理.....	30
3.5.2 环糊精拆分盐酸普萘洛尔对映体机制.....	31
3.6 试验中遇到的问题和解决方案.....	32
3.7 本章小结.....	32
第四章 盐酸克伦特罗对映体的拆分研究.....	33
4.1 实验原料及仪器.....	34
4.1.1 主要原料.....	34
4.1.2 主要仪器.....	34
4.2 实验步骤.....	34
4.2.1 合成几种(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯手性选择体.....	34
4.2.2 盐酸克伦特罗纯度检验.....	37
4.2.3 配制盐酸克伦特罗溶液.....	37
4.2.4 制备各种不同规格的薄层色谱板.....	38
4.2.5 薄层色谱分离盐酸克伦特罗对映体.....	38
4.3 结果与讨论.....	39
4.3.1 β -CD 作流动相手性添加剂 TLC 法拆分盐酸克伦特罗对映体.....	39
4.3.2 聚酰胺薄膜法拆分盐酸克伦特罗对映体.....	40
4.3.3 β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体.....	41
4.3.4 HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体.....	43
4.3.5 (2R,3R)-酒石酸-二-正十二烷基酯固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体.....	44
4.3.6 (2R,3R)-酒石酸-二-环己酯固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体.....	46
4.4 最优条件下拆分盐酸克伦特罗对映体的 TLC 色谱图.....	48
4.5 试验中遇到的问题和解决方案.....	49
4.6 (2R, 3R) -酒石酸-二-烷基酯作手性选择体拆分对映体机制.....	49
4.7 本章小结.....	50
第五章 结论和展望.....	51

5.1 结论.....	51
5.2 展望.....	52
参 考 文 献.....	53
致 谢.....	62
攻读学位期间主要的研究成果目录.....	63

第一章 文献综述

1.1 手性与手性药物

手性的概念与不对称密切相关^[1]。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 型的；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，并用“*”号标出。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^[2,3]。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^[4]。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、多聚糖也具有手性，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的不同的生理活性。

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不同，生物活性和药效、毒副作用存在显著差异。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^[5]，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^[5,6]:

- 手性药物分子两种对映体具有相同药效, 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(β -Prodine) 的镇痛作用约为阿法罗定(α -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。

- 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。

- 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”(沙利度胺, Thalidomide)^[7~9]。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, 药物必须注意它们不同的构型。

同样, 在农药和除草剂、杀虫剂杀菌剂等领域, 手性化合物亦具有对映选择效应以及不同的生趣降解速度而被关注, 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^[10]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^[11]: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:

- 不同的对映单体具有不同的药理作用;
- 不同的对映单体具有不同的生物活性;
- FDA 严格提出了手性药物需制备成单体的原则;
- 与人们生活息息相关的化学品因具有手性,从而具有对映选择效应以及不同的生趣降解速度。
- 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^[5,12~17]:

- 从天然光活性产物中获得,这种天然来源即“手性池”(Chiral pool);
- 由天然手性化合物经化学改造合成;
- 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异构体的物理性质差别,将其分开;

- 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；
- 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(Supercritical Fluid Chromatography ;SFC)、平面色谱（Plain Chromatography）等等；
- 动力学拆分；
- 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^[2]、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

◆ 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，将对映体晶体进行分别拣出，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。

本方法由于比较烦琐，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，所以使用面较窄，不利于推广。

◆ 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

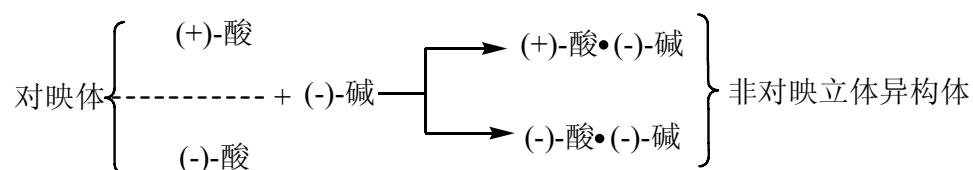
而使该对映体自外消旋体混合物中析出。这种拆分方法只需要 2 种对映体的少量晶种即可完成。倘若外消旋体化合物比其对映体的溶解度大,那么也可以用任一纯对映体晶体接种,而使该对映体自外消旋化合物饱和溶液中析出。

如果没有纯的对映体,还可考虑采用别的旋光性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^[18,19]。



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发现用灰绿青霉菌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,促进出现了动态动力学拆分^[20](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方法^[21]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^[22]。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。

Jeffrey H 等^[23]利用酶拆分了环氧卤丙烷，S Joly 等^[24]也对 β -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^[25~27]。

1.3.5 膜拆分法

手性拆分膜技术包括手性拆分液膜和手性拆分固膜两种主要方法^[28,29]。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得到了广泛的关注。

◆ 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^[30~32]。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^[33,34]。

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^[35]。

Coelhoso 等^[36]研究了液膜拆分的机制，并建立了液膜拆分的模型。

◆ 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^[37]、由不能自身支撑而具有手性选择性的高聚物^[38]和非选择性支撑层组成的非对称复合固膜^[39]；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^[40]、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^[41]、采用分子印迹技术制备的具有手性识别功能的高分子膜^[42]。

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，直接法避免了烦琐的衍生化操作，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立体化学决定的，这个原理 1952 年首次由 Dalglish

提出,即著名的“三点作用原理”^[43]。

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,不适用于制备性生产。

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缩短了更新换代的时间,出现多种智能化、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为 Armstrong^[44]提出,并已运用到研究中。

◆ 气相色谱法 (Gas Chromatography, GC)

手性气相色谱拆分法^[45]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^[46,47]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 β -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;后者是基于通过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^[48]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。

◆ 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^[49]。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 α -(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、 α -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^[50]。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^[51-59]，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。

◆ 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^[60]。SFC 具有以下优点^[61]：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。

◆ 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^[62], 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^[63,64], 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。

- 手性衍生化拆分法

手性衍生化拆分又称间接拆分^[65], 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^[66,67]。

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。

- 手性流动相添加剂 (CMPA) 法^[68]

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^[69,70]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, 并可采用反相柱 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 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 等。

在 HPLC 流动相中加入反离子, 使之与流动相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。

- 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^[71,72]、多糖类键合相^[73,74]、手性聚合物键合相、环糊精键合相^[70]和 Pirkle 型手性固定相^[75]、大环抗体类^[76]等。

◆ 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^[77,78]。

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)、手性流动相添加剂 (CMPA)、手性固定相 (CSP)。

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、 β -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进行分离。

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 β -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^[79,80]。

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^[81~89]。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^[77], 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。

1.4 研究目的与内容

1.4.1 本文研究的内容

本文研究了采用手性选择体作高效液相色谱流动相添加剂拆分手性对映体化合物，主要优化了羟丙基- β -环糊精作为流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体的色谱条件，并对比了文献报导的 β -环糊精作为流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体，分析了利弊，得到羟丙基- β -环糊精作为流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体的最佳色谱条件。

本文还研究了采用手性选择体流动相添加剂薄层色谱法拆分手性对映体化合物，并设计采用手性选择体固载相薄层色谱法进行手性拆分研究。实验结果表明，固载相薄层色谱手性识别性能理想。本研究研究合成了几种(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯作手性选择体，并将其用于固载相薄层色谱作拆分实验。分析了实验数据，并初步探讨了固载相薄层色谱拆分手性化合物的机理。

1.4.2 本研究的创新之处

通过采用 β -CD 衍生物，即具有更强手性识别能力的 HP- β -CD 作为 HPLC 手性流动相添加剂，拆分了氯噻酮对映体，提高了拆分效果。

手性选择体固载相薄层色谱法进行手性拆分国内外报道很少，但其操作简单，拆分效果好，本研究设计了该方法的实验方案，同时合成了几种酒石酸-二-烷基酯作固载相拆分，拆分效果理想。初步探讨了理论分析，尝试建立了拆分分子作用模型。

1.4.3 研究意义

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，拆分费用昂贵的现实尚未得到解决。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。本文研究的手性选择体固载相薄层色谱拆分，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。

第二章 高效液相色谱法拆分氯噻酮对映体的研究

氯噻酮 (Chlorthalidone, CHLOR) 是一种长效利尿降压药, 其分子含有一个手性碳原子, 属于手性药物, 对映体具有不同的药理活性^[90], 其结构式如图 2-1。目前临床上使用的是氯噻酮外消旋体。

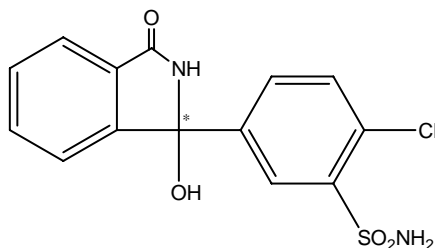


图 2-1 氯噻酮的化学结构式

Fig. 2-1 The Chemical Structure of Chlorthalidone

为提高药效并减轻人体器官的负担, 需对氯噻酮对映体进行拆分。目前已研究的氯噻酮对映体分离、分析方法有:

- 采用 β -环糊精 (β -Cyclodextrin, β -CD) 作毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 手性流动相添加剂^[91,92]拆分氯噻酮对映体。该方法需使用精密仪器毛细管电泳, 且不可放大, 只能对氯噻酮对映体进行分析检测。
- García-Alvarez-Coque 工作组^[93-95]将表面活性剂十二烷基硫酸钠 (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) 添加到流动相, 采用高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 对氯噻酮对映体进行了拆分研究, 结果表明分离度很低, 不能实现基线分离。
- Christian 等^[90]采用离子化 β -CD、Rosa 等^[96]采用天然 β -CD 作 HPLC 手性流动相添加剂, 对氯噻酮对映体做了拆分研究, 文献报道拆分效果较理想。
- 唐课文等^[97]报道了以酒石酸酯萃取分离氯噻酮对映体。

本研究主要以羟丙基 β -环糊精 (Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin, HP- β -CD) 作 HPLC 手性流动相添加剂, C_{18} 柱为固定相, 拆分了氯噻酮对映体, 探讨了 HP- β -CD 浓度、甲醇比例、三乙胺 (Triethylamine, TEA)、流速、柱温、pH 值等对分离因子 (α , separation factor) 的影响, 优化了色谱条件。同时, 本研究对比了 β -CD 作 HPLC 流动相拆分氯噻酮对映体。结果表明, β -CD 流动相虽具有一定的拆分能力, 但由于其刚性结构, 在水或甲醇甚至其它溶剂中溶解度均很低, 随流动相中 β -CD 浓度的增加, β -CD 易出现析晶而堵塞 HPLC 流路, 不易排除。同时, 手

性选择体的选择性能很大程度上与其浓度有很大的正性关系。由于HP- β -CD水溶性好,故作HPLC手性流动相拆分氯噻酮对映体时,是更好的手性流动相添加剂。

2.1 实验原料及仪器

2.1.1 主要原料

实验中所使用的主要试剂见表 2-1。

表 2-1 实验所用主要试剂

Tab. 2-1 The main reagents used in the research

名称	型号	生产厂家
β -环糊精	B.R.	北京奥博星生物技术责任有限公司
氯噻酮	$\geq 99\%$	SIGMA 公司
羟丙基- β -环糊精	$\geq 99\%$	江苏一鸣精细化工有限公司
尿素	A.R.	上海试剂一厂
三乙胺	A.R.	天津市科密欧化学试剂开发中心
磷酸	A.R.	湖南师大化学试剂厂
磷酸氢二钠	A.R.	河南焦作鑫安试剂厂
甲醇	G.R.	江苏汉邦科技有限公司
盐酸	G.R.	上海振兴化工二厂

2.1.2 主要仪器

实验中所使用的主要设备见表 2-2。

表 2-2 实验所用主要仪器

Tab. 2-2 The main apparatuses used in the research

名称	型号	生产厂家
循环水式多用真空泵	SHB—III	郑州杜甫仪器厂
电子天平	AY220	日本 SHIMADZU
酸度计	PHS-3C	萧山鑫龙医疗仪器公司
超声波清洗器	B2200S-T	BRANSON 超声上海有限公司
自动双重纯水蒸馏器	D1810C	上海申生生物技术有限公司
高效液相色谱仪	LC-2010A	日本 SHIMADZU

2.2 实验步骤

2.2.1 配制氯噻酮溶液

准确称取氯噻酮 0.0050g 于 50mL 烧杯中，加少许新鲜二次蒸馏水溶解后，转移至容量瓶中，继续用少许新鲜二次蒸馏水分三次洗涤烧杯，并转移至容量瓶，定容，置于 4℃ 以下暗处存放。进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2.2 β-CD 重结晶

称取 70.50g β-CD 于 500mL 烧杯中，加入 300mL 重蒸水，电炉加热煮沸，并不断搅拌，至 β-CD 完全溶解。烧杯于空气中放置冷却至室温后，转移入冰箱冷藏过夜。次日抽滤，滤饼用 200mL 冷却重蒸水洗涤两次，抽滤至干性，滤饼于真空 110℃ 下干燥，得重结晶 β-CD 63.8g，收率 90.5%。

2.2.3 色谱分离条件

色谱柱：Harbon Lichrospher-C₁₈ 色谱柱（5 μm，150×4.6mm）；

流动相：甲醇:水相=20:80（体积比，其中水相包括：C_{HP-β-CD}=30mmol/L；C_{Na₂HPO₄}=0.1mol/L；pH=5.0；C_{TEA}=2%(体积比)）；

流速：0.8ml/min；检测波长：紫外 254nm；进样量：20 μL；柱温：室温。

2.2.4 实验数据处理方法

由公式（2-1）计算得到分离因子 α：

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R2} - t_M} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (2-1)$$

式（2-1）中： t_{R2} 、 t_{R1} 为组分保留时间， t_M 为死时间， t'_{R2} 、 t'_{R1} 为调整保留时间。

2.3 结果与讨论

2.3.1 甲醇比例对分离度的影响

分别考察氯噻酮对映体在不同比例的甲醇和 HP-β-CD 水溶液流动相体系下（含 30mmol/L HP-β-CD；0.1mol/L Na₂HPO₄；pH=5；2%TEA（体积比））的拆分情况，室温下进样 0.1mg/mL 氯噻酮溶液 20 μL，流速 0.8mL/min，结果如图 2-2、图 2-3 所示。

