

• 研究论文 •

β -环糊精衍生化胰酶的合成及其手性分离性能研究

戴荣继^{*a} 佟斌^c 唐力^{a,c} 邓玉林^a 傅若农^d

(^a北京理工大学生命科学与技术学院 北京 100081)

(^b北京理工大学材料科学与工程学院 北京 100081)

(^c浙江万里学院环境科学系 宁波 315100)

(^d北京理工大学理学院化学系 北京 100081)

摘要 研究了 β -环糊精衍生化胰酶的合成以及作为毛细管电色谱手性选择剂的分离性能. 利用乙二醇二环氧丙烷醚作为交联剂, 将 β -环糊精接枝到胰酶蛋白的主链, 得到了 β -环糊精衍生化胰酶. 将其通过化学键合连接到毛细管柱内壁, 制备了 β -环糊精衍生化胰酶毛细管电色谱柱. 在加压毛细管电色谱模式下, 利用该柱分离了色氨酸、扑尔敏、布洛芬、异丙嗪和阿托品等对映异构体, 得到了理想的分离效果, 且在分离扑尔敏时, 随着电压的增加, 对映异构体分离的分离度和相对保留时间均增加.

关键词 β -环糊精; 胰酶; 手性分离; 毛细管电色谱

Synthesis and Properties of β -Cyclodextrin Derivatized Pancreatin Used as Chiral Selector in CEC

DAI, Rong-Ji^{*a} TONG, Bin^c TANG, Li^{a,c} DENG, Yu-Lin^a FU, Ruo-Nong^d

(^a School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

(^b School of Materials Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

(^c Department of Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100)

(^d Department of Chemistry, School of Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

Abstract The synthesis and properties of β -cyclodextrin derivatized pancreatin used as chiral selector were investigated in this paper. Such β -cyclodextrin derivatized pancreatin was synthesized using β -cyclodextrin and protein in the presence of ethylene glycol diglycidyl ether in boric acid buffer at pH value 8.7. Amino group was coated on the internal surface of the silica capillary by sol-gel technology with triethoxymethylsiloxane and (3-aminopropyl)trimethoxysiloxane. Covalent binding of β -cyclodextrin derivatized pancreatin was performed by glutaraldehyde. Tryptophan, chlorpheniramine, ibuprofen, promethazine and atropine were baseline separated by β -cyclodextrin derivatized pancreatin in pressure capillary electrochromatography. High resolution and large relative retention time were obtained at high operation voltage in the separation of chlorpheniramine.

Keywords β -cyclodextrin; pancreatin; chiral separation; capillary electrochromatography

环糊精及其衍生物是目前最常用和应用最广泛的手性选择剂^[1-5], β -环糊精原料易得, 空腔大小适中, 所以广泛地应用于手性化合物的分离和分析. 但是 β -环糊精

水溶解性较差, 手性分离中一般使用 β -环糊精衍生物, 包括中性衍生物、负电荷衍生物、正电荷衍生物和两性衍生物, 根据分离对象的不同选择不同的手性选择剂.

* E-mail: dairongji@bit.edu.cn

Received August 26, 2005; revised December 14, 2005; accepted March 6, 2006.

国家自然科学基金(No. 20275004)、北京理工大学基础研究基金(No. BIT-UBF-200306B06)资助项目.

蛋白质与药物存在立体作用, 也被用于手性选择剂^[6-10]. 几种蛋白质作为手性固定相成功应用于 HPLC, CE 等, 例如牛血清白蛋白、人血清白蛋白、 α -酸性糖蛋白、抗生物素蛋白、伴清蛋白、纤维素酶、卵粘蛋白、纤维素二糖水解酶和罗蛋白等. 根据所使用的 pH 值的不同, 蛋白质可带负电和正电. 它们带电的性质使其具备电迁移, 可用来分离碱性的和酸性物质.

我们实验室^[11-13]曾经研究了多种氨基酸衍生化的 β -环糊精的制备及其分离性能, 许多化合物得到了良好的分离. 本研究中合成了 β -环糊精衍生化的胰酶, 将其键合在毛细管柱内壁, 用加压毛细管电色谱成功分离了色氨酸、扑尔敏、布洛芬、异丙嗪和阿托品等对映异构体, 得到了理想的分离效果. 根据我们查阅相关文献的结果, 目前还没有关于环糊精衍生化蛋白质或者环糊精衍生化胰酶的合成以及它们作为手性选择剂分离手性化合物的报道.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

试剂: β -环糊精(食品级, 98%, 广东省郁南县环糊精厂), 胰酶(胰蛋白酶, 胰淀粉酶, 用 32.3% 混悬, Sigma), 乙二醇二环氧丙烷醚和 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(Fluka), 其它化学试剂为分析纯或者化学纯试剂.

