

β -环糊精固载硅胶薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体

于金刚, 黄可龙, 焦飞鹏, 彭霞辉

(中南大学化学化工学院功能材料化学研究所, 湖南 长沙 410083)

摘要 :以羧甲基纤维素钠为交联剂,将 β -环糊精固载在硅胶 GF254 表面上,并用其制备薄层色谱板。使用该薄层板拆分了盐酸克伦特罗对映异构体。考察了薄层拆分中展开剂的影响,发现展开剂中醇的种类和比例对拆分效果有较大的影响。分别考察了 10 种醇与乙腈混合溶剂作展开剂对拆分的影响,结果显示,只有正丁醇-乙腈、仲丁醇-乙腈、叔丁醇-乙腈混合溶剂作展开剂可拆分盐酸克伦特罗对映体。薄层色谱法拆分盐酸克伦特罗对映体的条件为:以 1.00 g β -环糊精固载在 15.00 g 硅胶 GF254 表面上,并用其制备薄层板,以乙腈-仲丁醇(体积比为 20:80)混合溶剂作展开剂,于室温下展开。在此条件下,盐酸克伦特罗对映体单体在薄层色谱板上的比移值 R_f 分别为 0.34 和 0.72,分离度 R_s 为 4.09,实现了基线分离,而且样品在薄层色谱板上的斑点大小一致,拆分效果最好。

关键词 :薄层色谱 β -环糊精固载硅胶;拆分;盐酸克伦特罗对映体

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)04-0431-03

Resolution of Clenbuterol Hydrochloride Enantiomers by Thin-Layer Chromatography on Silica Gel Impregnated with β -Cyclodextrin

YU Jingang, HUANG Kelong, JIAO Feipeng, PENG Xiahui

(Institute of Functional Material & Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract :The resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers was achieved by thin-layer chromatography on silica gel GF254 plates impregnated with β -cyclodextrin. The effect of stereoselective auxiliary (acetonitrile and alcohol) was investigated. Resolution of clenbuterol hydrochloride enantiomers could be attained by using alcohols of butanol, 2-butanol or *tert*-butanol together with acetonitrile as developing solvent. The optimal conditions of resolution were determined as follows: a plate prepared with 15.00 g silica gel GF254 impregnated with 1.00 g β -cyclodextrin, acetonitrile-2-butanol (20:80, v/v) as developing solvent and developed at room temperature. Under these conditions, R_f of the two isomers of clenbuterol hydrochloride enantiomers were 0.34 and 0.72 respectively. The resolution was 4.09 with baseline separation and the spots in chromatogram were almost of the same size.

Key words :thin-layer chromatography; silica gel impregnated with β -cyclodextrin; resolution; clenbuterol hydrochloride enantiomers

通常药物对映体的各个单体具有不同的生物活性、药理活性及化学行为,但目前在市场上销售的药物却多为外消旋体混合物,因此建立对映体的拆分方法显得特别重要。目前药物对映体拆分的主要方法有结晶分离、动力学拆分、膜分离、萃取拆分、色谱拆分等^[1]。薄层色谱(TLC)拆分法^[2,3]是最简便的色谱方法之一,具有操作方便、设备简单、分离效率高、分析速度快、色谱参数易调节等优点,在药物对

映体的分离中有实际意义,近年来受到越来越多的科研工作者的重视。

环糊精(cyclodextrin, CD)是由 6 至 8 个或多个 D-吡喃葡萄糖单元通过 1,4 位糖苷键连接而成的“去顶锥筒”状分子。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,因而广泛用于手性化合物的拆分中^[4]。

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,具有一个手性中心,有(-)-*R* 和(+)-*S* 两种构型(见图 1)。目前报道拆分盐酸克伦特罗对映体的方法有毛细管电泳 β -环糊精流动相添加剂拆分法^[5,6]、氨基型手性柱高效液相色谱拆分法^[7]。以上方法较适用于分析盐酸克伦特罗对映体,但不经济,且不易实现制备型放大拆分。

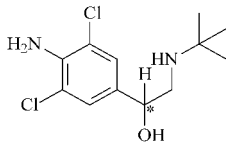


图 1 克伦特罗化合物的化学构型
Fig.1 The chemical structure of clenbuterol

本文以羧甲基纤维素钠为交联剂,将 β -环糊精固载在硅胶 GF254 表面,并用其制备薄层色谱板。采用普通展开剂,在该薄层色谱板上拆分了盐酸克伦特罗对映体,方法简单可行,易于放大。同时考察了拆分中展开剂种类和配比对拆分效果的影响,得到了最佳的拆分条件。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ZT- I 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);玻璃点样毛细管(硬质中性玻璃,内径 0.5 mm,管长 100 mm,华西医科大学仪器修造厂);D1810C 型自动双重纯水蒸馏器(上海申生生物技术有限公司);P-1 型薄层色谱展开缸(100 mm $\times$ 100 mm,上海信谊仪器厂)。

