

# 二肽对映体的毛细管胶束电动色谱分离研究

赵书林 李舒婷

(广西师范大学化学化工系 桂林 541004)

**摘 要** 以羟丙基- $\beta$ -环糊精为手性选择剂, 甲醇为有机修饰剂, 对四种含有一个和两个手性中心的二肽对映体的毛细管胶束电动色谱分离进行研究。结果表明, 二肽经萘-2,3-二甲醛柱前衍生后, 各种旋光异构体能够由毛细管胶束电动色谱完全分离, 而采用毛细管区带电泳或无甲醇存在时, 均不能达到手性拆分。

**关键词** 电动色谱 手性分离 羟丙基- $\beta$ -环糊精 二肽

## Enantiometric Separation of Dipeptides with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin by Micellar Electrokinetic Chromatography

Zhao Shulin, Li Shuting

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

**Abstract** The enantiomeric separation of dipeptides with one and two stereogenic centers by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is described. The dipeptides were precolumne derivatized with a fluorescence tagging reagent, naphthalene-2,3-dialdehyde (NDA). In the presence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) as the chiral selector and methanol as organic modifier, NDA-tagged dipeptide enantiomers were well resolved by MEKC. However, without enantiomeric separation was achieved by using capillary zone electrophoresis or in the absence of methanol.

**Key words** Micellar electrokinetic chromatography, Chiral separation, Dipeptide, Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin

近年来, 蛋白质和肽类药物的发展, 已引起了人们的关注。许多含有一个或两个手性中心的二肽, 不仅是合成生物活性肽的原料, 而且在蛋白质和肽类手性药物的开发中, 发挥着重要作用。而在上述产品的开发过程中, 必须对原料、中间体和产品的光学纯度进行检验。另外, 近年来含有 *D*-氨基酸残基的肽和蛋白质, 也已发现存在于动物体内<sup>[1]</sup>。因此, 二肽对映体的拆分和测定, 对于手性药物的发展及生命科学的研究, 均具有重要的理论和实际意义。

毛细管电泳(CE)手性分离, 具有高效、快速、低耗等特点, 近年来已取得很大进展<sup>[2]</sup>。Martin 等<sup>[3]</sup>以手性冠醚为选择剂, 用毛细管区带电泳分离了一系列二肽对映体。Schmid 等<sup>[4]</sup>基于配体交换原理, 用 *N*-烷基-*L*-羟基脯氨酸为手性选择剂, 分离了六种具有一个手性中心的二肽。Sabah 等<sup>[5]</sup>以羧甲基- $\beta$ -环糊精为手性选择剂, 采用聚丙烯酰胺涂层毛细管柱, 分离了三肽对映体。在上述研究中, 目标分离物一般为含有芳环氨基酸残基的肽, 而对于不含芳环氨基酸残基的肽, 则很难进行检测。

赵书林 男, 45 岁, 教授, 主要从事毛细管电泳生物分析和有机分析试剂的合成研究。

广西科学基金资助项目(0236013)和广西教育厅科学基金资助项目

2002-09-10 收稿, 2003-05-19 修回

用萘-2,3-二甲醛(NDA)柱前衍生二肽, 由于衍生物含有多个芳环, 不仅具有很强的紫外吸收, 而且为高荧光物质<sup>[6,7]</sup>。可以采用紫外、荧光和激光诱导荧光等多种方式进行检测。另外, 由于衍生物的疏水性较大, 用毛细管胶束电动色谱(MEKC)分离, 可得到较高的分离效率。本文采用紫外检测法检测, 选择羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)为手性选择剂, 详细研究了用 MEKC 拆分各种类型(含有一个或两个手性中心, 含有芳环氨基酸残基或不含芳环氨基酸残基)NDA 衍生的二肽对映体的可能性, 初步探讨了其影响因素, 并建立了最佳分离条件。结果表明, 在本实验选定的条件下, 试验的各种二肽对映体, 均达到了基线分离。基于本文的分离条件, 结合激光诱导荧光检测技术<sup>[8,9]</sup>, 则可广泛应用于质量有限的生物样品分析。