仪器: FTIR 仪(Bruker Equinox 55), 毛细管电色谱仪 TriSepTM-2010 GV(上海通微公司), i.d. 50 μ m 弹性石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂).

1.2 β -环糊精衍生化胰酶的合成

将 1 g 胰酶(BSA)和 1 g β -环糊精(β -CD, 使用前二次重结晶)溶解于 50 mL 50 mmol/L 的硼酸盐缓冲溶液(pH=8.7, 使用四硼酸钠和盐酸配制)中, 然后加入 0.25 mL 乙二醇二缩水甘油醚(EGDE), 混合溶液在 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 反应液为无色透明澄清的液体.

将反应液冷却到室温, 取分子透过量为 2500~3500 D 的透析袋 40 cm, 扎紧一端, 将反应液灌入透析袋中, 扎紧另一端. 将透析袋置于水槽中, 注入纯净水, 并加以缓慢搅拌, 大约 2~3 h 换一次透析袋外的纯净水, 直至水槽中的水呈 pH 中性, 用 AgNO_3 检测, 水中不含 Cl^- 为止. 这样反应液中的盐及其它小分子已被除去. 将除盐后的溶液冷冻干燥, 得到 1.1 g 白色片状晶体, FTIR (KBr) ν : 3500~3000, 1650, 1550, 1031 cm^{-1} ; MS (MALDI-TOF): 26010 (胰酶, 23329).

1.3 β -环糊精衍生化胰酶毛细管电色谱柱的制备

1.3.1 毛细管预处理

取 60 cm 长, 50 μ m 内径的石英毛细管(毛细管尺寸

根据实验需要而定), 用 1 mol/L NaOH 泡洗 2 h 以上, 接着用水和甲醇顺序清洗各 10 min, 再用氮气加热吹干, 备用.

1.3.2 氨基毛细管的制备

取 0.1 mL 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(3-APS)试剂和 0.06 mL 三乙胺, 溶于 5 mL 干燥的甲苯中, 混匀后吸入 5 mL 注射器, 使用手动泵, 利用注射器推产生正压将混合液注入毛细管中, 数分钟后用氮气吹干, 放置于恒温干燥箱中, 于 100 $^{\circ}$ C 反应 12 h 以上即可.

1.3.3 β -环糊精衍生化胰酶涂层

取氨基毛细管柱, 使用手动泵注入 5% 戊二醛溶液(配制于 pH=7.0, 100 mmol/L 的磷酸缓冲溶液中), 室温反应 5 h. 用磷酸盐缓冲溶液(100 mmol/L, pH=7.0)冲洗 15 min, 然后注入饱和 β -环糊精衍生化胰酶(配制于 pH=7.0 的 100 mmol/L 磷酸盐溶液中), 过夜反应. 磷酸盐缓冲溶液(100 mmol/L, pH=7.0)冲洗后, 用氮气吹干, 备用.

1.4 手性毛细管电色谱分离

取二次去离子水, 用 0.2 μ m 的醋酸纤维树脂膜过滤, 经过脱气后, 冲洗系统约 30 min; 安装上手性毛细管柱, 将纯净水换为磷酸盐缓冲溶液, 平衡柱子, 同时开启氙灯预热, 约 0.5 h 后, 基线基本平稳; 调整适当的电压值与缓冲液流速. 每次分析后均用缓冲溶液冲洗, 再进行下次实验. 紫外检测波长调节在药物各自的最大吸收波长处.

2 结果与讨论

2.1 β -环糊精衍生化胰酶的合成

用乙二醇二缩水甘油醚(EGDE)作为交联剂, 采用温和的反应条件以及后续使用透析袋除盐, 使用冷冻干燥法获得产物, 都是为了能够尽可能地保持蛋白质的活性. EGDE 是非常活泼的交联剂, 在非常温和的条件下可用于多种物质的交联, 包括蛋白质的交联, 以及多糖的交联. β -环糊精衍生化胰酶的合成如图 1 所示.

