

手性氨基酸的毛细管电泳拆分研究

程 燕, 白 敏, 石运伟, 明永飞, 尤进茂

(曲阜师范大学 化学科学学院, 山东 曲阜 273165)

摘 要: 以咔唑-9-乙基氯甲酸酯 (CEOC) 作柱前荧光衍生试剂, 在毛细管区带电泳和胶束电动色谱条件下, 以不同配比的 β 环糊精 (β -CD) 和脱氧胆酸钠 (SDC) 作手性选择剂, 在两种不同分离模式下, 对氨基酸衍生物进行了手性分离, 同时对分离过程中的相关参数进行了优化, 分别实现了 8 种和 10 种氨基酸的快速手性分离。

关键词: 手性分离; 毛细管电泳; 氨基酸; β 环糊精; 脱氧胆酸钠

中图分类号: O657.8; Q517 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)02-0052-04

Chiral Separation of Amino Acids by Capillary Electrophoresis

CHENG Yan, BA IM in, SHI Yun-wei, MING Yong-fei, YOU Jin-mao

(Chemical Science College, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract: Simple and rapid methods for the chiral separation of amino acid enantiomers using 9-(2-carbazole) ethyl chloroformate (CEOC) as derivation reagent by capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with diode array detector at 235 nm have been developed. Based on cooperative effect of binary chiral selectors, β -cyclodextrin (β -CD) and sodium deoxycholate (SDC) were investigated as chiral selectors, and the optimum molar ratio of β -CD to SDC for the chiral separation of each of amino acid enantiomers was obtained. Under CZE and MEKC separation modes, eight and ten pairs of amino acid enantiomers were separated with a good baseline resolution respectively. At the same time, the effect of some important parameters on the chiral separation was also investigated.

Key words: Chiral separation; Capillary electrophoresis; Amino acids; β -Cyclodextrin; Sodium deoxycholate

氨基酸是生命有机体的重要组成部分, 在生物学、化学和医药等领域中具有广泛的应用, 其对映体在蛋白质的研究、有机化学中的不对称合成中具有重要意义。尽管氨基酸对映体的拆分多采用高效液相色谱 (HPLC)^[1-2] 和气相色谱 (GC)^[3], 然而这两种方法不仅分析时间长, 而且手性固定相的制备成本昂贵。毛细管电泳以其分离效率高、分析速度快、费用低廉等优点成为解决手性分离的关键技术^[4-5]。特别在毛细管区带电泳 (CZE) 和胶束电动色谱 (MEKC) 模式下的手性分离得到广泛普及。

氨基酸分离通常采用的衍生试剂有: 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC)^[6]、5-二甲氨基萘-1-磺酰氯 (DNS-Cl)^[7]、邻苯二甲醛 (OPA)^[8]。在这些衍生试剂中, FMOC 衍生操作过程繁琐且易造成疏水衍生物的丢失, DNS-Cl 试剂稳定性较差, OPA 试剂有较高的灵敏度和选择性, 但它仅能与伯氨基酸反应。本文所采用的新型试剂咔唑-9-乙基氯甲酸酯 (CEOC) 对氨基酸的衍生简单, 衍生物稳定性高, 衍生物溶液不必预处理可直接进样分析。

在 CE 的手性分离中, 二元手性选择剂如中性和荷电环糊精的混合使用可以提高选择性和分离度^[9]。同样, 环糊精和手性表面活性剂如胆汁酸的混合使用也是提高分离的一种有效方式, 在 Okafu 等的工作中已证明^[10]。本文在 CZE 和 MEKC 两种模式下以 CEOC 作为柱前衍生试剂, 以 β 环糊精 (β -CD) 和脱氧胆酸钠 (SDC) 为拆分体系^[11], 考察并优化了氨基酸衍生物的手性分离条件, 获得满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-3D 毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司)。毛细管总长 48.5 cm, 有效柱长 40 cm, 内径 50 μ m (河

收稿日期: 2005-04-13; 修回日期: 2005-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20075016)

作者简介: 程 燕 (1980-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生; 尤进茂, 联系人, Tel: 0537-4458501, E-mail: jmyou6304@163.com

