

讲 座 高液效相色谱在生物医药研究中的应用

第六讲 高效液相色谱分离光学异构体(上)

徐修容

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

光学异构体具有不同的生理作用早已为人们所熟知, 如抗心律失常药普萘洛尔 (propranolol) 的 S(-)-异构体药理活性比 R(+)-异构体大 100 倍。沙立度胺 (thalidomide) R(+)-异构体有良好的镇静作用, 而 S(-)-异构体对孕妇有致畸作用。丙氧吩 (propoxyphene) 右旋体是强镇痛药, 强度比左旋体大 6 倍; 左旋体有强镇咳作用, 而右旋体却没有。自然界中光学活性物质也广泛存在于动、植物体内。这种生物立体选择和旋光物质的生物合成, 是生物系统特有的本能。在药物研究中为了提高药物的活性, 减少副作用, 深入研究药物的作用机理、毒性和代谢, 以及药物生产、质量控制, 都要求提供准确、微量、快速的测定方法和光学纯药物。

有机化学中对映体的拆分是一项比较困难和繁杂的实验技术, 曾提出多种方法, 效果不理想。高效液相色谱 (HPLC) 在 70 年代后期开始了此项研究, 短短的十年时间, 已取得突破性进展, 发展了多种方法, 用于直接拆分对映体的手性柱已有十几家工厂生产, 产品四十多个^[1,2]。当前手性 HPLC 仍是色谱学科中十分活跃的领域。

HPLC 拆分对映体有直接和间接两类方法。对映体以手性试剂衍生, 形成非对映异构体, 再以常规方法分离, 称为间接法。对映体不加处理, 直接用手性流动相 (CMP) 或手性固定相 (CSP) 分离, 称直接法, 使用者可根据具体情况选择使用。

§ 6-1 直接拆分法

近年来发展迅速, 取得了令人瞩目的进展, 直接拆分法分为 CSP 法和 CMP 法。

1. 手性固定相法 CSP 的研究始于七十年代后期, 发展异常迅速, 大量的各种类型 CSP 研制成功, 并开展了有关作用机理的研究。其中部份 CSP 已作为商品出售, 得到广泛的应用。CSP 可分为以下几类: (1) 蛋白质类键合相, (2) 手性聚合物相, (3) 环糊精相, (4) 氢键和电荷转移类键合相, (5) 配位基交换相。表 6-1 为 CSP 产品一览表。

(1) 蛋白质键合相 七十年代初已有人

将牛血清白蛋白 (BSA) 键合在琼脂糖上, 制成液相色谱用手性填料, 拆分了 DL-色氨酸。八十年代初 Allenmark^[3] 和 Hermansson^[4] 分别将 BSA 和 α -酸性糖蛋白 (α -AGP) 键合到微粒硅胶上制成 HPLC 用的 CSP, 商品名为 Resolvosil 和 Enantio Pac, Hermansson^[5,6] 和 Schill^[7,8] 等以 Enantio Pac 柱拆分了酸、胺和 β -氨基醇类药物如萘普生、双异丙吡胺、麻黄素、可卡因、阿托平等几十种药物, 拆分效果良好 (图 6-1)^[9], 分离系数 (α) 可达 1.1—4.0, 柱的稳定性好, 对温度和有机溶剂有较好的耐受性, 长期保存在异丙醇中 (12 个月), 对拆分效果无明显影响。Resolvosil 柱可用于拆分氨基及其衍生物、芳香亚砷、香豆素类、二苯乙醇及多种药如安定、华法林等^[9]。Resolvosil 的稳定性不如 Enantio Pac, 流动相中异丙醇含量不能超过 6%, 此类 CSP 的拆分机理尚不了解, 作用方式可能包括极性基团间的作用、立体和疏水效应等多种因素。蛋白质类 CSP 拆分化合物面广, 效果好, 但柱容量小, 最多上样量为 1—2 nmol, 常用洗脱系统为磷酸缓冲液 pH 4—7, 离子强度 0—500 mmol, 有机改性剂 5% 以下, 拆分酸性和碱性化合物, 流动相内可分别添加少量 (1—10 mmol), N,N'-二甲基辛胺或叔丁胺氢溴酸盐及辛酸。



图 6-1 Enantio Pac 柱拆分 3-乙基-5-苯基乙内酰胺
柱: 10 × 0.3 cm i. d. α -AGP (13 μ m); 流动相: 磷酸缓冲液 pH 7.15, 含 1.0% 异丙醇。

