

## · 药物分析 ·

## 毛细管电泳手性拆分方法的研发策略

陈伟成<sup>1</sup>, 刘长海<sup>2a</sup>, 张海<sup>2b</sup>, 朱臻宇<sup>2a</sup>, 赵亮<sup>2b</sup>, 张国庆<sup>2b</sup>, 柴逸峰<sup>2a</sup> (1. 上海市南汇区中心医院药剂科, 上海 201300; 2. 第二军医大学, a. 药学院药物分析教研室, 上海 200433; b. 东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438)

**[摘要]** 本文总结了毛细管电泳手性拆分的基本策略、分离条件选择策略、环糊精体系的选择, 并提出毛细管电泳手性拆分方法的一般研究与开发策略, 可为以后的毛细管电泳手性分离分析提供借鉴与思路。

**[关键词]** 毛细管电泳; 手性拆分; 研发策略

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)02-0130-04

## Research strategy of chiral separation by capillary electrophoresis

CHEN Wei-cheng<sup>1</sup>, LU Chang-hai<sup>2a</sup>, ZHANG Hai<sup>2b</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>2a</sup>, ZHAO Liang<sup>2b</sup>, ZHANG Guo-qing<sup>2b</sup>, CHAI Yi-feng<sup>2a</sup> (1. Department of Pharmacy, Shanghai Nanhui Central Hospital, Shanghai 201300, China; 2. Second Military Medical University, a Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Shanghai 200433; b Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

**[Abstract]** The selection method of separation condition and cyclodextrin and strategy of chiral separation by capillary electrophoresis were summarized, and a general research and development strategy was proposed, which can provide basis for chiral separation by capillary electrophoresis

**[Key words]** capillary electrophoresis; chiral separation; research strategy

建立毛细管电泳手性拆分方法是一个相当复杂而且耗时的工作。对于某对对映体来说, 很难预测何种手性选择剂对它的手性选择性更强。所以, 每次都要考察所有手性选择剂的选择性。为了建立准确、精密、快速、简便的分析方法。对于研发工作本身则是如何快速、有效的建立研究目标所需的方法, 不同的手性拆分方法的研发有一定的规律, 提供毛细管电泳手性拆分方法的研发策略, 可以为熟练者提供更高的工作效率, 为新手提供具体的思路和方法。本章根据课题的研究工作经验和体会, 结合文献资料, 提出毛细管电泳手性拆分方法的一般研究与开发策略。

### 1 手性拆分的基本策略

依据毛细管电泳的分离机理, 手性药物可分为 3 类, 即碱性、酸性和中性手性化合物。在用毛细管电泳作手性分离分析时, 不同类待测对映体的具体分离条件各有不同, 同一类待测对映体的具体分离条件也表现一定的规律性。根据实验和有关文献, 本文提出毛细管电泳手性拆分方法建立的一般策略<sup>[1]</sup>。

#### 1.1 对映体的分离分析 主要有“间接分析”和

“直接分析”两种方法。间接分析是让对映体与手性试剂进行化学反应, 可以使之转变成非对映异构体, 这样就能利用普通的毛细管电泳法进行分析。间接分析的优点是衍生化形成非对映异构体的理化性质差异大, 适合于色谱分析, 提高分离度, 且衍生化产物具有发光或荧光基团, 便于检测和提高检测灵敏度。局限性是: 衍生化引起分析方法快速、准确、精密和简便方面的指标降低; 需要高纯度的手性试剂, 这些试剂价格昂贵; 待测对映体必须具有可发生生化反应的活性基团; 衍生化反应条件要求温和、简便, 且反应要定量和完全。

1.2 直接分析 是在分析过程中引入手性环境, 手性环境可以通过 3 种方法构建, 即手性添加剂、手性填充毛细管 and 手性涂层毛细管。其中手性填充毛细管和手性涂层毛细管需要特别的制作方法, 推广有一定的难度; 而且这两种方法的重现性较差。手性添加剂法只需向电泳缓冲液中加入合适的手性选择剂, 对映体分子与手性选择剂形成具有不同稳定性的非对映体异构体包结复合物, 利用此差异进行分离分析。直接分析的关键是使对映体有足够大差异的手性环境, 以及高的分离效率<sup>[2-5]</sup>。