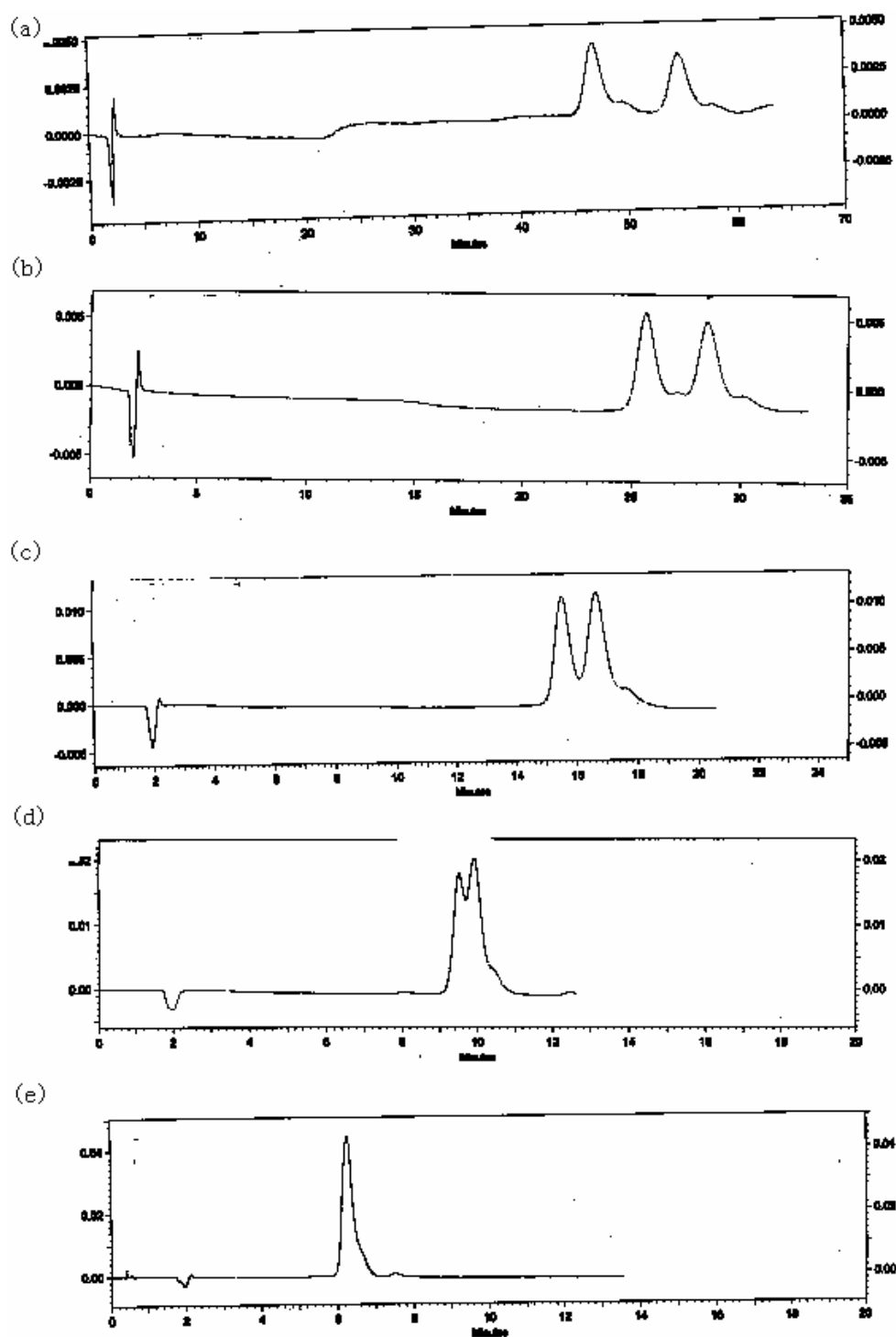


图 2-2 不同甲醇比例下高效液相色谱拆分氯噻酮对映体色谱图

a、15%甲醇 b、20%甲醇 c、25%甲醇 d、30%甲醇 e、35%甲醇

Fig. 2-2 HPLC Chromatograms of different percentage of methanol in mixed solvent

a、15% methanol b、20% methanol c、25% methanol d、30% methanol e、35% methanol

由图 2-2 分析可知, 甲醇比例对拆分效果影响很大。随甲醇体积百分比的增加, 分离因子 α 大大下降。可能是甲醇与氯噻酮对映体竞争流动相中的 HP- β -CD 疏水空腔, 所以随流动相中甲醇体积比例增加, 拆分分离度显著地下降。不过, 适当比例的甲醇可以调整保留时间。实验发现, 随着甲醇体积比例增加, 保留时间显著减少。经过实验, 选择 V (甲醇): V (HP- β -CD 水溶液) = 20: 80。

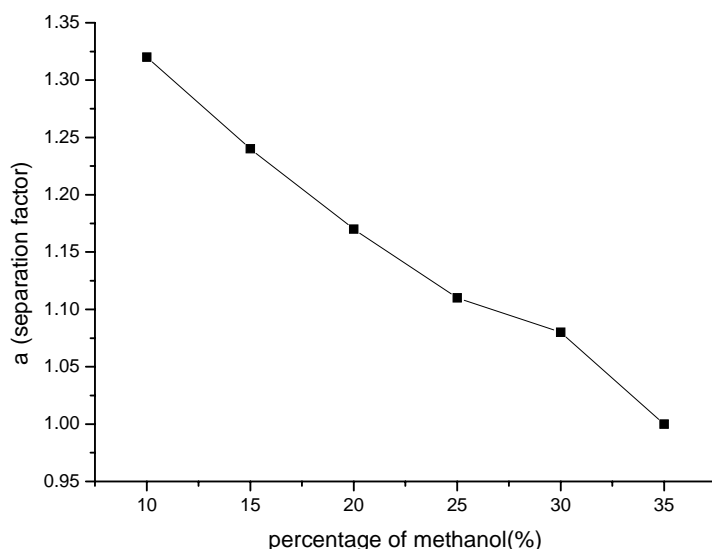


图 2-3 甲醇百分比对分离因子 α 的影响

Fig. 2-3 Effect of percentage of methanol on separation factor

2.3.2 HP- β -CD 浓度与分离度的关系

甲醇体积百分比为 20%时, 分别考察不同浓度的 HP- β -CD 的拆分情况, 结果如图 2-4。

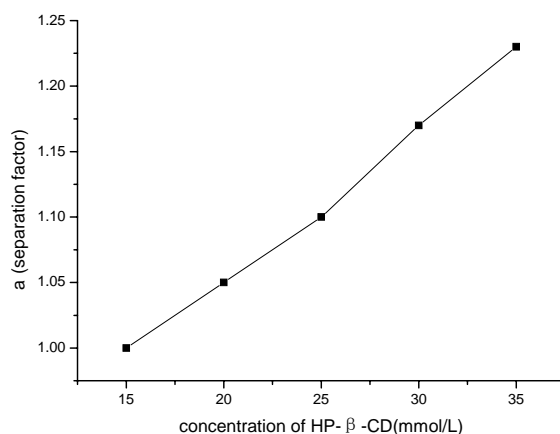


图 2-4 HP- β -CD 浓度对分离因子的影响

Fig.2-4 Effect of concentration of HP- β -CD on separation factor

由图 2-4 可知,随着 HP- β -CD 浓度的增加,分离因子 α 显著地增大。当 HP- β -CD 浓度为 15mmol/L 时,分离因子 α 为 1.0,即不能实现拆分。根据实验结果,当 HP- β -CD 浓度为 30mmol/L 时,拆分效果已经很好,故选择流动相中水相中 HP- β -CD 浓度为 30mmol/L。

2.3.3 pH 值对分离度的影响

pH 值可改变对映体分子与环糊精发生的主客体反应,还可改变固定相对环糊精分子的吸附作用,从而影响分离因子。在水相含 0.1mol/L Na_2HPO_4 、30mmol/L HP- β -CD、2% TEA,流动相中甲醇体积百分比为 20%的条件下,用 H_3PO_4 调节流动相 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,分别作 HPLC 拆分。结果表明,pH 值对分离因子 α 影响不大,在 pH=5.0 时, α 稍大。经实验结果分析,选择流动相 pH 为 5.0。

2.3.4 柱温的影响

柱温升高,可缩短保留时间,从而影响理论塔板数和分离因子。在流动相为甲醇:水相=20:80 (V/V,水相组成:0.1mol/L Na_2HPO_4 、30mmol/L HP- β -CD、pH=5、2% TEA) 条件下,分别考察柱温为 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃时 HPLC 拆分情况。结果表明,当柱温为 35℃时,分离因子 α 稍大。考虑到维持柱温稳定的条件下平衡基线需要较长的时间,而且本实验中柱温影响又可忽略不计,故选择室温下拆分即可。

2.3.5 流速的影响

HPLC 的流动相流速升高,可使保留时间降低,对映体与手性选择体的作用时间减少,从而影响分离因子。在优化了以上各项 HPLC 条件后,考察了流动相流速的影响。实验结果表明,流速对分离因子 α 影响也甚微,只会稍微地影响保留时间,经实验选择流速为 0.8mL/min。

2.3.6 TEA 的影响

TEA 是一个常用的有机改性试剂,氯噻酮对映体结构中极性较大的氨基官能团极易与固定相相互作用,导致出现拖尾峰。当流动相中未添加 TEA 时,色谱峰对称性很差。考察添加不同比例的 TEA,当 TEA 体积比从 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%变化时,并未对分离因子 α 产生影响。实验发现,当 TEA 体积百分比为 2.0%时,峰形对称性较好。

2.3.7 HP- β -CD 作流动相添加剂拆分氯噻酮的最佳条件

研究确定 HP- β -CD 作流动相添加剂拆分氯噻酮的最佳条件为：

色谱柱：Harbon Lichrospher- C_{18} 色谱柱 ($5\mu m$, $150\times 4.6mm$)；

流动相：甲醇:水相=20:80 (水相： $C_{HP-\beta-CD}=30mmol/L$ ； $C_{Na_2HPO_4}=0.1mmol/L$ ； $pH=5.0$ ； $C_{TEA}=2\%(V/V)$)；

流速：0.8mL/min；

紫外检测波长：254nm；

进样量：20 μL ；

柱温：室温。

以上色谱条件下，进行氯噻酮对映体的拆分，色谱图如图 2-5 所示。HPLC 色谱图显示，在此条件下可对氯噻酮对映体实现分离，分离因子为 1.17。

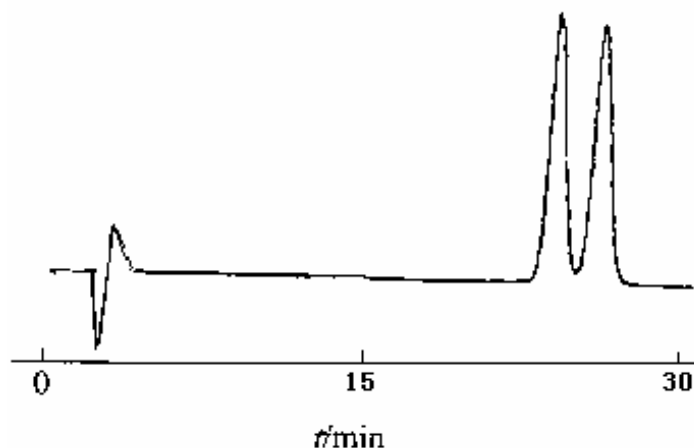


图 2-5 氯噻酮对映体拆分色谱图

Fig. 2-5 Chromatogram of resolution of Chlorthalidone enantiomers

2.4 β -CD 作手性流动相添加剂拆分氯噻酮对映体

采用 β -CD 作手性流动相添加剂^[96]对氯噻酮对映体进行拆分研究，发现流动相中 β -CD 超过 15mmol/L 时，极易发生 β -CD 结晶析出从而堵塞流路的现象。同时，拆分效果并不理想。当采用 12.5mmol/L β -CD 流动相 (V(甲醇): V(水相)=25: 75, 其中水相含: 12.5mmol/L β -CD, 2%TEA (V/V), 0.1mmol/L Na_2HPO_4 , $pH=4.0$) 进行拆分时，拆分 HPLC 色谱图如图 2-6。

由图 2-6 可知，由于 β -CD 溶解性不好，在流动相中浓度不高，分离效果较差，峰形不好且有叠加，说明手性识别性能不能达到实验要求。

2.5 实验中遇到的问题和解决方法

以 β -CD 作手性流动相添加剂对氯噻酮对映体进行拆分研究时, 随 β -CD 浓度上升, 由于 β -CD 的刚性结构, 在水中以及其他极性、非极性有机溶剂中均不易溶解, 极易在实验时出现析晶现象, 导致 HPLC 色谱仪流路堵塞, 不易排除。配制流动相时, 将配制好的流动相于冰箱中冷藏放置, 以次日无结晶析出为佳, 可有效避免以上情况。

手性选择体的识别功能与其在流动相中的浓度一般为正相关关系, 配制的流动相中 β -CD 浓度不高, 所以手性识别功能较差。

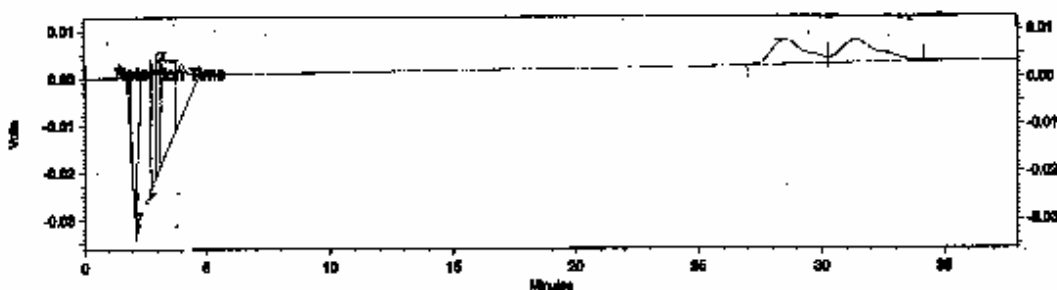


图 2-6 β -CD 作 HPLC 手性流动相添加剂氯噻酮对映体色谱图

Fig. 2-6 Chromatogram of resolution of Chlorthalidone enantiomers with β -CD as chiral mobile phase additive by HPLC

2.6 本章小结

系统研究了以 C_{18} 柱为固定相, 采用 HP- β -CD 作 HPLC 手性流动相添加剂拆分氯噻酮对映体的研究, 同时对比文献报道的方法, 结果表明, HP- β -CD 具有更好的拆分效果。

实验深入研究了 HP- β -CD 作 HPLC 手性流动相添加剂拆分氯噻酮对映体的主要影响因素诸如 HP- β -CD 浓度、甲醇比例、三乙胺 (Triethylamine, TEA) 添加剂、流速、柱温、pH 值等, 优化了色谱条件, 得到了最佳拆分条件。

第三章 薄层色谱法拆分盐酸普萘洛尔对映体

临床上广泛应用的抗心律失常药普萘洛尔（化学结构如图 3-1），是一种重要的 β 受体阻滞剂，目前以外消旋体形式给药。动物实验表明，S-(-)-普萘洛尔对 β 受体的阻滞程度比 R-(+)-普萘洛尔约大 100 倍；R-(+)-普萘洛尔对 β 受体的阻滞作用很小，但有避孕作用，可作为一种有效的避孕药^[98,99]。因此，普萘洛尔以外消旋体形式给药，治疗心脏系统疾病的效果不佳，且易带来副作用。将外消旋普萘洛尔拆分为手性纯化合物，并作为两种不同药物分别给药，可有效改善其治疗效果。