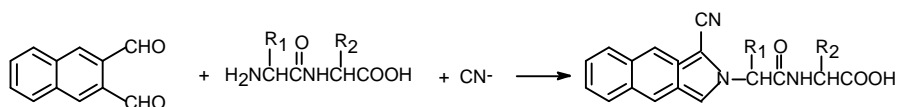
## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD 美国 Aldrich 公司)。D,L-亮氨酸-D,L-亮氨酸(D,L-Leu-D,L-Leu)、L-亮氨酸-L-亮氨酸(L-Leu-L-Leu)、D-亮氨酸-D-亮氨酸(D-Leu-D-Leu)、L-亮氨酸-D-亮氨酸(L-Leu-D-Leu)、D,L-亮氨酸-D,L-丙氨酸(D,L-Leu-D,L-Ala)、L-亮氨酸-L-丙氨酸(L-Leu-L-Ala)、D-亮氨酸-D-丙氨酸(D-Leu-D-Ala)、L-亮氨酸-D-丙氨酸(L-Leu-D-Ala)、D,L-亮氨酸-D,L-苯丙氨酸(D,L-Leu-D,L-Phe)、L-亮氨酸-L-苯丙氨酸(L-Leu-L-Phe)、D-亮氨酸-D-苯丙氨酸(D-Leu-D-Phe)、L-亮氨酸-D-苯丙氨酸(L-Leu-D-Phe)、D,L-亮氨酸-甘氨酸(D,L-Leu-Gly)、L-亮氨酸-甘氨酸(L-Leu-Gly)和十二烷基硫酸钠(SDS)均为美国 Sigma 公司产品。萘-2,3-二甲醛(NDA, 美国 Molecular Probes 公司)。实验中使用的其它试剂均为分析纯以上试剂, 使用水为二次蒸馏水。HP<sup>3D</sup> 型毛细管电泳仪, 带紫外吸收检测器(Agilent 公司); pHs-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 二肽的柱前衍生

取 1.0 mg/mL 的二肽溶液 10μL 于 500μL 的塑料离心管中, 然后依次加入 100 mmol/L 硼砂缓冲溶液(pH 9.5)150μL, 2 mmol/L 的 NDA 甲醇溶液 50μL 和 20 mmol/L 的氰化钾溶液 50μL, 充分摇匀。在室温下放置 30 min 后, 引入毛细管电泳系统进行分离测定。其衍生反应如下式所示:



### 1.3 背景电解质溶液

将一定量的 HP-β-CD, SDS 和甲醇溶解在 pH 9.0 的硼砂缓冲溶液中, 构成具有手性拆分能力的背景电解质溶液。不同肽的分离, 其背景电解质溶液的组成略有差别。具体组成见结果与讨论部分。

### 1.4 实验方法

电泳分离是在 50μm 内径的石英毛细管柱中进行, 有效长度为 50 cm。采用压力(50mbar×10S 进样。从正极进样, 负极 UV 检测, 检测波长为 254 nm。毛细管柱的工作温度为 25°C, 分离电压为 15~25 kV。每次进样前, 毛细管依次用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 水和电解质溶液各清洗 3~5 min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 手性选择剂的类型及用量对分离的影响

分别使用 HP-α-CD, HP-β-CD 和 HP-γ-CD 作为手性选择剂, 添加到背景电解质溶液中,

考察它们对 *D,L*-Leu-*D,L*-Leu, *D,L*-Leu-*D,L*-Ala, *D,L*-Leu-*D,L*-Phe 和 *D,L*-Leu-Gly 四种二肽对映体分离的影响。经过优化各自的分离条件后,发现只有 HP- $\beta$ -CD 能将上述四种二肽的各种旋光异构体全部拆分。采用 HP- $\alpha$ -CD 时,除 *D,L*-Leu-*D,L*-Leu 分离成两个峰外,其它均为一个峰。而 HP- $\gamma$ -CD,也只能将 *D,L*-Leu-*D,L*-Leu, *D,L*-Leu-*D,L*-Ala 和 *D,L*-Leu-*D,L*-Phe 分离成两个峰,*D,L*-Leu-Gly 则不能拆分。这一结果表明,以 CD 作为手性选择剂时,一些手性化合物能否拆分,在一定程度上依赖于 CD 分子的空腔大小。

当采用 HP- $\beta$ -CD 分离各种二肽对映体时,HP- $\beta$ -CD 在背景电解质中的浓度,随二肽种类的不同,各自有其最佳值。对于 *D,L*-Leu-*D,L*-Leu 和 *D,L*-Leu-*D,L*-Phe,电解质中 HP- $\beta$ -CD 的浓度为 30 mmol/L 时,各种旋光异构体均能达到基线分离,大于或小于此浓度,分离效率降低。对于 *D,L*-Leu-*D,L*-Ala 和 *D,L*-Leu-Gly,分离的最佳 HP- $\beta$ -CD 浓度为 12.5 mmol/L。

