

· 综述 ·

## 对映体的毛细管电泳分离

季一兵 陈玉英 薛俊<sup>1</sup> 林炳承<sup>1</sup>(中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009; <sup>1</sup>中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116012)

**摘要** 介绍了对映体药物的毛细管电泳分离方法的研究近况。对于光学异构体的分离, 有直接拆分和间接拆分, 色谱技术已早被人们所采用, 而毛细管电泳法问世不久。本文对直接拆分的四种模式: 主客体络合、配体交换络合、手性胶束包合及蛋白质亲合等研究原理和进展进行了讨论; 毛细管电泳间接拆分实为柱前衍生化, 其关键在于衍生化试剂的选择, 而在 MECC 中应用的试剂早已被 HPLC 法中广为采用, 故可被参考。毛细管电泳手性拆分尚有许多未尽事宜。

**关键词** 对映体; 毛细管电泳; 主客体络合; 手性胶束包合; 直接拆分; 间接拆分

光学活性物质广泛存在于自然界中, 尤其在药领域, 随着人们对药物生物活性认识的发展, 手性药物的拆分变得越来越重要。据报道, 在已知药物中约有 30%~40% 是手性的, 而这些手性药物仅有约 20% 以纯对映体销售, 约 80% 都以外消旋体的形式进入市场<sup>[1]</sup>。这些外消旋体进入人体后, 由于生物活性的差异, 效果很难预料。因此, 在药物研究中, 为了提高药效, 减少副作用, 深入研究手性药物的药理、毒性和代谢, 以及药物生产、质量控制, 都要求提供准确、微量和快速的分离分析方法, 测定手性药物的光学纯度。

色谱技术已被广泛用于手性药物的分离分析, 其中主要是气相色谱和高效液相色谱<sup>[2]</sup>, GC 的分离对象仅限于易挥发物质, HPLC 则存在费用偏高、分离效率偏低等不足, 所以能集高效和应用广泛性于一身的毛细管电泳技术已受到人们的重视。近年来, 已有不少科学工作者在用毛细管电泳进行手性拆分中作了探索和尝试, 取得了许多成果。

一般来说, 光学异构体的分离有直接拆分和间接拆分两种形式。直接拆分是由两个对映体与手性选择子形成不对称的络合物分子或其他结构, 产生不同的物理化学性质, 从而达到分离的目的。间接拆分是指先将对映体与手性选择子反应生成非对映化合物, 使之产生物理和化学性质的差异, 再进行分离。由于间接拆分复杂而且易产生消旋现象, 我们主要对直接拆分方法进行讨论。间接拆分仅略予提及。

### 1 直接拆分的几种模式

对于对映体的色谱拆分, Dalglish 等曾提出过“三点作用理论”<sup>[3]</sup>, 即在对映体和手性选择子之间至少存在三个作用点, 其中一个必须有立体选择性, 从而区别两个对映体。尽管这一理论存在着相当的局限性, 却还是被很大一部分学者用以作为认识色谱手性拆分机理的一种重要工具。但是, 就对映体的毛细管电泳拆分而言, 至今仍没有一个关于其原理的统一的说法, 也尚没有人探讨可否用“三点作用理论”对各种现象给予解释。下面我们按照目前学术界的一般看法, 从原理角度着手, 对毛细管电泳直接手性拆分的四种类型予以介绍。

#### 1.1 主客体络合

主客体络合是指被分析物(客体分子)在空间上被配合物(主体分子)包容形成络合物的过程。目前在 CE 中主要有两类物质用来与对映体形成内络合物, 一是环糊精(CD)及其衍生物, 二是手性冠醚。

环糊精是由多个吡喃葡萄糖单元以 1,4-糖苷键形成的低聚糖, 至今已分离出六聚、七聚、八聚和九聚体, 分别称为  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -CD。CD 分子具有中空的载角锥结构, 腔内呈相对疏水性, 羟基在开口处, 呈亲水性。由  $m$  个葡萄糖单元构成的 CD 分子有  $5m$  个手性中心, 因而作为主体分子能够提供给客体分子一个良好的不可多得的不对称环境, 对映体疏水部分有选择地进入到 CD 空穴中, 亲水部分与 CD 开口处