### 2 毛细管电泳手性分离条件选择策略

**[作者简介]** 陈伟成 (1964-) 男, 副主任药师, E-mail: wischn@126.com.  
**[通讯作者]** 柴逸峰, Tel: (021)81871203 E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

采用毛细管电泳拆分手性化合物时,有多种分离模式可供选择。从应用角度看应尽量选择相对简单的模式,因为模式简单,电泳中的操作参数就少,容易控制,比如选用凝胶电泳和毛细管电色谱等分离模式,必然会对柱子提出很高的要求,难以满足一般的用户,所以毛细管区带电泳是首选的操作模式,当然不排除考虑使用其它电泳操作模式。

### 2.1 手性添加剂的一般选择

**2.1.1 碱性手性化合物** 优先考虑使用电中性的不同类环糊精,包括环糊精、羟丙基-环糊精、二甲基-环糊精、三甲基-环糊精等,浓度可设在 4~40 mmol/L 之间,合适的 pH 值在 2.5 左右。

**2.1.2 酸性手性化合物** 优先考虑使用电中性的类环糊精,包括环糊精、羟丙基-环糊精、二甲基-环糊精、三甲基-环糊精等,浓度可设在 4~40 mmol/L 之间,比较合适的 pH 值在 4.5~5.5 之间,  $pK_a \pm 0.5$  单位左右对分离选择性敏感。

**2.1.3 中性手性化合物,或弱碱弱酸性化合物** 选用荷电的环糊精,首选环糊精类衍生物,最常用的是羧基取代或磺化的荷负电的环糊精以及氨基取代荷正电的环糊精。荷正电的羧基取代环糊精的 pH 一般为 4.0~6.0,磺化的环糊精的 pH 值适用范围较宽,在 3.0~7.0 左右。氨基取代带正电荷环糊精的 pH 适用范围小于 9.0,荷电环糊精的拆分浓度通常较低,一般在 3~15 mmol/L。为了保证分析物能出峰,注意缓冲液的 pH 值的选择。

**2.1.4 手性选择剂的一般选择流程** 根据化合物的  $pK_a$  的不同,分为碱性化合物、酸性化合物和中性化合物。各类型化合物的选择流程如图 1 所示<sup>[6]</sup>。

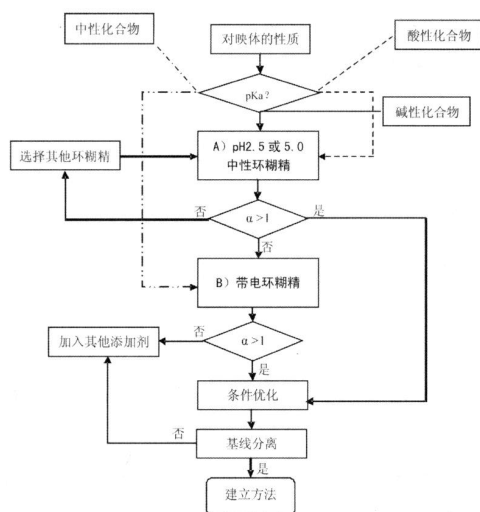


图 1 手性选择剂的一般选择流程  
分离因子

**2.1.5 根据化合物的结构选择手性选择剂** 若对映体的疏水母核上有长链,首先选择 6 位取代而 2、3 位没有取代的环糊精衍生物,如羟丙基-环糊精或羧甲基-环糊精,因为母核上长链与 2、3 位的取代基作用,空间位阻作用明显。若母核上没有长链,首先选择 2、3 位有取代的环糊精衍生物,因为 2、3 位的取代基较羟基有更强的手性选择性。

**2.1.6 二元环糊精和环糊精修饰-胶束电动色谱 (CD-MEKC) 体系的选择** 若按照手性拆分剂的一般选择流程,不能够手性分离化合物,就需要考虑用二元环糊精和 CD-MEKC 体系对化合物进行分离。

**2.1.7 根据化合物的结构选择手性选择剂** 若对映体的疏水母核上有长链,首先选择 6 位取代而 2、3 位没有取代的环糊精衍生物,如羟丙基-环糊精或羧甲基-环糊精,因为母核上长链与 2、3 位的取代基作用,空间位阻作用明显。若母核上没有长链,首先选择 2、3 位有取代的环糊精衍生物,因为 2、3 位的取代基较羟基有更强的手性选择性。

