

固-液制备色谱分离氢化可的松立体异构体

邓劲光, 胡熙恩, 朱永曙

(清华大学 核能技术设计研究院, 北京 100084)

文 摘: 研究了氢化可的松立体异构体的新型制备色谱分离技术。介绍了氢化可的松立体异构体分离问题的由来, 研究了固-液制备色谱中作为固定相的大孔吸附硅胶对氢化可的松立体异构体的静态和动态吸附特性, 以异丙醇为流动相, 对氢化可的松立体异构体进行了制备色谱分离, 并在实验中采用了色谱循环技术。实验表明, 大孔吸附硅胶对氢化可的松立体异构体的动态饱和吸附量为 4.8 mg/mL ; 同时, 用异丙醇为流动相的固液制备色谱可以分离氢化可的松立体异构体, 在采用循环法后能有效地提高分离度。

关键词: 大孔吸附硅胶; 氢化可的松; 制备色谱; 循环法

中图分类号: TQ 028

文献标识码: A

文章编号: 1000-0054(2000)11-0082-03

在医药工业生产中, 氢化可的松多采用半生物合成法^[1]。由于发酵菌种的反应选择性不高, 在氧化引入羟基时, 形成氢化可的松立体异构体, 二者产额比例约为 3:5^[1]。

固-液制备色谱是从传统的固-液分析色谱发展而来, 随着固定相生产工艺和技术的提高, 它的分离性能也得到了较大的改善。在氢化可的松立体异构体的分离过程中, 采用大孔吸附硅胶作为固定相进行分离取得了满意的效果。

在制备色谱中为了提高分离效果, 循环法等技术已被广泛使用。在本实验中, 应用循环技术以后, 氢化可的松立体异构体的分离性能得到了较大的改善。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

β 氢化可的松和 α 氢化可的松样品, 质量符合药典要求, 为山东新华制药股份有限公司提供; 大

孔微球吸附硅胶, 为山东青岛化工集团公司生产, 其余为市售。大孔微球吸附硅胶在使用前按下述的方法进行处理^[2]。

将不合格的硅胶过筛, 取 80~120 目的部分, 用 2 倍的 $2\sim 6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸浸泡过夜, 不时摇动, 使悬液由灰色变白, 再滤去含有 Fe^{2+} 等杂质的黄色酸液。如此反复洗涤, 直到滤液几乎变为无色为止, 再加入蒸馏水洗去硅胶表面的酸, 直到 pH 值为 6 左右, 接着用 2~3 倍于固体物质的 95% 乙醇洗涤一次, 120°C 烘干, 供实验使用。

1.2 实验装置与流程

本实验所用的制备色谱柱内径为 10 mm, 吸附床层高 400 mm。实验装置及流程如图 1 所示。

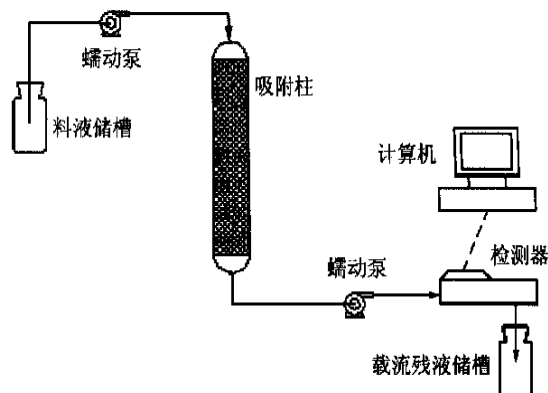


图 1 固-液制备色谱流程图

在图 2 中, 料液从储槽通过蠕动泵进入制备色谱分离柱的上端(进口), 经制备色谱柱分离后从下端(出口)流出, 再经蠕动泵送往检测器进行检测, 计算机在线数据采集并绘出色谱图。

1.3 分析方法

氢化可的松的紫外吸收峰波长为 241 nm , 用紫外分光光度计可以检测出氢化可的松溶液的消光度, 并依氢化可的松的紫外吸收标准曲线换算出其浓度。氢化可的松的紫外吸收标准曲线如图 2 所示。