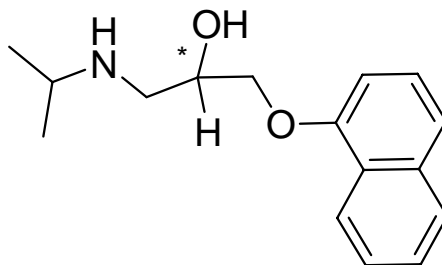


图 3-1 普萘洛尔的化学结构式

Fig. 3-1 The Chemical Structure of Propranolol

分离分析手性药物对映体多采用具有手性固定相（Chiral Solide Phase, CSP）高效液相色谱法，采用手性选择体固载薄层色谱（Thin Layer Chromatography, TLC）分离分析手性药物对映体的研究较少^[100,101]，但拆分效果较好。液相色谱 CSP 合成困难且价格昂贵，且在实验过程中极易损坏。相对而言，手性选择体固载薄层色谱选择范围也较宽，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。

目前拆分或分析盐酸普萘洛尔对映体成熟方法不多，采用 HPLC 法拆分时，无论是手性流动相甚至手性固定相，均难以解决色谱峰拖尾现象。本实验研究了将 β -CD、HP- β -CD 分别作为手性选择体固载于 TLC 板，分离了盐酸普萘洛尔对映体，并考察了流动相组成及配比、手性选择体固载量、缓冲溶液等对分离的影响，优化了实验条件。实验结果表明， β -CD、HP- β -CD 固载薄层色谱可有效拆分盐酸普萘洛尔对映体，且样品拆分后斑点大小一致，效果较好。

3.1 实验试剂及仪器

3.1.1 主要试剂

实验中所使用的主要试剂见表 3-1。

表 3-1 实验所用主要试剂

Tab. 3-1 The main reagents used in the research

名称	型号	生产厂家
β -环糊精	B.R.	北京奥博星生物技术责任有限公司
盐酸普萘洛尔	$\geq 99\%$	ACROS 公司
薄层层析硅胶 GF254	C.P.	青岛海洋化工有限公司
羧甲基纤维素钠	—	广东汕头市西陇化工厂
羟丙基- β -环糊精	$\geq 99\%$	江苏一鸣精细化工有限公司
甲醇	A.R.	湖南师大化学试剂厂
乙醇	A.R.	安徽特酒总厂
异丙醇	A.R.	中国上海试剂一厂
正丁醇	A.R.	河南焦作市化工三厂
仲丁醇	A.R.	中国医药公司北京采购供应站
叔丁醇	A.R.	北京化工厂
正戊醇	A.R.	中国上海试剂一厂
异戊醇	A.R.	湖南衡阳有机试剂厂
正己醇	C.P.	中国医药集团上海化学试剂公司
正庚醇	C.P.	广州新港化工厂
正辛醇	A.R.	上海化学试剂站中心化工厂
磷酸	A.R.	湖南师大化学试剂厂
磷酸氢二钠	A.R.	河南焦作鑫安试剂厂
三氯甲烷	A.R.	湖南师大化学试剂厂
乙酸乙酯	A.R.	河南焦作市化工三厂
石油醚	A.R.	湖南师大化学试剂厂
无水乙酸钠	A.R.	广东省台山市化工厂
pH 精密试纸	0.5~5.0	上海三爱思试剂有限公司
冰醋酸	A.R.	广东汕头市西陇化工厂

3.1.2 主要仪器

实验中所使用的主要设备见表 3-2。

表 3-2 实验所用主要仪器

Tab. 3-2 The main apparatuses used in the research

名称	型号	生产厂家
电子天平	AY220	日本 SHIMADZU
酸度计	PHS-3C	萧山鑫龙医疗仪器公司
超声波清洗器	B2200S-T	BRANSON 超声上海有限公司
真空干燥箱	DZF-6050	上海精宏实验设备有限公司
真空泵	2XZ-2	浙江黄岩求精真空泵厂
自动双重纯水蒸馏器	D1810C	上海申生生物技术有限公司
佳能数码照相机	A18	日本 CANON
薄层层析展开缸	P-1	上海信谊仪器厂
玻璃点样毛细管	—	华西医科大学仪器修造厂
三用紫外分析仪	ZF- I	上海顾村电光仪器厂
红外线快速干燥器	WS70-1	上海市吴淞五金厂

3.2 实验步骤

3.2.1 配制盐酸普萘洛尔溶液

准确称取 0.05g 盐酸普萘洛尔于烧杯中，加入 80mL 0.1mol/L 稀 HCl 溶液，超声振荡使其完全溶解后，转移入 100mL 棕色容量瓶中，用少许 0.1mol/L 稀 HCl 洗涤烧杯并转移入容量瓶，继续加入 0.1mol/L 稀 HCl 溶液定容，制得 0.50g/L 盐酸普萘洛尔稀盐酸溶液，放置冰箱冷藏备用。

3.2.2 制备手性选择体固载薄层色谱板

分别准确称取一定量 β -CD 或 HP- β -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 GF254 加入其中，搅拌约半小时，赶走气泡并使硅胶均匀分散到羧甲基纤维素钠水溶液中。采用倾注法铺制 7.5×2.5cm 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。

3.2.3 薄层色谱分离盐酸普萘洛尔对映体

用玻璃点样毛细管取 0.50g/L 盐酸普萘洛尔的稀盐酸溶液样液，圆点点样于 7.5×2.5cm 手性选择体固载薄层色谱板距一端 1cm 处，置于 P-1 型薄层层析展开缸中，以有机混合溶剂作展开剂，室温下展开。展开后，薄层色谱板用红外干燥器干燥后，在 ZT- I 型三用紫外分析仪的 365nm 紫外光及 254nm 紫外光下，照射薄板，可显示样品分离后的斑点位置。铅笔标注后，直尺测量样品斑点的相关参数，计算比移值 R_f 、分离度 R 。比移值 R_f 、分离度 R 分别由公式 (3-1)、(3-2) 计算得到：

$$R_f = b/a \quad (3-1)$$

$$R = \frac{d}{\left(\frac{W_1 + W_2}{2}\right)} \quad (3-2)$$

式 (3-1) 中： b 为原点中心至斑点中心的距离， a 为原点中心到溶剂前沿的距离；

式 (3-2) 中： d 为相邻两斑点中心之间的距离差， W_1 、 W_2 分别为相邻两斑点的宽度（见薄层色谱示意图：图 3-2）。

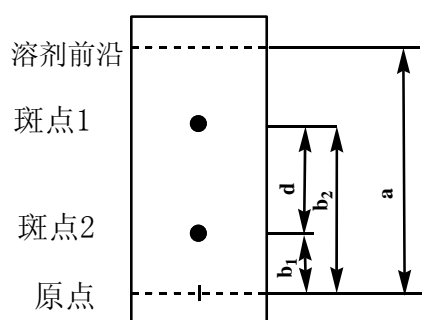


图 3-2 薄层色谱示意图

Fig.3-2 The sketch map of thin-layer chromatography

3.3 结果与讨论

3.3.1 β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

以 1.0g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 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、仲丁醇、叔丁醇、正戊醇、正己醇、正庚醇、正辛醇等多种醇与乙腈两两混合的混合溶剂 ($V/V=50/50$) 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, 只有正丁醇/乙腈、仲丁醇/乙腈混合溶剂可实现分离, 分离度 R 分别为 3.77 和 4.43, 且仲丁醇/乙腈混合溶剂拆分时分离度 R 较大, 样品斑点拖尾轻微, 分离效果较好, 所以本试验选用仲丁醇/乙腈混合溶剂作展开剂。

表 3-3 不同体积比的仲丁醇对 β -环糊精固载薄层色谱拆分效果的影响

Tab. 3-3 The effect of percentage of 2-butanol on the resolution using β -Cyclodextrin-impregnated Thin-layer chromatography

乙腈/仲丁醇 (体积比)	R_{f-1}	R_{f-2}	R
100:0	0.13	0.58	4.82
90:10	0.18	0.66	4.08
80:20	0.25	0.70	2.45
70:30	0.20	0.60	3.00
60:40	0.21	0.67	3.67
50:50	0.28	0.80	4.43
40:60	0.27	0.63	2.53
30:70	0.28	0.80	4.85
20:80	0.72	—	—
10:90	0.64	—	—
0:100	0.39	—	—

◆ 仲丁醇体积比对拆分效果的影响

以 β -CD 固载薄层色谱作拆分实验, 考察不同体积比乙腈/仲丁醇混合展开剂对分离效果的影响, 结果如表 3-3 所示。结果表明, 乙腈/仲丁醇混合展开剂中乙腈体积百分比大于 30%时, 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 (乙腈): V (仲丁醇)=30:70 时, 斑点大小均一, 无拖尾现象, 分离效果较好。

◆ β -CD 固载量对拆分效果的影响

分别考察 0.25g、0.50g、0.75g、1.00g、1.25g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验，选择流动相为混合溶剂乙腈/仲丁醇（V/V=30/70），室温下展开。实验结果（图 3-3）表明，随着 β -CD 固载量的增加，分离度 R 逐渐增大。 β -CD 固载量为 1.00g 时，TLC 色谱图显示分离后的样品点大小最均匀，所以选择条件为 1.0g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 来制备薄层色谱板。

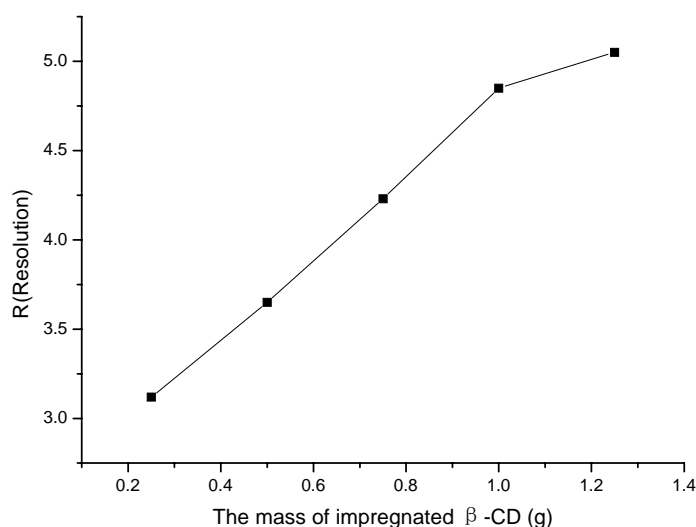


图 3-3 β -CD 固载量对拆分效果的影响

Fig. 3-3 The effect of the mass of impregnated β -CD on the resolution

◆ 缓冲溶液对拆分的影响

缓冲溶液一般可改善色谱拆分效果，而其中 Na_2HPO_4 缓冲溶液使用最多。本实验采用乙腈/仲丁醇混合溶剂为展开剂拆分盐酸普萘洛尔对映体时，样品在 TLC 薄板上展开后，紫外灯下显示分离后的两个斑点稍微拖尾。由于盐酸普萘洛尔具有酸性，配制含 Na_2HPO_4 缓冲溶液（0.1M，pH=3）作拖尾抑制剂添加到展开剂中，当其在展开剂的体积比从 0.2%~2.0%变化时，不仅不能改善 β -CD 固载薄层色谱拆分盐酸普萘洛尔对映体时的拖尾现象，反而严重影响拆分效果，分离度 R 均为 0，即不能实现拆分。由于拖尾现象非常轻微，故实验中选择条件为不添加缓冲溶液。

◆ β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔的最佳条件

经过实验，选择 β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔的最佳条件为：采

用 1.0g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验, 展开剂为乙腈/仲丁醇混合溶剂 ($V/V=30/70$), 室温下展开分离。

3.3.2 HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

以 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验, 考察 $V(\text{乙腈}): V(\text{醇})=50:50$ 的混合溶剂作展开剂的影响。结果如表 3-4 所示, 甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、叔丁醇与乙腈的混合溶剂均可实现拆分, 采用仲丁醇/乙腈混合溶剂拆分时分离度 R 最大, 且分离效果较好。

表 3-4 不同种类醇对以羟丙基- β -环糊精固载薄层色谱拆分效果的影响

Tab.3-4 The effect of the kind of alcohol on the resolution using
HP- β -Cyclodextrin-impregnated TLC

乙腈/醇 ($V/V=50/50$)	R_{f1}	R_{f2}	R
乙腈/甲醇	0.25	0.55	1.80
乙腈/乙醇	0.32	0.68	1.30
乙腈/异丙醇	0.28	0.67	1.74
乙腈/正丁醇	0.31	0.68	2.44
乙腈/仲丁醇	0.32	0.74	2.78
乙腈/叔丁醇	0.30	0.68	3.46
乙腈/正戊醇	0.57	—	—
乙腈/正己醇	0.55	—	—
乙腈/正庚醇	0.56	—	—
乙腈/正辛醇	0.45	—	—

◆ 仲丁醇体积比对拆分效果的影响

以 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验, 考察乙腈/仲丁醇混合展开剂不同体积比时对拆分效果的影响, 结果如表 3-5 所示。由表 3-5 数据可知, 与 β -CD 固载薄层色谱拆分盐酸普萘洛尔的展开剂配比一样, 乙腈/仲丁醇混合展开剂中乙腈体积百分比大于 30%时, 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, 选择乙腈/仲丁醇 ($V/V=50/50$) 混合溶剂展开, 斑点大小均一, 分离效果最好。

◆ 缓冲溶液对拆分的影响

同样考察 Na_2HPO_4 (0.1M, pH=3) 缓冲溶液对乙腈/仲丁醇混合溶剂为展开剂拆分盐酸普萘洛尔对映体的影响, 将 Na_2HPO_4 缓冲溶液作为拖尾抑制剂添加到展开剂中, 当其比例从 0.2%~2.0%变化时, 对于 HP- β -CD 固载薄层色谱拆分试验, 同样不能改善拖尾现象, 且严重影响拆分效果即不能实现拆分, 故实验中选择条件为不添加缓冲溶液。

表 3-5 不同体积比的仲丁醇对羟丙基- β -环糊精固载薄层色谱拆分效果的影响

Tab. 3-5 The percentage of 2-butanol on the resolution using
HP- β -Cyclodextrin-impregnated TLC

乙腈/仲丁醇 (V/V)	R_{f1}	R_{f2}	R
100:0	0.12	0.68	6.09
90:10	0.10	0.54	4.08
80:20	0.12	0.58	3.53
70:30	0.10	0.57	4.00
60:40	0.21	0.63	2.43
50:50	0.32	0.74	2.78
40:60	0.27	0.64	5.00
30:70	0.32	0.67	3.50
20:80	0.65	—	—
10:90	0.58	—	—
0:100	0.50	—	—

