

环糊精及其衍生物在手性药物分离分析中的应用

祝 芳 (解放军总医院第一附属医院,北京 100037)

[摘要] 有近一半的药物具有手性但通常两种异构体并不具有相同的药理活性,有一些异构体甚至具有毒性,因此,采用将手性药物良好分离的分析方法进行质控对药品的质量控制具有重要意义。环糊精及其衍生物是手性药物分离分析中常用的手性添加剂和手性固定相,本文对近年来环糊精及其衍生物在高效液相、气相、毛细管电泳、质谱、超临界流体等方面的应用进行综述。

[关键词] 环糊精;衍生物;手性药物;分离;分析

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2010)02-0094-04

application of cyclodextrin and its derivatives in chiral separation and analysis

ZHU Fang (The First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China)

[Abstract] About half of the drugs in use are chiral, however, that in most cases the pharmacological activity is restricted to one of the enantiomers (eutomer) whereas the other enantiomer (distomer) can be even toxic. The development of methods for enantioselective analysis became very important for drug quality control. Cyclodextrins (CDs) are the most frequently used chiral selectors in chiral separation and analysis. In this paper, the recently application of cyclodextrin and its derivatives were reviewed, which involved HPLC, GC, CE, MS and SFC.

[Key words] cyclodextrin; derivatives; chiral; separation; analysis

手性药物使得平面结构相同的化合物在空间上互为镜像是指药物的分子结构中含有手性因素,不能重合。同时,生物体系是一个复杂的手性体系,药物的作用是通过与体内大分子之间严格的手性识别和匹配实现的。因此,手性药物的一对对映体在生物体内的药代、药效、毒性等方面存在着显著的差异^[1]。

手性药物对应异构体的分离和测定是深入研究不同异构体各自生理药理作用及临床应用的基础,越来越引起人们的广泛关注。目前色谱手性分离一般采用直接法和间接法两种^[2]。间接法是指对映异构体与一种光学纯的试剂反应生成非对映异构体,然后在非手性环境下分离,方法涉及样品的转化、分离等预处理过程,容易造成组分的消旋化和损失。直接法是用手性固定相(CSP)或手性添加剂(CMPA)直接进行对映异构体的分离与测定,方法简单、快捷,可避免不必要的实验误差,在对映体的分离与测定中更受欢迎。

在直接法中,环糊精(CD)及其衍生物以独特的结构和性质,得到了广泛使用,本文就其手性分离分析中应用进行综述。

1 环糊精及其衍生物的结构特征

环糊精(CD)是环形寡聚糖,通常由6~12个互为椅式构象手性D-(+)葡萄糖单元通过 α -(1,4)-糖苷键连接而成。商品化的环糊精有 α -CD、 β -CD、 γ -CD,分别含有6个、7个、8个D-(+)葡萄糖单元。环糊精分子具有截锥式的圆筒形空腔构型,笼状结构。环糊精分子空腔内径不同,其所能包含的分子大小和类型有差异。每个葡萄糖单元具有5个手性中心,为手性拆分提供了良好的手性环境^[3]。

环糊精笼状结构中, α -(1,4)糖苷键向内,使腔内的电子云密度较高,具有疏水性,腔外由于羟基而具有亲水性。疏水性空腔可以与对应异构体分子的疏水性部分发生包合作用,而对映异构体分子中的极性基团与环糊精分子空腔边缘的羟基发生氢键等极性相互作用,从而构成三点相互作用,实现手性分离。

为了实现手性分离,手性化合物分子必须进入环糊精分子疏水性空腔,而其极性基团必须与环糊精分子空腔边缘的羟基发生氢键作用,因此选择性与对应异构体分子大小极性密切相关,限制了天然环糊精的应用范围。环糊精衍生物的发展拓展其应用。衍生物是在环糊精表面的羟基上引入其他基团,一定程度上改变CD的水溶性、疏水性及立体选

择性,进而增强其手性选择性。常用衍生化环糊精有:2,6-二甲基-环糊精(DM- β -CD)、2,3,6-三甲基-环糊精(TM- β -CD)、2-羟丙基-环糊精(HP- β -CD)、羧甲基-环糊精(CM- β -CD),都已成功的用于一些手性化合物的拆分。

