

毛细管电泳法手性拆分4种氨基酸和2种手性药物对映体

张春雨 李英杰* 郝秀菊 高 晴

(齐齐哈尔大学化学与化学工程学院 齐齐哈尔 161006)

摘 要 以双(6-氧- β -羧甲基-1,4-丁烯二酸单酯)- β -环糊精(DOCB- β -CD)作为手性添加剂,利用毛细管电泳对氨基酸和手性药物对映体进行拆分研究。以20 mmol/L磷酸盐为缓冲溶液,考察了手性添加剂的浓度及缓冲溶液的pH值与分离电压等对拆分效果的影响,并在其优化条件下,实现了4种DL-氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和组氨酸)以及手性药物(罗格列酮和酮洛芬)对映体的基线分离。

关键词 毛细管电泳, β -环糊精衍生物, DL-氨基酸, 手性药物

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2011)11-1340-03

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2011.00023

氨基酸是生命有机体的重要组成部分,对氨基酸手性对映体的分离分析研究在医药科学和生命科学等领域均有很重要的意义。因此,氨基酸经常被用作手性分离的模板物而加以研究^[1-2]。目前,常用高效液相色谱(HPLC)^[3]和气相色谱(GC)^[4]的方法拆分氨基酸对映体。但是,这2种方法不仅分析时间长,而且手性固定相的制备成本昂贵。而毛细管电泳(CE)以其分离效率高、分析时间短和样品用量少等优点而成为重要的分离分析技术之一,尤其在手性化合物的分析上受到了高度的重视^[5-6]。

β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)及其衍生物在毛细管电泳等分离分析方法中已经得到广泛的应用^[7-8]。天然环糊精由于受其分子键合能力和水溶性等物理化学性能的限制,使其在手性分离上有一定的局限性。对 β -CD不同的衍生化形式和反应条件,可能得到具有不同物理化学性能及分离选择性的 β -CD基手性选择剂。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^[9-10]。

由于双(6-氧- β -羧甲基-1,4-丁烯二酸单酯)- β -环糊精(DOCB- β -CD)不仅保留了 β -CD的疏水空腔的立体选择性,并且所引入的酯基和羧基基团,具有良好的水溶性和立体选择性,所以本研究以DOCB- β -CD作为手性选择剂,采用高效毛细管电泳法,拆分了4种未衍生化的氨基酸和2种手性药物的方法,考察了手性选择剂浓度、缓冲液pH值、柱温及分离电压对分离的影响,经过一系列实验优化,取得了良好的实验结果。

P/ACE/MDQ毛细管电泳仪(美国Beckman公司),石英未涂层毛细管50 μm $\times$ 60.0 cm,有效长度为50 cm(河北永年县锐沅色谱器件有限公司),FE20实验室pH计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司), β -CD(化学纯,南开大学精细化学实验厂),酮洛芬(KET, 99.8%,武汉世宏科贸有限责任公司),罗格列酮(RSG, 99.8%,北京化学试剂公司),DL-苯丙氨酸(DL-Phe)、DL-色氨酸(DL-Trp)(99.8%,上海晶纯试剂有限公司),DL-酪氨酸(DL-Tyr)、DL-组氨酸(DL-His)(99.8%,济南恒化科技有限公司)。

称取一定量手性选择剂DOCB- β -CD(参考文献[11]方法合成),用相应pH值缓冲液(20 mmol/L磷酸二氢钠-磷酸氢二钠)溶解,配制成不同浓度的背景电解质溶液,置于冰箱中冷藏备用。

在手性分离过程中,手性选择剂的浓度高低与手性识别强弱有关,手性试剂浓度太低,对映体的分离效果差;手性选择剂浓度过高,影响缓冲液的电渗流,溶液中各组分的电泳淌度也发生变化,从而影响分离度。并且随着浓度的增加,溶液的黏度增大,迁移率减小,从而使迁移时间增加。考察了以DOCB- β -CD为手性选择剂,其浓度在10~35 g/L范围改变时,对DL-Phe、DL-Trp、DL-Tyr、DL-His、罗格列酮和酮

洛芬对映体分离度的影响。实验结果表明,该 4 种氨基酸与 2 种手性药物对映体获得最大分离度的缓冲液浓度分别为 24、20、18、20、24 及 24 g/L。

缓冲溶液的 pH 值变化将改变溶质的有效电荷和毛细管表面电荷密度,从而影响电泳和电渗的平衡;它的改变可以有效的引起分析物质的带电情况,使得对映体和环糊精的作用力发生变化,同时还能影响 2 对映体的平均迁移率,从而影响分离效果。试验考察了 pH 值变化对 *DL*-Phe、*DL*-Trp、*DL*-Tyr、*DL*-His、罗格列酮和酮洛芬对映体拆分的影响,实验结果表明,在 pH 值分别为 3.5、3.5、4.0、3.5、6.5 及 5.5 时,该 4 种氨基酸与 2 种手性药物对映体均达到基线分离,分离度达到最大。