北永年光纤厂)。Milli-Q型超纯水系统。PHS-3C精密 pH计(上海精密科学仪器有限公司)。

*D,L*氨基酸(Met蛋氨酸; Tyr酪氨酸; Leu亮氨酸; Phe苯丙氨酸; Pro脯氨酸; Ala丙氨酸; Thr苏氨酸; Trp色氨酸; Val缬氨酸; Ile异亮氨酸)(美国 Sigma公司), β -环糊精(β -CD)、脱氧胆酸(deoxycholic acid)(美国 Sigma公司)。十二烷基硫酸钠(SDS)(分析纯, 进口分装, 武汉市鸿兴化工有限公司)。色谱纯乙腈(山东禹王集团化工厂)。三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(中国医药上海化学试剂公司)。其他试剂皆为分析纯。衍生试剂咪唑-9-乙基氯甲酸酯(CEOC)自制。

1.2 实验方法

1.2.1 样品衍生化 取 100 μ L 氨基酸 (1.0×10^{-3} mol/L) 放入安培瓶中, 依次加入 100 μ L pH 为 9.0 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲溶液, 100 μ L 无水乙腈, 150 μ L 衍生试剂 (1.0×10^{-3} mol/L), 静置 10 min, 向安培瓶中加入 20 μ L 30% (φ) 的醋酸溶液, 放置 5 ~ 10 min 后进样分析^[12]。

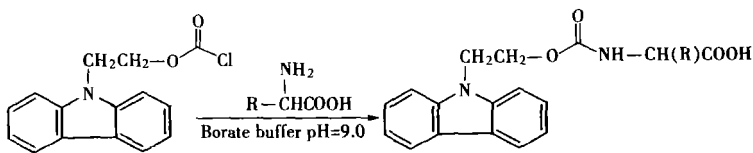


图 1 咪唑-9-乙基氯甲酸酯与氨基酸的衍生反应

Fig. 1 Derivatization of 9-(2-carbazole) ethyl chloroformate with amino acids

衍生化反应见图 1。

1.2.2 实验步骤 配制不同浓度的

不同 pH 值的三(羟甲基)氨基甲烷-磷酸盐(Tris- H_3PO_4)缓冲溶液, 在不同电压和温度下, 采用 235 nm DAD 检测, 分别对氨基酸衍生物进行分离, 寻找最佳分离条件。

实验前, 对缓冲溶液进行超声脱气 10 min, 每次进样之前, 分别用 0.1 mol/L 的氢氧化钠、Milli-Q 超纯水、缓冲溶液冲洗毛细管柱 2 min; 更换缓冲液时, 需要分别冲洗 10 min。

2 结果与讨论

在硼酸盐、磷酸盐及 Tris- H_3PO_4 体系下, 考察了表面活性剂 SDS 和 β -CD 浓度对氨基酸手性分离的影响^[13], 结果发现 SDS 和 β -CD 总浓度在 28 ~ 78 mmol/L 之间变化时, 除 Ile 外, 其余均不能获得满意的手性分离。由于 β -CD 与 SDC 对化合物的手性分离具有协同作用, 且在电泳条件下具有不同的迁移速率, 因此本实验以 β -CD 与 SDC 为手性选择剂, 考察了两者的不同配比以及缓冲液的浓度、pH 等因素对手性分离的影响。

2.1 缓冲液浓度的影响

实验以硼酸盐、磷酸盐和 Tris- H_3PO_4 3 种不同缓冲体系为基准, 考察了它们对手性拆分的影响。结果表明 Tris- H_3PO_4 体系下的拆分效果要比单一的硼酸盐或磷酸盐体系好, 因此实验中选择 Tris- H_3PO_4 作为手性拆分的缓冲体系。在进样压力 5 kPa, 电压 12 kV, 柱温 23 $^{\circ}$ C, 缓冲溶液的 pH 为 9.0 的条件下, 以 Ala, Met, Pro, Phe 为代表, 缓冲液浓度在 40 ~ 80 mmol/L 范围改变时对分离度的影响结果见图 2。4 种氨基酸对映体的拆分均在缓冲液浓度为 60 mmol/L 获得最大分离度。

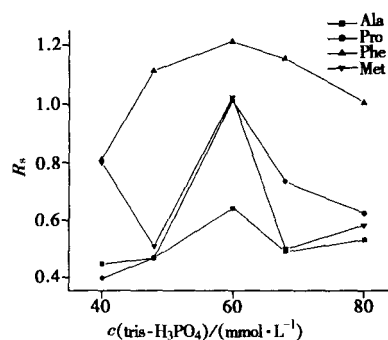


图 2 Tris- H_3PO_4 浓度对分离度的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of Tris- H_3PO_4 on chiral separation conditions: 1.8 mmol/L β -CD, 1.8 mmol/L SDC, pH = 9.0