2 环糊精在手性分离药物分析中应用

在手性药物分离分析中,环糊精可作为手性添加剂(CMPA)和手性固定相(CSP)。CD与不同的分离方法结合,实现了各具特色的分离效果。

2.1 在 HPLC 中的应用 在 HPLC 法中, CMPA 法利用手性选择剂与药物消旋体中各对映体结合的稳定常数不同,以及药物与结合物在固定相上分配的差异,实现对药物对映体的分离。CSP 直接将对映体相互作用,而其中一个生成具有不稳定的短暂的对映体复合物,造成在色谱柱内保留时间的不同,从而达到分离的目的。20 世纪 90 年代以来,制备出一系列衍生化 CD 键合 CSP,如乙酰化的 α -CD、 β -CD、对甲苯酯 β -CD、氨基甲酸酯 β -CD 等,一般用含甲醇、乙醇、乙腈作为有机改性剂的缓冲溶液作流动相。Bhushan 等^[4]应用 β -CD 键合的手性色谱柱(ChiraDex)从硫利达嗪市售制剂 Thioril tablets (Cipla Ltd, Goa, India)中的消旋体中成功分离出了 R 型的手性异构体。徐颖等^[5]用 HPLC 手性流动相添加剂法拆分了佐匹克隆对映体。选用 Zorbax-RX-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 0.12 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液:甲醇(75:25 V/V)为流动相(其中含 9.0 mmol/L 的 2 环糊精, pH 为 6.0, 流速为 0.8 ml/min; 检测波长 305 nm, 可以达到基线分离, 操作简便, 比手性柱法更经济。Shengli 等^[6]以硫酸化 β -CD 为流动相中的手性添加剂, 高效液相色谱法快速分离了部分手性芳香胺, 并用圆二色谱法考察了 S-环糊精与这些对映体的相互作用。结果显示, 分离作用是通过环糊精对分析物芳香部分包和, 以及在狭窄空腔中胺和硫酸基团位静电相互作用。

2.2 在 GC 中的应用 目前, CD 衍生物与非手性硅烷基质结合是常用的气相色谱 CSP, 其中 C-6 甲基硅烷取代的 CD 发展较为迅速。Takahisa 等^[7]合成了 2,3-二甲氧基甲基- β -O-特丁基-二甲基硅烷- β -环糊精(2,3-MOM-IBDMS- β -CD)和 2,3-MOM-IBDMS- β -CD 作为气相色谱 CSP, 这种新的 CD 衍生物可分离含多种功能基团的手性挥发性物质, 如仲醇类、内酯类、芳香类、含甲基或含硫的化合物。Wang Dong-Xin 等^[8]合成了 4 种以环糊精为侧链的含氢聚甲基硅氧烷, 分别用合成的 4 种化合物为固

定相,首次采用溶胶-凝胶法制备了气相色谱手性毛细管柱。在这些色谱柱上,以手性化合物(\pm)苯基-丁内酯为探测物对 4 种色谱柱的柱效率、手性选择性、容量因子、分离度及固定相的极性等各种色谱参数进行了测定,并将测定的数值进行了比较。发现环糊精以圆台较小的一端与含氢硅油相连,连接臂中不含苯氧基而含有醚键,连接臂较短(含 4 个亚甲基)的固定相是所合成的 4 种固定相中的最佳选择。周美杨等^[9]设计合成了新的噻吩杂环衍生化-环糊精手性固定相 2,6-二-O-戊基-3-O-[(2-甲酰基)噻吩基]- β -CD, 该固定相对各类有机化合物,特别是芳香族位置异构体及对映异构体有较好的分离能力,并对含多手性中心的菊酸衍生物具有一定的分离效果,显示了较强的立体选择能力。**2.3 在毛细管电泳法(CE)中的应用** CE 法以高压电场为驱动力,毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间的淌度和分配系数的不同而实现高效分离。毛细管电泳的多种分离模式中,CD 有着各自不同应用。