◆ HP- β -CD 固载量对拆分的影响

分别考察 0.25g、0.50g、0.75g、1.00g、1.25g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验, 选择流动相为混合溶剂乙腈/仲丁醇 (V/V=50/50), 室温下展开, 分离度分别为 2.31、2.44、2.69、2.78、3.11。实验结果表明, 随着 HP- β -CD 固载量的增加, 分离度 R 逐渐增大。HP- β -CD 固载量为 1.00g 时, TLC 色谱图显示分离后的样品点大小最均匀, 所以选择条件为 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 来制备薄层色谱板。

◆ HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体最佳条件

经过实验,选择 HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸普萘洛尔对映体最佳条件为:采用 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验,展开剂乙腈/仲丁醇混合溶剂 (V/V=50/50),室温下展开分离。

3.4 最优条件下拆分盐酸普萘洛尔对映体的 TLC 色谱图

在上述实验得到的最优条件下分别做 TLC 拆分盐酸普萘洛尔对映体实验,每张 TLC 薄板上圆点点样两个样品点,完全展开后,红外灯下烘干薄板,暗室中使用三用紫外仪在 254nm 紫外灯照射下显示样品分离后的斑点,采用佳能数码相机于夜光、曝光时间最大以及禁止闪光模式下摄制 TLC 图 (图 3-4),由摄制相片可知,样品被有效分离。

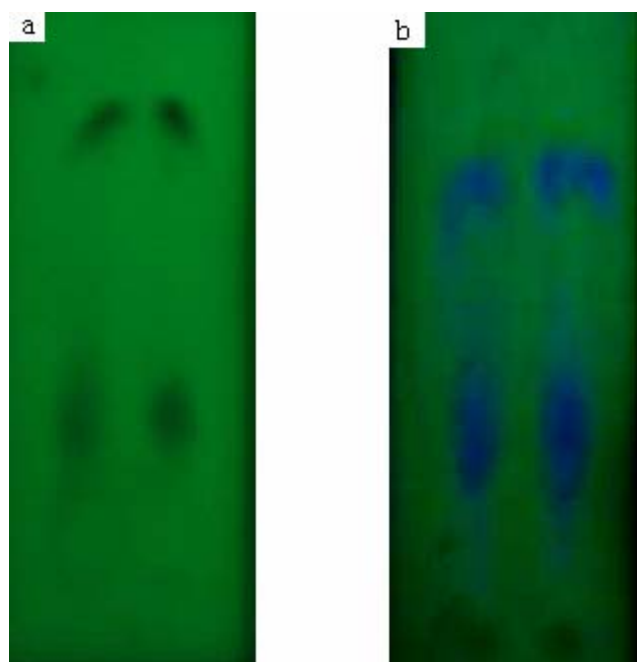


图 3-4 TLC 拆分盐酸普萘洛尔色谱图

a、 β -环糊精固载TLC (展开剂: 乙腈/仲丁醇 (V/V = 30/70))

b、羟丙基- β -环糊精固载TLC (展开剂: 乙腈/仲丁醇 (V/V = 50/50))

Fig. 3-4 TLC chromatograms of resolution of Propranolol hydrochloride

a、 β -CD-impregnated TLC (V(acetonitrile)/2-butanol (V/V = 30/70))

b、HP- β -CD-impregnated TLC (acetonitrile/2-butanol (V/V = 50/50))

3.5 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 α -1,4

糖苷键键连而成的“去顶锥筒”状分子，分别是 α -CD、 β -CD、 γ -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。

环糊精作手性选择体拆分对映体时，其独特结构使其具有特殊的包合能力。已成为主-客体化学中重要的分子识别工具之一^[79]。常用 β -CD 的空腔大小能与多种被分析物的大小配比，但它在水中的溶解度小，虽可从提高介质的 pH 办法或添加尿素等助溶剂增大它的溶解度，但其他因素也将影响对映体的分离和分析^[49]。增大 β -CD 溶解度的另一办法是使之衍生化，在 CD 分子上每个葡萄糖基 2, 3 和 6 位的羟基易用各种基团使之衍生化而得到稳定的衍生物，其中用的较多的是甲基（在 2, 6 或 2, 3 和 6 位）、羟丙基、甲胺基、磺丁基、乙酰基或羧甲基，这些衍生物与 CD 母体相比较，它们的水溶性大大提高。

虽然 β -CD 和客体包合作用机理或许有所不同，但其空腔半径仍相同，目前常用的 β -CD 衍生物为甲基或羟烷基衍生物。 β -CD 也可用荷电的基团修饰，这样在分离机制上引入了静电作用力。主-客体包合物的稳定性受多种因素影响，如客体分子的化学结构和疏水性、抗衡离子、pH、有机溶剂及 CD 浓度等。

3.5.1 对映体分离原理

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^[49]：



式（3-3）、（3-4）中，D 和 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^[79]：

$$\frac{R_f}{1-R_f} = \left(\frac{V_m}{W_g}\right) \cdot \left(\frac{1}{k'}\right) \cdot (K_b \cdot [CD] + 1) \quad (3-5)$$

式 (3-5) 中, V_m 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 (3-5) 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。

3.5.2 环糊精拆分盐酸普萘洛尔对映体机制

Armstrong 等^[44]采用 β -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 β -CD 上 2, 3 位仲羟基更易生成氢键 (见图 3-5), 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。

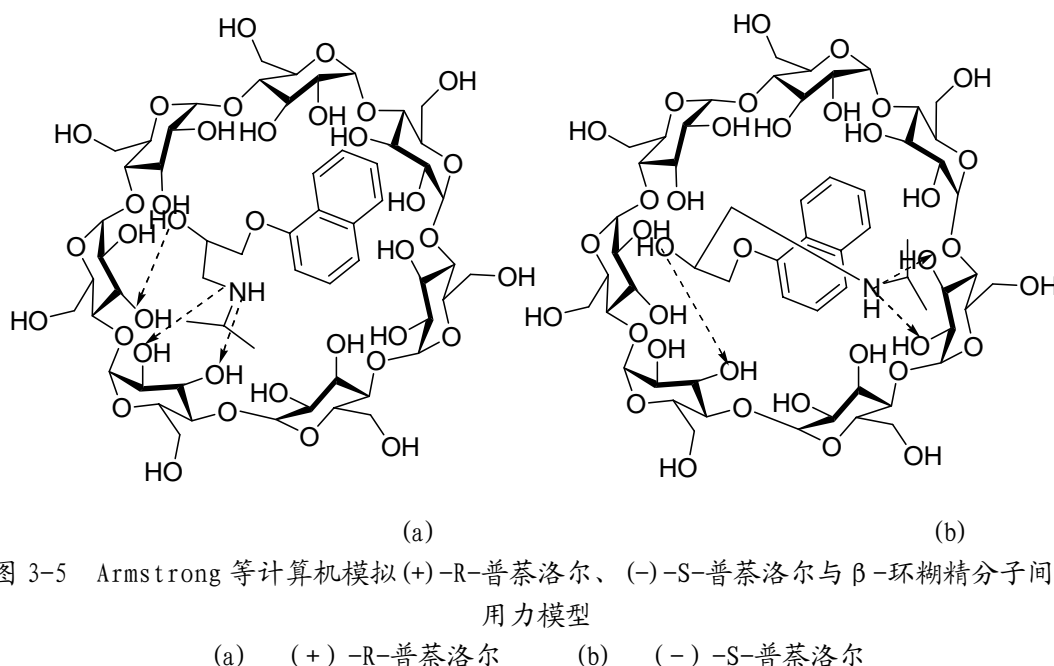


Fig. 3-5 Proposed stereochemical interaction between (+)-R- Propranolol, (-)-S-Propranolol and the β -cyclodextrin chiral stationary phase
(a) (+)-R-Propranolol (b) (-)-S- Propranolol

β -CD 的水溶性小, 而 HP- β -CD 在水中的溶解度大于 50%, 并可溶于醇的水溶液。固载在硅胶板上的 β -CD 或 HP- β -CD, 强烈吸附于固体硅胶表面上, 使

固定相表面手性化, 形成手性固定相。在展开过程中, 对映体与覆盖于固定相表面的 β -CD 或 HP- β -CD 形成不同的分子间作用力, 在薄层板上的移动速度不同, 实现分离。同时, 衍生化的环糊精可与试样产生更多的受力作用点, 所以 HP- β -CD 的手性识别能力比未衍生化的环糊精强。采用 HP- β -CD 作流动相添加剂分离氯噻酮实验结果正好说明了这一点。同样, 将 HP- β -CD 固载于 TLC 板, 拆分盐酸普萘洛尔对映体, HP- β -CD 的手性识别能力相对 β -CD 也强得多。

3.6 试验中遇到的问题和解决方案

制备手性选择体硅胶薄层板时, 如果不预先将 β -CD 或 HP- β -CD 溶解在羧甲基纤维素钠水溶液中, 加入硅胶 GF254 后搅拌时, β -CD 或 HP- β -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 GF254, 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。

3.7 本章小结

采用 β -CD、HP- β -CD 作手性选择体固载薄层色谱方法, 拆分了盐酸普萘洛尔对映体。以乙腈/仲丁醇混合溶剂作展开剂, 混合展开剂中乙腈体积百分比大于 30%时, 室温下展开均可拆分盐酸普萘洛尔对映体, 并实现基线分离。

考察了拆分条件, 得到手性选择体固载薄层色谱拆分盐酸普萘洛尔对映体的最佳试验条件: 采用 β -CD 固载薄层色谱拆分时, 以 1.0g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备薄层色谱板, 选择展开剂为乙腈/仲丁醇 (V/V=30:70), 室温下展开; 采用 HP- β -CD 固载薄层色谱拆分时, 以 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备薄层色谱板, 选择展开剂为乙腈/仲丁醇 (V/V=50:50), 室温下展开。

实验结果表明, 将 β -CD 衍生化为 HP- β -CD 固载薄层色谱, 不仅增大了 CDs 水溶性, 且增大了 CDs 手性选择性能。

第四章 盐酸克伦特罗对映体的拆分研究

盐酸克伦特罗(Clenbuterol Hydrochloride), 化学名为 4-氨基-3,5-二氯- α -[(1,1-二甲基)氨基]-甲基苯甲醇盐酸盐 (或: 1-(4-氨基-3,5-二氯苯基)-2-叔丁基氨基乙醇盐酸盐), 克伦特罗 (化学结构式如图 2-1 所示) 的盐酸盐, 具有一个手性中心, 有(-)-R 和(+)-S 两种构型。盐酸克伦特罗^[102]具有减少肌肉中脂肪的作用, 从而添加于家畜家禽饲料中来喂养, 提高瘦肉比例; 同时又是一种有效的 β_2 -肾上腺素能激动剂, 为拟交感神经药物, 具有很强的扩张支气管平滑肌作用, 临床上主要用于治疗哮喘^[103,104]。研究发现, β_2 -肾上腺素能激动剂类药物临床上有效的一般为其(-)-异构体, 而(+)-异构体则对疗效没有贡献^[105]。

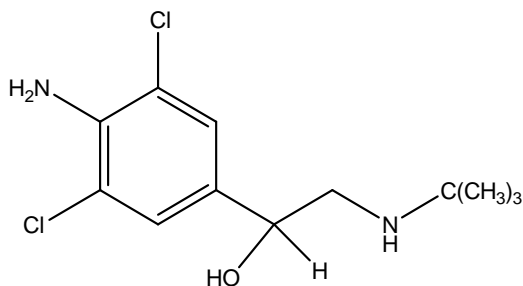


图 4-1 克伦特罗的化学结构式

Fig. 4-1 The chemical structure of clenbuterol

为了得到对映纯的盐酸克伦特罗药物单体, 需对其进行拆分。到目前为止, 报道的拆分方法主要有: 采用 β -环糊精为流动相添加剂毛细管电泳^[106,107]法拆分盐酸克伦特罗对映体以及采用氨基型手性柱 HPLC^[108]进行拆分。以上文献报道的方法, 适用于分析盐酸克伦特罗对映体, 不易实现放大, 故无法采用这些方法进行盐酸克伦特罗药物单体的制备。

本实验探讨了以 β -CD、HP- β -CD 作手性流动相添加剂, 分别采用聚酰胺薄膜以及硅胶 GF254 铺制的薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 板拆分盐酸克伦特罗对映体。实验结果表明, 考察多种流动相配比均无法实现拆分。

本实验研究合成了几种(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯, 并将这些(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯以及 β -CD、HP- β -CD 等多种手性选择体分别固载于硅胶 GF254 制备了 TLC 板, 分离了盐酸克伦特罗对映体, 并考察了流动相组成及配比、手性选择体固载量、缓冲溶液等对分离的影响, 优化了实验条件。实验结果表明, β -CD、HP- β -CD、(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯固载薄层色谱板, 在使用普通的展开剂的

条件下, 均可有效拆分盐酸克伦特罗对映体, 且样品拆分后斑点大小一致, 效果较好。

4.1 实验原料及仪器

4.1.1 主要原料

实验中所使用的主要试剂见表 4-1, 其它试剂见表 3-1。

表 4-1 实验所用主要试剂

Tab. 4-1 The main reagents used in the research

名称	型号	生产厂家
盐酸克伦特罗	≥98%	上海大众药业有限公司
氢氧化钠	分析纯	广东汕头市西陇化工厂
氯化钠	分析纯	广东汕头市西陇化工厂
(2R,3R)-酒石酸	≥99.7%	常茂生物化学工程股份有限公司
环己醇	A.R.	广东汕头市西陇化工厂
正十二醇	C.P.	上海化学试剂站中心化工厂
甲苯	A.R.	邵阳市有机化学试剂厂
对甲苯磺酸	A.R.	中国医药集团上海化学试剂公司
无水硫酸镁	A.R.	天津市科密欧化学试剂开发中心
碳酸氢钠	A.R.	天津市瑞金特化学品有限公司
盐酸	G.R.	上海振兴化工二厂
聚酰胺薄膜	—	浙江台州市路桥四甲生化塑料厂
正庚烷	A.R.	苏州工业园区正兴化工研究院

4.1.2 主要仪器

实验中所使用的主要设备见表 4-2, 其余仪器见表 3-2。

4.2 实验步骤

4.2.1 合成几种 (2R, 3R)-酒石酸-二-烷基酯手性选择体

装有油水分离器、球型回流冷凝管、干燥管的 500mL 单口烧瓶中, 加入甲苯 300mL, 磁力搅拌回流 3h 以除去甲苯中的少量杂质水, 冷却至室温, 再往反应瓶中加入(2R,3R)-酒石酸 22.5g (0.15mol), 烷基醇 0.375mol, 对甲苯磺酸 2.0g

(0.01mol), 回流下磁力搅拌反应约 10h, 直到从油水分离器中分出理论量的水后, 停止反应。反应液空气中放置冷却至室温, 分别用 200mL (100mL×2) 5% 的 NaHCO_3 水溶液洗涤两次, 收集有机层; 再用 200mL (100mL×2) 饱和 NaCl 溶液洗涤有机层两次, 去离子水 300 mL (100mL×3) 洗涤三次后, 收集的有机层用适量无水 MgSO_4 干燥过夜。