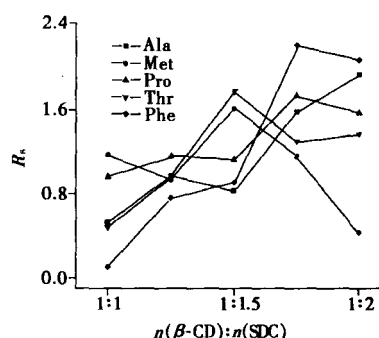


图 3 β -CD 和 SDC 的摩尔比对分离度的影响

Fig. 3 Effect of the molar ratio of β -CD to SDC on chiral separation conditions: 60 mmol/L Tris- H_3PO_4 , pH = 9.0

2.2 β -CD 和 SDC 摩尔比的影响

β -CD 和 SDC 两者用量比对氨基酸衍生物的手性拆分起着决定性作用^[14]。实际分离中, 单独使用两者中的任何一种都不能得到满意结果, 两者按一定比例混合后手性拆分效果十分显著。两者的这种协同作用很可能是 β -CD 选择性地与 *D* 型氨基酸结合, 而 SDC 选择性地与 *L* 型氨基酸结合。由于 β -CD 和 SDC 两者本身在电泳下具有不同的迁移速率, 导致氨基酸的 *D*、*L* 型对映体具有不同的迁移速率而获得满意分离。实验在保持 60 mmol/L Tris- H_3PO_4 , pH = 9.0 的条件下, 考察了

β -CD 与 SDC 不同的用量比, 对 5 种代表性氨基酸衍生物手性拆分的影响结果见图 3。由图 3 知, 5 种代表性的氨基酸 Ala、Met、Pro、Phe、Thr 分别在 $n(\beta\text{-CD}) : n(\text{SDC})$ 为 1 : 2, 1 : 1.5, 1 : 1.7, 1 : 1.7, 1 : 1.5 时具有最大分离度。氨基酸分离度随 β -CD 和 SDC 的摩尔比未显示规律性变化。实际分离中, 每种氨基酸的最佳拆分结果对应着不同的 β -CD 和 SDC 的摩尔比。其结果见表 1。

2.3 pH 值的影响

实验考察了 pH 变化对代表性的 Ala、Tyr、Leu、Phe、Pro 氨基酸的手性拆分的影响^[15]。结果表明, 在 pH 值 9.0 时, 5 种氨基酸衍生物的 D、L 型对映体迁移时间最短, 各对映体分离度基本达最大, 见图 4。实验选用缓冲溶液 pH 为 9.0。

2.4 有机添加剂、温度及电压对分离度的影响

实验考察了异丙醇、乙腈、甲醇 3 种有机添加剂对氨基酸衍生物手性分离的影响, 结果发现, 异丙醇、甲醇和乙腈的加入均不能明显改进分离度, 实际分离过程中未加有机添加剂。

比较了不同温度下氨基酸的手性拆分情况, 结果发现, 温度的变化对其分离影响不大, 本实验选择毛细管的分离温度为 23 $^{\circ}\text{C}$ 。

在适宜范围内, 柱效通常随外加电压的增大而提高。然而过高的电压, 又导致焦耳热加剧, 柱效反而降低。考虑到在不影响分离度的前提下, 减小分析过程的运行时间, 实验中采用 12 kV 的分离电压, 可获得满意结果。

2.5 氨基酸衍生物的手性拆分

在前述选定的色谱条件下, 采用两种不同的分离模式, 对 CEOC 氨基酸的衍生物进行了手性拆分, 拆分结果见表 1 (MEKC 模式) 和表 2 (CZE 模式)。CZE 模式下的 8 种氨基酸衍生物的出峰顺序均为 D 型先于 L 型。MEKC 模式下的 10 种氨基酸衍生物除 T₁p 是 L 型先于 D 型, 其它 9 种均为 D 型先于 L 型出峰。

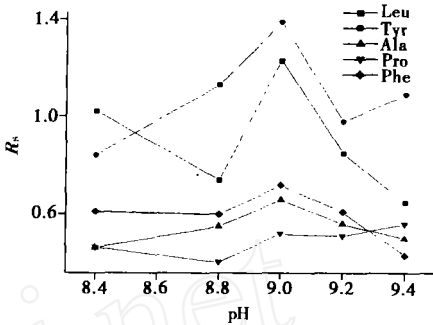


图 4 pH 对分离度的影响
Fig. 4 Effect of pH on chiral separation
conditions: 60 mmol/L Tris - H₃PO₄,
1.8 mmol/L β -CD, 1.8 mmol/L SDC

