

PyNPase的表达稳定。在基因表达方面,说明质粒稳定存在,PyNPase编码基因未丢失。

1.2.6 重组 PyNPase活性的鉴定 将工程菌诱导培养后,离心收集菌体,加入缓冲液重悬,冰上超声破碎细胞,离心收集上清液,得到粗酶液。按文献^[4]方法,1 ml反应混合液中含有 30 mmol L⁻¹磷酸钾盐(pH 7.8)、5 mmol L⁻¹β-巯基乙醇、1 mmol L⁻¹EDTA、30 mmol L⁻¹5-Fu 10 mmol L⁻¹尿苷及 50 μl酶液,在 50℃下保温 30 min后,加入 0.1 ml 1 mol L⁻¹HCl终止反应。转移酶活性通过分析尿苷转变成 5-Furd 的量来测定。将反应液点于 GF₂₅₄硅胶板上,用二氯甲烷-四氢呋喃(4:1)溶剂系统展开,在 254 nm 的紫外光下检测尿嘧啶、5-Fu 5-Furd及尿苷的斑点。在磷酸盐存在下,工程菌粗酶液在第 50代仍具有转化活性,能使 5-Fu 转化为 5-Furd。图 4表明,工程菌转化活性稳定。

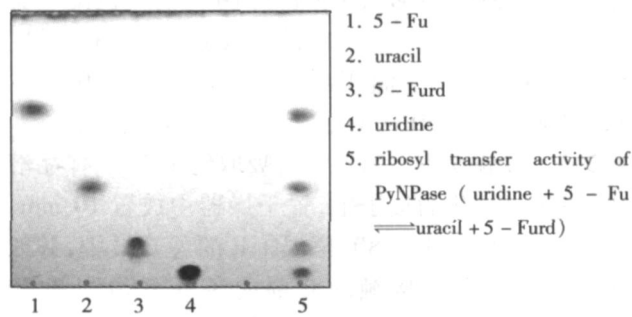


图 4 PyNPase的转化反应分析
Fig 4 PyNPase transferred reaction

2 讨论

基因工程菌产业化应用的最大障碍在于保存及

培养过程中表现出的传代不稳定性,体现在重组 DNA 分子某一区域发生缺失、重排或修饰,导致其表现功能的丧失和整个重组分子从受体细胞中丢失。解决其遗传不稳定性有效方法之一是利用载体质粒上的遗传标记,如氨苄青霉素抗性基因,培养过程中选择性地抑制丢失重组质粒的细胞生长,提高稳定性。重组质粒的稳定性高,目的基因得到扩增,目的基因表达产物含量也高,反之,则失去了意义。质粒不稳定性大致分为分离和结构的不稳定性。前者是细胞在分裂时引起的不稳定性,是质粒丢失的主要原因;后者是质粒本身结构发生缺失、插入、重排等引起的不稳定性,对质粒主要遗传标记丢失影响较小。文中实验结果表明,PyNPase工程菌在传代过程中的质粒未发生明显丢失,也未发现质粒结构不稳定。而且传至 50代次后仍保留重组质粒,并保持原代菌种的 Amp 抗性、生物学活性及其他生理特征,表明此工程菌适合于工业化生产。

参考文献:

- [1] 俞国策,焦瑞身,丰翼程,等. 大肠杆菌 *E. coli* HB101 (pBR322)高密度培养过程质粒的稳定性[J]. 生物工程学报, 2001, 1(2): 185-188
- [2] Joseph S. David W. Russell. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002. 26-40.
- [3] 宋宁,陈静娴,吴伟,等. rhB 工程菌在不同浓度安苄青霉素选择压力下平板和摇瓶 100代稳定性考察[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2002, 39: 156-159.
- [4] 阮期平,周长林,窦洁,等. 5-氟尿苷的微生物转化[J]. 微生物学报, 2001, 42: 117-120

收稿日期: 2006- 11

D- 10- 樟脑磺酸铵- 薄层色谱法拆分普萘洛尔对映体

董海英, 梁冰*, 程德军

(四川大学化学工程学院, 四川 成都 610065)

摘要: 目的 研究薄层色谱拆分普萘洛尔对映体的新方法。方法 采用 D- 10- 樟脑磺酸铵手性离子对试剂- 薄层色谱法,在硅胶 GF₂₅₄板上拆分普萘洛尔对映体;考察展开体系、温度、预饱和时间、pH、手性离子对试剂浓度以及湿度对拆分效果的影响。结果 最佳分离条件为 D- 10- 樟脑磺酸铵溶液(0.85 mmol L⁻¹, pH 8.0)- 二氯甲烷- 甲醇(0.3: 1.95: 0.75)在 8℃下预饱和 30 min,样品溶液的 pH 7.0,以 1% 香草醛浓硫酸溶液显色。结论 所用方法可拆分普萘洛尔。

关键词: 普萘洛尔对映体; 拆分; D- 10- 樟脑磺酸铵; 手性离子对试剂; 薄层色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006- 0103(2007)03- 0297- 03

作者简介: 董海英(1981-),女,正攻读分析化学专业的硕士学位。

* 通讯作者 (Correspondent author), E-mail: lingbing@sina.com.