电压对 *DL*-Phe、*DL*-Trp、*DL*-Tyr、*DL*-His、罗格列酮和酮洛芬这 4 种氨基酸和 2 种手性药物的分离也有影响。随电压的升高迁移时间逐渐减小,相应地使对映体与手性选择剂间的非对映异构作用减弱,使拆分程度降低;分离电压升高使分离柱效提高,使对映体半峰宽减小,使分离度增大。

考察了电压在一定范围内对 4 种氨基酸和 2 种手性药物分离度的影响,最终确定 4 种氨基酸和 2 种手性药物的最佳分离电压分别为 20、15、15、20、25 及 25 kV。

试验比较了不同温度下氨基酸的手性拆分的情况,结果表明,温度变化对几种氨基酸对映体及手性药物的分离度有一定的影响,但亦存在最佳分离柱温。实验选择毛细管的最佳分离温度为 15 ℃。

对上述最佳分离条件进行了考察,得到了 4 种氨基酸和 2 种手性药物的毛细管电泳分离谱图,如图 1 所示。结果表明,本方法操作简单、分析时间短、重现性好,为氨基酸及手性药物的手性分离分析提供了一种新的分析方法。

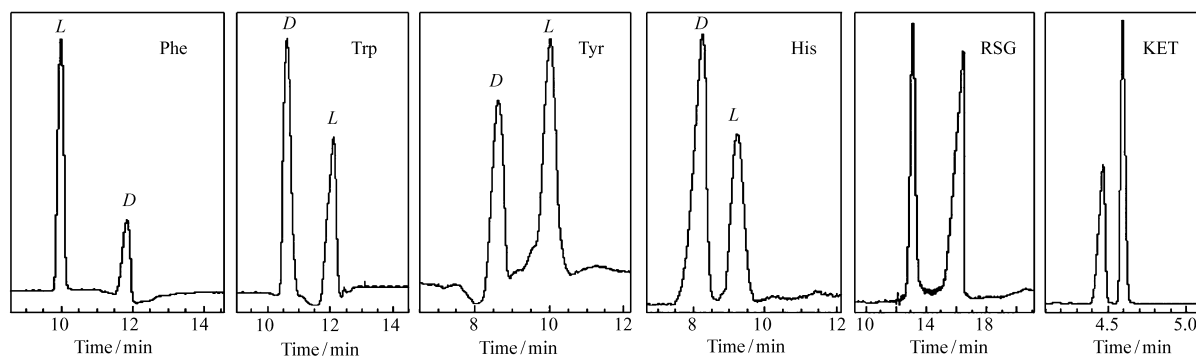


图 1 4 种氨基酸和 2 种手性药物对映体的电泳分离图

Fig.1 Electropherograms of four amino acids and two chial drug enantiomers by CE

Conditions; *DL*-Phe: pH=3.5, 24 g/L DOCB- β -CD, temperature = 15 ℃, voltage: 20 kV; *DL*-Trp: pH=3.5, 20 g/L DOCB- β -CD, temperature = 15 ℃, voltage: 15 kV; *DL*-Tyr: pH=4.0, 18 g/L DOCB- β -CD, temperature = 15 ℃, voltage: 20 kV; *DL*-His: pH=5.5, 20 g/L DOCB- β -CD, temperature = 15 ℃, voltage: 15 kV; RSG: pH=6.5, 24 g/L DOCB- β -CD, temperature = 15 ℃, voltage: 25 kV; KET: pH=5.5, 24 g/L DOCB- β -CD, temperature: 15 ℃, voltage: 25 kV

