

β-环糊精硫酸酯的制备及其在毛细管电泳拆分中的应用

Preparation of β-cyclodextrin sulfate and its application in enantiomeric separation of ephedrine and pseudo-ephedrine by capillary zone electrophoresis

孙青葵¹, 刘长海², 徐建明¹, 吴秋业¹, 柴逸峰^{2*}, 俞世冲¹

(1. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 2. 药学院药物分析学教研室)

[关键词] β-环糊精硫酸酯; 电泳, 毛细管; 手性拆分

[中图分类号] O 621.3; O 657.8

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2006)04-0453-02

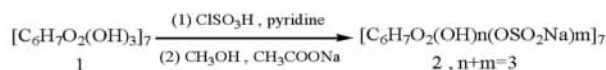
β-环糊精(β-cyclodextrin, β-CD)及其衍生物是在毛细管电泳手性拆分研究中应用最为广泛的一类手性添加剂,目前的研究多集中在经化学修饰的β-CD衍生物上,希望通过特定结构侧链或基团的引入能在增加β-CD衍生物溶解性能的同时增强其对手性化合物的拆分能力^[1~3]。麻黄碱对映异构体中只有D-型麻黄碱具有药理活性,临床上所应用的麻黄碱类药物都不同程度的混杂有对映异构体。已有文献报道以毛细管电泳方法对麻黄碱和伪麻黄碱进行拆分研究,但拆分效果始终不太理想^[4,5]。本研究参考有关文献^[6,7]制备了β-CD硫酸酯,并尝试通过将自制的手性添加剂β-CD硫酸酯和市售羟丙基β-环糊精组成混合手性添加剂,采用毛细管电泳法对麻黄碱和伪麻黄碱混合液中的2对D-型和L-型对映体进行分离,取得了较好的效果。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料 β-CD(上海化学试剂公司,纯度>95%,反应前经2次重结晶,烘干备用),羟丙基-β-CD(由中国科学院上海药物研究所提供,纯度>98%),氯磺酸、吡啶、甲醇、无水醋酸钠(分析纯,上海化学试剂公司);MP-21型熔点测定仪(温度计未经校正,日本Yamato公司);Hitachi 270-50型红外光谱仪(日本日立公司),KBr压片法;Bruker Spectrospin AC-P300型磁共振仪,瑞士布鲁克公司,以DMSO-d₆为溶剂,TMS为内标。美国Waters毛细管电泳仪,二极管阵列检测器。Tris(分析纯,上海实生细胞生物技术有限公司),磷酸(分析纯,上海试剂四厂昆山分厂),水为双蒸水。麻黄碱、伪麻黄碱消旋体(中国药品生物制品检定所,纯度>99%)。D-及L-型麻黄碱、伪麻黄碱标准品(华东理工大学化学工程学院,纯度>99%)。

1.2 β-CD硫酸酯的制备 取4.3 ml(0.065 mol)氯磺酸于0~5℃搅拌下小心加入26 ml干吡啶中,加完后将所得混合物升温至70~75℃,然后于搅拌下快速加入研成细粉的β-CD 1.135 g(0.001 mol),将所得混合物升温至80℃搅拌反应6 h,稍冷,将反应混合液倒入60 ml甲醇中并搅拌处理1 h,制备出粗制的β-CD硫酸酯吡啶盐。用砂芯玻璃漏斗滤过,并不断用甲醇洗至滤液变为无色,空气中干燥。然后将粗制的β-CD硫酸酯吡啶盐溶于7.6 ml水和5.0 ml 30%醋

酸钠溶液中将β-CD硫酸酯吡啶盐转化为钠盐。然后将钠盐溶液缓慢加入100 ml无水乙醇中,强力搅拌处理1 h,使产物沉淀。滤过收集沉淀,用乙醇不断洗涤滤饼,空气中干燥,得产品约2.6 g, m. p. 186~188℃。其反应式如下:



1.3 麻黄碱和伪麻黄碱的毛细管电泳拆分 取麻黄碱和伪麻黄碱消旋体适量,用甲醇溶解,摇匀,置冰箱中备用。未涂渍熔融石英毛细管(河北永年光学纤维厂),75 μm × 68 cm(有效长度60 cm);背景电解质溶液:50 mmol/L Tris缓冲液含有1.0% β-CD硫酸酯(自制)和2.0%羟丙基β-CD,用25 mmol/L磷酸溶液调节pH 2.5;温度:15℃;检测波长:214 nm;电压:16 kV;进样条件:压力进样,50 mbar × 3 s(1 bar = 10⁵ Pa);2次进样间先用0.1 mol/L NaOH冲洗6 min,然后用运行缓冲液冲洗4 min。

2 结果和讨论

2.1 β-CD硫酸酯制备条件的优化 本实验选用了氯磺酸作为硫酸酯化试剂,在反应溶剂、反应物配比不变的情况下,以β-CD投料量为1.135 g(0.001 mol)为例,考察了不同反应温度(60℃、80℃、100℃)条件下对反应的影响,产物量(g)及熔点分别为2.0、2.6、1.7和190~202℃、186~188℃、185~198℃。试验结果表明80℃反应条件下β-CD的转化率较高,产物β-CD硫酸酯熔点较敏锐。

实验中粗品β-CD硫酸酯吡啶盐的沉出我们曾选用丙酮、无水乙醇和甲醇进行操作,结果表明丙酮和无水乙醇的沉出效果较差,粗品β-CD硫酸酯吡啶盐呈粗粉末状,且易粘在器壁上,不易进行过滤操作;但是甲醇的效果要明显优于丙酮和无水乙醇,粗品β-CD硫酸酯吡啶盐呈粗颗粒状,黏性小,易于进行处理。另外,终产物β-CD硫酸酯钠盐的沉出我

[基金项目] 上海市“曙光计划”(03SG31);上海市教育委员会基金(01JG050354)。Supported by “Shangahi Shuguang Project” (03SG31) and Foundation of Shanghai Municipal Education Commission (01JG050354)。

[作者简介] 孙青葵,硕士,讲师。E-mail:sqy2000@sohu.com

* Corresponding author. E-mail:yfchai@smmu.edu.cn

们也选用丙酮、无水乙醇和甲醇进行操作,结果表明无水乙醇和甲醇的效果相当,2种沉出溶剂条件下样品回收率均为90%左右,考虑到甲醇的毒性较大,最终选用无水乙醇。

本实验 β -CD 硫酸酯的制备我们选用了氯磺酸作为硫酸酯化试剂,该试剂易吸潮且腐蚀性强,因此试剂的保存和取用要小心,反应时需保持反应容器的干燥。所有反应试剂使用前应进行纯化和干燥处理,另外要尽可能避免在反应过程中出现结块的沉积物。

2.2 采用 IR、 ^1H NMR 和 ESI-MS 对产物 β -CD 硫酸酯进行结构鉴定

2.2.1 红外吸收光谱(IR)法 用 KBr 将 β -CD 和 β -CD 硫酸酯分别压片,测定。 β -CD 的主要红外吸收峰波数(cm^{-1})为 3 488,2 955,1 456,1 236,1 158,1 044,1 006,942,879,817,746,695。 β -CD 硫酸酯新增加的红外吸收峰波数(cm^{-1})为 2 332,1 651,无吸收峰消失。

2.2.2 磁共振(^1H NMR)法 从 β -CD 硫酸酯的磁共振图谱上可知其分子形状极不均匀,这主要是由于取代位置分布不均匀引起的。可以看出在 4.09~4.72 区域包含除端基质子 H-1 外葡萄糖上所有质子的信号,4.79~5.47 区域则为端基质子 H-1 信号。

