

文章编号: 0529-6579 (2000) 04-0061-05

3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -环糊精键合 固定相的合成及性能评价^{*}

朱全红, 邓芹英, 曾陇梅

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 对 3, 5-二硝基苯甲酰基衍生化的 β -环糊精键合固定相进行研究, 采用均匀设计法对衍生化反应的工艺条件进行优化. 用红外光谱、元素分析及热重分析方法对键合相进行表征, 结果表明此键合相性能稳定, 适用于正相及反相液相色谱. 用 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -环糊精键合相做薄层色谱的手性固定相, 结合氯仿-丙酮-三乙胺和乙腈- $\varphi=1\%$ 乙酸三乙胺-乙酸展开剂系统, 7 种手性药物得到完全分离, 对映体间的相对比移值 α 为 1.19~2.03.

关键词: β -环糊精键合固定相; 衍生化; 薄层色谱; 手性药物; 手性分离

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A

近年来, 液相色谱法直接拆分对映体已被广泛用于对映体的纯度测定、不对称合成及体内药代动力学的研究中. β -环糊精 (β -CD) 键合固定相^[1, 2] 由于性质稳定, 能用于正相和反相色谱系统, 因而在此领域的应用潜力很大. 但由于 β -CD 本身的性质和手性识别过程要求客体分子必须要有大的疏水基团, 又使这种未衍生化的 β -CD 键合相的应用受到一定限制, 为此可用不同的衍生化试剂对 β -CD 的羟基进行修饰^[3~5], 以提高键合相与手性分子之间的作用力, 扩大应用范围. 本文用 3, 5-二硝基苯甲酰氯对 β -CD 键合固定相进行衍生化, 引入的 3, 5-二硝基苯甲酰基使含有不饱和键的手性分子与键合相之间增加了新的 π - π 作用和氢键作用, 提高了这种键合相的手性识别能力. 用均匀设计法^[6] 对衍生化反应的合成条件进行优化, 优选出反应条件温和、 β -CD 键合量高的工艺条件. 红外光谱、元素分析及热重分析结果表明, 3, 5-二硝基苯甲酰基取代的 β -CD 键合固定相性能稳定, 适用于正相和反相液相色谱. 用薄层色谱硅胶作基质制备了 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 手性固定相, 配合氯仿-丙酮-三乙胺和乙腈- $\varphi=1\%$ 乙酸三乙胺 (TEAA, pH 4.1)-乙酸流动相系统, 对 7 种手性药物 (图 1) 对映体进行分离, 取得良好的分离效果, 对映体间的相对比移值 α ($\alpha = R_D/R_F$) 在 1.19~2.03 之间.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

3, 5-二硝基苯甲酰氯 (CP), 上海名鹤农药化工厂产品; 甲苯 (AR), 经无水氯化钙

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29672054)

收稿日期: 1999-09-13; 作者简介: 朱全红 (1970~), 女, 博士研究生, 通讯联系人: 邓芹英.