收稿日期 1994-03-19

的仲羟基形成氢键,如图 1<sup>[4]</sup>。根据两对映体络合常数的差异达到手性分离的目的。不同的 CD,其腔尺寸大小不同,因而对与其形成配合物的客体分子大小有选择性。在已有文献中, $\beta$ -CD 用得最多,因其价格相对便宜,适合于许多中等大小分子的分离,特别是芳香族化合物。表 1 列出了 CD 的部分性质。

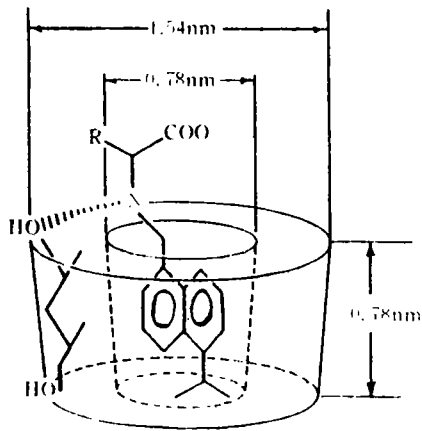


Fig 1. Configuration of Dns-amino acid interaction with  $\beta$ -CD

Tab 1. Some properties of cyclodextrins

| Cyclodextrin type                  | $\alpha$  | $\beta$   | $\gamma$  |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Molecular weight                   | 973       | 1135      | 1297      |
| Inner diameter of cavity, nm       | 0.47~0.52 | 0.60~0.64 | 0.75~0.83 |
| Outer diameter of cavity, nm       | 1.46      | 1.54      | 1.75      |
| Solubility in water at 25 C, mol/L | 0.114     | 0.016     | 0.179     |

性拆分的范围扩大到亲油性物质和不带电的中性分子,并使选择性进一步提高。CD-MECC 模式是在电泳流和电渗流驱动下,被分析物在水、胶束和 CD 之间进行分配,使不同对映体因迁移速度差异而得到分离。图 2 为 CD-MECC 模式作用示意图。尽管对映

体与胶束和选择子 CD 都发生作用,但最终分离还是取决于后者。在此体系中  $\gamma$ -CD 被认为是最有效的添加剂<sup>[10,11]</sup>,用来拆分氨基酸、多环芳烃及一些小分子药物,有机试剂及某些手性化合物加入到 SDS 胶束中可以提高选择性。

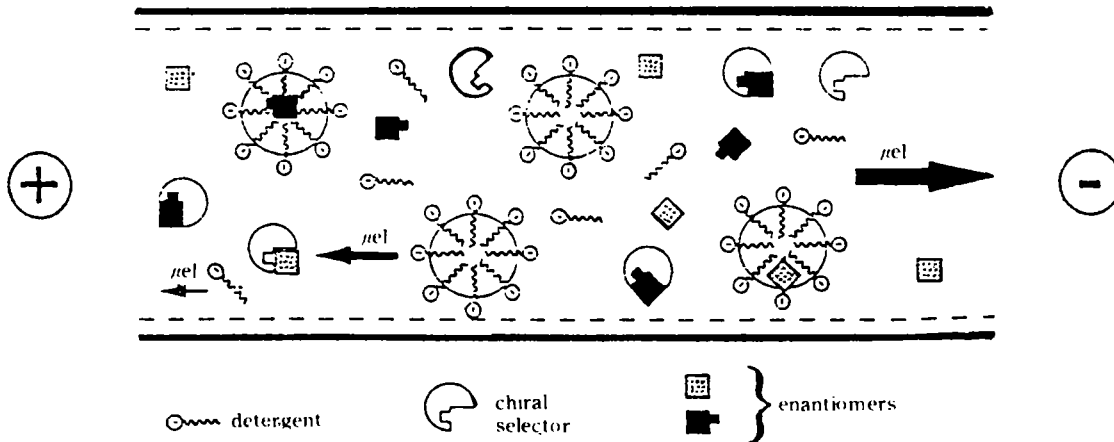


Fig 2. Separation mechanism in CD-MECC

从表中可以看出, $\beta$ -CD 水溶性很差,其衍生物如甲氧基环糊精等的应用可以提高对映体药物如叔丁喘宁、心得安的选择性<sup>[5]</sup>。另外根据 HPLC 的成功经验,在缓冲液中加入高浓度尿素或采用碱性条件可以大大提高  $\beta$ -CD 的溶解度<sup>[6]</sup>,Fanali 等已在这方面作出尝试<sup>[5]</sup>。