表 4-2 实验所用主要仪器

Tab. 4-2 The main apparatuses used in the research

名称	型号	生产厂家
恒温水浴锅	W201	上海申生科技有限公司
旋转蒸发器	W201B	上海申生科技有限公司
自动双重纯水蒸馏器	D1810C	上海申生生物技术有限公司
电热鼓风干燥箱	101-2A	天津市泰斯特仪器有限公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101S	郑州长城科工贸有限公司

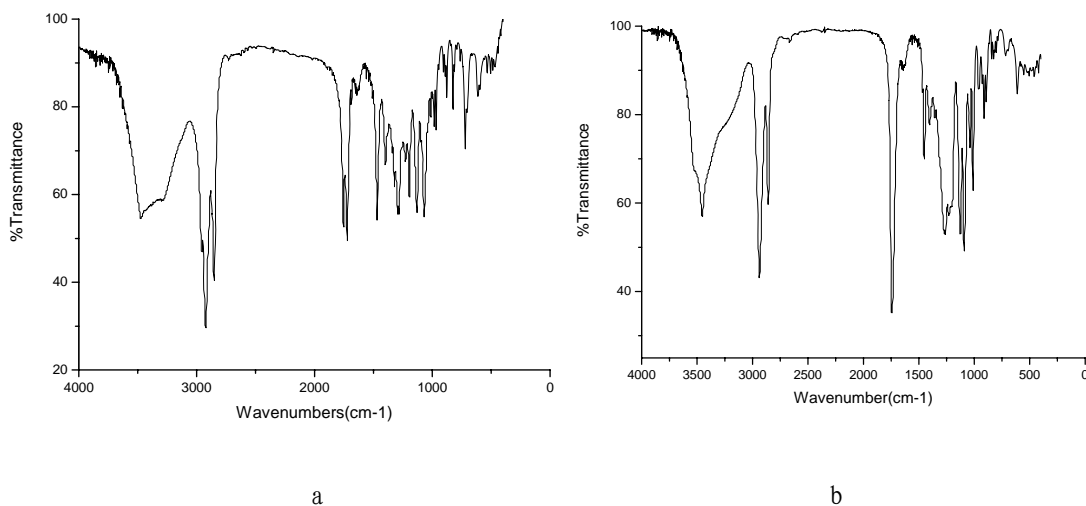


图 4-2 L-(+)-酒石酸-二-正十二酯、L-(+)-酒石酸-二-环己酯的红外波谱图

a L-(+)-酒石酸-二-正十二酯 b L-(+)-酒石酸-二-环己酯

Fig.4-2 IR spectrum of (2R,3R)-di-dodecyl tartrate and (2R,3R)-di-cyclo-hexyl tartrate

a、(2R,3R)-di-dodecyl tartrate b、(2R,3R)-di-cyclo-hexyl tartrate

表 4-3 (2R, 3R)-酒石酸-二-正十二酯红外波谱数据分析

Tab. 4-3 Analysis of IR data of (2R, 3R)-di-dodecyl tartrate

吸收峰 (cm^{-1})	振动方式	基团	强度
3471.83	$\nu_{\text{-OH}}$	-OH	m
2954.84	$\nu_{\text{as-CH}}$	-CH ₂	s
2922.88	$\nu_{\text{as-C-CH}_2\text{-C-}}$	-C-CH ₂ -C-	s
2852.42	$\nu_{\text{-CH}}$	-C-CH ₃	m
720.29	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n - ($n \geq 4$)	m
1754.99, 1721.28	$\nu_{\text{as-C=O}}$	-C=O	m
1467.70	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n -	m
1320.27, 1291.98, 1228.80, 1194.40	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n - ($n \geq 4$)	m
1131.45	$\nu_{\text{as-C-O-C}}$	-C-O-C(esters)	m
1069.83, 983.90	$\nu_{\text{=C-C-O-H}}$	=C-C-O-H	m

表 4-4 (2R, 3R)-酒石酸-二-环己酯红外波谱数据分析

Tab. 4-3 Analysis of IR data of (2R, 3R)- di-cyclohexyl tartrate

吸收峰 (cm^{-1})	振动方式	基团	强度
3453.67	$\nu_{\text{-OH}}$	-OH	m
2937.52	$\nu_{\text{as-CH}_2}$	-CH ₂	s
2859.04	$\nu_{\text{-CH}_2}$	-C-CH ₃	m
1451.55	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n - (cyclohexane)	m
717.34	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n - ($n \geq 4$)	s
1743.82	$\nu_{\text{as-C=O}}$	-C=O	s
1259.31, 1230.54	$\delta_{\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}}$	-(CH ₂) _n - ($n \geq 4$)	m
1135.78	$\nu_{\text{as-C-O-C}}$	-C-O-C(esters)	m
1091.03, 962.72	$\nu_{\text{=C-C-O-H}}$	=C-C-O-H	m

次日抽滤，滤液减压蒸馏除去甲苯，所得产物转移入真空干燥器干燥，得粗产物。正庚烷重结晶粗产物，并真空干燥，得纯的(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯。

分别制备了 (2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯、(2R,3R)-酒石酸-二-环己酯，它们的红外表征波谱图分别见图 4-2(a, b)。

图 4-2 红外波谱数据分析分别见表 4-2 (a)。由所列红外波谱数据及相应的基团分析,产物分子中存在以下基团:羟基、羰基、长链 $-(CH_2)_n$ -以及酯的 $-C-O-C-$,其数据与文献[115]一致,故产物是目标产物(2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯。

图 4-2 (b) 红外波谱数据分析分别见表 4-4。由所列红外波谱数据及相应的基团分析,产物分子中存在以下基团:羟基、羰基、环己基以及酯的 $-C-O-C-$,其数据与文献[115]一致,故产物是目标产物(2R,3R)-酒石酸-二-环己酯。

4.2.2 盐酸克伦特罗纯度检验

盐酸克伦特罗原料药由上海大众药业有限公司生产,纯度为 $\geq 98\%$ 。为了确定样品的纯度,建立了液相色谱检测盐酸克伦特罗原料药的方法。色谱条件如下:

色谱柱: Harbon Lichrospher- C_{18} 色谱柱 ($5\mu m$, $150\times 4.6mm$);

流动相: 甲醇:水相=40:60(体积比),水相组成: $C_{HP-\beta-CD}$ =1mmol/L; 2% H_3PO_4 (体积比);

流速: 0.8mL/min; 紫外检测波长: 254nm; 盐酸克伦特罗样品 (0.1mg/mL) 进样量: 20 μ L; 柱温: 室温。检测 HPLC 色谱图见图 4-3 所示。

测试结果表明,盐酸克伦特罗原料药纯度为 98.12%。

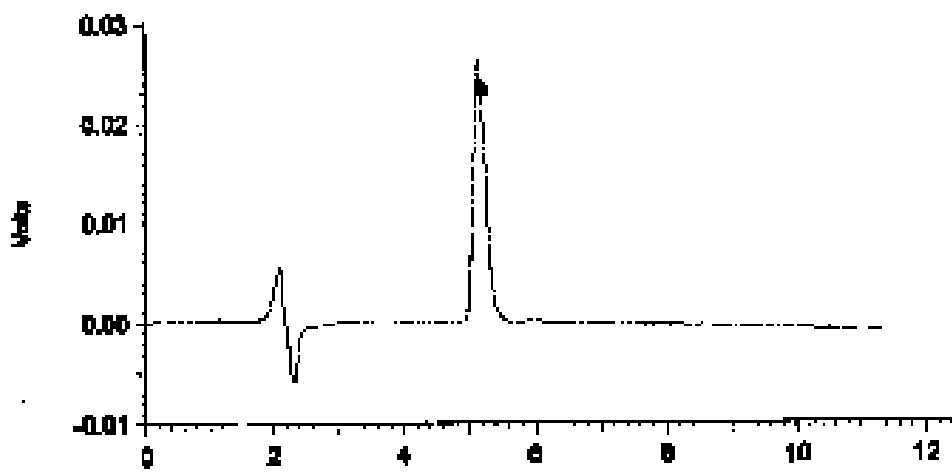


图 4-3 盐酸克伦特罗纯度分析 HPLC 色谱图

Fig. 4-3 HPLC Chromatogram of purity analysis of clenbuterol hydrochloride

4.2.3 配制盐酸克伦特罗溶液

准确称取 0.05g 盐酸克伦特罗于 100mL 烧杯中,加入 40mL 0.1mol/L 的稀

HCl 溶液, 超声振荡使其完全溶解后, 转移入 100mL 棕色容量瓶中容量瓶中, 使用少量 0.1mol/L 的稀 HCl 分三次洗涤烧杯, 并转移入容量瓶中, 继续加入 0.1mol/L 的稀 HCl 溶液定容, 制得 0.50g/L 的盐酸克伦特罗的稀盐酸溶液, 放置冰箱冷藏备用。

4.2.4 制备各种不同规格的薄层色谱板

◆ 制备硅胶 GF254 薄层色谱板

准确称取 15.00g 硅胶 GF254 加入烧杯, 加入 40mL 0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液, 搅拌约半小时, 采用倾注法铺制 7.5cm×2.5cm 硅胶薄层板。室温下空气中放置过夜至干性后转移入烘箱, 于 105℃下活化 1 小时后, 转移入干燥器放置备用。

◆ 制备 (2R, 3R)-酒石酸-二-烷基酯固载的硅胶 GF254 薄层色谱板

分别准确称取一定量的(2R,3R)-酒石酸-二烷基酯, 加入少许乙腈, 搅拌至 (2R,3R)-酒石酸-二烷基酯完全溶解后, 加入 40mL 0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液。称取 15.00g 硅胶 GF254 加入烧杯并搅拌约半小时, 采用倾注法铺制 7.5cm×2.5cm 硅胶薄层板。室温下空气中放置过夜至干性后转移入烘箱, 于 105℃下活化 1 小时后, 转移入干燥器放置备用。

◆ 制备 β -CD 及其衍生物固载的硅胶 GF254 薄层色谱板

分别准确称取一定量 β -CD 或 HP- β -CD 于烧杯中, 加入 40mL 0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液搅拌至 β -CD 或 HP- β -CD 完全溶解后, 称取 15.00g 硅胶 GF254 加入烧杯并搅拌约半小时, 采用倾注法铺制 7.5cm×2.5cm 硅胶薄层板。室温下空气中放置过夜至干性后转移入烘箱, 于 105℃下活化 1 小时后, 转移入干燥器放置备用。

4.2.5 薄层色谱分离盐酸克伦特罗对映体

玻璃点样毛细管取 0.50g/L 的盐酸克伦特罗的稀盐酸溶液样液, 圆点点样于薄层色谱板 (7.5×2.5cm) 的一端距其下端 1cm 处, 薄板放置于 P-1 型薄层层析展开缸中室温下展开。完全展开后, 取出并于红外干燥箱中烘干, 采用 ZT- I 型 三用紫外分析仪 254nm 紫外光下显示样品分离后的斑点位置, 用铅笔标注后测量并参照式 (3-1) 计算 R_f 、式 (3-2) 计算分离度 R 。

4.3 结果与讨论

4.3.1 β -CD 作流动相手性添加剂 TLC 法拆分盐酸克伦特罗对映体

近年来,随着环糊精在分析化学中应用研究的深入,用其作为TLC的手性添加剂来分离对映体的研究也日趋活跃。TLC是最基础最简便的色谱手段之一,用TLC分离对映体的研究具有重要的实用意义。在TLC上分离对映体时,用环糊精作流动相手性添加剂要比将它制作成手性固定相更简便,也易于操作^[79,109]。环糊精作为手性选择体,其浓度对拆分有较大的影响,流动相中溶有足够大浓度的环糊精是TLC有效分离对映体的一个关键因素。

根据公式^[110]:

$$[\beta\text{-CD}]_{\text{solubility}} = 0.002 + 0.0259[\text{Urea}] \quad (4-1)$$

式(4-1)中, $[\beta\text{-CD}]_{\text{solubility}}$ 表示在 25.5℃、尿素摩尔浓度为 $[\text{Urea}]$ 时, β -CD 在水中的溶解度。

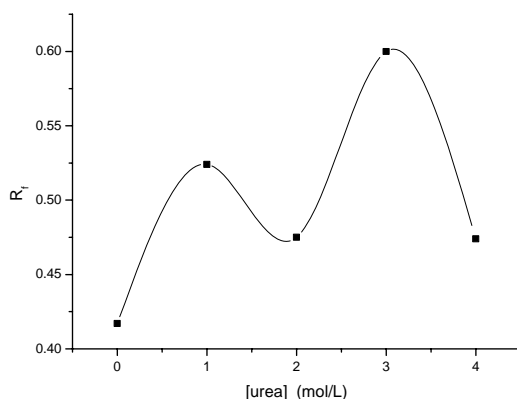


图 4-4 尿素助溶 β -环糊精饱和溶液作展开剂硅胶 GF254 TLC 法拆分盐酸克伦特罗

Fig.4-4 Resolution of Clenbuterol Hydrochloride on Silica gel GF254 thin-layer chromatography using urea-solubilized β -cyclodextrin saturated solution as mobile phase

分别配制 β -CD 饱和水溶液、含尿素 1mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 2mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 3mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 4mol/L 的 β -CD 饱和水溶液作展开剂,采用硅胶 GF254 板对盐酸克伦特罗作拆分研究,结果如图 4-4 所示。

由图 4-4 可知,采用硅胶 GF254 铺制 TLC 板, β -CD 饱和水溶液以及尿素增溶的 β -CD 饱和水溶液做展开剂拆分盐酸克伦特罗对映体时,比移值 R_f 呈不规则变化,且不能实现手性拆分。

4.3.2 聚酰胺薄膜法拆分盐酸克伦特罗对映体

聚酰胺是一类化学纤维原料，又称锦纶或尼龙，它对许多极性化合物有吸附作用，具有特异的分辨性能，可用于柱层析、薄层层析及薄膜层析。将锦纶涂布于涤纶布上，形成质地均匀且紧密的多孔薄膜，即为聚酰胺薄膜，具体的结构如图 4-5 所示。