CD 可作为毛细管区带电泳(CZE)的 CMPA,使溶液中对映体各自电泳迁移速率不同而分离。控制 CD 的种类及浓度,缓冲液组成及 pH 值及外加试剂,实现分离。其中 CD 的类型和取代基对分离有很大影响。侯经国等^[10]采用 β -CD 及其衍生物作为手性选择剂对毛果芸香碱对映体进行了分离,同时考察背景电解质 pH、操作电压和温度等因素对对映体分离的影响,结果 HP- β -CD 可以使毛果芸香碱对映体达到基线分离。陈德英等^[11]研究了影响盐酸舍曲林对映异构体分离的因素,比较不同种类环糊精对盐酸舍曲林对映异构体的手性选择性,建立拆分盐酸舍曲林对映异构体的毛细管区带电泳分离方法。以 15 mg/ml CM- β -CD 为手性添加剂,采用 30 mmol/L 四硼酸钠(pH11)为背景电解质,操作电压为 15 kV,柱温为 20 $^{\circ}$ C,波长为 210 nm 的条件下,分离了盐酸舍曲林对映异构体,其中阴离子环糊精对盐酸舍曲林对映异构体的手性选择性比中性环糊精高。黄碧云等^[12]采用高效毛细管电泳法,以羟乙基-环糊精为手性选择剂对苯磺酸氨氯地平对映体进行拆分,并确定了最佳分离条件。该法可用于苯磺酸氨氯地平对映体手性拆分及光学纯度测定。

毛细管胶束电动色谱(MECC)为一种基于胶束增溶和电动迁移的新型液体色谱,在缓冲液中加入离子型表面活性剂作为胶束剂,利用溶质分子在水相和胶束相分配的差异进行分离,拓宽了 CZE 的应用范围。MECC 以胶束增溶作为分配原理,溶质在水相、胶束相中的分配系数不同,在电场作用下,毛

细管中溶液的电渗流和胶束的电泳,使胶束和水相有不同的迁移速度,同时待分离物质在水相和胶束相中被多次分配,在电渗流和这种分配过程的双重作用下得以分离。2003年 Mohanty 和 Dey^[13]首次报道了将 CD 应用于 MECC 中,之后他们又继续对这一方法进行研究,发现将 CD 应用于 MECC 中对疏水性化合物的手性分离非常有效^[14,15]。

毛细管等速电泳 (CIEP) 是一种不连续介质毛细管电泳技术,其基本原理是溶质在毛细管电泳中达到平衡后,各区带相随,分成清晰的界面以等速移动并完成分离。在 CIEP 中,要使用 2 种缓冲溶液系统,其中一种为前导电解质,充满整个毛细管柱,另一种为尾随电解质,置于一端的电泳槽中。CD 及其衍生物常作为前导电解质加入物。黄宗玉等^[16]用 HP- β -CD 为前导电解质加入物,使酒石酸托特罗两对映体基线分离,最低检出浓度为 0.5 g/ml。赵卫^[17]采用毛细管电泳法对罗哌卡进行手性分析比较,以 30 mmol/L 三甲基- β -环糊精 (TM- β -CD) 为手性选择剂,0.2 mmol/L 磷酸三乙醇胺 (pH 3.5) 缓冲溶液为背景电解质, +20 Kv, 20 μ m, 206 nm 波长检测,对罗哌卡进行毛细管电泳法手性分离分析,对映体可基线分离。缓冲液 pH 及手性选择剂浓度对拆分效果的影响最为显著。

毛细管电色谱法 (CEC) 是将色谱柱中众多的固定相微粒填充到研究毛细管中不仅具有 CE 水平的高柱效,而且具有 HPLC 水平的高选择性。Lin 等^[18]以 PPC- β -CD 键合硅胶颗粒为手性分离的固定相,采用 CEC 法分离了肾上腺素、异丙肾上腺素、昔奈福林、普奈洛尔等 7 种手性药物的异构体,并且其中 5 个在 12 min 内达到了良好的基线分离。

2.4 在 MS 中的应用 质谱技术由于具有质量分辨、信息量大、样品用量少、灵敏、快速等优点。近年来通过在体系中引入手性环境,与对映体发生立体选择性反应或通过非共价相互作用形成非对映异构体复合物,含有手性对映体的复合物离子具有不同的离子化效率和碎裂行为,从而在质谱图中表现出手性差异。