表 1 胶束条件下氨基酸衍生物最佳的手性分离参数 *

Table 1 The separation parameters of amino acid derivatives by MEKC

Amino acids	Retention time t/min		Capacity		Theory plates		Selectivity		Resolution R_s	Chiral selectors $c/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	t_1	t_2	k_1'	k_2'	N_1	N_2	α_1	α_2		$\beta\text{-CD}$	SDC
Met	14.62	15.04	2.20	2.30	55 050	60 984	1.08	1.03	1.69	18	30
Tyr	15.34	15.72	1.21	1.27	118 469	159 897	2.22	1.02	2.14	18	30
Leu	15.44	15.74	1.23	1.27	70 731	64 528	2.13	1.02	1.23	18	30
Phe	14.99	15.27	1.15	1.19	101 363	145 738	1.35	1.02	1.62	12	18
Pro	14.28	14.77	1.15	1.22	39 482	47 188	2.04	1.03	1.73	18	30
Ala	13.20	13.46	1.57	1.62	154 064	167 038	1.09	1.02	1.90	12	24
Thr	12.50	12.91	0.87	0.94	39 311	102 380	1.02	1.03	2.02	12	24
T ₁ p	15.55	16.10	1.18	1.27	64 467	30 585	1.29	1.04	1.98	12	24
Val	14.27	15.91	0.90	1.14	21 688	25 578	1.31	1.11	4.13	18	30
Ile	9.84	10.04	1.84	1.90	97 417	72 974	2.8	1.02	1.51	**	

* 60 mmol/L Tris - H₃PO₄, pH = 9.0; ** Ile separation conditions: 80 mmol/L borate, 30 mmol/L SDS, 12 mmol/L β -CD, 3% acetonitrile, pH = 10.0

表 2 区带条件下氨基酸衍生物最佳的手性分离参数 *

Table 2 The separation parameters of amino acid derivatives by CZE

Amino acids	Retention time t/min		Capacity		Theory plates		Selectivity		Resolution R_s	Chiral selectors $c/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	t_1	t_2	k_1'	k_2'	N_1	N_2	α_1	α_2		$\beta\text{-CD}$	SDC
Met	10.90	11.07	0.65	0.68	16 464	132 201	1.02	1.02	0.73	1.2	1.8
Tyr	7.42	7.54	0.56	0.58	18 501	142 137	1.80	1.80	0.84	1.2	1.8
Leu	7.56	7.68	0.58	0.60	39 090	147 375	1.51	1.02	1.09	1.2	1.8
Phe	7.49	7.61	0.65	0.68	23 156	258 005	1.31	1.02	0.97	1.2	1.8
Pro	10.85	11.05	0.68	0.71	11 887	117 566	1.58	1.02	0.76	1.8	1.8
Ala	10.84	10.10	0.70	0.72	9 751	158 347	1.09	1.01	0.55	1.8	1.8
Thr	9.87	10.09	0.59	0.62	4 534	79 582	1.59	1.02	0.60	1.8	1.8
T ₁ p	10.36	10.67	0.42	0.47	7 630	53 987	1.31	1.03	1.01	1.2	2.4

* 60 mmol/L Tris - H₃PO₄, pH = 9.0

按表 1 的优化条件，在胶束电动色谱条件下，10 种 CEOC 氨基酸衍生物手性拆分结果见图 5。区带电泳模式下，8 种 CEOC 氨基酸衍生物的手性拆分图略。就总体而言，两种不同的拆分模式都能获得一定的手性拆分效果。尽管区带电泳模式下，氨基酸衍生物拆分时间短，然而分离度略有下降。胶束电动色谱模式下，氨基酸衍生物拆分时间略有加长，但其分离度明显提高。