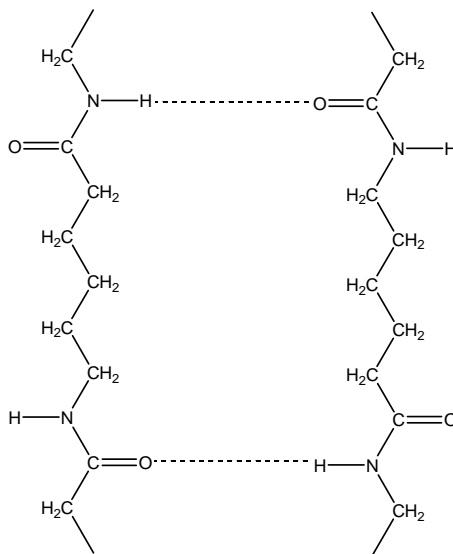


图 4-5 聚酰胺薄膜的结构

Fig.4-5 The Chemical sketch of polyamind membrane

由于聚酰胺的-C=O 基以及-NH 基可与被分离物质形成氢键，因此可吸附酸类、酚类、醌类、硝基及胺基化合物等。由于各种物质与聚酰胺形成氢键的能力不同，在层析过程中，展开剂与被分离物质在聚酰胺表面竞相形成氢键。因此，选择适当的展开剂，可使各种待分离物质在聚酰胺表面与溶剂之间有不同的分配系数，经过吸附与解吸附的展开过程，各自按一定次序分离开来。聚酰胺薄膜层析性能优良，亦具有灵敏度高、分辨能力强、速度快、操作方便等优点。

Armstrong 等^[111]在聚酰胺薄膜上用 α -CD 分离了苯甲酸及其取代位置异构体，从而将聚酰胺薄膜层析引入手性分离领域。国内在相关领域也有研究^[112,113]。将聚酰胺薄膜裁剪成 2.5cm×10cm 大小，在距其一端 1cm 处圆点点样盐酸克伦特罗溶液，分别采用 β -CD 饱和水溶液、含尿素 1mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 2mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 3mol/L 的 β -CD 饱和水溶液、含尿素 4mol/L 的 β -CD 饱和水溶液于层析缸中作展开剂作分离实验。完全展开后于暗室内紫外灯 254nm 紫外光下显示样品斑点，铅笔标注后，测量并计算比移值 R_f 。结果如

图 4-6 所示。

由图可知，随着尿素增溶 β -CD 饱和水溶液的浓度的升高，比移值 R_f 先增加后下降，且都无法实现分离。

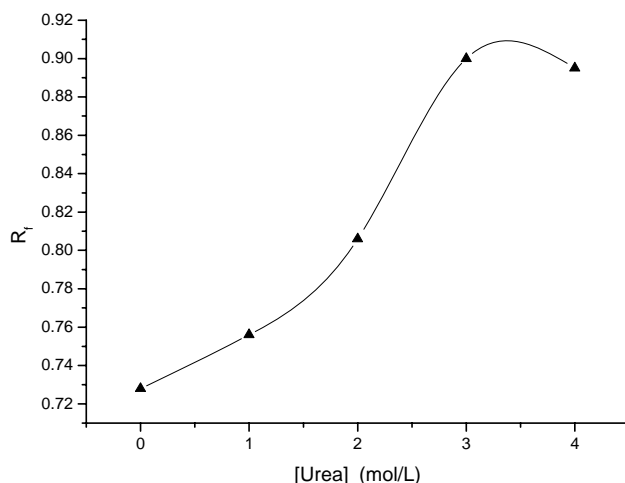


图 4-6 尿素助溶 β -环糊精饱和溶液作展开剂聚酰胺薄膜 TLC 法拆分盐酸克伦特罗

Fig. 4-6 Resolution of Clenbuterol Hydrochloride on thin-layer chromatography using urea-solubilized β -cyclodextrin saturated solution as mobile phase

4.3.3 β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

以乙腈/醇 (V/V=50/50) 混合溶剂作展开剂，0.50g β -环糊精固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板进行盐酸克伦特罗的拆分实验，考察了甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、叔丁醇、正戊醇等多种醇与乙腈的混合溶剂分离效果。结果表明，醇为正丁醇、仲丁醇、叔丁醇时，均可有效拆分盐酸克伦特罗对映体，分离度 R 分别为 3.75、6.09、2.54，其中以乙腈/仲丁醇为展开剂时，分离度 R 最大，且样品分离后斑点大小较一致；以其它醇与乙腈混合溶剂作展开剂时，则无法实现拆分，故本实验采用乙腈/仲丁醇为展开剂（表 4-5）。

◆ 仲丁醇比例对拆分的影响

选择 0.50g β -环糊精固载的 TLC 板，以不同体积比的乙腈/仲丁醇混合溶剂进行薄层色谱展开分析，结果如表 4-6 所示。结果表明，展开剂中乙腈体积比小于 10% 或大于 80%，不能实现拆分。当展开剂中乙腈体积百分含量从 20%~70% 变化，分离度先增大后减小，且都大于 1.5，即均可实现基线分离。考察拆分后

样品斑点形状, 选择乙腈/仲丁醇 (V/V=20/80) 混合溶剂展开时, 斑点大小一致, 拆分效果最好。

表 4-5 醇的种类对拆分效果的影响

Tab. 4-5 The effect of kind of alcohol on the resolution

乙腈 / 醇 (V/V=50/50)	R_{f-1}	R_{f-2}	R	展开时间/ (min)
乙腈 / 甲醇	0.21	—	—	7
乙腈 / 乙醇	0.34	—	—	12
乙腈 / 异丙醇	0.30	—	—	10
乙腈 / 正丁醇	0.28	0.79	3.75	13
乙腈 / 仲丁醇	0.23	0.80	6.09	10
乙腈 / 叔丁醇	0.20	0.76	2.54	12
乙腈 / 正戊醇	0.60	—	—	13
乙腈 / 异戊醇	0.56	—	—	12
乙腈 / 正辛醇	0.54	—	—	11
乙腈 / 环己醇	0.78	—	—	17

表 4-6 不同体积比的仲丁醇对拆分效果的影响

Tab. 4-6 The percentage of 2-butanol on the resolution

乙腈/仲丁醇 (V/V)	R_{f-1}	R_{f-2}	R	展开时间/ (min)
80:20	0.71	—	—	4
70:30	0.24	0.79	2.71	6
60:40	0.28	0.89	3.89	8
50:50	0.23	0.80	6.09	10
40:60	0.30	0.86	4.07	15
30:70	0.34	0.70	3.62	22
20:80	0.33	0.70	3.31	26
10:90	0.75	—	—	32
0:100	0.74	—	—	38

同时, 随着展开剂中仲丁醇体积比增大, 展开时间越来越长, 可能是仲丁醇的羟基与硅胶板固载的 β -环糊精的 2, 3, 6 位的羟基形成动态的分子间氢键, 所以展开剂在硅胶板上移动速度减慢, 展开时间增长。

◆ β -环糊精固载量对拆分的影响

考察不同量 β -环糊精固载的 TLC 板做拆分实验, 选择展开剂为乙腈/仲丁醇混合溶剂 (V/V=20/80) 展开, β -环糊精用量分别为 0.25g、0.50g、0.75g、1.00g 时, 分离度分别为 3.07、3.31、3.57、4.09, 可见分离度 R 随固载环糊精量增大

而递增。当固载 β -环糊精 1.00g 时, 分离度最大, 且样品分离后大小一致。

经过实验, 选择盐酸克伦特罗对映体最优分离条件为: 1.00g β -环糊精固载的 TLC 板, 乙腈/仲丁醇混合溶剂 ($V/V=20/80$) 作展开剂, 室温下展开。

4.3.4 HP- β -CD 固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

选择 0.50g HP- β -环糊精固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板, 采用乙腈/醇混合溶剂 ($V/V=50/50$) 作展开剂, 室温下薄层层析拆分盐酸克伦特罗对映体, 分离结果如表 4-7。

表 4-7 醇的种类对拆分效果的影响

Tab. 4-7 The effect of kind of alcohol on the resolution

乙腈 / 醇 ($V/V=50/50$)	R_{f1}	R_{f2}	R	展开时间/ (min)
乙腈 / 甲醇	0.19	—	—	7
乙腈 / 乙醇	0.34	—	—	12
乙腈 / 异丙醇	0.25	—	—	10
乙腈 / 正丁醇	0.23	0.75	3.10	13
乙腈 / 仲丁醇	0.25	0.75	3.00	10
乙腈 / 叔丁醇	0.25	0.72	3.75	12
乙腈 / 正戊醇	0.70	—	—	13
乙腈 / 异戊醇	0.73	—	—	12
乙腈 / 正辛醇	0.54	—	—	11
乙腈 / 环己醇	0.81	—	—	17

从表 4-7 可知, 采用正丁醇、仲丁醇、叔丁醇与乙腈混合作展开剂时, 均可有效拆分盐酸克伦特罗对映体, 而其它醇为展开剂时, 则无法拆分盐酸克伦特罗对映体。实验同时发现, 使用乙腈/叔丁醇混合溶剂展开时, 分离度 R 最大, 同时显示具有样品分离后斑点基本不拖尾, 分离效果最好。

◆ 展开剂中乙腈/叔丁醇的比例对拆分效果的影响

以不同体积比的乙腈/叔丁醇混合溶剂于室温下进行薄层色谱展开分析, 结果如表 4-8 所示。结果表明, 随着展开剂中叔丁醇体积百分比为 50% 时, 分离度 R 最大, 样品分离后斑点大小一致, 无拖尾现象。

◆ HP- β -CD 固载量对拆分效果的影响

考察不同量 HP- β -CD 固载的 TLC 板做拆分实验, 选择展开剂为乙腈/叔丁

醇混合溶剂 (V/V=50/50) 展开, HP- β -CD 用量分别为 0.25g、0.50g、0.75g、1.00g 时, 分离度分别为 3.14、3.75、3.87、4.35, 可见分离度 R 随固载环糊精量增大而递增。当固载 HP- β -CD 量为 1.00g 时, 分离度最大, 且样品分离后大小一致。

表 4-8 不同体积比的叔丁醇对盐酸克伦特罗对映体拆分效果的影响

Tab. 4-8 The percentage of tert-butanol on the resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers

乙腈/叔丁醇 (V/V)	R_{f-1}	R_{f-2}	R	展开时间/(min)
100:0	0.17	0.72	2.83	3
90:10	0.23	0.73	1.41	5
80:20	0.20	0.69	2.20	5
70:30	0.23	0.63	3.40	7
60:40	0.31	0.75	3.25	10
50:50	0.25	0.71	3.75	12
40:60	0.39	0.79	2.33	17
30:70	0.40	0.77	2.17	27
20:80	0.37	0.71	2.05	32
10:90	0.39	0.70	2.18	36
0:100	0.34	0.57	1.42	45

经过实验, 选择盐酸克伦特罗对映体最优分离条件为: 1.00g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板, 乙腈/叔丁醇混合溶剂 (V/V=50/50) 作展开剂, 室温下展开。

4.3.5 (2R, 3R)-酒石酸-二-正十二烷基酯固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

选择 0.25g (2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯固载 15.0g 硅胶 GF254 的薄层板, 以乙腈分别与各种醇混合溶剂 (V/V=50/50) 作流动相, 层析展开分离盐酸克伦特罗, 结果见表 4-9。由表可知, 乙腈分别与正丁醇、仲丁醇或叔丁醇混合作展开剂时, 可实现盐酸克伦特罗对映体的拆分。由拆分后的 TLC 色谱斑点可知, 当流动相为乙腈/正丁醇时, 两分离后的斑点大小较一致, 所以选择乙腈/正丁醇为展开剂做拆分实验。

◆ 流动相中乙腈/正丁醇的体积比例对拆分效果的影响

分别以不同体积比的乙腈/正丁醇室温下进行薄层色谱展开分析, 结果如表

4-10 所示。

表 4-9 醇的种类对拆分效果的影响

Tab. 4-9 The effect of kind of alcohol on the resolution

乙腈/醇 (V/V=50/50)	R _{f-1}	R _{f-2}	R	展开时间/min
乙腈 / 甲醇	0.21	—	—	8
乙腈 / 乙醇	0.22	—	—	9
乙腈 / 异丙醇	0.21	—	—	10
乙腈 / 正丁醇	0.17	0.69	2.74	11
乙腈 / 仲丁醇	0.22	0.67	2.70	11
乙腈 / 叔丁醇	0.18	0.60	2.78	11
乙腈 / 正戊醇	0.62	—	—	13
乙腈 / 异戊醇	0.55	—	—	13
乙腈 / 正己醇	0.57	—	—	15
乙腈 / 正庚醇	0.47	—	—	13
乙腈 / 正辛醇	0.47	—	—	15

表 4-10 不同体积比的正丁醇对盐酸克伦特罗对映体拆分效果的影响

Tab. 4-10 The percentage of n-butanol on the resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers

乙腈/叔丁醇 (V/V)	R _{f-1}	R _{f-2}	R	展开时间/min
100:0	0.06	—	—	3
90:10	0.12	0.61	3.47	6
80:20	0.13	0.71	4.06	7
70:30	0.14	0.62	2.25	8
60:40	0.14	0.63	2.62	9
50:50	0.17	0.69	2.74	13
40:60	0.70	—	—	13
30:70	0.58	—	—	17
20:80	0.66	—	—	22
10:90	0.58	—	—	25

实验结果表明, 整个实验条件范围内, 展开剂对拆分的影响很大。展开剂中正丁醇体积比为 10%~50%时, 方可实现盐酸克伦特罗对映体的分离。当 V

(乙腈)/V(正丁醇)=90/10 时, 样品分离后斑点最均一, 且实现了基线分离, 所以选择展开剂条件为乙腈/正丁醇混合溶剂(V/V=90/10)。

◆ (2R, 3R)-酒石酸-二-正十二酯固载量对拆分效果的影响

分别考察(2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯固载量分别为 0.25 g、0.30 g、0.35 g、0.40 g、0.45 g、0.50 g 的层析板对拆分的影响, 分离度分别为 3.47、3.55、3.69、3.91、4.11、4.76。实验发现, 将 0.5g (2R,3R)-酒石酸-二正十二酯固载于 15.0g 硅胶上制备的薄层板, 其分离效果最好。且样品拆分后薄层板上两对映体斑点大小较一致, 分离效果较好。

经过实验, 选择盐酸克伦特罗对映体最优分离条件为: 0.5g (2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板, 乙腈/正丁醇混合溶剂(V/V=90/10)作展开剂, 室温下展开。

4.3.6 (2R, 3R)-酒石酸-二-环己酯固载 TLC 薄层板拆分盐酸克伦特罗对映体

◆ 不同展开剂对拆分的影响

选择 0.25g (2R,3R)-酒石酸-二-环己酯固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层板做拆分实验, 采用乙腈/醇(V/V=50:50)作展开剂, 室温下薄层层析拆分盐酸克伦特罗对映体, 分离结果如表 4-11 所示。从表可知, 当采用正丁醇、仲丁醇、叔丁醇、正庚醇、正辛醇时, 均可拆分盐酸克伦特罗对映体, 其中正丁醇、仲丁醇、叔丁醇均可实现基线分离。而其它醇为展开剂时, 则无法拆分盐酸克伦特罗对映体。实验同时发现, 使用乙腈/叔丁醇展开时, 分离度 R 最大, 分离效果最好, 所以本实验采用乙腈/叔丁醇作展开剂。