表 6-1 手性固定相和生产厂

商品名	手性选择部分	生产厂
Cyclobond I	β-环糊精	Astec
Bakerbonded chiral ionic DNBPG	(R)-DNB 苯基甘氨酸	Baker
Bakerbonded chiral covalent DNBPG	(R)-DNB 苯基甘氨酸	
Bakerbonded chiral covalent DNBLeu	(S)-DNB 亮氨酸	
Chiralcel OA	纤维素三乙酯	Daicel
Chiralcel OB	纤维素三苯甲酸酯	
Chiralcel OC	纤维素三苯基氨基甲酸酯	
Chiralcel OE	纤维素三苄基醚	
Chiralcel OK	纤维素三肉桂酸酯	
Chiralcel OT(+)	聚三苯甲基异丁烯酸酯	
Chiralcel OP(+)	聚吡啶二苯甲基异丁烯酸酯	
Chiralcel WH	脯氨酸-铜	
Chiralcel WM	氨基酸-铜	
Enantio Pac	α-酸性球蛋白	LKB
Cellulose CEL-AC-40 XF	纤维素三乙酯	Macherey, Nagel
Nucleosil chiral-1	羟基脯氨酸-铜	& Co.
Resolvosil	牛血清白蛋白	
D-Naphthylalanine	D-萘基丙氨酸	Reigis
L-Naphthylalanine	L-萘基丙氨酸	
Ionic D-phenyl glycine	(R)-DNB 苯基甘氨酸	
Covalent D-phenyl glycine	(R)-DNB 苯基甘氨酸	
Covalent L-phenyl glycine	(S)-DNB 苯基甘氨酸	
Covalent D,L-phenyl glycine	(R,S)-DNB 苯基甘氨酸	
Covalent L-leucin	(S)-DNB 亮氨酸	
Ionic L-leucine	(S)-DNB 亮氨酸	
Chiral B Dex = siloopolyol	β-环糊精	Serva
Chiral DNBL-C = siloopolyol	(R)-DNB 亮氨酸	
Chiral DNBDL-C = siloopolyol	(S)-DNB 亮氨酸	
Chiral hypro-Cu = siloopolyol	羟基脯氨酸-铜	
Chiral Val Cu = siloopolyol	缬氨酸-铜	
Sumipax OA-1000	α-萘乙酰胺	Sumitomo
Sumipax OA-1000A	α-萘乙酰胺	
Sumipax OA-2000	(R)-DNB 苯基甘氨酸(离子型)	
Sumipax OA-2000A	(R)-DNB 苯基甘氨酸(共价)	
Sumipax OA-2100	氯苯异戊酰苯基甘氨酸	
Sumipax OA-2200	菊酰苯基甘氨酸	
Sumipax OA-3000	叔丁胺羧酰缬氨酸	
Sumipax OA-4000	(S)(S)-α-萘乙胺羧酰缬氨酸	
Sumipax OA-4100	(R)(R)-α-萘乙胺羧酰缬氨酸	
Supelcosil LC-(R)-urea	苯乙基脲	Supelco

注: DNB=3,5-二硝基苯甲酰

(2) 手性聚合物相 有两类来源不同的聚合物相,一是天然纤维素的衍生物,另一是合成高分子化合物。前者有 Chiralcel OA-Ok、Cellulose CEL-AC-40XF 等六种,后者有 Chiralcel OT 和 OP 等两种。Chiralcel OA-OK 是将纤维素衍生物吸附在大孔微粒硅胶上^[10],此类 CSP 对螺烯、亚砷、磷酸酯、氰类、醇、酯、酰胺都有良好的拆分效果,也成功的用于多种药物及中间体的拆分(图 6-2)^[11,12]。使用于强酸和强碱的拆分,样品需分别衍生成相应的酰胺和酯。常用的流动相为己烷-异丙醇、乙醇、甲醇-水和乙醇-水。

三苯甲基丁烯酸酯类聚合物,因其螺旋结构而具有手性,Okamoto^[13] 等将聚合物涂渍在 10μm 的硅胶上而成,主要有 Chiralcel OT 和 OP。此类 CSP 对刚性平面结构样品有良好的立体选择性,适用于酯、烃类、酰胺和含磷化合物的拆分^[14],α 值为 1.10-1.35。螺旋结构的固定相可能是由于立体效应而产生拆分作用(图 6-3),当对映体依附在螺旋的不同层次,保留值不同,产生手性拆分。