$\beta$ -CD 溶解度问题的解决有助于对映体的分离。因在一定范围内,对映体分离随 CD 浓度增加而增大。Wren 等提出一数学模式来讨论 CD 浓度变化对分离度的影响<sup>[7]</sup>。体系中有有机溶剂如甲醇、乙腈的加入也将影响分离,该文也对此作了较详细的分析。其他影响因素还有离子强度、温度等。Altria 针对  $\beta$ -氨基醇类药物的手性拆分<sup>[8]</sup>。Kuhn 针对多巴胺兴奋剂 quinagolide 的分离都展开了讨论<sup>[9]</sup>。

Guttman 等首次将 CD 引入到凝胶电泳中<sup>[4]</sup>,在 pH8.3 条件下分离丹酰化氨基酸对映体,理论塔板数可达 300 000~700 000/m,该文还给出选择性优化的模式,包括  $\beta$ -CD 浓度、温度等因素的优化。

Terabe<sup>[10]</sup>等提出的 CD-MECC 模式使 CD 进行手

关于利用 CD 作选择子的部分文献列于表 2。

Kuhn 等<sup>[9]</sup>提出用冠醚作选择子,冠醚是大环聚醚,中间形成空穴,能与大小相当的分子形成主-客体络合物。特别是 18-冠醚-6 四羧酸已被证实为可分离氨基酸和多巴胺等对映体,由于此种冠醚带微弱

电荷,可使游离对映体和络合物淌度差异增大,从而提高分离度。和 CD 类似,冠醚的分离能力受浓度的影响。通常用 20~40 mol/L 较为合适。在冠醚作手性分离时,*D*-对映体所形成的络合物更为稳定,因此,通常在*L*-对映体之后流出。但由于冠醚毒性较

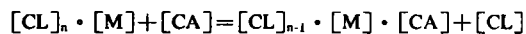
Tab 2. Chiral separation with cyclodextrins

| Chiral drug                        | Selector                            | Reference |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Dancyl-amino acid                  | 75mmol/L β-CD                       | [4]       |
| Terbutaline and propranolol        | 15 mmol/L β-CD, 40 mmol/L β-CD+urea | [5]       |
| Bronchodilator                     | 16 mmol/L β-CD                      | [8]       |
| Dopa                               | 30 mmol/L β-CD                      | [8]       |
| Ephedrine, Epinephrine             | 18 mmol/L DM-β-CD                   | [11]      |
| Cardiovascular                     | 20 mmol/L β-CD                      | [12]      |
| Tioconazole                        | 10 mmol/L HP-β-CD                   | [13]      |
| Dns-amino acid                     | 100 mmol/L β-CD+5 mol/L urea        | [14]      |
| Chloramphenicol                    | 10 mmol/L γ-CD, DM-β-CD             | [15]      |
| Barbiturates, aromatic hydrocarbon | 30 mmol/L β-CDm 50 mmol/L γ-CD      | [12]      |
| <i>D, L</i> -epinephrine           | 18 mmol/L DM-β-CD                   | [16]      |
| Polycyclic aromatic compound       | 40 mmol/L γ-CD                      | [17]      |
| Dns-amino acid                     | 50 mmol/L β-CD+10 mmol/L γ-CD       | [11]      |

大,柱效相对较低,所以不及 CD 应用广泛。

### 1.2 配体交换络合

配体交换络合是指中心离子(如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ )和至少两个手性双官能团配体形成螯合物的过程。有两种可能的分离模式:一种是一种螯合剂,如光学纯的氨基酸,与中心离子形成半络合物,手性分离是基于两对映体与此半络合物作用的稳定常数的差异。另一种是选择一定螯合剂浓度,使中心离子配位达到饱和,然后被对映体取代一个分子的螯合剂形成三元配合物,如下式所示:



式中 CL 为手性螯合剂, M 为中心离子, CA 为被分离手性分子。Gassmann 等<sup>[15]</sup>首先以 *L*-组氨酸作配体,  $\text{Cu}^{2+}$  作中心离子分离了 10 种丹酰化氨基酸。此后,他们又利用 *L*-天冬酰-*L*-苯丙氨酸作配体有效地分离了 14 种丹酰化氨基酸,并讨论  $\text{Cu}^{2+}$  浓度与配体浓度比值对分离的影响。但到目前为止,利用配体交换络合法进行手性拆分仍只限于氨基酸,范围较窄。

### 1.3 手性胶束包合

在前述 CD-MECC 中, CD 和胶束分别溶于水,各自处于独立的悬浮状态,与此不同的是,采用手性胶束包合分离对映体时,手性中心必须与胶束结合,即在胶束中引入手性基团或胶束本身具有手性。一般认为,溶质在表面与胶束进行偶极-偶极作用,并与胶束中心有疏水作用。因大多手性化合物在手性中心附近有极性基团,因此在极性基团的附近有手

性中心的表面活性剂适用于对映体的分离,但溶质与胶束作用机制仍不很明确,我们需要更为详细的作用模型来预测手性选择性。Cohen<sup>[20]</sup>用十二烷基-*L*-丙氨酸(SDALa)和 SDS 混合胶束来分离几种氨基酸;Dobarhi 等<sup>[21]</sup>则用 *N*-十二烷酰基-*L*-缬氨酸(SD-Val)和 SDS 混合胶束,并且认为,手性分离是基于对映体与胶束的手性中心形成氢键来实现的。另外,作者还指出尿素和甲醇的加入可以有效改善峰形和分离度。一些天然的非离子表面活性剂也被用于对映体的拆分。Qtsuka 等<sup>[22]</sup>将毛地黄皂甙与 SDS 混合;Isihema<sup>[23]</sup>则用甘草酸加 SDS 分离衍生化氨基酸。

到目前为止,使用得最多的手性胶束是胆汁盐。胆汁盐是由最多不超过十个单体组成的小胶束,是一种常见的生物表面活性剂,具有先导活性。它的结构完全不同于长链烷基表面活性剂,所有的羟基基本位于同一个平面上(见图 3)。因此,这种表面活性剂既具有疏水(环状结构)表面又具有亲水(羟基、氨基、羧基、磺基)表面,而它内部的疏水性却没有 SDS 胶束那样强<sup>[24]</sup>。

与 β-CD 不同,胆汁盐宜在强电渗条件下使用,这也是它常用于 MECC 的原因之一,从这个意义上来说缓冲液 pH 高比较有利,因为高 pH 能增加电渗。但是两性介质在高 pH 下易呈阴性,降低手性识别的能力。反之,低 pH 会使分离时间过长。如果被分离对象的刚性较强,胆汁盐所能提供的对映体选择性也就更强一些。Terabe 等又将胆汁盐加到 SDS 缓冲液

中作手性分离。其中,以牛黄脱氧胆汁盐所显示的效果最佳<sup>[25-27]</sup>。

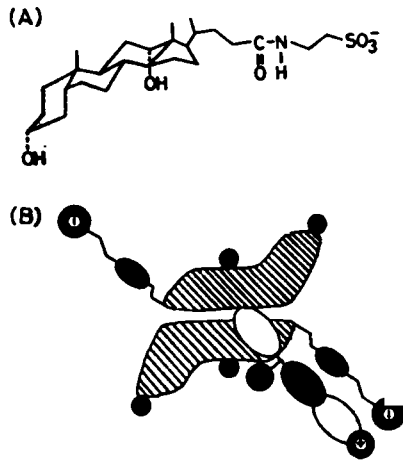


Fig 3. (A) Structure formula of taurodeoxycholate  
(B) A biomolecular aggregate of taurodeoxycholate