**2.2 二元环糊精和环糊精修饰-胶束电动色谱 (CD-MEKC) 体系的选择** 若按照手性拆分剂的一般选择流程,不能够手性分离化合物,就需要考虑用二元环糊精和 CD-MEKC 体系对化合物进行分离。

**2.2.1 二元环糊精体系** 二元环糊精体系是指缓冲液中同时存在两种环糊精作为手性选择剂。二元环糊精体系具有与相应的一元体系不同的机理,其独特的性质,将继续成为手性拆分的研究热点之一。一般而言,二元具有比一元更强的拆分能,其强大的拆分能力对手性拆分的实际应用将有大的促进作用。这种广泛的应用前景,在对于中性化合物的拆分中有明显的体现<sup>[7]</sup>。

**2.2.2 CD-MEKC 体系** 在环糊精缓冲液中加入十二烷基硫酸钠 (SDS) 或胆酸盐类等形成 CD-MEKC 体系可扩大其拆分范围,表面活性剂通常对环糊精还有增溶作用。使用 CD-MEKC 时对映体在胶束相、环糊精相和水相中分配,因为环糊精的手性识别能力 (使用手性胶束时,胶束相也具有手性识别能力) 而获得分离。CD-MEKC 特别适用于中性和疏水性化合物的分离<sup>[8]</sup>。在 CD-MEKC 体系中,加入离子对试剂可以改善手性识别,这与离子对高效液相色谱有相似之处。

**2.2.3 手性选择剂的补充选择流程** 根据化合物  $pK_a$  的不同,各类型化合物的选择流程如图 2 所示。

### 2.3 其他手性选择剂的选择

**2.3.1 手性冠醚** 对伯胺一般考虑采用手性冠醚作为手性选择剂。冠醚是另一类能形成主客体配合物的拆分剂。手性冠醚的 4 个手性碳上的羧基向两

侧交叉对应,对映体与其存在静电和位阻作用,产生具有手性差异的包结作用而获得分离<sup>[9]</sup>。由于冠醚毒性较大,应用时柱效相对较低,所以不及环糊精应用广泛。

性,可能具备广谱手性选择能力。但大环抗生素通常存在紫外吸收,使用间接紫外吸收或采用高波长紫外检测可解决部分问题。

### 3 毛细管电泳手性分离条件优化策略<sup>[10-18]</sup>

#### 3.1 直接寻优法

3.1.1 优化手性添加剂的浓度 试验不同的手性添加剂浓度优化分离条件。

3.1.2 优化 pH值 对与酸性和碱性对映体, pH对选择性的影响很大,低 pH对手性分离有利,但降低 pH又会使电渗下降,导致总迁移率降低。所以,需要调节缓冲液的 pH值,优化手性分离条件。首先对 pH进行粗调,以 0.5 为单位进行调节;然后再以 0.1 为单位微调。

3.1.3 优化柱温 在多数实验中,降低温度都会提高分离效率,低温有助于样品分子与手性选择剂发生相互作用,但对于蛋白质类手性选择剂时,要避免温度过低过高而使蛋白质变性。通常实验中只需考察 15、20、25,若有需要也可微调。

3.1.4 优化电压 对映体的出峰时间对电场强度很敏感,电场强度影响溶质在毛细管电泳中的停留时间,电场强度在分离过程中有一最佳值。

3.1.5 有机溶剂的优化 有些样品的水溶性差,可以通过向缓冲液中加入适量的有机溶剂如乙腈、甲醇来增溶。有机添加剂还可影响手性添加剂的溶解行为。

3.1.6 缓冲液电解质浓度的优化 增加缓冲液电解质浓度,可以降低电渗,改善分离,但随着电解质浓度的增加,又会使电流增加,增大焦耳热,不利于分离。

3.1.7 毛细管柱长和内径的优化 提高毛细管柱的柱长,提高分离度,但却延长了分离时间;增加柱内径,使电流增加,增大焦耳热,降低分离效率,但提高检测灵敏度。

3.1.8 进样量及样品的离子强度的优化 降低进样量会增加分离效率,所以在保证一定的灵敏度的情况下,尽量减少样品的进样量。降低样品溶液的离子强度,由于高离子强度样品会产生电弥散现象,用预处理方法降低样品的离子强度,以增加分离效率。