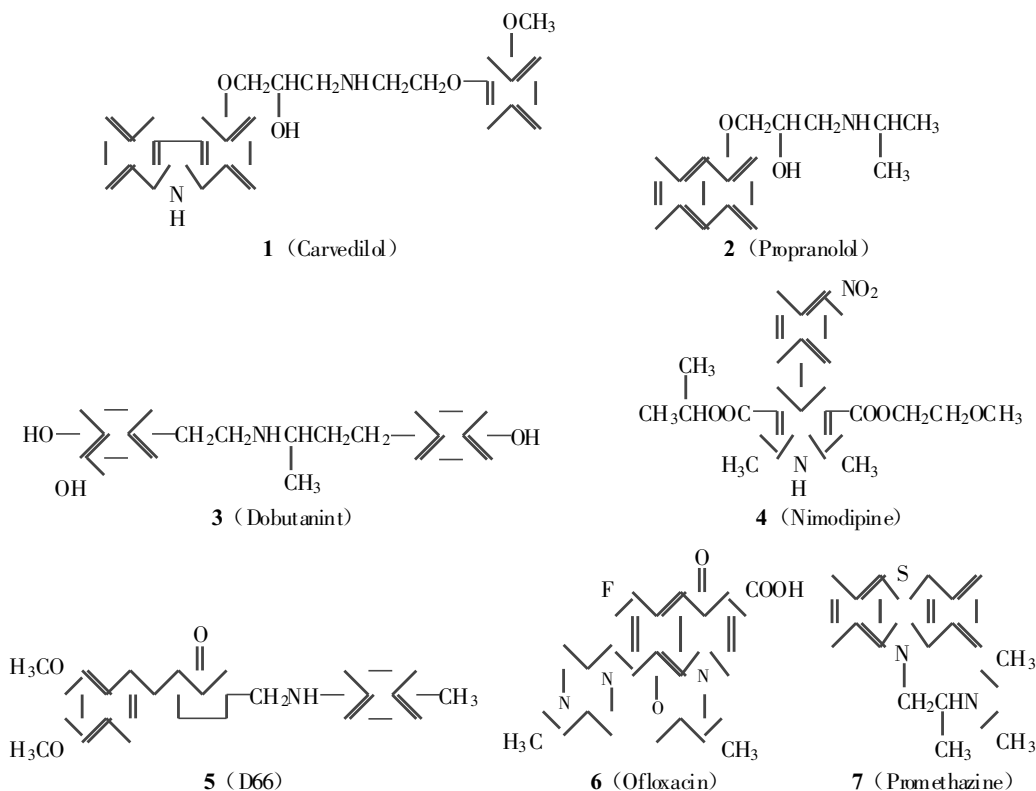


图 1 手性药物的化学结构式

Fig 1 The chemical structure of the chiral drugs

干燥后蒸馏, 收集 $110 \sim 112^{\circ}\text{C}$ 馏分; 吡啶 (AR), 经 KOH 干燥后蒸馏, 收集 $114 \sim 116^{\circ}\text{C}$ 馏分; 薄层色谱用硅胶 ($10 \sim 40 \mu\text{m}$), 青岛海洋化工厂产品; 手性药物卡维地洛 (1, Carvedilol), 由第一军医大学药物研究所提供, 用甲醇配成浓度为 1 mg/mL 的溶液; 普洛萘尔 (2, Propranolol), 汕头金石制药总厂产品, 片剂用水溶解后过滤, 滤液用浓氨水调至中性, 二氯甲烷萃取, 蒸去二氯甲烷, 残渣用甲醇配成 1 mg/mL 的溶液; 多巴酚丁胺 (3, Dobutamine), 上海第一制药厂产品, 针剂用 NaOH 试液调至中性, 乙酸乙酯萃取, 蒸去乙酸乙酯, 残渣用甲醇配成 1 mg/mL 的溶液; 尼莫地平 (4, Nimodipine), 片剂用适量乙醇溶解后过滤, 用无水乙醇配成 1 mg/mL 的溶液; D66 (5, 具有抗炎活性的化合物), 由沈阳药科大学药物合成室提供, 用甲醇配成浓度为 1 mg/mL 的溶液; 氧氟沙星 (6, Ofloxacin), 由广州南方医院提供, 用正丁醇配成 1 mg/mL 的溶液; 异丙嗪 (7, Promethazine), 江苏金坛制药厂产品, 针剂用 NaOH 试液调至中性, 乙醚萃取, 蒸去乙醚, 残渣用无水乙醇配成 1 mg/mL 的溶液. 以上各药物经溶剂处理后, 在硅胶板上用不同极性溶剂展开, 未见其他斑点, 说明都是纯度较高的手性药物. 其他试剂均为分析纯.

美国 Nicolet 公司 5DX 型红外光谱仪、Perkin-Elmer 公司 240C 型元素分析仪及日本岛津 TGA-50 型热重分析仪用于 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 键合固定相的表征; 紫外线双波长荧光分析仪用于薄层中样品斑点的观察.