收稿日期: 1999-11-17

作者简介: 邓劲光(1970-), 男(汉), 湖北, 博士研究生。

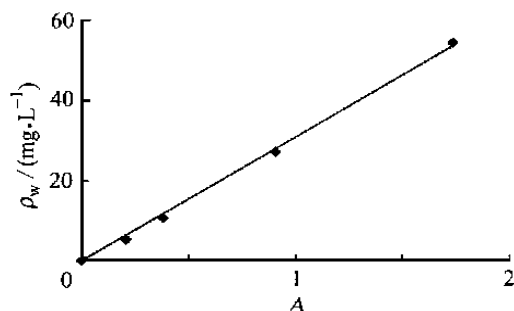


图2 氢化可的松紫外吸收标准曲线

由图2可知, 氢化可的松的浓度 ρ_w 在0~60 mg/L内, 与消光度 A 呈线性关系: $\rho_w / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 30.885A$; 相同的实验表明, 在同样的浓度范围内, 表氢化可的松的浓度与消光度也有基本相同的线性关系, 因此只要测出其消光度, 就可以依线性关系换算出它们的浓度。

2 实验结果与讨论

2.1 大孔吸附硅胶的吸附特性

2.1.1 静态吸附量

准确量取1 mL经处理后的干硅胶于锥形瓶中, 加入50 mL浓度为563.7 mg/L的氢化可的松水溶液, 于20℃恒温振荡至吸附平衡, 用紫外分光光度计分别测定吸附前后的溶液浓度, 并按下式计算硅胶的静态吸附量:

$$Q = \frac{(\rho_0 - \rho_e) \times V}{V_0} \quad (1)$$

式中: Q 为吸附量, ρ_0 为起始浓度, ρ_e 为平衡浓度, V 为溶液体积, V_0 为大孔吸附硅胶体积。

实验测得平衡浓度为450.7 mg/L, 代入公式计算得: 大孔吸附硅胶的静态吸附量, 以硅胶体积计为5.65 mg/mL。

2.1.2 动态吸附曲线

以高浓度的氢化可的松水溶液连续均匀地流过制备色谱柱, 在出口端流出的溶液通过蠕动泵输送到紫外分光光度计的石英流动池内, 可以连续检测到氢化可的松浓度随时间变化的曲线如图3所示。

实验的色谱条件为: 流动相流速为0.8 mL/min; 床层体积50 mL; 料液浓度1 g/L。

由图4所示的穿透曲线计算得出, 大孔吸附硅胶的动态饱和吸附量约4.8 mg/mL。

2.1.3 吸附等温线

准确量取1 mL硅胶于锥形瓶中, 加入50 mL

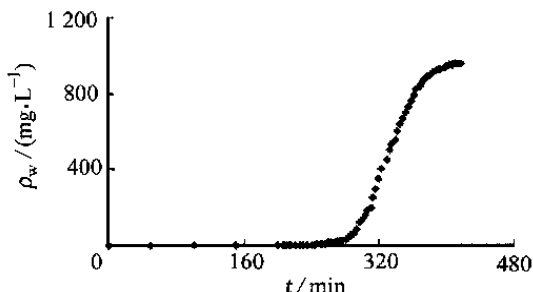


图3 氢化可的松立体异构体在硅胶上的穿透曲线

浓度为563.7 mg/L的标准氢化可的松水溶液, 于20℃恒温搅拌, 在不同吸附时间分别取样, 用紫外分光光度计测定体系浓度, 直至吸附平衡。所绘出的吸附量随时间的变化关系曲线如图4所示。

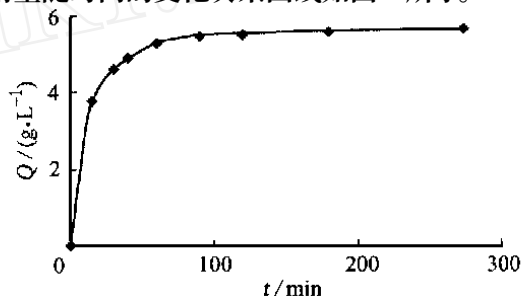


图4 大孔吸附硅胶吸附氢化可的松的动力学曲线

图4的曲线是Langmuir型吸附等温线, 等温线方程为

$$Q = Q_{\infty} \frac{K\rho}{1 + K\rho} \quad (2)$$

式中: Q 为吸附量, 单位为mg/mL, ρ 为浓度, 单位为mg/L, 饱和吸附量 $Q_{\infty} = 5.65 \text{ mg/mL}$, Langmuir吸附平衡常数 $K = 1.37 \times 10^{-3} \text{ L/mg}$ 。

根据Langmuir^[31]提出的吸附速度方程, 由图4可以计算出硅胶的平衡速率常数 k_a :

$$\ln \frac{Q_e}{Q_e - Q_t} = k_a t \quad \text{或} \quad -\ln(1 - F) = k_a t, \quad (3)$$

式中: Q_t 为 t 时刻硅胶的吸附量, Q_e 为平衡时硅胶的吸附量, $F = Q_t/Q_e$, k_a 为平衡速率常数。以 $-\ln(1 - F)$ 对时间 t 作图得一直线, 其斜率就是平衡速率常数 k_a , 经计算得大孔吸附硅胶的平衡速率常数 $k_a = 8.46 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 。