Chiralcel OT 和 OP 柱的流动相可采用己烷、己烷-异丙醇或甲醇,Chiralcel OT 在低温时拆分效果更好(15℃以下)。

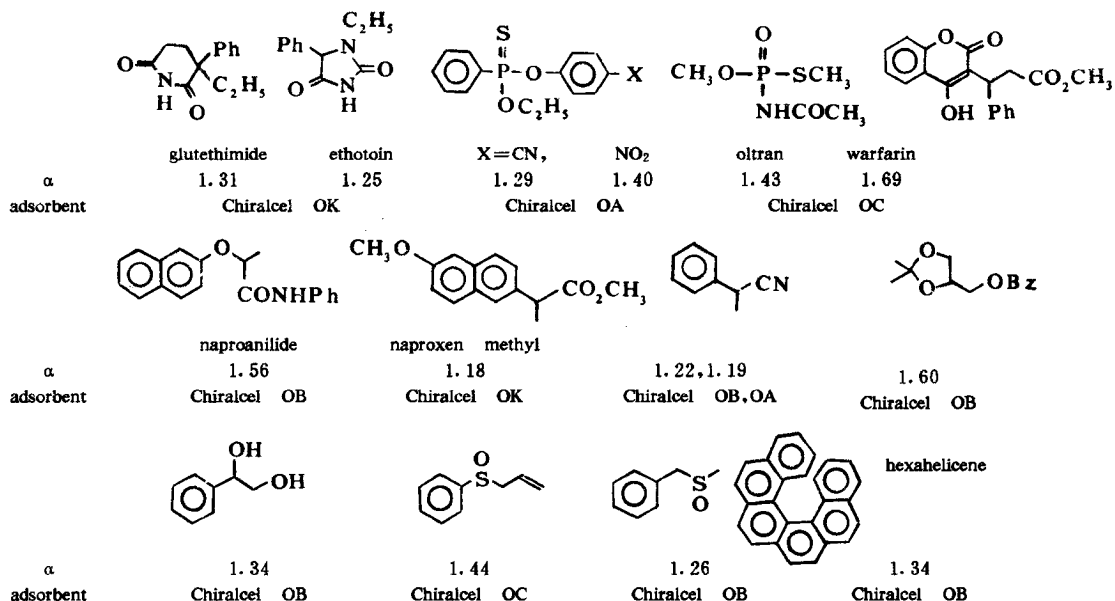


图 6-2 纤维素类 CSP 拆分药物及中间体的对映体

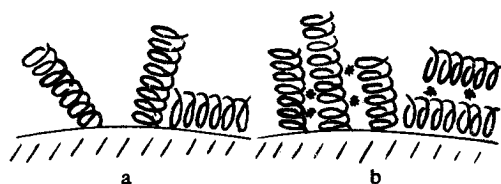


图 6-3 聚三甲基异丁烯酸酯涂渍硅胶

a. 低浓度, b. 高浓度.

(3) 环糊精相 环糊精(CD)是一类环形寡聚糖, α-, β-, 和 γ-CD 分别由 6, 7, 8 个 D-吡喃葡萄糖通过 α-1, 4-羟基连在一起, β-CD 内腔直径为 0.8

nm。Ward^[15] 将 β-CD 通过 6—10 碳的间隔基键合到微粒硅胶上, 商品名 Cyclobond I。这种 CSP 像切去顶端的锥形圆筒, 边缘有羟基, 内部为疏水性的内腔, 只有当分子的大小正好使非极性部分进入腔内, 极性基团与边缘的羟基产生较强的作用才能拆分^[15] (图 6-4)。某些具有萘环和双环化合物可得到良好的拆分, 如丹酰氨基酸、巴比妥类、乙内酰胺、部分甾体和非甾体雌激素、金属茂等。单环化合物如扁桃酸、酪氨酸、麻黄素等也可拆分^[16-17], 使用范围广, 仅次于 Pirkle 型 CSP。流动相为甲醇-水或乙腈-水, γ-CD 无拆分作用, α-CD 仅对小分子有拆分作用^[18]