本研究采用了傅立叶红外光谱(FTIR)与基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)两种测定方法进行产物的结构测定. β -环糊精胰酶的谱图中存在胰酶的特征吸收峰: 1650 和 1550 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ 伸缩和 $\text{N}-\text{H}$ 变形振动)和在 1200~1000 cm^{-1} 处 β -CD 的特征吸收谱带. 从红外光谱图数据可以说明产物中蛋白质与 β -CD 是同时存在的.

MALDI-TOF MS 的中分子离子峰数据显示, 胰酶与 β -CD 已经键合, 从 MALDI-TOF MASS 的结果可以看出键合上的两个 β -CD. β -CD 胰酶的分子量为 26010,

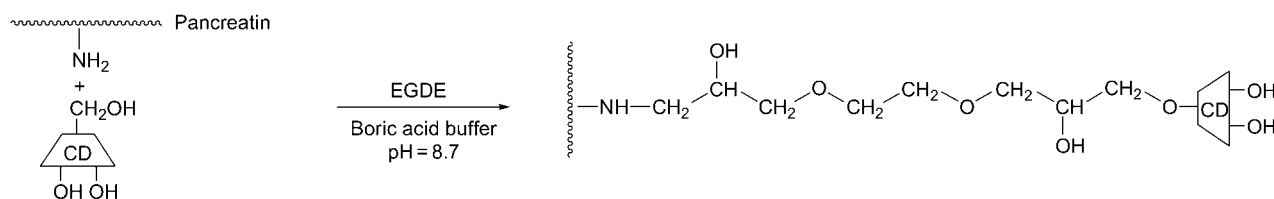
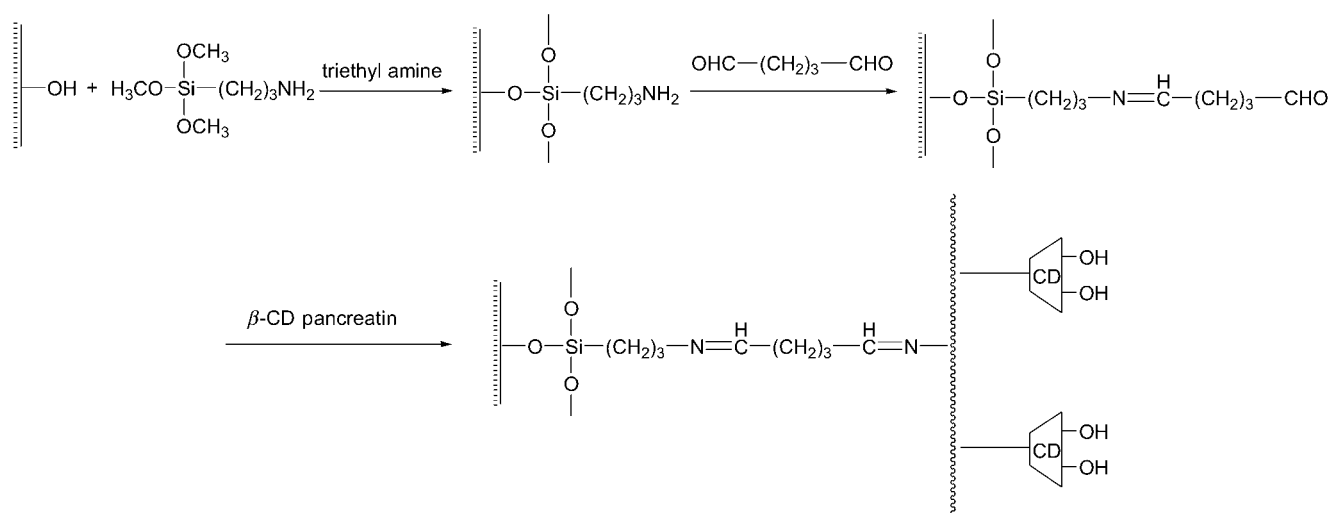


图1 环糊精衍生化蛋白质的合成

Figure 1 The synthesis of β -cyclodextrin derivatized pancreatin图2 β -环糊精衍生化胰酶毛细管电色谱柱的制备Figure 2 The preparation of β -cyclodextrin derivatized pancreatin capillary column

胰酶的分子量为 23329, 两个分子量之差为 2681, β -CD 的分子量为 1135, 平均在胰酶上键合 2.36 个 β -CD, 这是由于胰酶本身是一种混合酶, 另一方面是因为环糊精在胰酶上交联的数目不一致是混合物所造成的。