β -环糊精(北京奥博星生物技术责任有限公司,含量 $\geq 98\%$,使用前在二次重蒸水中重结晶两次,真空(10 mm Hg)条件下干燥 4 h);盐酸克伦特罗(纯度 $\geq 98\%$,上海大众药业有限公司);薄层色谱用硅胶 GF254(化学纯,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);二次重蒸馏水(自制);其他试剂均为分析纯。

1.2 盐酸克伦特罗溶液的配制

精密称取 0.05 g 盐酸克伦特罗于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 80 mL 0.1 mol/L HCl 溶液,超声振荡使其完全溶解,加入 0.1 mol/L HCl 溶液定容,制得 0.50 g/L 盐酸克伦特罗的盐酸溶液,放置冰箱中冷藏备用。

1.3 β -环糊精固载硅胶薄层色谱板的制备

分别精密称取 0.25,0.50,0.75,1.00 g β -环糊精,加入到 40 mL 0.5% 的羧甲基纤维素钠水溶液

中,搅拌至 β -环糊精完全溶解后,加入 15.00 g 硅胶 GF254,搅拌约 0.5 h,赶走气泡并使硅胶在羧甲基纤维素钠水溶液中搅拌均匀。采用倾注法铺制 7.5 cm $\times$ 2.5 cm 硅胶薄层板,室温下于空气中放置过夜,晾干后转移入干燥箱中于 105 $^{\circ}$ C 下干燥 1 h,置于干燥器中备用。

1.4 盐酸克伦特罗对映体的拆分

用玻璃点样毛细管取 0.50 g/L 的盐酸克伦特罗盐酸溶液,圆点点样于薄层色谱板一端(距薄层板下端 1 cm 处),分别点两点以供参考,展开剂为乙腈-仲丁醇(体积比为 50:50)混合溶液,薄层板置于展开缸中于室温下展开。展开后于红外干燥器下烘干,在三用紫外分析仪下观察薄层板,在 365 nm 下样品在薄层板上的展开斑点呈红色,用铅笔标注,测量并计算比移值 R_f 。分离度 R_s 由以下公式计算得到:

$$R_s = \frac{d}{(W_1 + W_2)/2}$$

式中 d 为相邻两斑点中心之间的距离, W_1 和 W_2 分别为相邻两斑点的宽度。

2 结果与讨论

2.1 醇的种类对拆分效果的影响

选择 0.50 g β -环糊精固载硅胶制备的 TLC 板,采用乙腈-醇(体积比为 50:50)混合溶剂作展开剂,分离结果如表 1 所示。从表 1 可知,当展开剂中的醇为正丁醇、仲丁醇、叔丁醇时,可有效拆分盐酸克伦特罗对映体。而用其他醇时则无法拆分盐酸克伦特罗对映体。实验同时发现,以乙腈-仲丁醇为展开剂时,分离度 R_s 最大,且样品分离后斑点大小较一致,故本实验采用乙腈-仲丁醇为展开剂。

表 1 展开剂中醇的种类对拆分效果的影响
Table 1 The effect of the kind of alcohols in developing solvent on the resolution

Kind of alcohol	R_{f1}	R_{f2}	R_s	Developing time/min
Methanol	0.21	0.21	0	7
Ethanol	0.34	0.34	0	12
iso-Propanol	0.30	0.30	0	10
<i>n</i> -Butanol	0.28	0.79	3.75	13
2-Butanol	0.23	0.80	6.09	10
<i>tert</i> -Butanol	0.20	0.76	2.54	12
<i>n</i> -Pentanol	0.60	0.60	0	13
iso-Pentanol	0.56	0.56	0	12
<i>n</i> -Octanol	0.54	0.54	0	11
Cyclohexanol	0.78	0.78	0	17

Developing solvent : acetonitrile-alcohol (50:50 , v/v).