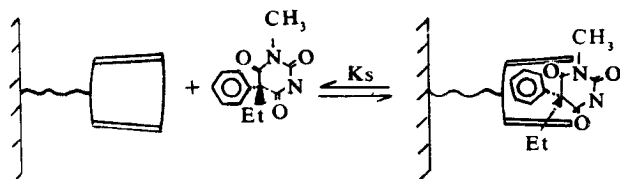
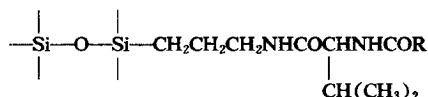


图 6-4 CD 分子与溶质形成包埋复合物

(4) 氢键和电荷转移键合相 由光学活性的有机小分子通过一定的间隔基键合到微粒胶上制得。Hara 等在七十年代末以 N-酰基缬氨酸与氨基硅胶键合, 得到一系列氨基酸型 CSP, 结构如下:



R = CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉, (CH₃)₃C

对多种氨基酸和二肽衍生物有一定的拆分效果, α 值最大为 1.13。作者^[20-23]曾对另一类氨基酸型固定相的结构与拆分效果的关系作了系统研究, 固定相的结构如下:

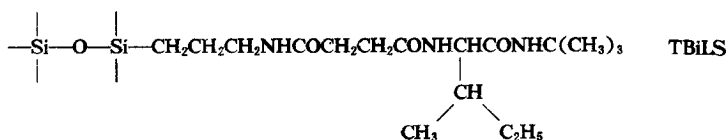


A = (CH₂)₂, (CH₂)₃, —CH=CH—, —C₆H₄—, (CH₂)NH, CH(OH)CH(OH)。

R = CH₃, CH₂C₆H₅, CH₂CH(CH₃)₂, CH(CH₃)₂, CH(CH₃)C₂H₅。

R' = H, C₆H₅, C₆H₁₁, C(CH₃)₃, CH(CH₃)₂, (CH₂)₂CH₃, (CH₂)₃CH₃

结果表明 R 和 R' 基的立体效应增大, 拆分效果增加。A 基的刚性增加对拆分效果不利。将酰胺基改为脲基, 或引入不对称碳原子不能改善拆分效果。其中以琥珀酰异亮氨酸—叔丁酰胺固定相(TBILs)效果最好。



对氨基酸衍生物, α-氨基羟基磷酸衍生物^[21]、磷酰胺^[24]、二茂铁丙氨酸及亮-亮二肽衍生物^[21]都有较好的拆分效果, 部分结果见表 6-2、图 6-5。

由于氨基酸型 CSP 对二肽有良好的拆分效果, 作者又研制了十种二肽型 CSP^[25]。此类 CSP 对 α-氨基羟基磷酸衍生物拆分效果极佳, 洗脱系统为异丙醇或四氢呋喃与己烷的混合液, α 值最高可达 1.64。

氨基酸类 CSP 拆分机理是通过氢键使溶质的一对对映体与固定相形成稳定性不同的非对映络合物, 因色谱的保留值不同, 而达到拆分的目的。实验结果表明, 固定相和溶质不对称碳原子上取代基的立体效应对拆分效果有明显影响。

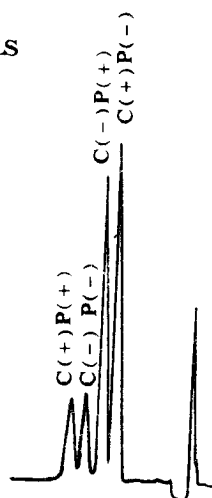

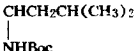
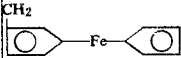


图 6-5 TBILs 柱拆分磷酰胺

柱: 15×0.5cm. d.; 流动相: 异丙醇—己烷(2:98. V/V); 流量: 1.3ml/min; 检测 280nm.