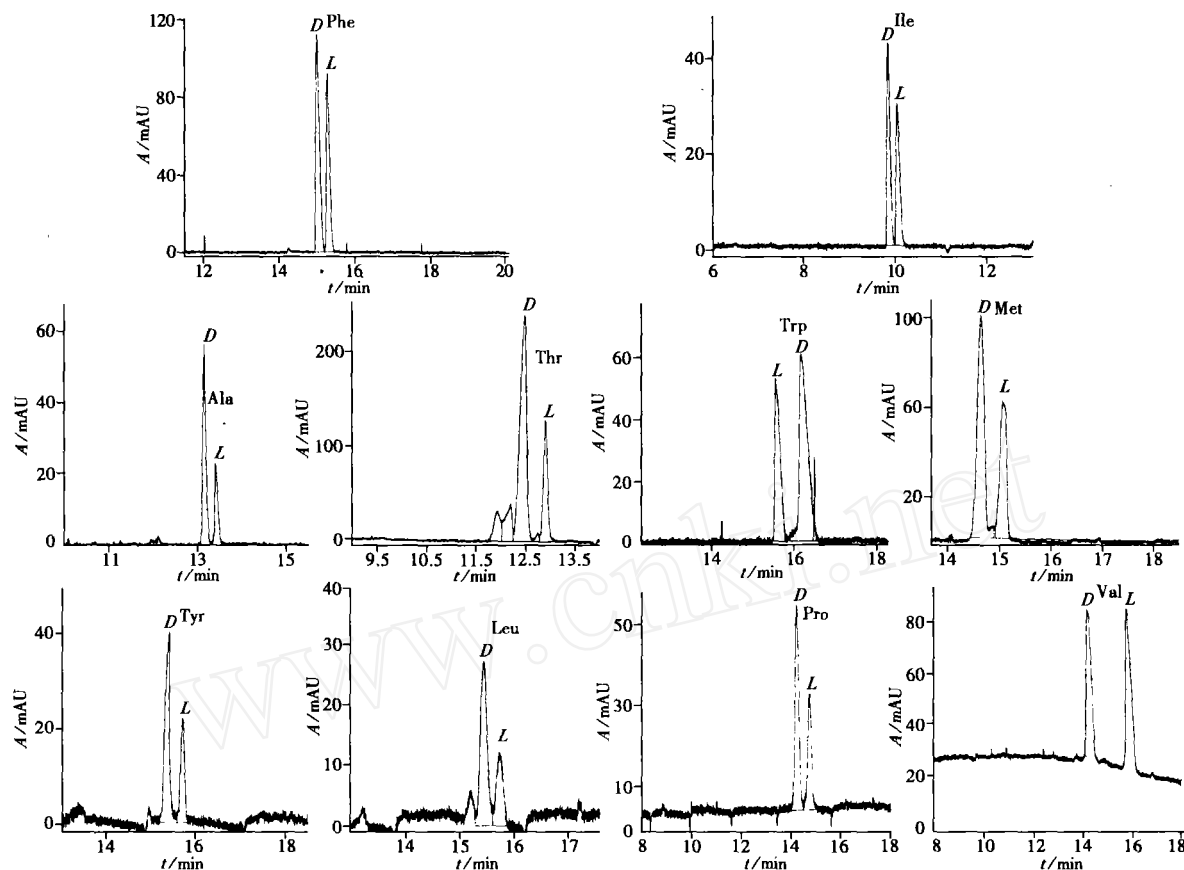


图 5 10 种氨基酸衍生物的手性分离

Fig. 5 Chiral separation of 10 pairs of amino acids derivatized by CEOC
conditions: pressure: 5 kPa, voltage: 12 kV, temperature: 23 ; DAD detection at 235 nm,
60 mmol/L Tris - H_3PO_4 , pH = 9.0, the concentration of β -CD and SDC see table 1

3 结 论

本实验在毛细管区带电泳模式下实现了 8 种氨基酸的手性拆分，在胶束电动色谱模式下实现了 10 种氨基酸的手性拆分。用 MEKC 拆分光学异构体分析时间短，效率高，选择性好，显示出独特的作用，具有强大的生命力。CD 与 SDC 的应用，大大开拓了分析范围，所建立的方法简单、快速、拆分环境友好，结果满意。

参考文献：

- [1] PIETTE V, LÄMMERHOFER M, LINDNER W. Enantiomer separation of N-protected amino acids by non-aqueous capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with tert-butyl carbamoylated quinine in either the background electrolyte or the stationary phase[J]. J Chromatogr, A, 2003, 987: 421 - 427.
- [2] 祝馨怡, 蔡迎春, 陈立仁, 等. α -氨基酸在 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相上的分离[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 17 - 20.
- [3] MOLNARI F, VALENTIM, POTENZA D. Determination of the enantiomeric composition of 1,2-diacylglycerols from olive oil by GC and ^{13}C NMR spectroscopy[J]. Ital J Food Sci, 1995, (7): 37 - 45.
- [4] 林炳承. 毛细管电泳导论[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 92 - 94.
- [5] 赵书林, 林向成, 沈江珊, 等. 非衍生芳香族蛋白氨基酸对映体的毛细管电泳手性拆分[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6): 8 - 10.