#### 1.4 蛋白质亲和

在药物分析中,这是一个颇具吸引力的领域,用蛋白质作手性选择子最适合于具有生物活性物质的对映体拆分。和 HPLC 相比,这种做法有很多好处,一是样品和添加剂的用量小,非常有利于昂贵稀有的蛋白质或其它生物分子的分离研究;二是由于分子能在和生理条件非常相似的环境中悬浮,比起基质和载体的共价结合来更加准确方便。Sandra 等<sup>[28]</sup>用牛血清蛋白、 $\alpha$ -酸性糖蛋白和纤维素酶作手性选择子加入到缓冲液中,分离色氨酸及几种手性药物。作者认为,蛋白质与对映体的作用主要是靠其肽链或糖单元位置上有选择地与两对映体形成氢键。有机溶剂的加入会显著影响分离。Yang 等<sup>[29]</sup>用人血清白蛋白作添加剂在 10 min 内完成了色氨酸分离,并认为这种状态将适用于能和血清白蛋白结合的其它化合物。值得注意的是人血清白蛋白被吸附到毛细管壁上的量和这种吸附对电渗流的影响。实际上只要不被管壁吸附,不仅是蛋白,连 DNA、RNA 或者其它带电粒子原则上都能被用作毛细管电泳的添加剂,作为高选择性的“准固定相”用于类似于 MECC 这样的电动色谱技术中。但部分是由于蛋白质在管壁上严重吸附。目前开发出的能作手性选择子的蛋白质种类很有限,所以这一领域的工作还未见其他更多的报道。

#### 2 CE 间接手性拆分

前已提及,本文所指的间接拆分实际上是一种柱前衍生,柱前衍生的核心是衍生剂的选择。在

HPLC 中已有许多试剂被用于作为手性衍生试剂,其中很大一部分看来可以用于 MECC 的手性分离,用于间接拆分的试剂宜具备下列条件:

1. 反应快;
2. 产物稳定;
3. 没有消旋;
4. 过剩试剂对检测没有响应或其响应易于除去;
5. 试剂含有或可能产生很强的生色基团或荧光基团;
6. 试剂的两种对映体纯品都能得到而且价格不是太贵。

毛细管电泳中手性间接拆分的优点至少有两条,一是如果手性中心十分接近反应中心,那么这种方法将可对手性识别的机理加以预测;二是如果试剂选择合适,这种方法可既获得生色基团又产生手性选择性,一举两得。但总体说来,和毛细管电泳的直接拆分相比这种方法还是有很多不足之处,因此影响了它的发展,这些缺点包括要作复杂的论证,反应可能不完全,过剩的试剂分离困难,以及大量的额外样品处理步骤等等。已经采用的试剂有 1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸(Marfen 试剂),2,3,4,6-四氧-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖-异氰酸盐(GITC)和 1-(9-苄基)乙基氯仿(FLEC)。其中 FLEC 几乎具备了上述所有条件,唯一的不足是要用溶剂萃取除去过剩的试剂。这种试剂迅速和伯胺、叔胺反应,形成带有荧光的衍生物在 260 nm 有吸收。已经用它从一个有三个手性中心的化合物中分离了 5~8 个对映体<sup>[30]</sup>。

#### 3 关于近期发展的几点看法

毛细管电泳手性拆分问世不久,发展很快,当然也还存在着不少未尽事宜,特别是尚未来得及对大量的实验结果进行纵横两向的比较和研究,寻找能在更高层次上对现象作更为一般阐述的规律。因此,在方法的使用上还带有一定的盲目性,缺乏更多的自觉性。另外,在一些技术问题上,也尚有不少不得不涉及或探讨的课题。比如,可否参照毛细管气相色谱的思路将手性选择子涂渍或键合到毛细管壁上发展出一系列具有不同选择性的手性毛细管电泳柱并进行微量制备的尝试;解决选择子随样品一起经过检测器能在多大程度上对样品的检出造成干扰等。

但是总的说来,由于毛细管电泳技术高效、快速、灵活、方便,特别是可以通过改变选择子的浓度、缓冲液的 pH 和离子强度、加入有机溶剂等方法极为方便地改变体系的选择性和分离效率,显示了很多 HPLC 所不及的独特的优越性,具备了成为手性分离常规技术的各种条件,因此已经并将在今后一段时间继续成为相关领域学者关心的热点。