2.2 毛细管电色谱柱的制备

毛细管电色谱柱的制备分为四个步骤: (1)毛细管内壁活化, 利用氢氧化钠处理毛细管柱内壁, 使毛细管内壁的硅羟基充分活化; (2)氨基毛细管柱的制备; (3)毛细管柱内壁引入醛基; (4) β -环糊精衍生化胰酶的化学键合。制备方法如图 2 所示。

2.3 对映异构体分离

使用 β -环糊精胰酶涂层毛细管, 在 CEC 模式下考察了对色氨酸、扑尔敏、异丙嗪、阿托品和布洛芬等对映异构体的分离。

2.3.1 电色谱中电流(I)与电压(U)的关系

选择的所加电压范围是 $-10 \sim -20$ kV。表 1 列出了在 $\text{pH}=7.0$, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液的条件下, 电流值随电压变化的数据。在所选的电压范围中, 电流值与电压值基本上呈线性关系。

表1 电流值随电压的变化

Table 1 The relationship of U - I

Item	1	2	3	4	5	6
U/kV	-10	-12	-14	-16	-18	-20
$I/\mu\text{A}$	6.8	8.9	11.8	12.8	14.0	15.1

2.3.2 缓冲溶液 pH 值对分离的影响

使用 β -环糊精胰酶涂层毛细管, 研究了 pH 值对手性分离结果的影响, 同样选用弱酸性的条件下进行实验, pH 值的范围在 $3.5 \sim 7.0$ 之间, 表 2 列出了各个对映异构体的分离情况。

表中 R_s 为分离度, 指相邻两色谱峰保留值之差与两峰底宽平均值之比, 用下面的公式(1)计算:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

α 为相对保留时间, 近似用下面的公式(2)计算:

$$\alpha = \frac{t_1}{t_2} \quad (2)$$

表2 缓冲溶液 pH 值对手性分离的影响
Table 2 The influence of pH on the chiral separation results

Compound	pH									
	3.5		4.0		5.0		6.0		7.0	
	R_s	α	R_s	α	R_s	α	R_s	α	R_s	α
Tryptophan	0.89	1.14	—	—	—	—	—	—	—	—
Chlorpheniramine	1.57	1.24	3.02	1.28	0.92	1.15	—	—	—	—
Ibuprofen	—	—	—	—	0.51	1.15	0.50	1.12	—	—
Promethazine	—	—	0.82	1.13	—	—	—	—	—	—
Atropine	—	—	0.57	1.21	0.83	1.18	0.76	1.16	—	—

式中 t_1 和 t_2 分别代表两种对映体的迁移时间, w_1 和 w_2 分别代表两对映体的峰底宽. 一般来说, 当 $R_s < 1.0$ 时, 两峰总有部分重叠; 当 $R_s = 1.0$ 时, 两峰能明显分离; $R_s \geq 1.5$ 时, 两峰已完全分离, 即达到基线分离.

从表 2 中可以看到, 对于不同的化合物具有不同的最佳分离 pH 值. 布洛芬与阿托品在 pH 值范围 4.0~6.0 之间都可以有一定程度的分离, 且在 pH 值为 5.0 时有最佳的分离度, 分别是 0.51 和 0.83; 使用 β -环糊精胰酶涂层毛细管, 扑尔敏得到了很好的分离, 在 pH=4.0 时, 达到了 3.02 的分离度, 在其他的 pH 值下也有很好的分离效率, 但是 pH 值大于 5.0 后就不能够得到分离. 色氨酸需要在酸性稍强的条件下即 pH=3.5 得到分离, 而异丙嗪则在 pH=4.0 得到分离.

这是由于在不同 pH 条件下, 各种化合物与手性选择剂的作用力不同, 而且在不同 pH 条件下物质的荷电情况也发生变化, 从而导致分离结果的变化^[15].

2.3.3 电压对分离的影响

本实验在 -10~-20 kV 的范围内进行. 固定 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=4.0), 0.1 mP 的柱压, 210 nm 检测波长, 对扑尔敏进行改变电压的分离实验. 图 3

为扑尔敏在不同电压下的分离图.

从以上的数据中可以看出, 随着工作电压的增大, 扑尔敏的分离度有很明显的提高, 这是由于在手性环境下, 对映异构体周围的电荷发生了变化^[14,15], 两个对映异构体所带的电荷不同, 电压对分离效果产生了较大影响.