2.2 仲丁醇的比例对拆分效果的影响

选择 0.50 g β -环糊精固载硅胶制备的 TLC 板,以不同体积比的乙腈-仲丁醇进行薄层色谱展开分

析 结果如表 2 所示。实验结果表明 ,展开剂中乙腈体积分数小于 10% 或大于 80% 时 ,不能实现拆分。当展开剂中乙腈体积分数为 20% ~70% 时 ,分离度 R_s 先增大后减小 ,且都大于 1.5 ,均可实现基线分离。考察拆分后样品斑点的形状 ,乙腈-仲丁醇的体积比为 20: 80 时展开斑点大小一致 ,拆分效果最好。

表 2 展开剂中仲丁醇的体积分数对拆分效果的影响
Table 2 The effect of volume percentage of 2-butanol in developing solvent on the resolution

φ (2-butanol)/%	R_{f1}	R_{f2}	R_s	Developing time/min
20	0. 71	0. 71	0	4
30	0. 24	0. 79	2. 71	6
40	0. 28	0. 89	3. 89	8
50	0. 23	0. 80	6. 09	10
60	0. 30	0. 86	4. 07	15
70	0. 34	0. 70	3. 62	22
80	0. 33	0. 70	3. 31	26
90	0. 75	-	0	32
100	0. 74	-	0	38

Developing solvent : acetonitrile-2-butanol.

实验中发现 ,随着展开剂中仲丁醇比例的增大 ,展开时间越来越长 ,可能是仲丁醇的羟基与硅胶上固载的 β -环糊精 2 ,3 ,6 位上的羟基形成动态的分子间氢键 ,使得展开剂在硅胶板上的移动速度减慢 ,因而展开时间增长。

2.3 β -环糊精用量对拆分的影响

考察了以不同量的 β -环糊精固载硅胶制备的薄层色谱板的拆分效果 ,以乙腈-仲丁醇(体积比为 20: 80)混合溶剂展开 ,当 β -环糊精用量分别为 0. 25 ,0. 50 ,0. 75 ,1. 00 g 时 ,分离度分别为 3. 07 ,3. 31 ,3. 57 ,4. 09 ,可见分离度 R_s 随环糊精用量的增大而递增。当 β -环糊精用量为 1. 00 g 时 ,分离度最大 ,且样品分离后斑点大小一致。所以本实验选择以 1. 00 g β -环糊精固载的硅胶 GF254 制备的薄层色谱板。

2.4 讨论

固载在硅胶板上的 β -环糊精可很好地吸附在固体硅胶表面上 ,且因其具有右旋的立体构型 ,可使固定相表面手性化 ,形成动态手性固定相。手性选择体与手性药物对映体分子的结构决定了二者的作用力类型和强度 , β -环糊精的 2 ,3 ,6 位的羟基可与盐酸克伦特罗对映体上的—OH、—NH 形成分子间氢键 ,而盐酸克伦特罗对映体的芳香苯环可进入 β -环糊精的疏水空腔 ,形成第三点作用力 ,满足“ 三点作用力 ”^[8]原则。而盐酸克伦特罗对映体两单体的空间立体构型不同 ,作用力大小则不一样 ,因而在薄层板上的移动速度不同 ,从而实现了分离。

β -环糊精固载硅胶薄层色谱板的制备方法简单 ,拆分盐酸克伦特罗对映体的效果明显 ,且不需要苛刻的色谱条件 ,有可能成为盐酸克伦特罗对映体制备性拆分或检测的一种可行方法。有关将 β -环糊精固载硅胶用于放大制备型柱色谱分离的实验有待进一步研究。

参考文献 :

[1] Rekoske J E. AIChE J ,2001 ,47(1) :2
[2] Nagata Y ,Iida T ,Sakai M. J Mol Catal B :Enzym ,2001 ,12 (1-6) :105
[3] Suedee R ,Songkram C ,Petmoreekul A ,Sangkunakup S ,Sankasa S ,Kongyarit N. J Pharm Biomed Anal ,1999 ,19(3-4) :519
[4] Schneiderman E ,Stalcup A M. J Chromatogr B ,2000 ,745 (1) :83
[5] Armstrong D W ,Chang L W ,Chang S S C. J Chromatogr A ,1998 ,793(1) :115
[6] Toussaint B ,Hubert Ph ,Tjaden U R ,Van der Greef J ,Crommen J. J Chromatogr A ,2000 ,871 :173
[7] Song Y ,Wang D ,Hu Y P ,Chen X X ,Jiao Y G ,Hou D Y. J Pharm Biomed Anal ,2003 ,31(2) :311
[8] Dalglish C E. J Chem Soc ,1952 ,137 :3 940