2.2.3 电喷雾质谱(ESI-MS)法 β -CD 硫酸酯电喷雾质谱图中出现了 15 个主要信号, m/z 分别为 2 106.18,2 072.85,2 038.25,2 003.84,1 969.41,1 936.20,1 901.90,1 868.07,1 610.76,1 559.69,1 508.73,1 457.77,1 406.80,1 355.34 和 1 304.27,主峰附近的峰为核素峰。其中 1 406.80 和 1 304.27 之间、1 457.77 和 1 355.34 之间、1 508.73 和 1 406.80 之间、1 559.69 和 1 457.77 之间、1 610.76 和 1 508.73 之间、1 969.41 和 1 868.07 之间、2 003.84 和 1 901.90 之间、2 038.25 和 1 936.20 之间、2 072.85 和 1 969.41 之间、2 106.18 和 2 003.84 之间,质荷比 m/z 均相差约 102,是 $-\text{SO}_2\text{Na}$ 替代 H 的质量,其余峰则为产物与测定体系中加入 Na^+ 、 NH_4^+ 后形成的离子类似物,由质荷比 m/z 分布情况可将这些峰归属为含 1~8 个 $-\text{SO}_2\text{Na}$ 基团的 β -CD 硫酸酯,由各碎片峰的丰度值可知样品中主要含 1~4 个 $-\text{SO}_2\text{Na}$ 基团取代后的产物。

2.3 毛细管电泳条件的选择 考察了不同毛细管柱、背景电解质中 β -CD 硫酸酯的浓度(0.5%、1.0%、1.5%)、pH 值(5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5)、缓冲液的种类和浓度(25、50、75 mmol/L)、柱温、电压等因素对分离的影响,优化了分离条件。在 1.3 项电泳条件下,理论塔板数按 L -型计算不低于 10 000;样品出峰时间 >25 min, D -和 L -型的分离度良好($R_s > 2.5$),峰形对称(对称因子为 1.2),电泳分离

图中 4 个峰的归属采用标准品对照确定(图 1)。

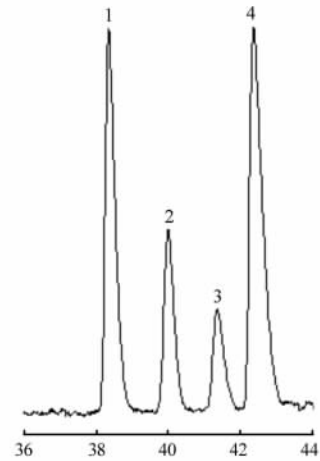


图 1 麻黄碱和伪麻黄碱的毛细管电泳分离图

1: D -伪麻黄碱;2: D -麻黄碱;3: L -伪麻黄碱;4: L -麻黄碱

[参考文献]

[1] Masurier N, Estour F, Froment MT, et al. Synthesis of 2-substituted beta-cyclodextrin derivatives with a hydrolytic activity against the organophosphorylester paraoxon [J]. Eur J Med Chem,2005,40: 615-623.

[2] Peroche S, Degobert G, Putaux JL, et al. Synthesis and characterisation of novel nanospheres made from amphiphilic perfluoroalkylthio-beta-cyclodextrins[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005,60: 123-131.

[3] Lesur D, Gassama A, Moreau V, et al. Synthesis of regioselectively and uniformly modified maltoheptaose derivatives from cyclomaltoheptaose precursors[J]. Carbohydr Res,2005, 340: 1225-1231.

[4] 武向锋,柴逸峰,刘荔荔,等.以羟丙基- β -环糊精为手性选择剂的毛细管电泳法分离测定日夜百服宁片剂中的伪麻黄碱[J].色谱,2001,19:552-554.

[5] 邹定,吴学军,姜文清,等.胶束电动毛细管色谱法用于研究麻黄碱类药物的手性分离[J].中国药学杂志,2001,36:688-690.

[6] Masanobu Y. Cyclodextrin derivatives;US,5241059[P]. 1993-08-31.

[7] Reuscher H. Process for the purification of water-soluble cyclodextrin derivatives;US,5831081[P]. 1998-11-03.

[收稿日期] 2005-08-22

[修回日期] 2006-03-02

[本文编辑] 尹茶