## 2.2 甲醇用量对分离的影响

加入甲醇可以减小流动相的极性,改变毛细管壁的 Zeta 电位,降低电渗流,使各对映体的保留时间相应增加,从而使各种对映体的分离度增大。同时由于甲醇的存在,改变了各种对映体与 HP- $\beta$ -CD 形成的包合物的稳定性,增大了各对映体之间的电泳迁移率差,使分离度得到改善。实验结果表明,在本实验中当无甲醇存在时,各种手性物质均不能得到手性拆分。加入甲醇后,各对映体得到分离,其分离度随背景电解质中,甲醇浓度的增加而增大。图 1 给出了 *D,L*-Leu-*D,L*-Leu,在不同甲醇浓度下的分离情况。从图中 1 可见,当电解质中甲醇的浓度达到 30 (vol)% 时,各对映体之间均达到了基线分离。

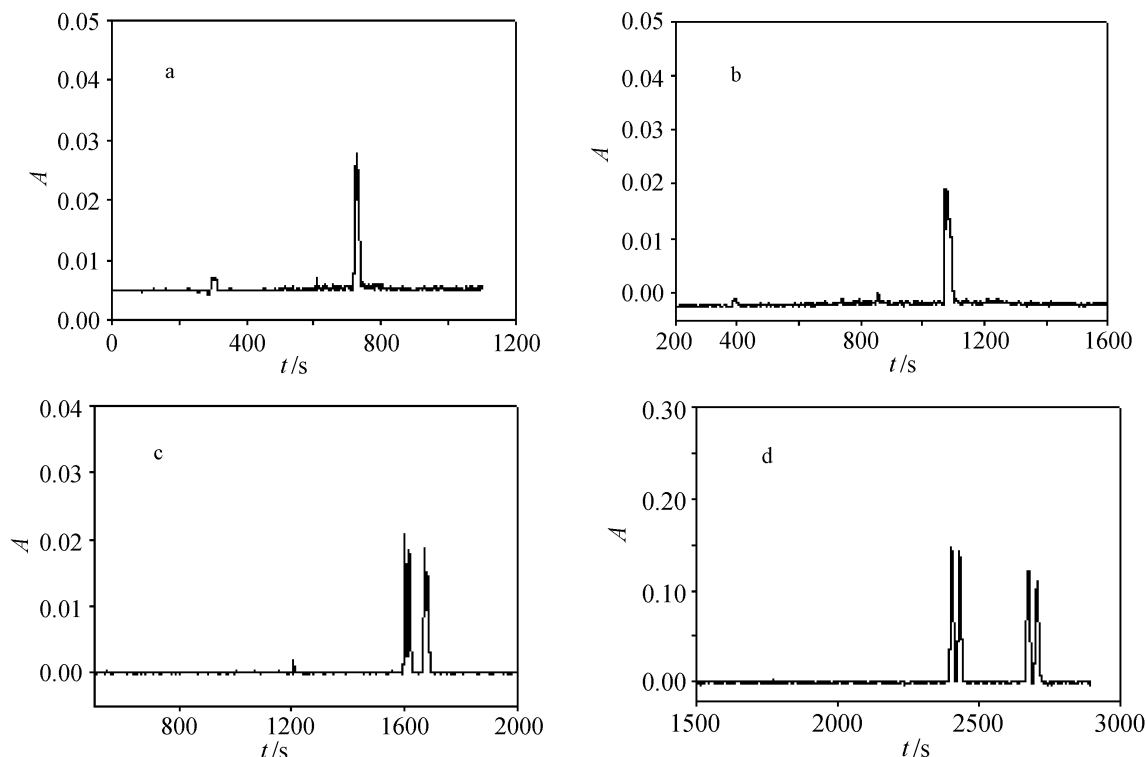


图 1 甲醇浓度对分离的影响

Fig. 1 Effects of methanol concentration on resolution

甲醇: 0%(a), 10%(b), 20%(c), 30%(d); 背景电解质组成: 25 mmol/L 硼砂(pH 9.0), 100 mmol/L SDS, 30 mmol/L HP- $\beta$ -CD; 50 $\mu$ m 内径毛细管; 25 kV 应用电压

### 2.3 SDS 浓度对分离的影响

实验结果表明, 用 NDA 衍生的肽, 由于具有较大的疏水性, 所以只有在 MEKC 分离模式下, 才能达到手性拆分。SDS 在背景电解质中的浓度, 对各手性物质的保留时间和对映体的分离度有较大影响。两者均随 SDS 浓度的增大而增加。对于 *D.L*-Leu-*D.L*-Ala 和 *D.L*-Leu-Gly, SDS 的浓度为 50mmol/L 时, 各对映体已达基线分离。而对于 *D.L*-Leu-*D.L*-Leu 和 *D.L*-Leu-*D.L*-Phe, 电解质中 SDS 的浓度需增加至 100 mmol/L 时, 才能达到各对映体的完全手性拆分。表 1 给出了 *D.L*-Leu-*D.L*-Leu 各对映体的保留时间, 分离因子 $\alpha$ 和分离度 $R_s$ , 随 SDS 浓度的变化。