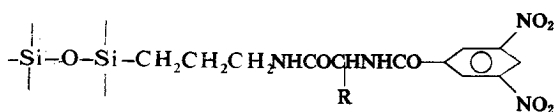
表 6-2 TBILs 柱拆分氨基酸衍生物和 α-氨基羟基磷酸

色谱条件: 色谱柱 柱 I: 10×0.5cm i. d. (拆分氨基酸), 柱 II: 15×0.5cm i. d. (拆分 α-氨基羟基磷酸酯); 流动相 己烷: 异丙醇=98:2(V/V); 流量: 柱 I 为 1.3ml/min, 柱 II: 1.5ml/min; 检测: 氨基酸衍生物, UV230nm, α-氨基羟基磷酸酯, UV220nm 或 254nm; 温度: 室温。

Compounds R ₁ CONHCHCOOCH ₃ R ₂		Column I			Compounds R ₁ NHCHP(O)(OR ₃) ₂ R ₂			Column II		
R ₁	R ₂	K ₁ '	K ₂ '	α	R ₁	R ₂	R ₃	K ₁ '	K ₂ '	α
CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	11.28	13.09	1.16	Cbz	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂ H ₅	1.24	1.46	1.18
CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	10.40	11.99	1.15	Cbz	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	1.99	2.80	1.41
CH ₃	CH(CH ₃) ₂	10.09	11.68	1.16	Cbz	CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	1.47	1.66	1.13
CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	14.67	16.67	1.14	Cbz	CH ₃	C ₂ H ₅	2.61	2.83	1.09
CH ₃	CH ₂ COOC ₂ H ₅	26.88	27.62	1.05	Cbz	CH(CH ₃) ₂	C ₂ H ₅	1.23	1.43	1.15
CH ₃	CH ₂ CH ₂ SCH ₃	25.21	28.04	1.11	Cbz	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	1.56	1.74	1.13
* CH ₃		20.68	22.77	1.10	CH ₃ CO	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	10.75	13.39	1.31
	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1.16	1.55	1.34						
** CH ₃		5.22	6.71	1.29						

* 洗脱液为己烷/异丙醇(92/8, V/V); ** 使用柱 I 拆分, 化合物为乙酯。

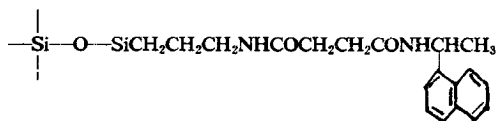
七十年代后期 Pirkle 研制了一种萘取代氟醇型 CSP,对具有 3,5-二硝基苯甲酰取代的多种类型化合物都有很好的拆分效果,在此基础上制备了氨基酸 3,5-二硝基苯甲酰胺类 CSP^[26],结构如下:



现已由多家厂商生产。除共价键外还有离子型 Pirkle CSP,其拆分效果同共价键型不相上下,只是流动相中极性溶剂含量不宜过高(20%以下)。此类 CSP 作用机理包括形成 $\pi-\pi$ 键、氢键或偶极叠合。固定相本身是 π -电子接受体并具有形成氢键的基团,因此被拆分的溶质必须具有 π -电子的给予体如萘环、烷基苯和极性基团。如溶质不含 π -电子给予体,可通过衍生化反应引入这一基团。Pirkle 型 CSP 拆分效果好,可拆分化合物已有四十类近万种^[27-30],

并用于制备性分离^[31,32]。Pirkle 型 CSP 常用流动相为已烷与异丙醇的混合溶剂。

Oi^[33] 根据相同原理研制了另一类 CSP,结构如下:



已由 Sumitomo 生产,商品名 Sumipak OA-1000^[33], CSP 上具有萘环,被拆分的溶质必须是 π -接受体,拆分样品的 3,5-二硝基苯甲酰和 3,5-二硝基苯胺的衍生物可获得良好的拆分效果。Oi 相继又制备出一系列多种具有苯基和萘基酰胺和尿类的 CSP^[34,37]。上述 CSP 对胺、羧酸、氨基酸、氨基醇、羟羧酸、醇、酯等都有一定的拆分效果。OA-4000 和 OA-4100 对未进行衍生的样品也可以拆分。流动相多采用正相系统:己烷-氯仿-乙醇,己烷-异丙醇。同时 Pirkle 等也研制了萘胺^[38-40]和萘取代氨基酸类 CSP。