◆ 流动相中乙腈/叔丁醇的体积比例对拆分效果的影响

分别以不同体积比的乙腈/叔丁醇室温下进行薄层色谱展开分析, 结果如表 4-12 所示。

实验结果表明, 整个实验条件范围内, 展开剂对拆分的影响很大, 且不具有规律性。随着展开剂中叔丁醇体积比增大, 逐渐实现分离; 当 V(乙腈)/V(叔丁醇)=50/50 时, 分离度 R 最大; 而叔丁醇体积比为 60%时, 分离度 R 剧烈减小; 叔丁醇体积比超过 60%时, 分离度 R 又随其体积比增大而逐渐增大; 当展开剂全部为叔丁醇时, 又不能拆分盐酸克伦特罗对映体。

表 4-11 醇的种类对盐酸克伦特罗对映体拆分效果的影响

Tab. 4-11 The effect of kind of alcohol on the resolution of clenbuterol hydrochloride

乙腈/醇(V/V=50:50)	R _{f-1}	R _{f-2}	R	展开时间/min
乙腈-甲醇	0.25	—	—	5
乙腈-乙醇	0.27	—	—	7
乙腈-异丙醇	0.23	—	—	10
乙腈-正丁醇	0.25	0.64	2.08	11
乙腈-仲丁醇	0.22	0.69	3.50	11
乙腈-叔丁醇	0.31	0.71	3.92	15
乙腈-正戊醇	0.58	—	—	12
乙腈-异戊醇	0.65	—	—	13
乙腈-正己醇	0.53	—	—	12
乙腈-正庚醇	0.43	0.57	1.33	14
乙腈-正辛醇	0.28	0.40	1.47	16

表 4-12 不同体积比的叔丁醇对盐酸克伦特罗对映体拆分效果的影响

Tab. 4-12 The percentage of tert-butanol on the resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers

乙腈/叔丁醇 (v/v)	R _{f-1}	R _{f-2}	R	展开时间 / (min)
100:0	0.06	—	—	3
90:10	0.10	—	—	5
80:20	0.08	0.23	1.50	6
70:30	0.12	0.27	1.00	8
60:40	0.14	0.28	1.13	13
50:50	0.31	0.71	3.92	15
40:60	0.32	0.76	2.52	18
30:70	0.35	0.79	3.53	22
20:80	0.39	0.75	3.91	25
10:90	0.40	0.80	1.85	28
0:100	0.51	—	—	58

◆ (2R, 3R)-酒石酸-二环己酯固载量对拆分效果的影响

分别考察(2R,3R)-酒石酸-二环己酯固载量分别为 0.25 g、0.30 g、0.35 g、0.40 g、0.45 g、0.50g 的层析板对拆分的影响,分离度分别为 3.92、3.94、4.11、4.17、4.21、4.32。实验发现,将 0.5g (2R,3R)-酒石酸-二环己酯固载于 15.0g 硅胶上制备的薄层板,其分离效果最好,分离度为 4.32。而且样品拆分后薄层板上两对

映体斑点大小较一致，分离效果较好。

经过实验，选择盐酸克伦特罗对映体最优分离条件为：0.5g (2R,3R)-酒石酸-二环己酯固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板，乙腈/叔丁醇混合溶剂（V/V=50/ 50）作展开剂，室温下展开。

4.4 最优条件下拆分盐酸克伦特罗对映体的 TLC 色谱图

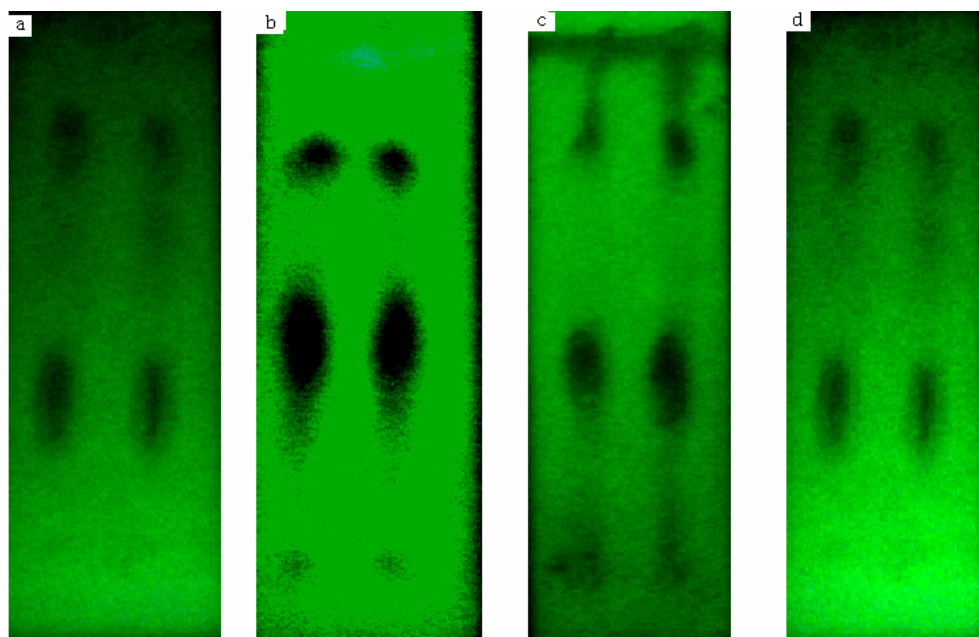


图 4-7 手性选择体固载相薄层色谱法分离盐酸克伦特罗对映体图照片

a、 β -环糊精固载 TLC 板

b、HP- β -环糊精固载 TLC 板

c、(2R, 3R)-酒石酸-二-正十二酯固载 TLC 板

d、(2R, 3R)-酒石酸-二环己酯固载 TLC 板

Fig. 4-7 Photos of resolution of clenbuterol hydrochloride using chiral selector impregnated Thin-Layer Chromatography

a、TLC plank impregnated with β -cyclodextrin

b、TLC plank impregnated with hydroxypropyl- β -cyclodextrin

c、TLC plank impregnated with (2R, 3R) -di-dodecyl tartrate

d、TLC plank impregnated with (2R, 3R)-di-cyclohexyl tartrate

在上述最优条件下分别做 TLC 拆分盐酸克伦特罗对映体实验，每张 TLC 薄板上圆点点样两个样品点，完全展开后，红外灯下烘干薄板，暗室中使用三用

紫外仪在 254nm 紫外灯照射下显示样品分离后的斑点, 采用佳能数码相机于夜光、曝光时间最大以及禁止闪光模式下摄制 TLC 图 (图 4-7), 由摄制相片可知, 样品均被有效分离。

4.5 试验中遇到的问题和解决方案

制备(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯固载薄层板时, 因(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯水溶解性能不好, 须预先加入少许乙腈, 搅拌至(2R,3R)-酒石酸-二环己酯完全溶解后, 再加入羧甲基纤维素钠水溶液, 然后称取硅胶 GF254 加入烧杯并搅拌, 可成功铺制平整的薄层板。

三用紫外仪 254nm 紫外灯下, 佳能数码相机摄制 TLC 图时, 闪光模式下摄制的相片很不清楚, 由于闪光灯光线很强, 导致样品暴露在闪光灯下, 从而斑点不得显示。采用增大曝光时间并禁止闪光模式, 可摄制得到清楚的 TLC 分离色谱照片。

4.6 (2R, 3R)-酒石酸-二-烷基酯作手性选择体拆分对映体机制

W Lindner 等^[114]采用酒石酸衍生物作手性选择体研究拆分了烷基醇胺, 从而酒石酸衍生物被广泛运用到手性拆分领域。E Heldin 等^[115]对酒石酸衍生物作手性选择体做了系统的研究, 合成了多种酒石酸酯类衍生物, 并得出一些有用的结论。

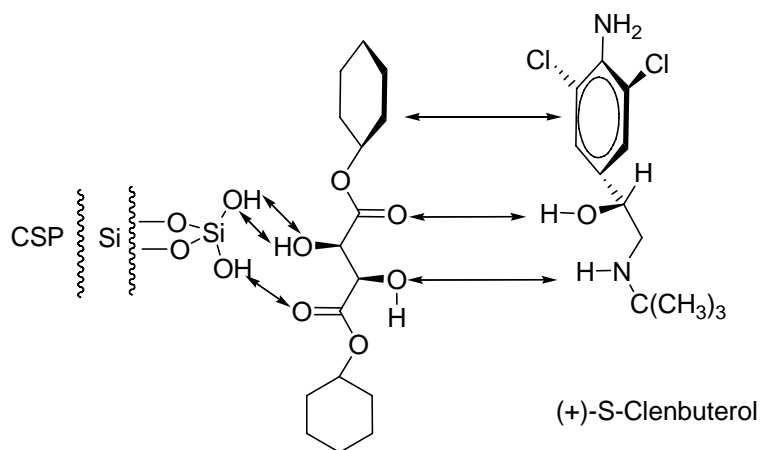


图 4-8 (+)-S-克仑特罗与固定相 (2R, 3R)-酒石酸-二环己酯相互作用模式

Fig.4-8 Proposed stereochemical interaction between (+)-S-clenbuterol and (2R, 3R)-di-cyclo-hexyl tartrate chiral stationary phase

采用酒石酸衍生物铺制 TLC 薄层板进行对映体拆分尚未有报道。酒石酸烷

基酯类衍生物在紫外区无吸收,不会产生干扰,而且由于其结构中有羟基、羰基官能团,可与硅胶表面的硅醇羟基形成氢键作用力,从而实现与硅胶的固载。本论文考察了流动相条件与酒石酸烷基酯固载量的影响,认为固载相中酒石酸烷基酯浓度可对分离产生较大的影响,同时,流动相的配比影响也较大。

(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯具有弹性的羟基(-OH)和刚性羰基(-C=O),具有与被拆分手性溶质作用的位置,所以具有比较广泛的适用性。主要与多种类型的手性化合物发生氢键缔合,从而实现手性识别(图 4-8)。

4.7 本章小结

以 β -CD 作手性流动相添加剂,同时使用尿素对 β -CD 增溶,分别采用硅胶 GF254 薄层板和聚酰胺薄膜拆分盐酸克伦特罗对映体。结果表明, β -CD 作手性流动相添加剂 TLC 法不能对盐酸克伦特罗对映体实现分离;

采用 β -CD、HP- β -CD 分别固载硅胶 GF254 制备薄层板,乙腈/醇混合溶剂为展开剂,成功分离了盐酸克伦特罗对映体,同时优化了拆分的实验条件。

设计合成了两种手性选择体(2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯、(2R,3R)-酒石酸-二-环己酯,分别采用它们制备了固载相薄层板,对盐酸克伦特罗对映体进行拆分实验。结果表明,制备的两种(2R,3R)-酒石酸-二-烷基酯具有一定的手性识别功能,可分离盐酸克伦特罗对映体。优化了拆分实验条件,探讨了分离机制,建立了分离的分子作用模型。

第五章 结论和展望

5.1 结论

本文系统地研究了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。得出以下结论:

采用手性选择体作高效液相色谱流动相添加剂,拆分了氯噻酮对映体。优化了色谱条件,得到 HP- β -CD 作为流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体的最佳色谱条件:色谱柱:Harbon Lichrospher-C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 150 \times 4.6mm);流动相:甲醇:水相=20:80 (水相: C_{HP- β -CD}=30mmol/L; C_{Na₂HPO₄}=0.1mol/L; pH=5; C_{TEA}=2%(体积百分比));流速:0.8ml/min;检测波长:紫外 254nm;进样量:20 μ L;柱温为室温。在此条件下拆分,分离因子 α 为 1.17。并对比了文献报导的 β -CD 作为流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体,分析了利弊。

研究采用手性选择体固载相薄层色谱法拆分了盐酸普萘洛尔对映体,得到最佳分离条件:采用 1.0g β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验,展开剂乙腈/仲丁醇混合溶剂 (V/V=30/70),室温下展开分离,分离度 R 为 4.85;采用 1.0g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶 GF254 制备的薄层色谱板作拆分实验,展开剂乙腈/仲丁醇混合溶剂 (V/V=50/50),室温下展开分离,分离度 R 为 2.78。同时对分离机制进行了探讨。

研究采用手性选择体作薄层色谱流动相添加剂和固载薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体。分别得到了几种手性选择体固载相的分离最佳条件:1.00g β -环糊精固载的 TLC 板,乙腈/仲丁醇混合溶剂 (V/V=20/80) 作展开剂,室温下展开,分离度 R 为 4.09;1.00g HP- β -CD 固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板,乙腈/叔丁醇混合溶剂 (V/V=50/50) 作展开剂,室温下展开,分离度 R 为 4.35;0.5g (2R,3R)-酒石酸-二-正十二酯固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板,乙腈/正丁醇混合溶剂 (V/V=90:10) 作展开剂,室温下展开,分离度 R 为 4.76;0.5g (2R,3R)-酒石酸-二环己酯固载 15.0g 硅胶制备的 TLC 板,乙腈/叔丁醇混合溶剂 (V/V=50/50) 作展开剂,室温下展开,分离度 R 为 4.32。结果表明,手性选择体固载相薄层色谱具有良好的手性识别能力。同时初步探讨了分离机制,尝试建立了固载相

分离模型。

5.2 展望

本论文首次系统研究了羟丙基- β -环糊精作流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分氯噻酮对映体，拆分效果比 β -环糊精作流动相手性添加剂的 HPLC 法拆分时理想。

本论文还首次研究了采用手性选择体作固载相薄层色谱法拆分了盐酸克伦特罗对映体和盐酸普萘洛尔对映体，拆分效果均很理想。初步研究的拆分分子作用模型可为今后的研究提供理论依据。研究取得了一些成就，但以下工作仍有待完善：

- 展开剂组成和配比影响拆分效果的机理和相应的规律；
- 进行柱色谱放大实验操作时可能遇到的难点和解决方案；
- 设计合成更有效的手性选择体的方法和理论依据；
- 放大实验得到大批量的产物时，确定旋光单体的立体构型的方法研究。