3.2 正交试验设计 正交试验设计 (orthogonal experimental design)是研究多因素多水平的一种设计方法,它是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验,这些有代表性的点具备了“均匀分散,齐整可比”的特点,正交试验设计是分式析因设计的主要方法。是一种高效率、快速、经济

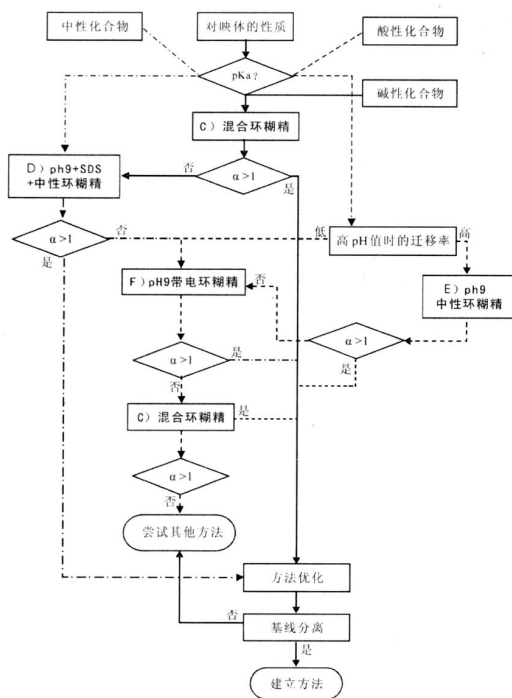


图 2 手性选择剂的补充选择流程  
分离因子

2.3.2 手性金属络合物 常用于氨基酸对映体的拆分。将  $\text{Cu}^{2+}$  等金属离子和手性氨基酸形成的金属离子配合物作为手性选择剂。 $\text{Cu}^{2+}$  与 氨基和羧基形成六元环配合物,当加入新的氨基酸时,对应的 氨基和羧基也将和  $\text{Cu}^{2+}$  形成五元环配合物结构,从而形成同时含有五元和六元环的三元配合物,对映体因与此络合物中的一个手性氨基酸进行配体交换而实现手性分离。利用配体交换络合法进行手性拆分仅限于氨基酸,范围较窄。

2.3.3 手性胶束 采用手性胶束包容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,不同于在 CD - MEKC 中,形成三相体系,增强环糊精的手性选择性。到目前为止,使用最多的手性胶束是胆汁盐,这种表面活性剂既具有疏水表面又具有亲水表面,而它的内部的疏水性却没有 SDS胶束那样强。

2.3.4 蛋白质 用蛋白质作为手性选择剂最适合于具有生物活性物质的对映体拆分。可作手性选择剂的蛋白质有牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵粘蛋白、纤维素酶、酸性糖蛋白等。

2.3.5 大环抗生素 大环抗生素具有多个手性中

的实验设计方法。

正交试验设计方法简单,在有限的几个试验中即有可能找到合适的条件,通用性强、适应面广,如以分离因子 $F$ 值作为最终分离的衡量指标,通过一些简单的数学表达式判断较好,而且可接受的实验结果所在的区域,一目了然,完全符合对映体分离分析的要求。

Perrin等采用四因素三水平和三因素二水平试验设计,只需9次和4次实验即完成了12种氨基酸的基线分离<sup>[17]</sup>。

**3.3 单纯形法** 单纯形法是一种系统的优化算法,通过在单纯形的各个顶点上进行实验,对各顶点的实验响应函数值(根据实验的各项结果综合考虑得出的一个对该方法进行总体评价的指标)进行比较,判断其变化趋势,作为下一步的实验条件参考。通过反射变换使单纯形不断移动到响应较好的区域,直至按照预定的精确度充分接近最优点。单纯形法无需考虑各实验参数之间的交互关系。