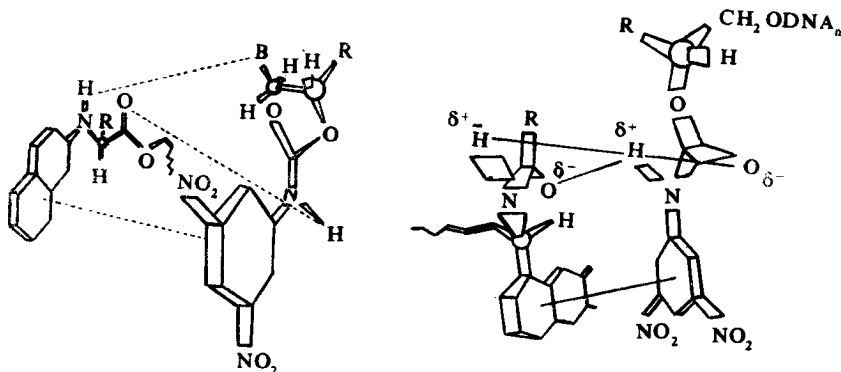


图 6-6 $\pi-\pi$ 键类 CSP 与溶质相互作用示意图

Pirkle 等^[42-44]认为此类 CSP 的拆分机理包括:溶质与 CSP 间芳基与 3,5-二硝基苯基形成 $\pi-\pi$ 键, $-\text{NH}-$ 基与 $-\text{CO}-$ 基间的氢键及酰胺偶极的静电作用(图 6-6),由于溶质的不对称碳原子上取代基空间位置的不同,使生成的非对映络合物的稳定性不同,而达到拆分的目的。一般取代基的立体效应大,拆分效果较好。

(5) 配位基交换相 Davankov^[45-46] 将 L-脯氨酸键合到树脂上,经吸附 Cu(II) Ni(II) 或 Zn(II) 后,可拆分氨基酸对映体。Gubity^[47-48] 将 L-脯氨酸和 L-缬氨酸通过间隔基键合到硅胶上,制成 HPLC 用 CSP,以 CuSO_4 水溶液处理后即可用于氨基酸和二肽类的拆分。此类 CSP 已有四种商品,Chiracel WH, WM 和 Chiral hypro-Cu, Val-Cu。除上述氨基酸外,用于 CSP 键合基的尚有:L-1,2-二氨基丙烷、 β -羟基氨基酸、1-麻黄素、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-肌杂-2-环丁烷羧酸、L-酒石酸、L-2-哌啶酸^[49]及(-)-反-1,2-环

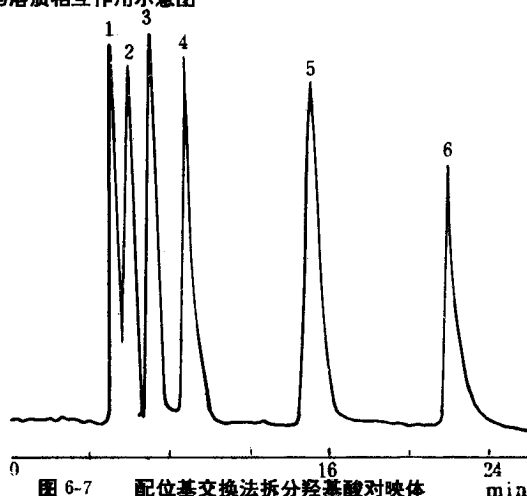


图 6-7 配位基交换法拆分氨基酸对映体

柱:Si-Hypro,流动相:10mmol CuSO_4 ,温度:20℃,流量:2ml/min,检测:UV223nm。峰:1. D(+)-乳酸,2. L(-)-乳酸,3. D(+)-苯基乳酸,4. L(-)-苯基乳酸,5. D(+)-3-苯基乳酸,6. L(-)-3-苯基乳酸。

己二胺。拆分化合物包括氨基酸、二肽、 α -羟基酸及有关药物如 α -甲基多巴、甲状腺激素等, α 值 1.10—8.0 配位基交换色谱的流动相多为水或磷酸、乙酸氢缓冲液, 有时加入一定量的有机溶剂(乙腈)。为防止铜离子的流失, 在流动相中加入适当的 CuSO_4 , 此类 CSP 亦可用于制备性分离。下图为羟基酸对映体的拆分。