1.2 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 键合固定相的制备

β -CD 键合固定相^[1]是 β -CD 与硅胶通过不含氮的硅烷偶联剂一步合成得到的键合相

($w(C)$ 为 12.50% ~ 13.10%), 经 70 °C 真空干燥 12 h 后称取 2 g 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 甲苯及 0~3 mL 吡啶. 电磁搅拌下, 加入 3, 5-二硝基苯甲酰氯 0.2~1.4 g, 于 80~140 °C 反应 3~9 h. 冷却后, 抽滤, 固体物依次用吡啶、甲醇、水、甲醇洗涤, 70 °C 真空干燥 12 h, 得产物 1.8~2.1 g, $w(C)$ 为 13.50%~17.27%. 产物进行元素分析、热重分析及红外光谱的测定.

1.3 薄层色谱条件

将 2 g 3, 5-二硝基苯甲酰化的β-CD 键合固定相与 6 ml $\rho=0.3\%$ 羧甲基纤维素钠水溶液混匀, 研磨成糊状, 均匀涂布在 5 块 2.5 cm×7.5 cm 的干净玻板上, 制成均匀平滑的薄层, 室温下水平晾干, 在烘箱中 80 °C 烘 1 h, 置干燥器中备用. 用毛细管在距板边缘 1 cm 处点样. 展开剂系统为氯仿-丙酮-三乙胺和乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA-乙酸, 在紫外下 ($\lambda=366$ nm) 观察样品斑点的位置.

2 结果与讨论

2.1 衍生化反应的工艺条件优化

用均匀设计法优化 3, 5-二硝基苯甲酰氯衍生化的β-CD 键合固定相的合成工艺条件. 考察因素为 3, 5-二硝基苯甲酰氯的用量 (A) 为 0.2~1.4 g; 吡啶用量 (B) 为 0~3 mL; 反应温度 (C) 为 80~140 °C; 反应时间 (D) 为 3~9 h. 由于键合相中β-CD 的键合量以及衍生化基团的取代数目与手性拆分密切相关, 而碳含量从一定程度上能反映出这两个指标, 因此本实验以衍生化键合相的碳含量为观察指标. 采用均匀设计使用表的 $U_7(7)^4$ 表, 实验结果见表 1.

表 1 衍生化键合相的合成条件优化

Tah 1 The optimization of the derivatized reaction conditions

水平	A/g	B/mL	$C/^{\circ}C$	D/h	$w(C)/\%$
1	0.2	0.5	100	8.0	13.50
2	0.4	1.5	130	7.0	13.87
3	0.6	2.5	90	6.0	14.43
4	0.8	0	120	5.0	17.27
5	1.0	1.0	80	4.0	16.86
6	1.2	2.0	110	3.0	16.56
7	1.4	3.0	140	9.0	16.26

对实验结果进行逐步回归, 得回归方程: $Y = 11.69 + 8.72A - 1.07B - 3.68A^2 + 0.13B^2$, 当 $A = 1.2$ g, $B = 0.1$ mL, $C = 80$ °C, $D = 3$ h 时, w 最大为 16.75%, 但回归结果比实验条件 4 的 $w(C)$ 为 17.27 要小, 因此优选实验条件 4 为最佳工艺条件, 即 $A = 0.8$ g, $B = 0$ mL, $C = 120$ °C, $D = 5$ h. 按此优化条件合成 3, 5-二硝基苯甲酰化的β-CD 键合固定相, $w(C)$ 为 15.27%~17.30%. β-CD 与硅烷偶联剂的反应摩尔比按投料比 (1:1.5) 计, 根据碳含量可知每个β-CD 上有 2.3~6.5 个羟基被 3, 5-二硝基苯甲酰基取代.

2.2 衍生化的β-CD 键合固定相的表征

2.2.1 红外光谱 β-CD 键合固定相和 3, 5-二硝基苯甲酰氯衍生化的β-CD 键合固定相的红外光谱图 (溴化钾压片法) 中 1 089, 1 096 cm^{-1} 的吸收峰归属于 Si—O—Si. 衍生化的β-CD 键合相与未衍生的β-CD 键合相比, 羟基的伸缩振动峰 $\nu(-OH)$ 3 374 cm^{-1} 明显减弱, 说明衍生化键合相中的羟基由于被 3, 5-二硝基苯甲酰基取代而减少, 强度减弱; 出现了波数为 3 107, 1 743, 1 630, 1 553, 1 461, 1 349, 920, 800, 723 cm^{-1} 的吸收峰, 其中 1 743 cm^{-1} 的吸收峰归属于酯 $-C=O$ 的伸缩振动; 3 107 cm^{-1} 的吸收峰归属于苯环碳氢伸缩振动, 1 630, 1 461 cm^{-1} 的吸收峰归属于苯环的骨架振动, 苯环的面外弯曲振动

920, 800, 723 cm^{-1} 的吸收峰显示出苯环是三取代的类型; 硝基的伸缩振动峰出现在 1 553, 1 349 cm^{-1} 处. 由红外光谱可以看出, 衍生化反应是成功的.