表 1 SDS 浓度对 *D.L*-Leu-*D.L*-Leu 各对映体的保留时间、分离因子和分离度的影响

Tab.1 Influence of SDS concentration on migration times, separation factor and resolution of the eluted enantiomers of *D.L*-Leu-*D.L*-Leu

[SDS]/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	保留时间/min				分离因子		分离度	
	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$\alpha_{2/1}$	$\alpha_{4/3}$	$R_{s2/1}$	$R_{s4/3}$
25	20.33	20.56	21.33	21.33	1.011	0	1.25	0
50	27.56	27.84	28.89	29.07	1.010	1.006	1.38	0.53
75	33.33	33.67	35.16	35.40	1.010	1.007	1.50	1.16
100	40.00	40.44	45.78	46.44	1.011	1.014	1.54	1.50

### 2.4 pH 对分离的影响

实验考察了背景电解质的 pH 对分离的影响。结果表明, 电解质的 pH<8.0 时, 基本无手性拆分能力, 在 pH8.8~9.5 之间, 手性分离效果最好。这可能是由于 pH 不同, 肽的电荷不同, 使它们的电泳行为产生差异。另一方面, 实验已表明, 在本实验条件下, 未衍生的二肽不能达到手性拆分, 因而上述结果也可能与 NDA 衍生物的稳定性有关, 因为 NDA 与肽衍生反应的最佳 pH 范围也是 9.0~9.5。此外, 各种异构体的保留时间, 均随 pH 的增大而减小。这一现象与 SDS 体系中, 电渗流随 pH 增加而增大的常规是一致的。

### 2.5 硼酸盐浓度的影响

实验结果表明, 背景电解质中硼酸盐的浓度, 对手性分离效果, 也有明显影响。当硼酸盐浓度大于 50 mmol/L 以后, 手性拆分效率反而降低。这可能是由于硼酸盐浓度过大, 使电流加大, 焦耳热增加, 从而使手性分离不利。另外, 分离不同手性物质的最佳硼酸盐浓度也有差别。对于 *D.L*-Leu-*D.L*-Ala 和 *D.L*-Leu-Gly, 其最佳浓度为 10 mmol/L。而 *D.L*-Leu-*D.L*-Leu 和 *D.L*-Leu-*D.L*-Phe 的最佳浓度为 25 mmol/L。

### 2.6 标准样品的 MEKC 手性分离

综合上述各种影响因素, 确定了不同二肽对映体的最佳分离条件。对于 *D.L*-Leu-*D.L*-Leu 和 *D.L*-Leu-*D.L*-Phe 的分离条件为: 25 mmol/L 的硼砂(pH 9.0), 100 mmol/L 的 SDS, 30 mmol/L 的 HP- $\beta$ -CD 和 30(vol)% 的甲醇, 应用电压为 25kV。对于 *D.L*-Leu-*D.L*-Ala 和 *D.L*-Leu-Gly 的最佳分离条件为: 10 mmol/L 的硼砂(pH 9.0), 50 mmol/L 的 SDS, 12.5 mmol/L 的 HP- $\beta$ -CD 和 15(vol)% 的甲醇, 应用电压为 15kV。在上述条件下, 得到的电泳分离结果如图 2 所示。从图 2 可见, 在实验选择的条件下, 四种二肽的各种旋光异构体, 均能达到基线分离。因而可直接应用于这些手性肽的光学纯度检验。