## 参考文献

- 1 Konig WA. *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*. Heidelberg;Huethig,1987. 4
- 2 林炳承. 手性分子的色谱分离. 色谱,1990,448:41
- 3 Dalglish C. The optical resolution of aromatic amino-acid on paper chromatography. *J Chem Soc*, 1952,137:3940
- 4 Guttman A,Paulus A,Cohen AS,*et al.* Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr*,1988,448:21
- 5 Fanali S. Use of Cyclodextrin in capillary zone electrophoresis resolution of terbutaline and propranolol enantiomers. *J Chromatogr*, 1991,545:437
- 6 Pharr DY,Fu ZS,Smith TK. Solubilization of cyclodextrin for analytical applications. *Anal Chem*,1989,61(3):275
- 7 Stephen AC. Theory of chiral separation in capillary electrophoresis. *J Chromatogr*,1993,636:57
- 8 Altra KD,Goodall DM,Rogan MM. Chiral separation of amino alcohols by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 1992,34(1/2):19
- 9 Kuhn R,Stiecklin F,Erni F. Chiral separation by host-guest complexation with cyclodextrin and crown ether in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*,1992,34(1/2):33
- 10 Nishi H,Fukuyama T,Teraba S. Chiral separation by cyclodextrin - modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr*,1991,553:503
- 11 Terabe S,Miyashita Y,Ishihama Y,*et al.* Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr*, 1993,636:47
- 12 Nielen MW. Chiral separation of basic drug using cyclodextrin - modified capillary zone electrophoresis. *Anal Chem*, 1993,65:885
- 13 Pemn SG,Goodall DM,Loran JS. Differential binding of tioconazole enantiomers to hydroxypropyl- cyclodextrin studied by capillary electrophoresis. *J Chromatogr*,1993,636:149
- 14 Otsuka K,Terabe S. Optical resolution of chlorpheniramine by cyclodextrin added capillary zone electrophoresis. *J Liq Chromatogr*, 1993,16(4):945
- 15 Snopek J,Soini H,Novotry M,*et al.* Selected applications of cyclodextrin selectors in capillary electrophoresis. *J Chromatogr*, 1991,559:215
- 16 Peterson TE,Tronbridge D. Quantitation of *l*-epinephrine and determination of the *d*-/*l*- epinephrine enantiomer ratio in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *J Chromatogr*,1992,603 :298
- 17 Terabe S,Miyashita Y,Shibata O,*et al.* Separation of highly hydrophobic compounds by cyclodextrin- modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr*, 1990,516:23
- 18 Gassmann E,Kuo JE,Zara RN. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science*,1985,230:813
- 19 Goxel P,Gassmann E,Michelsin H,*et al.* Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper-aspartame supprot electrolyte. *Anal Chem*,1987,59(1):44
- 20 Cohen AS,Paulus A,Karger BL. High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels. *Chromatographia*,1987,24:15
- 21 Dobashi A,Ono T,Hara S. Enantioselective hydrophobic entanglement of enantiomeric solutes by electrokinetic chromatography. *J Chromatogr*,1989,480:413
- 22 Otsuka K,Kanagara J,Tatekawa K. Chiral separation by micellar electrokinetic chromatography with sodium *N*- dodecanoyl-*L*-Valinate. *J Chromatogr*, 1991,556:209
- 23 Mayer S,Schurig V. Enantiomer separation by electrochromatography in open tubular columns coated with chiral-DEX. *J Liq Chromatogr*,1993,16(4):915
- 24 Wienberger R. *Practical Capillary Electrophoresis*. New York. 1993
- 25 Terabe S,Shibata M,Miyashita Y. Chiral separation by electrokinetic chromatography with bile salt micelles. *J Chromatogr*, 1989,480:403
- 26 Nishi H,Fukuyara T,Matsuo M. Chiral separation of trimequinol hydrochloride and related compound by micellar electrokinetic chromatography. *Anal Chim Acta*, 1990, 236(2):281
- 27 Lurie IS. Micellar electrokinetic chromatography of the enantiomers. *J Chromatogr*,1992,605:269
- 28 Busch S,Johan CK,Poppe H. Chiral separation by complexation with proteins in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr*,1993,635:119
- 29 Yang J. Chiral separation by capillary electrophoresis. Lecture presented at 5th International symposium on HPCE. Orlando (U. S. A. ),1993