

高效液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物体(下)

徐修容

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

2. 手性流动相法 手性流动相法亦称手性添加剂法。优点是拆分化合物不需以手性试剂衍生,也不需要价格昂贵的 CSP,而是将手性试剂加到流动相中,使用常规的正相或反相柱分离,由于方法简便,引起广泛的注意。作用原理有两种可能:(1)溶质在流动相中与手性试剂形成非对映络合物,因而在固定相和流动相中分配特性不同。(2)手性试剂吸附在柱上形成动态的 CSP。Davankov^[50]将手性试剂吸附在柱子上,拆分样品时,流动相中不再加手性试剂。使用的手性添加剂大多数为 CSP 的键合基团,拆分原理同 CSP 相似。主要手性添加剂有以下几类:

(1)蛋白质 由于蛋白质类 CSP 对多种药物有良好的拆分效果,白蛋白和 α -AGP^[51-52]曾作为手性添加剂拆分某些精神病药物如异丙嗪、甲硫哒嗪及双异丙吡胺等。Pettersson^[53]以白蛋白拆分了酸、二羧酸和色胺酸,为保持蛋白添加剂的稳定,对流动相的组成和固定相有一定的要求,一般采用大孔径的 DIOL 或 RP-2 为固定相,流动相为磷酸缓冲液, pH 6.5 左右。

(2)环糊精类: 以 β -CD 制成的 CSP 对多类化合物都有良好的拆分效果。 β -CD 对紫外检测无干扰,价格较低,是比较理想的手性添加剂。Deboski^[54]对 β -CD 拆分扁桃酸作了系统研究,认为化合物的不对称碳原子上具有能与 β -CD 形成氢键的基团,才能拆分。Sybiliska^[55]等以 β -CD 拆分巴比妥类药物,发现只有嘧啶环上有不对称碳原子的巴比妥如美芬妥因、甲基苯巴比妥和海索巴比妥可以拆分。Nobuhara^[56]和 Gazadag^[57]分别对流动相的组成、添加剂的浓度及不同型号的 C_{18} 柱对拆分的影响作了探索,流动相以乙醇-缓冲液 (pH 6.2) 对 CD 的溶解度较好,添加剂浓度增加保留值降低,分离效果改善。CD 作为手性添加剂效果远不如 CD 型 CSP。

(3)氢键型手性试剂 Dabashi^[62]以 N-乙酰-L-缬氨酸-叔丁酰胺作为手性添加剂对多种氨基酸衍生物有较好的拆分效果, α 值: 1.10—1.16, 同时也发现

N,N'-二异丙基酒石酰胺(R,R-)对 α -羟基酸, β -羟基酸, 氨基酸的酯或酰胺, β -羟基酮及脲, α -氨基醇, 酰胺, α -二醇和 β -联萘酚等多种化合物都有较好拆分效果(图 7-8)。

这两种 CMP 都是通过溶质和手性试剂之间形成氢键而产生作用,流动相要求极性低,多采用己烷-氯仿系统,固定相为硅胶,添加剂的浓度加大,氯仿含量

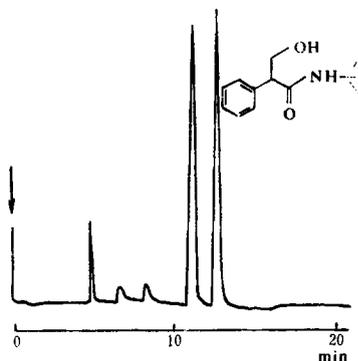


图 7-8 拆分 N-叔丁基- β -羟基- α -苯基丙酰胺

柱: $50 \times 0.1 \text{ cm i. d.}$, Nucleosil 100-5 (5 μm);
流动相: 己烷-氯仿 (30:70v/v); 含
83.38mmol N,N'-二异丙基酒石酸酰胺, 流
量: 60 $\mu\text{l}/\text{min}$; 温度: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测: UV254nm。

减低,对拆分有利。

(4)配位基手性试剂 Lindner^[59]将金属络合物 L-2-异丙基-4-N-乙酰-二乙烯四胺- Zn^{++} 加到流动相中,使其动态的吸附在 C_{18} 柱上,可用于丹酰-氨基酸的拆分,同年 Hare^[60]以 L-Proline-Cu 为手性添加剂用阳离子交换色谱拆分氨基酸,手性配位基除 L-氨基酸及其衍生物外,光学活性的胺和酰胺亦被采用(表 7-3)^[61]。溶质与配基及金属离子生成两个三元非对映络合物,由于稳定性或物理性质的不同而达到拆分的目的。洗脱顺序与一般反相分离一致,溶质的疏水性增加,保留时间延长,疏水性氨基酸拆分时流动相中应加入一定量的有机改性剂,甲醇或乙醇。