参 考 文 献

- [1] Kalaskar D M, Ulijn R V, Gough J E, *et al.* Characterisation of Amino Acid Modified Cellulose Surfaces Using ToF-SIMS and XPS[J]. *Cellulose*, 2010, **17**: 747-756.
- [2] SONG Qingbao, CHEN Shuiqing, MA Chunan. Research Progresses on The Resolution of Chiral Amino Acid[J]. *J Zhejiang Univ Technol*, 2010, **38**(2): 134-137 (in Chinese).
宋庆宝, 陈水清, 马淳安. 手性氨基酸拆分研究进展[J]. *浙江工业大学学报*, 2010, **38**(2): 134-137.
- [3] MA Guijuan, GONG Bolin, YAN Chao. Preparation of *L*-Isoleucine-Type Polymer-bonded Chiral Ligand Exchange Stationary Phase and Enantiomeric Separation of *DL*-Amino Acids[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2009, **26**(2): 125-129 (in Chinese).
马桂娟, 龚波林, 阎超. *L*-异亮氨酸聚合物手性配体交换固定相的制备及对 *DL*-氨基酸的拆分[J]. *应用化学*, 2009, **26**(2): 125-129.
- [4] HE Hongbo, ZHANG Wei, XIE Hongtu, *et al.* A GC/MS Method to Assess ^{15}N Ratios in Soil Amino Sugars and Amino Acid Enantiomers[J]. *Acta Pedolog Sin*, 2009, **46**(2): 289-298 (in Chinese).

- 何红波,张威,解宏图,等. 测定土壤氨基糖和氨基酸手性异构体中氮同位素比值的气相色谱/质谱方法[J]. 土壤学报,2009,46(2):289-298.
- [5] ZHAO Yanmin,ZHAO Yanfang. Progress in Study on Chiral Ligand-exchange Capillary Electrophoresis[J]. *Chem Reag*, 2010,32(5):422-426(in Chinese).
- 赵艳敏,赵艳芳. 手性配体交换毛细管电泳研究进展[J]. 化学试剂,2010,32(5):422-426.
- [6] Juvancz Z, Kendrovics R B, Ivanyi R, *et al.* The Role of Cyclodextrins in Chiral Capillary Electrophoresis [J]. *Electrophoresis*,2008,(29):1701-1712.
- [7] LI Yingjie, CHEN Zhichun, GAO Lidi, *et al.* Use of Carboxymethyl-poly- β -cyclodextrin as Chiral Selective Agent in Capillary Electrophoretic Separation of Chiral Compounds[J]. *Chem Engine*,2009,45(5):586-588(in Chinese).
- 李英杰,陈治春,高立娣,等. 羧甲基聚合- β -环糊精作为选择剂应用于毛细管电泳法拆分手性化合物[J]. 化学工程师,2009,45(5):586-588.
- [8] Karathanos V T, Mourtzinis I, Yannakopoulou K, *et al.* Study of the Solubility, Amioxidam Activity and Structure of Inclusion Complex of Vanillin with β -Cyclodextrin[J]. *Food Chem*,2007,101:652-658.
- [9] Nielsen A L,Madsen F,Larsen K L. Controlled Release of Ibuprofen from Cyclodextrin Modified PVP/PEG Hydrogels[J]. *Drug Delivery*,2009,16(2):92-101.
- [10] WU Xiaodan,ZHU Yaer. Chiral Separation of Tamslosin by Capillary Electrophoresis with HS- β -Cyclodextrin as Chiral Selector[J]. *Chinese J Pharm Anal*,2008,28(5):715-717(in Chinese).
- 吴筱丹,朱亚尔. 坦洛新对映体的 HS- β -环糊精的 HPCE 手性拆分研究[J]. 药物分析杂志,2008,28(5):715-717.
- [11] REN Weiheng,DING Zhigang, SONG Fajun, *et al.* Synthesis of Succinodehydrogenase by β -Cyclodextrin[J]. *Chinese J Org Chem*,1998,18:66-70(in Chinese).
- 任维衡,丁志刚,宋发军,等. 用 β -CD 构筑琥珀酸脱氢酶的研究[J]. 有机化学,1998,18:66-70.

Chiral Separation of Enantiomers of Four Amino Acids and Two Chial Drugs through Capillary Electrophoresis

ZHANG Chunyu, LI Yingjie*, HAO Xiuju, GAO Qing

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

Abstract Enantiomers of amino acids and chiral drugs were separated by capillary zone electrophoresis using double (6-*O*- β -carboxy-methyl-1,4-maleic acid ester)- β -cyclodextrin (DOCB- β -CD) as chiral selector. The buffer solution used was 20 mmol/L phosphate. The influences of DOCB- β -CD concentration, background buffer pH value, temperature and applied voltage were investigated. Under the respective optimum condition, enantiomers separation of four kinds of *DL*-amino acids (Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine and Histidine) and two kinds of chiral drugs (rofecoxib and rosiglitazone) were attained with a clear separation from the baseline.

Keywords capillary electrophoresis, β -cyclodextrin derivative, *DL*-amino acid, chiral drugs