2.2.2 热重分析 图 2 为衍生化前后 β -CD 键合固定相的热重分析曲线 (升温速度: 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 记录温度: 室温 $\sim$ 630 $^{\circ}\text{C}$; 空气流速: 45 mL/min). 热重曲线显示了键合相受热失重、分解的情况, 衍生化后的键合相在 151.4、194.3 和 342.8 $^{\circ}\text{C}$ 处有 3 个分解拐点, 而衍生化前的键合相只有 1 个, 在 318.8 $^{\circ}\text{C}$, 表明衍生化后由于引入了 3, 5-二硝基苯甲酰基, 受热分解的情况与衍生化前的键合相有所不同, 衍生化基团在 151.4 和 194.3 $^{\circ}\text{C}$ 下分解失重.

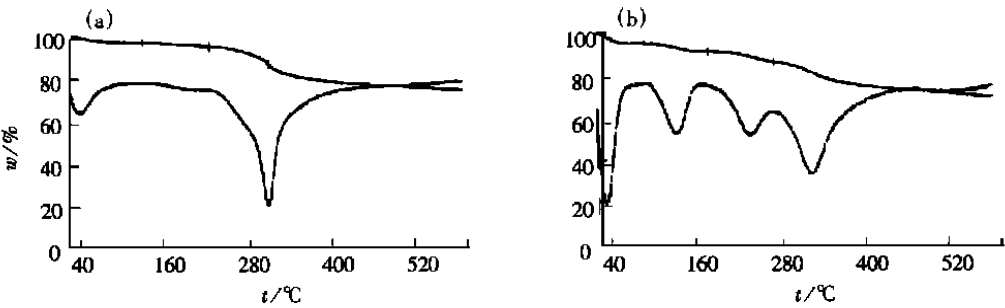


图 2 衍生化前后 β -CD 键合固定相的热重分析曲线

Fig.2 TG curves of (a) β -CD bonded phase and (b) derivatized β -CD bonded phase

(a) β -CD 键合固定相; (b) 衍生化的 β -CD 键合固定相

2.3 衍生化的 β -CD 键合固定相的性能评价

2.3.1 稳定性 衍生化的 β -CD 键合相在制备过程中要经过 N, N 二甲基甲酰胺 (DMF)、吡啶、甲醇、甲苯等溶剂的处理, 说明此键合相在有机溶剂中性能是稳定的. 为了考察其对反相色谱的适应性, 将衍生化的 β -CD 键合固定相在甲醇-水 ($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=50:50$) 混合溶剂中分别浸泡 1, 3, 5, 7 d, 过滤、干燥后, 分别测定其碳含量, $w(\text{C})/\%$ 分别为 16.86, 16.75, 16.68, 16.60, 16.52. 表明衍生化的 β -CD 键合固定相在反相色谱常用的甲醇-水溶剂系统中是稳定的, 它既可用于正相色谱, 也可用于反相色谱.

2.3.2 色谱拆分性能 用 3, 5-二硝基苯甲酰基衍生化的 β -CD 键合相做薄层色谱的手性固定相, 配合氯仿-丙酮-三乙胺和乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA (pH 4.1)-乙酸展开剂系统, 紫外光下 ($\lambda=366\text{ nm}$) 观察 7 种手性药物的拆分情况, 结果见表 2, $\varphi=1\%$ TEAA (pH 4.1) 是 $\varphi=1\%$ 三乙胺溶液用乙酸调至 pH 为 4.1.