(下转第 59 页)

- [2] CHEN Y Q, WANG N, ZHANG P, et al. Molecular evidence identifies bloom-forming *Phaeocystis* (Prymnesiophyta) from coastal waters of southeast China as *Phaeocystis globosa*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30: 15 - 22
- [3] 董正臻, 董振芳, 丁德文. 快速测定藻类生物量的方法探讨[J]. 海洋科学, 2004, 28(11): 1 - 2
- [4] GOWER F R, DOERFFER R, BORSTAD G A. Interpretation of the 685 nm peak in water-leaving radiance spectra in terms of fluorescence, absorption and scattering, and its observation and scattering, and its observation by MERIS[J]. Int J Remote Sensing, 1999, 20(9): 1771 - 1786
- [5] 陈国珍, 黄贤志, 郑朱梓, 等. 荧光分析法(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 101
- [6] 马春琪, 刘 瑛, 李克安, 等. 瑞利光散射及其在生物化学分析中的应用研究[J]. 科学通报, 1999, 44(7): 682 - 690
- [7] LIN B, LUO H Q, LIU S P. Resonance Rayleigh scattering technology as a new method for the determination of the inclusion constant of β -cyclodextrin[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2002, 58: 501 - 507
- [8] HU X L, LIU S P, LIN B. Resonance Rayleigh scattering spectra for studying the interaction of aminoglycoside antibiotics with pontamine sky blue and their analytical applications[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 42 - 48
- [9] EULLAFFROY P, VERNET G. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae[J]. Water Research, 2003, 37: 1983 - 1990
- [10] JOAO S, RUI S. Can chlorophyll fluorescence be used to estimate photosynthetic production in the seagrass *Zostera noltii*? [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 307: 207 - 216
- [11] 蒋治良, 刘凤志, 刘绍璞, 等. 氯金酸罗丹明 S 缔合纳米微粒体系的共振散射增强与荧光猝灭研究[J]. 分析化学, 2003, 31: 1364 - 1368

(上接第 55 页)

- [6] KANG J W, YANG Y T, YOU J M. Fast chiral separation of amino acid derivatives and acidic drugs by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis with vancomycin as chiral selector[J]. J Chromatogr, A, 1998, 825: 81 - 87
- [7] DESDER D G, FANAL I S. Use of negatively charged sulfobutyl ether - cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr, A, 1995, 716: 183 - 196
- [8] YANG L, ZHANG D, YUAN Z. Enantioseparation of *o*-phthalaldehyde derivatized amino acids using - CD-modified micellar electrokinetic chromatography in the mixed aqueous - organic media[J]. Anal Chem Acta, 2001, 433: 23 - 30
- [9] FILLET M, PHILIP HUBERT. Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins[J]. J Chromatogr, A, 2000, 875: 123 - 134
- [10] OTSUKA K, TERABE S. Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants[J]. J Chromatogr, A, 2000, 875: 163 - 178
- [11] LU X N, CHEN Y. Chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection using mixed selectors of β -cyclodextrin and sodium taurocholate[J]. J Chromatogr, A, 2002, 955: 133 - 140
- [12] YOU J M, SHAN Y C, ZHEN L, et al. Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 9-(2-carbazole) ethyl chloroformate by reverse phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry[J]. J Anal Biochem, 2003, 313(1): 17 - 27
- [13] LELIÈVRE F, GAREL P. Selectivity in capillary electrophoresis: Application to chiral separation with cyclodextrins[J]. Anal Chem, 1997, 69: 385 - 392
- [14] 卢小宁, 陈 毅. 基于二元手性选择剂协同作用的毛细管电泳拆分氨基酸对映体研究[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23: 822 - 824
- [15] YANG L L, YUAN Z B. Comparison of enantioseparation of amino acid derivatives in aqueous and mixed aqueous - organic media by capillary zone electrophoresis[J]. Fresenius J Anal Chem, 1999, 365: 541 - 544