黄河舟等采用改良型单纯形法成功分离了9-硝基喜树碱和12硝基喜树碱。该法在最优化条件的搜索模式上比传统方法更科学,各个因子之间的交互作用不会影响最终结果,从而实现了电泳条件的综合优化,结果更优。也为“单纯形法”应用于手性拆分提供了借鉴<sup>[18]</sup>。

### 【参考文献】

- [1] 柴逸峰. 毛细管电泳法在手性药物分析中的基础和应用研究[D]. 第二军医大学, 2002.
- [2] 安登魁, 等. 现代药物分析选论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [3] 陈义. 毛细管电泳技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] 林炳承. 毛细管电泳导论[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] 丁文静. 几种手性药物的色谱和毛细管电泳拆分方法研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [6] Jimidar MI, Van Ael W, Van Nyen P, *et al*. A screening strategy for the development of enantiomeric separation methods in cap-

illary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(16): 2772.

- [7] 宫守凤, 何新亚, 林炳承, 等. 毛细管电泳手性拆分中的二元环糊精体系[J]. *化学进展*, 2001, 13(6): 450.
- [8] Cucinotta V, Giuffrida A, Maccarone G, *et al*. The 6-derivative of beta-cyclodextrin with succinic acid: a new chiral selector for CD-EKC[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(5): 1009.
- [9] Salami M, Jira T, Otto HH. Capillary electrophoretic separation of enantiomers of amino acids and amino acid derivatives using crown ether and cyclodextrin[J]. *Pharmazie*, 2005, 60(3): 181.
- [10] Yang WC, Yu AM, Yu XD, *et al*. Modeling and optimization of the chiral selectivity of basic analytes in chiral capillary electrophoresis with negatively charged cyclodextrins using electrochemical detection[J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(10): 2025.
- [11] Wistuba D, Schurig V. Recent progress in enantiomer separation by capillary electrochromatography[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(18): 4136.
- [12] Daali Y, Cherkaoui S, Christen P, *et al*. Experimental design for enantioselective separation of cefiprol by capillary electrophoresis using sulfated beta-cyclodextrin[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(17): 3424.
- [13] Rizzi AM, Kremser L. pKa shift-associated effects in enantioseparations by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(13): 2715.
- [14] Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, *et al*. Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioselectivity in capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(13): 2691.
- [15] Varesio E, Gauvrit JY, Longerey R, *et al*. Central composite design in the chiral analysis of amphetamines by capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(6): 931.
- [16] Wren SA, Rowe RC, Payne RS. A theoretical approach to chiral capillary electrophoresis with some practical implications[J]. *Electrophoresis*, 1994, 15(6): 774.
- [17] Perrin C, Vargas MG, Heyden YV, *et al*. Fast development of separation methods for the chiral analysis of amino acid derivatives using capillary electrophoresis and experimental designs[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 883: 249.
- [18] 黄河舟, 柴逸峰, 李吉学, 等. 改良型单纯形法优化硝基喜树碱的毛细管电泳分离[J]. *分析实验室*, 2004, 23(9): 29.

【收稿日期】 2009-10-21

【修回日期】 2009-12-03

(上接第 117页)

**3.3 盐酸小檗碱**为方中君药黄柏的主要药效成分,该成分的浸出效果代表了方中有效成分的浸出情况,且其含量测定有成熟方法,故选其为评价指标,权重系数定为0.6。同时总干浸膏的多少可以作为大类成分间接控制的一个指标,所以选择其作为评价指标之一,权重系数定为0.4。通过加权计算综合得分评价提取工艺,最终筛选出三黄解毒乳膏中药材的最佳提取工艺。

### 【参考文献】

- [1] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 299.
- [2] 谢华, 贾云志. 正交试验优选复方苦黄乳膏乳化工艺[J]. *中国药房*, 2008, 19(3): 190.
- [3] 赖庆宽, 廖芳, 李世娟, 等. 左金丸提取工艺的优化研究[J]. *中成药*, 2008, 30(10): 1560.

【收稿日期】 2009-09-08

【修回日期】 2009-11-05