Enantioseparation of racemic Propranolol using D-10- camphor ammonium sulphate by TLC

DONG Hai-ying LANG Bing*, CHENG De-jun

(Department of Pharmaceutical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract **OBJECTIVE** To establish a new method for enantioseparation of racemic Propranolol hydrochloride by TLC. **METHODS** The separation was carried out on silica gel GF₂₅₄ plate, using D-10- camphor ammonium sulphate as chiral ion-pair agent in the mobile phase. The effects of the mobile phase, temperature, presaturation time, pH, the concentration of ion-pair agent and humidity on separation were investigated. **RESULTS** The optimal separation condition was D-10- camphor ammonium sulphate (0.85 mmol L⁻¹, pH 8.0) - dichloromethane - methanol (0.3: 1.95: 0.75), presaturated for 30 min at 8°C in advance; the pH of sample was 7.0, taking 1% vanillin/sulfuric acid as chromogenic agent. **CONCLUSION** Propranolol enantiomer is successfully separated in this way.

Key words Racemic Propranolol; Enantioseparation; D-10- camphor ammonium sulphate; Chiral ion-pair agent; TLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2007)03-0297-03

普萘洛尔是临床上广泛应用的 β -受体阻滞剂, 一直以外消旋体的形式入药。动物实验表明, R (+)普萘洛尔对受体的阻滞程度比 S (-)普萘洛尔约小 100 倍, 且有避孕作用^[1]。将外消旋普萘洛尔拆分为半性纯化合物, 并作为两种不同药物入药, 可提高普萘洛尔的药品质量。目前, 拆分普萘洛尔对映体的方法主要有 HPLC 和 TLC 法^[2~4]。文献^[5~7]应用了 D-10-樟脑磺酸铵拆分了多种对映体。但未见将其应用于薄层色谱分离普萘洛尔对映体的报道。为此, 我们在考察了展开剂体系、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基础上, 提出了 D-10-樟脑磺酸铵-薄层色谱法拆分普萘洛尔对映体的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和药品

DZF-6050 真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); 数码相机 (日本奥林巴斯); 平面色谱数字图像处理软件 (自制)。硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); D-10-樟脑磺酸 (上海华东师范大学化工厂) 为色谱纯; 羧甲基纤维素钠、浓氨水、甲醇、二氯甲烷、95%乙醇、香草醛、浓硫酸等均为国产分析纯。盐酸普萘洛尔片 (湖北华中药业有限公司, 每片 10 mg)。

1.2 方法

1.2.1 溶液的制备 参考文献^[8]方法, 取 10 片盐酸普萘洛尔片 (0.711 g), 置研钵中碾碎。用 20 mL 95%乙醇溶解, 配成 5 mg mL⁻¹ 的溶液, 超声溶解 1 h 抽滤, 取滤液作为样品溶液。准确称取 98.5 mg D-10-樟脑磺酸, 溶于 25 mL 甲醇中, 滴加浓氨水调 pH, 得到 17 mmol L⁻¹ 的 D-10-樟脑磺酸铵溶液, 再用甲醇稀释为 0.85 mmol L⁻¹。吸取 0.3 mL 至展开缸中, 加入 1.95 mL 的二氯甲烷及 0.75 mL 的

甲醇, 混合, 即得展开剂。取 1.0 g 香草醛溶于 100 mL 浓硫酸中, 即得显色剂。

1.2.2 薄层板的制备 按 12 mL 羧甲基纤维素钠水溶液 (5 g L⁻¹) 加入 4 g 硅胶 GF₂₅₄ 的比例配制乳状液后, 在 2.5 cm × 10 cm 的玻璃板上均匀涂布, 厚度 500~600 μ m。室温下晾干, 置烘箱中, 105°C ~ 110°C 活化 30~60 min, 取出, 置干燥器中备用。

1.2.3 实验方法 用点样器吸取约 1.5 μ L 样品溶液, 点于已活化的板子上, 置干燥器中放置 10 min, 移取展开剂 3 mL 置 8°C 恒温 1 h 的展开缸中, 并放入点样板。在不接触展开剂的条件下预饱和 30 min, 展开, 展距 8 cm, 取出, 晾干, 置紫外灯 (254 nm) 下观察。将板子浸入香草醛硫酸溶液中显色, 照相, 用 Photoshop 和平面色谱数字图像软件处理。

1.3 结果

1.3.1 显色方法的选择 盐酸普萘洛尔对映体拆分后, 比较了紫外灯 (254 nm)、碘熏和硫酸香草醛^[4] 3 种方法显色的结果, 三者均可以显示两个斑点, 大小、位置一致。但在紫外灯下显示的荧光猝灭斑点较模糊, 照相效果不清晰; 碘熏显色的效果不如硫酸香草醛。因此, 选用硫酸香草醛显色。所现的两个紫红色斑点显示普萘洛尔对映体获得拆分。