但是, 当电压过大时, 会产生较大的焦耳热, 曾观察到在 -15 kV 以上电压时, 经过很短时间, 即出现基线不稳, 且有气泡产生. 因此, 分离电压不宜高过 -15 kV.

3 结论

利用乙二醇二环氧丙烷醚作为交联剂, 成功制备了 β -环糊精衍生化胰酶. 通过化学键合制备了 β -环糊精衍生化胰酶毛细管电色谱柱. 利用加压毛细管电色谱, 该柱分离了色氨酸、扑尔敏、布洛芬、异丙嗪和阿托品等对映异构体, 得到了良好的分离效果. 在分离扑尔敏时, 随着电压的增加, 对映异构体分离的分离度和相对保留时间都增加.

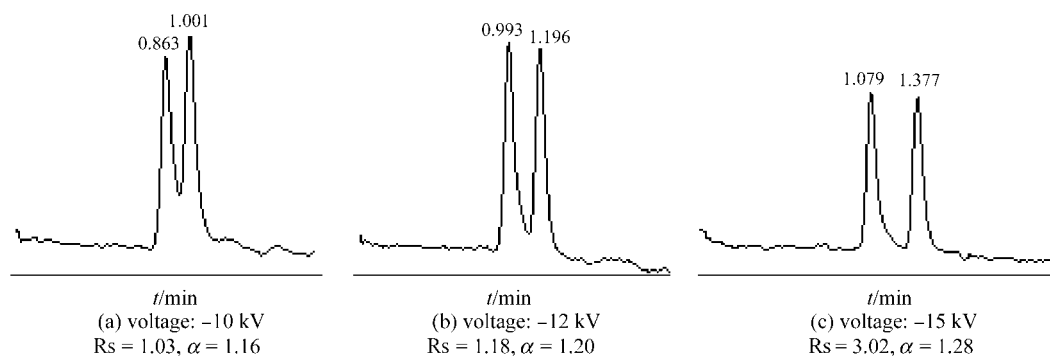


图3 扑尔敏在不同电压下的分离图

分离条件: 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, pH=4.0, 柱压: 0.1 mP, 检测波长: 210 nm

Figure 3 The chromatograms of chlorpheniramine under different operation voltages

Separation condition: 20 mmol/L phosphoric acid buffer, pH=4.0; pressure, 0.1 mP, detection wavelength, 210 nm

References

- 1 Ren, S. F.; Wang, H. Y.; Guo, Y. L. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 1959 (in Chinese).
(任士芳, 王昊阳, 郭寅龙, 化学学报, **2004**, *62*, 1959.)
- 2 Lu, H. J.; Yu, C. T.; Guo, Y. L. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 882 (in Chinese).
(陆豪杰, 余翀天, 郭寅龙, 化学学报, **2002**, *60*, 882.)
- 3 Fillet, M.; Bechet, I.; Hubert, H. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1107.
- 4 Cravotto, G.; Bicchi, C.; Tagliapietra, S. *Chirality* **2004**, *16*, 526.
- 5 Mayr, B.; Schottenberger, E. O. *J. Chromatogr. A* **2002**, *973*, 115.
- 6 Haginaka, J. *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 235.
- 7 Haginaka, J. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 253.
- 8 Tanaka, Y.; Terabe, S. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 103.
- 9 Lloyd, D. K.; Aubry, A. F.; Lorenzi, E. D. *J. Chromatogr. A* **1997**, *792*, 349.
- 10 Blanco, M.; Valverde, I. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 428.
- 11 Dai, R. J.; Zhang, S.; Fu, R. N. *Acta Chim. Sinica* **1998**, *56*, 594 (in Chinese).
(戴荣继, 张姝, 傅若农, 化学学报, **1998**, *56*, 594.)
- 12 Dai, R.-J.; Zhang, S.; Fu, R.-N. *J. Beijing Inst. Technol.* **1998**, *18*, 159 (in Chinese).
(戴荣继, 张姝, 傅若农, 北京理工大学学报, **1998**, *18*, 159.)
- 13 Dai, R. J.; Tong, B.; Fu, R. N. *J. Beijing Inst. Technol.* **2004**, *13*, 206.
- 14 Deng, Y.; Zhang, J.; Tsuda, T.; Yu, P. H.; Boulton, A. A.; Cassidy, R. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4586.
- 15 Fanali, S.; Catarcili, P.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3131.

(A0508263 QIN, X. Q.; ZHENG, G. C.)