2.2 氢化可的松的制备色谱分离

在以大孔吸附硅胶为固定相的基础上, 流动相选择了异丙醇, 对氢化可的松立体异构体进行了制备色谱分离。实验条件如下: 料液浓度 ρ_t 为1000 mg/L, 其中, 氢化可的松两种异构体的比例约为1:1; 流动相流速 v 为1 mL/min。检测器检测

并绘出的色谱图如图 5 所示。

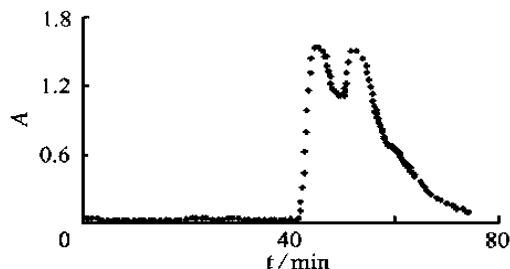


图 5 氢化可的松立体异构体制备色谱图

图 5 中, 分子极性稍弱的 β 体先于极性稍强的 α 体流出色谱柱。由二者的保留时间和半峰宽计算出分离度 R_s 为 0.56, 尚不能满足分离的要求, 因而需要研究改进措施。

2.3 用循环法提高色谱的分离度 R_s

在以大孔吸附硅胶为固定相时, 用异丙醇作流动相一次通过制备色谱柱分离氢化可的松立体异构体还不能完全达到分离要求, 在其它色谱分离条件不改变的前提下, 将图 1 中的检测器出料口与进料口处的蠕动泵直接相连, 采用循环法, 是提高制备色谱分离度的有效办法, 经过一次循环以后所得结果如图 6 所示。

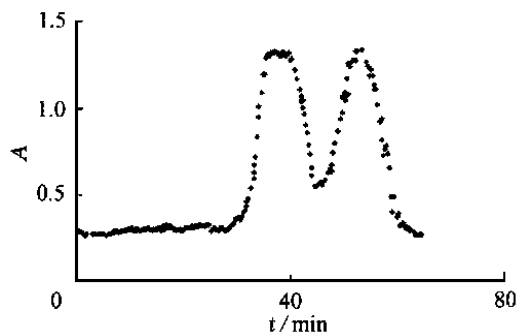


图 6 氢化可的松异构体的制备色谱循环分离

由图 6 可知, 氢化可的松异构体的分离度 R_s 提高到了 0.88, 基本能够满足分离要求。同时, 假如分离度还不够的话, 可以继续循环, 一直到满足要求为止。

3 结 束 语

用制备色谱分离氢化可的松立体异构体是手性化合物分离的新兴的手段, 有广阔的应用前景。实验中用大孔吸附硅胶作固定相, 用异丙醇作流动相, 采用循环法提高制备色谱的分离度, 达到了预期的效果, 为制备色谱进一步的放大研究打下了基础。

[参考文献] References

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会 中华人民共和国药典及药典注释 [M] 北京: 化学工业出版社, 1990
Pharmacopoeia Council of Ministry of Health P R China General Notices of P R China Pharmacopoeia [M] Beijing: Chemical Engineering Press, 1990 (in Chinese)
- [2] 林卓坤 色谱法(一) [M] 北京: 科学出版社, 1982
Lin Zhuokun Chromatography Method (I) [M] Beijing: Science Press, 1982 (in Chinese)
- [3] 陈天红, 张 扬, 史作清, 等 PYR 树脂对甜菊糖的吸附与洗脱性能研究 [J] 离子交换与吸附, 1998, 14(6): 521-525
Chen Tianhong, Zhang Yang, Shi Zuoqing, et al Study on the adsorption and desorption behavior of PYR resin for stevia glycosides [J] Ion Exchange and Adsorption, 1998, 14(6): 521-525 (in Chinese)

Separation of hydrocortisone isomers with liquid-solid preparative chromatography

DENG Jinguang, HU Xien, ZHU Yongjun
(Institute of Nuclear Energy Technology,
Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The static and dynamic adsorption of hydrocortisone isomers on macroporous adsorptive silicagel (MAS) was studied. The hydrocortisone isomers were separated using preparative chromatography with MAS as the solid phase and isopropanol as the mobile phase with recycling. The results showed that the static and dynamic saturation capacities of hydrocortisone isomers were about 5.65 and 4.8 g/L MAS and that the preparative chromatography could separate the isomers. Recycling effectively improved the separation factor.

Key words: macroporous adsorptive silicagel; hydrocortisone; preparative chromatography; recycling