1.3.2 展开体系的选择 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。结果表明, 当二氯甲烷与甲醇体积比为 2.6 (1.95: 0.75) 时, 分离效果最好。

1.3.3 温度及其预饱和时间对拆分的影响 比较了普萘洛尔在室温 (28°C)、8°C、-17°C 拆分时温度的影响。结果表明, 在室温下对映体未得到分离; 而

8℃时斑点比较清晰; -17℃时,拖尾较严重,且斑点大小不一致,故选择 8℃作为展开的最佳温度。进一步比较普萘洛尔在冰箱(8℃)下预饱和 15、30、45、60、90、120 min 的影响。结果表明普萘洛尔的放置时间越短,斑点分得越开,但拖尾较严重;放置时间越长,斑点靠得越近。故选择预饱和时间为 30 min。

1.3.4 pH 对拆分的影响 由于手性离子对添加剂对分离效果的影响比较大,因此,考察了展开剂中手性离子对试剂 pH 分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 时,对普萘洛尔拆分效果的影响。结果表明展开剂中手性离子对试剂 pH 在 6.5~10.0 时,普萘洛尔均能得到拆分。当比较盐酸普萘洛尔样品溶液 pH 分别为 6.5、7.0、8.0 对拆分的影响时, pH 7.0 两斑点大小基本一致,故选其作为样品溶液的 pH 值。

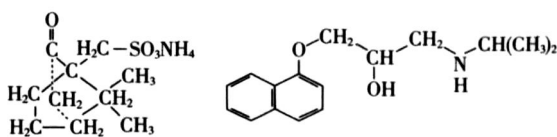
1.3.5 手性离子对添加剂浓度对拆分的影响 由于手性离子对添加剂可与对映体生成非对映异构体,其浓度变化将影响分离效果。当浓度为 0.85 mmol L⁻¹ 时,两斑点大小一致,均为紫红色,而浓度小于 0.85 mmol L⁻¹ 时,两斑点颜色均出现墨绿色;浓度大于 0.85 mmol L⁻¹ 时,两斑点不匀。故选择 0.85 mmol L⁻¹。

1.3.6 薄板吸潮对拆分的影响 薄板吸潮的程度可影响薄板的活性。因此,将点样并在干燥器中干燥后的板子分别置空气中暴露 10 s、5、10、30 min 后,置展开缸中展开。结果在空气中暴露 10 s 的拆分效果最好,两斑点大小基本一致,均为紫红色。因此,薄板在空气中暴露的时间越短越好。

1.3.7 色谱的重复性 由“1.3.1”~“1.3.6”项可知,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(0.85 mmol L⁻¹, pH 8.0)-二氯甲烷-甲醇(0.3:1.95:0.75),在冰箱(8℃)下预饱和 30 min,样品 pH 7.0。按此条件,同时在一个展开缸中背对背展开两块薄板(5 cm × 10 cm),每块薄板点三个点。经平面色谱数字图象软件处理,薄板 1 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 $RSD = 6.7\%$ 。

1.3.8 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的结构见图 1。手性识别的产生是根据 D-10-樟脑磺酸铵分子与普萘洛尔对映体分子在空间上的结合,生成稳定的非对映异构离子对,而使其在有机流动相和固定相中的分配差异变大。



D-10-樟脑磺酸铵 普萘洛尔

图 1 D-10樟脑磺酸铵和普萘洛尔的结构式

Fig 1 The structures of D-10-camphor ammonium sulphate and Propranolol

2 讨论

普萘洛尔对映体在较低温度(8℃)下,以 D-10-樟脑磺酸铵为手性离子对试剂,在二氯甲烷-甲醇的体系中可以得到分离。方法简便、易行,为建立其对映体的分析方法打下了基础。

参考文献:

- [1] Alex D. Chirality-A cause for panic[J]. Chemistry in Britain 1988, 24(9): 847-848.
- [2] 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.
- [3] 于金刚, 黄可龙, 刘素琴, 等. 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.
- [4] 徐莉, 刘岚, 何建峰, 等. 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.
- [5] 徐秀珠, 邹莉, 胡明华, 等. 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.
- [6] Huang M B, Li G L, Yang G S. Enantiomeric separation of aromatic amino alcohols by chiral ion-pair chromatography on a silica gel plate[J]. J Liq Chromatogr, 1997, 20: 1507.
- [7] Duncan JD, Anstrung DW, Stalcup AM. Normal phase TLC separation of enantiomers using chiral ion interaction agents[J]. J Liq Chromatogr, 1990, 13: 109.
- [8] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 579.

收稿日期: 2006-11

热烈祝贺《华西药学杂志》进入美国《化学文摘》(CA)
2005年引文频次最高的 1000种期刊表