参 考 文 献

- [1] Persson Bengt-Arne, Andersson Shalini. Unusual effects of separation conditions on chiral separations. *J Chromatogr A*, 2001, 906: 195~203
- [2] 叶秀林. 立体化学. 北京: 北京大学出版社, 1999
- [3] 张永敏. 物理有机化学. 上海: 上海科学技术出版社, 2001
- [4] 向小莉, 袁黎明. 手性化合物. 化学教育, 2003, (5): 3~6
- [5] 尤田耙. 手性化合物的现代研究方法. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993
- [6] 李良智, 史大永, 刘均洪, 等. 手性药物的构型与药效活性. 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.*). *Biol Cell*, 1995, 84(1-2): 114
- [8] Matthews S James, McCoy Christopher. Thalidomide: A review of approved and investigational uses. *Clin Ther*, 2003, 25(2): 342~395
- [9] Trent D Stephens, Carolyn J W Bunde, Bradley J Fillmore. Mechanism of Action in Thalidomide Teratogenesis. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 1489~1499
- [10] Anon. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, U.S. Food and Drug Administration Guidance, Washington, DC, 1992
- [11] Israel Agranat, Hava Caner. Intellectual property and chirality of drugs. *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. 化工进展, 2002, 21(36): 375~380
- [13] 杨振云, 张贻亮. 手性工业. 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. 化学通报, 1997, (2): 12~21, 16
- [15] Karen W Phinney. Chiral separations. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 372: 22
- [16] Shalini Andersson, Stig G Allenmark. Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 54: 11~23
- [17] 蒋约珥. 液膜手性分离技术. 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. 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. 合成化学, 1999, 7(4): 340~345
- [20] El Gihani, Moharem T, Williams Jonathan M J. Dynamic kinetic resolution. Curr Opin Chem Biol, 1999, 3(1): 11~15
- [21] Allen JV, Williams JMJ. Dynamic kinetic resolution with enzyme and palladium combinations. 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. 化工进展, 1995, (2): 32~36
- [23] Jeffrey H, Lutje Spelberg, Lixia Tang, et al. Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins. Tetrahedron: Asymmetry, 2004, (15): 1095~1102
- [24] S Joly, Mangalam S Nair. Studies on the enzymatic kinetic resolution of β -hydroxy ketones. J Mol Catal B-Enzym., 2003, (22): 151~160
- [25] 王道宾, 何炳林. 用固定化氨基酰化酶拆分 DL-对氯苯丙氨酸. 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. 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. 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. 现代化工, 2004, 24(4): 15~18
- [29] Alan Gabelman, Sun-Tak Hwang. Hollow fiber membrane contactors. J Membrane Sci, 1999, (159): 61~106
- [30] Hadik Péter; Szabó Lujza-P, Nagy Endre. D, L-lactic acid and D,L-alanine enantioseparation by membrane process. Desalination, 2002, 148(1-3): 193~198
- [31] Keurentjes JTF, Nabuurs LJWM, Vegter EA. Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures. J Membrane Sci, 1996, 113(2): 351~360
- [32] Maier Norbert M, Franco Pilar; Lindner Wolfgang. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. J Chromatogr A, 1996, 906(1):3~33
- [33] Pickering PJ, Chaudhuri JB. Enantioselective extraction of (d)-phenylalanine from racemic (d/l)-phenylalanine using chiral emulsion liquid membranes. 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 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 β -cyclodextrin. *J Membrane Sci*, 2000, 167 (1): 33~45

[36] Coelho IM, Cardoso MM, Viegas RMC, et al. Transport mechanisms and modelling in liquid membrane contactors. *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. *Polymer*, 1997, 38(1): 235~238

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

[39] Lee NH, Frank CW. Separation of chiral molecules using polypeptide-modified poly(vinylidene fluoride) membranes. *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 Membrane Sci*, 2000, 175 (1): 111~117

[41] 龙远德, 黄天宝. β -环糊精聚合物膜拆分氨基酸对映体. *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. *Polymer*, 2002, 43(1-3): 287~292.

[43] Dalgliesh C E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper. *Chromatography. 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 β -cyclodextrin inclusion complexes. *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. *色谱*, 1994, 12(4): 259~262

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

[47] Volker Schurig. Separation of enantiomers by gas chromatography. *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 Chromatogr A, 1999, 843: 99~121

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[61] 马剑茵. 手性药物的色谱分离方法. 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. 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 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 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. *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 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 Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1989, 493: 105~115
- [68] Renato Lukač, Andrew J Clark, Syma Khalid, et al. Chiral discrimination in mobile phases for HPLC. *J. Mol. Liq.*, 2002, 98-99: 413~425
- [69] Gorag S, Herenyi B. α -Acid glycoprote in column in the high-performance liquid chromatographic analysis of some groups of chiral drugs. *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 cartridge column via β -cyclodextrin inclusion complexes. *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 Chromatogr B*, 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 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 Chromatogr A*, 2001, 906: 185~193
- [74] Irma Kartoza, Martial Kanyonyo, Thierry Happaerts, et al. Comparative HPLC enantioseparation of new chiral hydantoin derivatives on three different polysaccharide type chiral stationary phases. *J Pharmaceut Biomed Analysis*, 2002, 27(3-4): 457-465
- [75] Poul Vibholm Petersen, Jens Ekelund, Lars Olsen, et al. Chiral separations of β -blocking drug substances using the Pirkle-type α -Burke 1 chiral stationary phase. *J Chromatogr. A*, 1997, 757 (1-2): 65~71
- [76] Timothy J Ward, Alton B Farris III. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review . *J Chromatogr A*, 2001, 906 (1-2): 73~89
- [77] 何丽一. 平面色谱方法及应用. 北京: 化学工业出版社, 2000
- [78] 朱全红, 邓芹英, 曾陇梅. 手性药物的薄层色谱拆分. *药物分析杂志*, 2002, 22(2): 155~158
- [79] 郝爱友, 童林荟, 张复升. β -环糊精为 TLC 流动相添加剂分离对映体. *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. *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 β -环糊精键合固定相的制备及应用. *分析化学*, 2000, 28(3): 349~352
- [82] 黄慕斌, 李高兰, 王 晓. β -环糊精键合相薄层板的制备及其性能初探. *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. β -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. *合成化学*, 2001, 9(6): 499~502
- [84] 余品香, 邓芹英, 王 鹏. β -环糊精色谱手性固定相的合成及性能表征. *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. *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 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 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 Chromatogr A*, 1994, 685(2): 360~364
- [89] Bhushan R, Parshad Vineeta. Resolution of (\pm)-ibuprofen using l-arginine-impregnated thin-layer chromatography. *J Chromatogr A*, 1996, 721(2): 369~372
- [90] Christian R, Anita F. Cationic β -cyclodextrin: a new versatile chiral additive for separation of drug enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1995, 704: 67~74
- [91] Lelièvre Frédéric, Chao Yan Zare, Richard N, et al. Capillary electrochromatography: operating characteristics and enantiomeric separations. *J Chromatogr A*, 1996, 723(1): 145~156
- [92] D Mangelings, C Perrin, D L Massart, et al. Optimisation of the chlorthalidone chiral separation by capillary electrochromatography using an achiral stationary phase and cyclodextrin in the mobile phase. *Anal Chem Acta*, 2004, 509: 11~19
- [93] S Torres-Cartas, R M Villanueva-Camañas, M C García-Alvarez-Coque. Modelling and optimization of the separation of steroids eluted with a micellar mobile phase of sodium dodecyl sulphate containing acetonitrile. *Anal Chim Acta*, 1996, 333: 31~40
- [94] M J Ruiz-Angel, J R Torres-Lapasió, M C García-Alvarez-Coque. Effects of pH and the presence of micelles on the resolution of diuretics by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2004, 1022: 51~65
- [95] S Carda-Broch, J R Torres-Lapasió, J S Esteve-Romero, et al. Use of a three-factor interpretive optimisation strategy in the development of an isocratic chromatographic procedure for the screening of diuretics in urine samples using micellar mobile phases. *J Chromatogr A*, 2000, 893: 321~337
- [96] Herráez-Hernández Rosa, Campíns-Falcó, Pilar. Chromatographic separation of chlorthalidone enantiomers using β -cyclodextrins as chiral additives. *J Chromatogr B: Biomed Sci & Appl*, 2000, 740(2): 169~177

- [97] 唐课文, 周春山. 疏水性L-酒石酸酯立体选择性萃取分离氯噻酮对映体. 分析化学, 2004, 32(1): 63~66
- [98] 彭司勋. 药物化学. 北京: 中国医药科技出版社, 1999, 170
- [99] Eber O, Buchinger W, Lindner W, et al. The effect of D- versus L-propranolol in the treatment of hyperthyroidism. Clin Endocrinol, 1990, 32(3): 363~72
- [100] 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 Chromatogr A, 1994, 685: 360~364
- [101] Bhushan R, Parshad Vineeta. Resolution of (\pm)-ibuprofen using L-arginine-impregnated thin-layer chromatography. J Chromatogr A, 1996, 721: 369~372
- [102] Emery P W, Rothwell N J, Stock M J, et al. Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rats. Biosci Rep, 1984, 4: 83~91
- [103] Engelhardt G. Struktur-Wirkungsbeziehungen in einer Reihe von neuen Amino-Halogen-substituierten Phenyl-aminoäthanolen. Arzneimittel Forsch, 1972, 22: 869~876
- [104] Engelhardt G. Pharmakologisches Wirkungsprofil von NAB 365 (Clenbuterol), einem neuen Broncholytikum mit einer selektiven Wirkung auf die adrenergen β_2 -Rezeptoren. Arzneimittel Forsch, 1976, 26: 1404~1420
- [105] Bertil Waldeck. β -Adrenoceptor agonists and asthma-100 years of development. Europ J Pharmacol, 2002, (445): 1~12
- [106] Armstrong D W, Chang L W, Chang S S C. Mechanism of capillary electrophoresis enantioseparations using a combination of an achiral crown ether plus cyclodextrins. J Chromatogr A, 1998, (793): 115~134
- [107] Toussaint B, Hubert Ph, U R Tjaden, J van der Greef, et al. Enantiomeric separation of clenbuterol by transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis-UV detection: New optimization technique for transient isotachopheresis. J Chromatogr A, 2000, (871): 173~180
- [108] Song Yaru, Wang Defa, Hu Yuping, et al. Direct separation and quantitative determination of clenbuterol enantiomers by high performance liquid chromatography using an amide type chiral stationary phase. J Chromatogr Biomed

Anal, 2003, 31: 311~319

[109] 王树雷, 郝爱友. 以 2-氧-[(R)-羟基丙基]- β -环糊精作 TLC 流动相手性添加剂分离肾上腺素对映体. 分析试验室, 2001, 20(6): 86~87

[110] Willie L Hinze, Daniel Y Pharr, Zheng Sheng Fu, et al. Thin-Layer chromatography with urea-solubilized β -cyclodextrin mobile phase. Anal Chem, 1989, 61: 422~428

[111] Hinze W L, Armstrong D W. Thin-layer chromatographic separation ortho, meta, and para substituted benzoic acids with aqueous solutions of α -cyclodextrin. Anal Lett, 1980, 13: 1093~104.

[112] 黄慕斌, 李洪宽. 环糊精流动相添加剂分离色氨酸对映体的薄层色谱法. 色谱, 1995, 13(2): 120~122

[113] 詹庄平, 郭红云. TLC 手性流动相添加剂法分离氯霉素中间体. 浙江化工, 1997, 28(4): 46~48

[114] W Lindner, Ch Leitner G. Uray. Liquid chromatographic separation of enantiomeric alkanolamines via diastereomeric tartaric acid monoesters. J Chromatogr, 1984, 316: 605~616

[115] E Heldin, K J Linder, C Pettersson, et al. Tartaric acid derivatives as chiral selectors in liquid chromatography. Chromatographia, 1991, 32(9/10): 407~416

致 谢

本文是在黄可龙教授的悉心指导和亲切关怀下完成的。

在本论文完成之际，首先要衷心地感谢敬爱的导师黄可龙教授。三年来，黄老师渊博的知识、严谨的治学态度、忘我的工作作风、乐观的情怀、宽容的胸襟让我受益匪浅。学习上黄老师对我要求严格，并耐心教会我如何开展科研工作，给予我启发式教导；生活上黄老师也给予我无微不至的关怀。这一切都深深地感染和感动着我。导师的言传身教将会激励我在今后的人生道路上不断进步，我亦将铭记在心，终生受益。

本研究工作同时还得到刘素琴副教授等化学化工学院众多老师的帮助和支持，赖德勇高工在实验试剂购买方面也给予了很大的帮助，在此一并表示感谢。同时，感谢焦飞鹏博士、彭霞辉博士、卢凌彬博士、攀钢研究院常志峰高工和李林德高工、工程师潘进和石瑞城等的帮助。01 级硕士生师兄李进飞、师姐杨敏、刘玉革、商菊清等给予了许多帮助，同级硕士生郭小义、刘勇刚、彭波、李朝建、唐丽娜、张静、黄朝晖、路雁雁以及 03 级硕士生们进行了有益的讨论，在此表示感谢。

深深感谢我的妻子周方良，你的鼓励和帮助让我准时完成了学业，感谢你三年来给予我的默默支持。

最后要感谢远在家乡的父母，是您们的支持，也是您们的教诲和督促，我才得以再次进中南大学深造，您们对我的支持和关爱使我终生难忘。

本课题得到了国家自然科学基金资助项目（No.20376085）资助，同时有关研究内容得到了中南大学研究生创新项目（No.040206）资助，在此一并表示感谢。

2005 年 3 月 28 日

攻读学位期间主要的研究成果目录

1. 于金刚, 黄可龙, 等. 羟丙基- β -环糊精固载相薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体. 分析试验室. (拟在 2005 年第 7 期刊出)
2. 于金刚, 黄可龙, 等. 高效液相色谱手性流动相添加剂法拆分氯噻酮对映体. 分析试验室. (拟在 2005 年第 8 期刊出)
3. 于金刚, 黄可龙, 等. 手性选择体涂敷薄层色谱拆分盐酸普萘洛尔. 分析试验室. (拟在 2005 年第 11 期刊出)
4. 于金刚, 黄可龙, 等. β -环糊精固载相薄层层析法拆分盐酸克伦特罗对映体. 色谱. (拟在 2005 年第 3 期刊出)
5. 于金刚, 刘素琴, 等. 酒石酸酯涂敷薄层色谱法拆分克伦特罗. 色谱 (拟在 2005 年第 4 期刊出)
6. 焦飞鹏, 于金刚, 等. 手性配体交换乳状液膜选择性萃取扁桃酸对映体机理研究, 膜科学与技术. (已接收)
7. 焦飞鹏, 于金刚, 等. 手性选择体萃取分离特布他林对映体传质机理, 应用化学. (已接收)
8. 焦飞鹏, 黄可龙, 于金刚, 等. 萘普生分子印迹拆分过程热力学研究. 材料导报. (已接收)
9. 焦飞鹏, 黄可龙, 于金刚, 等. S,S-酒石酸酯立体选择性萃取分离普萘洛尔对映体过程量热研究, 化学通报. (已接收)
10. 焦飞鹏, 黄可龙, 于金刚, 等. 中空纤维膜组合手性选择剂萃取分离沙丁胺醇模型简论, 中南大学学报 (英文版). (已接收)
11. 彭霞辉, 黄可龙, 焦飞鹏, 赵学辉, 于金刚. 聚苯胺的合成及性能. 中南大学学报 (自然科学版), 2004, 35(6): 974~977
12. 于金刚, 黄可龙, 等. β -环糊精流动相添加剂 HPLC 拆分扁桃酸. 大环化学和超分子化学研究进展. 西安: 西北大学出版社, 2004: 43~45
13. 焦飞鹏, 黄可龙, 彭霞辉, 于金刚, 等. β -环糊精萃取拆分氯噻酮对映体研究. 大环化学和超分子化学研究进展. 西安: 西北大学出版社, 2004: 40~42