参 考 文 献

[1] R. Dappen et al., J. Chromatogr., 373, 1 (1986).
 [2] 吕湘林等, 药化学报, 23, 67 (1988).
 [3] S. Allenmark et al., J. Chromatogr., 264, 63 (1983).
 [4] J. Hermansson, J. Chromatogr., 269, 71 (1983).
 [5] J. Hermansson, J. Chromatogr., 336, 321 (1984).
 [6] J. Hermansson, J. Liq. Chromatogr., 9, 621 (1984).
 [7] G. Schill et al., J. Liq. Chromatogr., 641 (1986).
 [8] E. Delee et al., Chromatographia, 24, 357 (1987).
 [9] S. Allenmark, J. Liq. Chromatogr., 9, 425 (1986).
 [10] A. Ichida et al., Chromatographia, 19, 280 (1984).
 [11] T. Shibata et al., J. Liq. Chromatogr., 9, 313 (1986).
 [12] K. H. Rumbach et al., J. Chromatogr., 351, 346 (1986).
 [13] Y. Okamoto et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 6971 (1981).
 [14] Y. Okamoto et al., J. Liq. Chromatogr., 9, 369 (1986).
 [15] J. T. Ward et al., J. Liq. Chromatogr., 9, 407 (1986).
 [16] D. W. Armstrong et al., Anal. Chem., 57, 481 (1985).
 [17] D. W. Armstrong et al., Anal. Chem. Acta, 208, 275 (1988).
 [18] D. W. Armstrong et al., Anal. Chem., 59, 2594 (1987).
 [19] S. Hara et al., J. Chromatogr., 186, 543 (1979).
 [20] 徐修容等, 化学学报, 41, 262 (1983).
 [21] 徐修容等, 色谱, 1, 22, (1984).
 [22] 唐琴梅等, 色谱, 7, 157, (1989).
 [23] 刘晋钊等, 化学学报, 48, 1011 (1990).

[24] 赵国辉等, 第六次全国色谱学术报告会论文集, P503, 1987.
 [25] 刘晋钊等, 化学学报, 49, 170 (1991).
 [26] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 192, 143 (1980).
 [27] W. H. Pirkle et al., J. Am. Chem. Soc., 103, 3964 (1981).
 [28] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 387, 313 (1987).
 [29] P. Pescher et al., J. Chromatogr., 371, 159 (1986).
 [30] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 348, 89 (1985).
 [31] W. H. Pirkle et al., J. Org. Chem., 47, 4037 (1982).
 [32] A. Tambute, J. Chromatogr., 363, 89 (1983).
 [33] N. Oi et al., J. Chromatogr., 257, 111 (1983).
 [34] N. Oi et al., J. Chromatogr., 265, 111 (1983).
 [35] N. Oi et al., J. Chromatogr., 259, 487 (1983).
 [36] N. Oi et al., J. Chromatogr., 285, 198 (1983).
 [37] J. Gul, J. Chromatogr., 331, 349 (1985).
 [38] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 322, 295 (1985).
 [39] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 328, 1 (1985).
 [40] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 358, 377 (1986).
 [41] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 388, 307 (1987).
 [42] W. H. Pirkle et al., J. Org. Chem., 48, 5022 (1983).
 [43] W. H. Pirkle et al., J. Chromatogr., 316, 585 (1984).
 [44] I. W. Wainer, J. Liq. Chromatogr., 7, 713 (1984).
 [45] V. A. Davankov et al., J. Chromatogr., 82, 359 (1973).
 [46] V. A. Davankov et al., Adv. Chromatogr., 18, 139 (1980).
 [47] G. Gubitz et al., HRC & CC, 2, 145 (1979).
 [48] G. Gubitz et al., J. Liq. Chromatogr., 4, 701 (1981).
 [49] G. Gubitz, J. Liq. Chromatogr., 9, 519, (1986).

(后面的文献载于下期)

(收稿日期: 1989年6月15日)

(上接 397 页)

参 考 文 献

[1] L. P. A. De Jong, J. Environ. Anal. Chem., 29 (3), 179 (1987).
 [2] H. C. De. Bisschop et al., Chromatographia, 18 (8), 433 (1984).
 [3] H. Willian et al., AD—A107555, 1981.

(收稿日期: 1989年12月2日)

Gas Chromatographic Analysis of the Trace Nerve Agents and Organophosphorus Pesticides in Blood Zhang Honglan, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing. 100850

This method uses Sep- Pak C_{18} cartridge to concentrate trace nerve agents and organophosphorus pesticides in blood. Methanol was selected as the eluting solvent. The eluates were analyzed on Varian-6000 Gas Chromatograph equipped with nitrogen/ phosphorus detector (NPD). The recoveries were in the range of 65—99%. In this way the minimum detectable concentration was 10pg/ml blood. The method is simple, rapid and highly sensitive. It is shown experimentally that the Sep- Pak C_{18} cartridge may be replaced by X- 5 resin cartridge.