用 3, 5-二硝基苯甲酰化的 β -CD 键合相制成手性薄层, 在正相 (氯仿-丙酮-三乙胺) 和反相 (乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA-乙酸)

表 2 手性药物在衍生化的 β -CD 键合相上的薄层拆分结果

Tah 2 The thin-layer chromatographic separation data of the chiral drugs on derivatized β -CD bonded phase

手性药物	R_D	R_F	α	流动相 ¹⁾
1	0.58	0.76	1.33	I (1+3+0.1)
2	0.22	0.45	2.03	I (1+3+0.1)
3	0.51	0.82	1.63	I (0.5+1.5+0.3)
4	0.76	0.84	1.19	I (1+3+0.1)
5	0.47	0.67	1.42	II (0.4+2+0.6)
6	0.43	0.74	1.70	II (1.5+1.5+0.1)
7	0.54	0.70	1.29	II (1+1+0.2)

1) 流动相 I: 氯仿-丙酮-三乙胺;
II: 乙腈- $\varphi=1\%$ TEAA-乙酸

溶剂系统中, 7 对手性药物得到完全分离, 说明这种衍生化的 β -CD 键合相对生物碱类手性药物具有良好的拆分效能. 这种衍生化的键合相由于在 β -CD 分子的伯羟基上引入了 2.3 ~ 6.5 个 3, 5-二硝基苯甲酰基, 这些取代基键合在 β -CD 的小口端, 使 β -CD 空腔的性质和大小发生改变, 能与更多的手性分子形成包埋络合物. 另外, 手性分子与键合相除包埋作用外, 3, 5-二硝基苯甲酰基是一个 π -酸基团, 能与手性分子中的芳环 π -碱基团发生 π - π 电荷转移作用, β -CD 上未被取代的羟基仍与手性分子之间存在氢键作用, 这些作用对 3, 5-二硝基苯甲酰基取代的 β -CD 键合相的手性识别都有一定影响. 尽管有些手性分子的结构、基团性质较为相近, 但拆分所用的流动相却完全不同, 对手性拆分机理的研究还有待于深入.

参考文献:

- [1] 余品香, 邓芹英, 王鹏, 等. β -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.
- [2] ARMSTRONG D W, ALAK A. Thin-layer chromatographic separation of optical, geometrical and structural isomers [J]. Anal Chem, 1986, 58: 582.
- [3] ARMSTRONG D W, STALCUP A M, HILTON M L, et al. Derivatized cyclodextrins for normal-phase liquid chromatographic separation of enantiomers [J]. Anal Chem, 1990, 62: 1610.
- [4] LI S, PURDY W C. Direct separation of enantiomers using multiple-interaction chiral stationary phases on the modified β -cyclodextrin-bonded stationary phase [J]. J Chromatogr, 1992, 625: 109.
- [5] HARGITAI T, KAIDA Y, OKAMOTO Y. Preparation and chromatographic evaluation of 3, 5-dimethylphenyl carbamoylated- β -cyclodextrin stationary phases for normal-phase high performance liquid chromatographic separation of enantiomers [J]. J Chromatogr, 1993, 628: 11.
- [6] 曾昭钧, 张晓箐. 均匀设计及其应用[M]. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1992. 62 ~ 140.

Preparation and Evaluation of 3, 5-Dinitrobenzoyl-Substituted β -Cyclodextrin Bonded Stationary Phase

ZHU Quan-hong, DENG Qin-ying^{*}, ZENG Long-mei

Abstract: 3, 5-Dinitrobenzoyl-substituted β -cyclodextrin (β -CD) bonded stationary phase was prepared and the synthetic conditions were optimized by means of uniform design. The product was characterized by IR spectrometry, elemental analysis and thermogravimetric analysis. The results showed that the derivatized β -CD bonded phase was stable and suitable to both normal phase and reversed phase chromatography. It was used as the chiral stationary phase for the thin-layer chromatographic separation of chiral drugs and seven chiral drugs were completely resolved ($\alpha = 1.19 \sim 2.03$) by using chloroform-acetone-triethylamine and acetonitrile-1% triethylammonium acetate (TEAA, pH 4.9)-acetic acid as mobile phases.

Keywords: β -cyclodextrin-bonded stationary phase; derivatization; thin-layer chromatography; chiral drug; chiral separation

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China