(5)手性离子对试剂 这一方法是在离子对色谱的基础上发展起来,将一般的离子试剂换成手性离子对试剂,即可用于有机酸和碱对映体的拆分。(+) -

10-樟脑磺酸和 N-苄氧羰基甘氨酸-L-脯氨酸^[62]作为手性离子对试剂,可用于氨基醇类化合物对映体的拆

表 7-3 配位基交换色谱手性添加剂

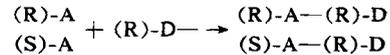
手性添加剂	固定相	金属离子	拆分样品
L-2-异丙基-4-正辛基二亚乙基三胺	C ₈	Zn ⁺⁺	Dns-AA
L-脯氨酸正辛胺	C ₈	Zn ⁺⁺ , Cd ⁺⁺ Ni ⁺⁺ , Cu ⁺⁺	Dns-AA, 二肽, 尼凡诺 乙琥珀酰亚胺
L-脯氨酸十二烷胺	C ₈	Hg ⁺⁺ Ni ⁺⁺	Dns-AA
L-脯氨酸	阳离子交换剂	Cu ⁺⁺	AA
L-脯氨酸	C ₈	Cu ⁺⁺	AA
L-脯氨酸	C ₈	Cu	Dns-AA
L-脯氨酸	硅胶	Cu ⁺⁺	甲状腺激素
L-精氨酸	C ₈	Cu ⁺⁺	AA
L-组氨酸	C ₈	Cu ⁺⁺	AA
L-组氨酸甲酯	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
L-苯丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	α-甲基多巴, 色氨酸
L-苯丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	3,4-二羟丁基鸟嘌呤
L-苯丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	间及对-羟基扁桃酸
正烷基-L-羟基脯氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
L-天门冬氨酸单烷胺	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
L-天门冬氨酸-L-苯丙氨酸甲酯	C ₁₈	Cu ⁺⁺	多巴, AA
N,N-二丙基-L-丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	Dns-AA
N,N-二烷基-L-氨基酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
N-(甲基苯磺酰)-L-苯丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
N-(甲基苯磺酰)-D-苯丙氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	AA
(2'S, 4R, 2'RS)-N-(2'-羟基-十二烷基)-4-羟基脯氨酸	C ₁₈	Cu ⁺⁺	四氢噻唑-4-羧酸
N,N,N',N'-四甲基-(R)-丙二胺-1,2-	C ₁₈	Cu ⁺⁺	多巴, 扁桃酸
(R,R)-酒石酸酐单正辛胺	C ₁₈	Cu ⁺⁺	去甲肾上腺素, AA

注 AA:氨基酸, Dns-AA:丹酰氨基酸。

分,一般认为手性的配对离子应具有静电吸附和形成氢键作用才能产生拆分效果^[62](图 7-9)。奎宁、奎尼定及辛可尼定碱对樟脑磺酸和具有极性基团的酸也有较好的拆分效果。固定相为 DIOL 键合相,流动相为二氯甲烷和戊醇混合液。极性溶剂浓度增大,保留值降低,拆分效果下降;配对离子浓度加大,拆分效果

§ 7-2 间接拆分法

虽需进行生化反应,但生成的非对映异构体,物化性质不同,可用常规的正相或反相法分离,衍生后又可改善溶质的色谱性能及增加检测灵敏度,仍为不少作者采用。分析的样品应具有进行衍生化的基团,反应条件应该温和、简便,反应方程式如下:



D 为手性试剂, A 为溶质。已有多种手性试剂可供选用。异氰酸酯和异硫氰酸酯可作为氨基酸^[63,64]、胺^[65]、氨基酸^[66-69]等的手性衍生试剂 HCl, 酸酐和酰氯可作为醇和胺^[70]的衍生试剂,手性胺可用于羧酸的拆分^[71-73], 2,3,4,6-四乙酰-β-D-吡喃葡萄糖异硫氰酸酯、R(-)-萘乙异氰酸酯、(-)-α-甲氧萘乙酸、(+)-10-樟脑磺酸、RR-或 SS-酒石酸酐、光学纯的氨基酸等为常用的手性衍生试剂。手性衍生试剂的结构对拆分效果有很大影响,靠近不对称碳原子有大的

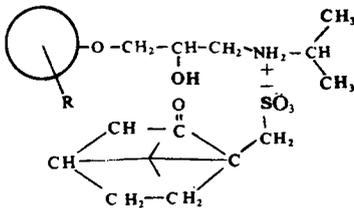


图 7-9 (+)-10-樟脑磺酸与氨基醇相互作用示意图。

增加。

取代基,能加强拆分效果,衍生基团与不对称碳原子相距越近,效果也越好。为达到良好检测效果,手性衍生试剂应选择具有紫外和荧光发色基团的化合物。这种间接拆分法效果良好,灵敏度高。下图为服用外消旋萘普生后,血清中对映体的分离^[73]。