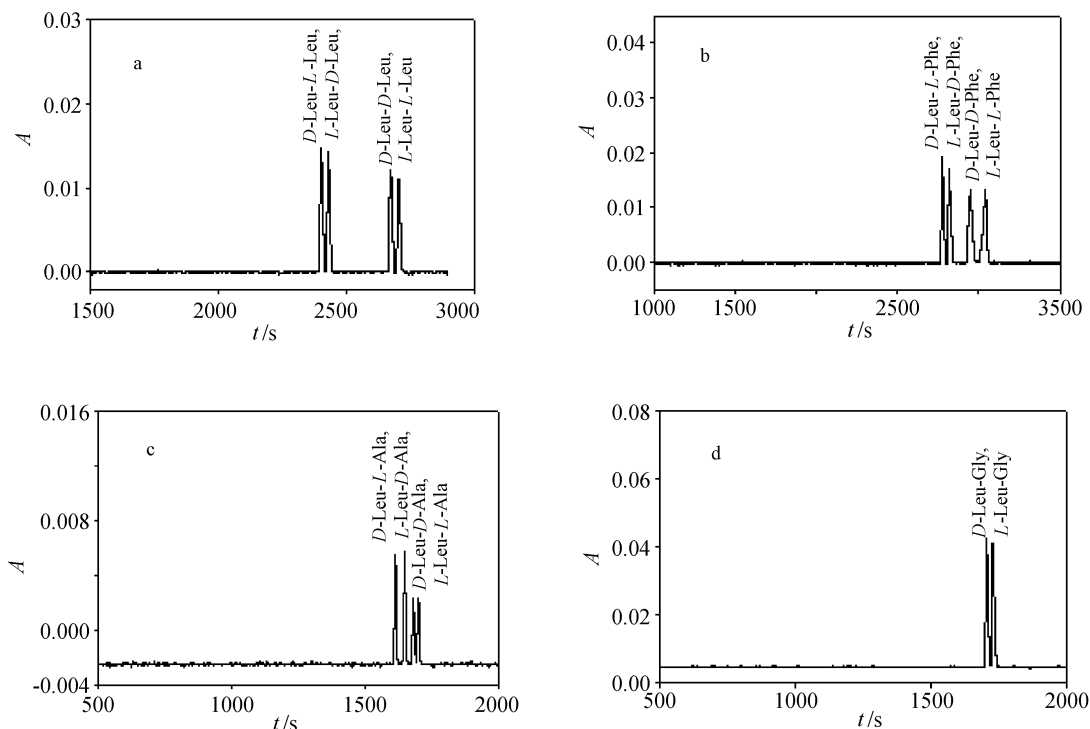


图 2 标准样品的 MEKC 手性分离

Fig.2 Chiral separations of test samples by MEKC

*D,L*-Leu-*D,L*-Leu (a), *D,L*-Leu-*D,L*-Phe (b). 背景电解质组成: 25 mmol/L 硼砂(pH 9.0), 100 mmol/L SDS, 30 mmol/L HP- $\beta$ -CD, 30% 甲醇; 50 $\mu$ m 内径毛细管; 25 kV 应用电压. *D,L*-Leu-*D,L*-Ala (c), *D,L*-Leu-Gly (d). 背景电解质组成: 10 mmol/L 硼砂(pH 9.0), 50 mmol/L SDS, 12.5 mmol/L HP- $\beta$ -CD, 15% 甲醇; 50 $\mu$ m 内径毛细管; 15 kV 应用电压.

## 2.7 旋光异构体的鉴定

电泳图中各种旋光异构体位置的确定, 采用标准加入法进行。即在外消旋体中, 分别加入单一的对映体, 根据峰的增高和流出时间, 即可鉴定各对映体的相对位置。测定结果如图 2。从图 2 可见, 在分离过程中, 以 *D-L*、*L-D*-构型的异构体, 电泳速度较快, 要先于 *D-D*-和 *L-L*-构型的异构体流出。对于同一对对映体, 又以 *D*-构型开头的异构体移动较快。这可能与各种对映体与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物的稳定性有关系。因为 *D-L*、*L-D*-构型的异构体与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物的空间位阻, 要大于 *D-D*-和 *L-L*-构型与 HP- $\beta$ -CD 形成包合物的空间位阻, 所以前者的稳定性要小于后者, 故 *D-L*、*L-D*-构型的异构体, 电泳速度较快, 先于 *D-D*-和 *L-L*-构型的异构体流出。

## 参考文献

- [1] F Morishita, Y Nakanishi, S Kaku et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 240: 354~358.
- [2] G Gubitz, M G Schmid. Electrophoresis, 2000, 21: 4112~4135.
- [2] M G Schmid, G Gubitz. J. Chromatogr. A, 1995, 709: 81~88.
- [3] M G Schmid, R Rinaldi, D Dreveny et al. J. Chromatogr. A, 1999, 846: 157~163.
- [4] S Sabah, G K E Scriba. J. Chromatogr. A, 1999, 833: 261~268.
- [6] R G Carlson, K Srinivasachar, R S Givens et al. Org. Chem., 1986, 51: 3978~3983.
- [7] B K Matuszewski, R S Givens, K Srinivasachar et al. Anal. Chem., 1987, 59: 1102~1105.
- [8] S L Zhao, C Prasad, H J F Robertson et al. Fresenius J. Anal. Chem., 2001, 369: 220~224.
- [9] D T Chiu, S J Lillard, R H Scheller, et al., Science, 1998, 279: 1190~1192.