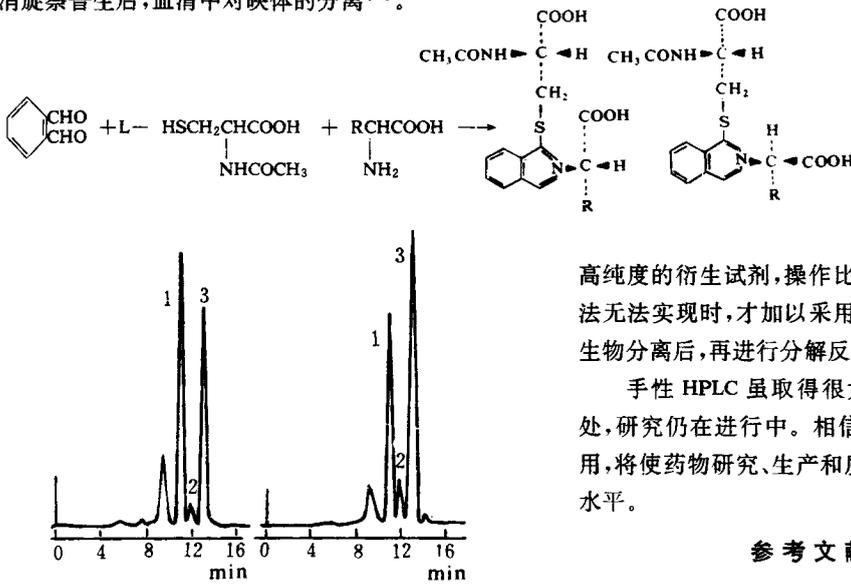


图 7-10 dl 萘普生 1-1-(4-二甲氨基-1-萘)乙胺衍生物的分离。

(a)标样,(b)服用萘普生 2 小时后血清样本。
柱: $\mu \times 1/4$ d. (μ Porasil); 流动相: 己烷-四氢呋喃, 流量: 0.6 ml/min; 检测: 荧光激发波长 320nm, 发射波长 410nm。峰: 1. 1-萘普生, 2. 内标, 3. d-萘普生。

分离方法多采用反相或反相离子对色谱。

§ 7-3 结 论

近年来由于方法的不断发展,手性 HPLC 法已成为测定光学异构体较为理想的方法,分离效果好,速度快,灵敏度高,应用面广,优于其他方法。在一种对映体中另一对映体的含量在 0.1% 以下都可准确测出。制备性分离也得到可喜的结果,几克或几十克样品,一次分离可以得到两种光学异构体的纯品。

手性 HPLC 的三种方法中发展最快的是 CSP 法,这种方法使用简便,适用面广,稳定性好,定量分析准确,可用于常规和生物样品分析,也适用于制备性分离。但固定相价格昂贵,每种固定相都有一定的使用范围,有时需要将样品进行衍生后才能测定。

CMP 法虽兼有不需衍生化反应和特殊固定相,缺点是手性添加剂价格比较贵,有时需自己制备,分离化合物的范围有限,制备分离比较麻烦。

间接拆分法分离效果好,分离条件简便,但需要

氨基酸与邻苯二甲醛及巯基乙醇反应,生成具有强荧光衍生物,可用于氨基酸的测定。如以光学纯的半胱氨酸代替巯基乙醇,可用于氨基酸对映体的拆分^[74],柱前或柱后衍生皆可,反应情况如下图:

高纯度的衍生试剂,操作比较麻烦,多半在其他方法无法实现时,才加以采用。如需制备分离,要在衍生物分离后,再进行分解反应,才能得到所需产物。

手性 HPLC 虽取得很大的进展,但仍有不足之处,研究仍在进行中。相信随着这一方法的推广应用,将使药物研究、生产和质量控制提高到一个新的水平。

参 考 文 献(续前)

[50] V. A. Davankov et al., *J. Chromatogr.*, 218, 547(1981).
 [51] J. Hermanssor, *J. Chromatogr.*, 316, 537(1985).
 [52] C. Pettersson et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 221 (1986).
 [53] C. Pettersson et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 269(1986).
 [54] J. Debowski et al., *Chromatographia*, 16, 198(1982).
 [55] D. Sybilka et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 591(1986).
 [56] Y. Nobukara et al., *J. Chromatogr.*, 258, 276(1983).
 [57] M. Gazdag et al., *J. Chromatogr.*, 351, 125(1986).
 [58] A. Dobashi et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 243(1986).
 [59] W. F. Lindner et al., *Anal. Chem.*, 51, 433(1979).
 [60] P. E. Hare et al., *Science*, 204, 1226(1979).
 [61] W. F. Lindner et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 551(1986).
 [62] C. Pettersson et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 269(1986).
 [63] J. Gal, *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 673(1986).
 [64] A. J. Sedman, *J. Chromatogr.*, 278, 199(1983).
 [65] K. Miller, *J. Chromatogr.*, 307, 335(1984).
 [66] N. Nimura et al., *J. Chromatogr.*, 202, 375(1980).
 [67] T. Kinoshita et al., *J. Chromatogr.*, 210, 77(1981).
 [68] N. Nimura et al., *J. Chromatogr.*, 316, 547(1984).
 [69] T. Nambara et al., *Anal. Chim. Acta*, 101, 111(1978).
 [70] G. Helmchen et al., *Chromatographia*, 7, 713(1974).
 [71] J. Goto et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 683(1986).
 [72] W. H. Pirkle et al., *J. Chromatogr.*, 123, 400(1976).
 [73] J. Goto et al., *J. Chromatogr.*, 239, 559(1982).
 [74] N. Nimura et al., *J. Chromatogr.*, 352, 169(1986).

(收稿日期: 1989年6月15日)