CD 及其衍生物也是质谱 MS 手性识别中常用的手性选择剂。利用质谱手段还能够研究 CD 及其衍生物作为手性选择剂,与目标异构体的结合情况。Grigorean 等^[19]采用主-客体交换反应的方法考察了全甲基取代的 CD 对一些手性药物如 (D 和 L 多巴、青霉胺和麻黄碱)、氨基酸及多肽的手性识别能力。于湛等^[20]利用电喷雾质谱研究了七-(2,6-二-O-甲基)- β -环糊精 (DM- β -CD) 作为手性识别试剂对薄荷醇对映体的手性识别效应。实验结果表明,

在气相条件下,DM- β -CD 可以与薄荷醇形成特异性结合复合物,化学计量比为 1:1。对复合物的串联质谱研究表明,DM- β -CD 对薄荷醇对映体有较强的手性识别能力,手性识别率为 $R_{chiral} = 1.81$ 。DM- β -CD 与 (-)-薄荷醇形成的复合物比与 (+)-薄荷醇形成的复合物稳定。张敏等^[21]用柱塞泵进样、电喷雾电离质谱分别研究了 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精作为手性拆分试剂对 (R)、(S)-2-丁醇进行的分子识别作用。研究表明,电喷雾电离质谱可以很好地反映这 3 种手性拆分试剂对 (R)、(S)-2-丁醇的手性识别能力;并对 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精与 (R)、(S)-2-丁醇形成的复合物,计算了热力学的平衡常数。研究了 CapEx 电压的变化对 α -环糊精、 β -环糊精、 γ -环糊精的手性识别的影响,研究发现,在不同的 CapEx 电压下,这 3 种环糊精对 (R)、(S)-2-丁醇均有手性识别能力。Claudia 等^[22]用磺甲基- β -环糊精为手性选择剂,毛细管电泳耦合串联质谱法对巴氯芬手性分离检测,最低检测限达到 0.1 μ g/ml (消旋体浓度),适宜制剂中巴氯芬的手性异构体分析。

2.5 在超临界流体色谱 (SFC) 中应用 SFC 采用接近或超过临界温度和临界压力的高压流体作为流动相的一种新颖的色谱技术。CD 作为固定相可直接用于 SFC,而不需要作任何处理。Wang 等^[23]合成了 4 种不同 CD 衍生硅胶 (MPCCD、MDPCCD、OPCCD、ODPCCD),并对将它们分别作为固定相应用于 SFC 和 HPLC,发现它们在这两种方法中均具有分离手性化合物的能力,其中 OPCCD 的手性分离能力最好。Kasai 等^[24]以衍生化的 β -CD 色谱柱为固定相,应用 SFC 法对六种咪喃衍生物进行了手性分离,结果显示分子量为 150~180 的咪喃衍生物可以很好的手性分离。

2.6 在荧光分析中应用 在环糊精存在情况下,对映体有不同的手性包络差异,实现对映体的手性识别荧光测定。李伟等^[25]利用 β -环糊精存在下,D,L-色氨酸对映体呈现的手性包络差异第一次成功地实现了该对映体的手性识别荧光测定。在 D 或 L-色氨酸对映体互为 50 倍量的混合物中,可以准确测定 D 或 L-色氨酸对映体。

3 展望

CD 在手性分离中表现出独特的手性选择性,它在手性药物拆分中得到了广泛的应用。与其他手性拆分试剂相比,它的价格相对便宜,使用方式比较灵活,在手性药物拆分领域将会起到越来越重要的作用。

(下转第 111 页)

- [4] 范玉玲, 崔福德, 杨明世, 等. 齐墩果酸和齐墩酸钠对二甲苯引起的小鼠耳肿胀抑制作用的研究 [J]. 中医药研究, 2004, 18(6): 37.
- [5] RICHARD P, MacDERMOTT. Chemokines in the Inflammatory Bowel Diseases [J]. Journal of Clinical Immunology, 1999, 19(5): 266.
- [6] Frangiogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis [J]. Inflammation Research, 2004, 53: 585.
- [7] Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 Lymphocytes [J]. Nature, 1998, 391: 344.

[收稿日期] 2009-09-23

[修回日期] 2009-11-10

(上接第 96 页)

【参考文献】

- [1] 刘会臣. 手性药物的药代动力学立体选择性及其影响因素研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 19(5): 380.
- [2] 罗明可. 现代色谱法在手性药物拆分中的应用进展 [J]. 福建医药杂志, 2004, 26(5): 156.
- [3] 申睿, 谢剑炜. 手性选择剂及其在手性药物分离分析中的应用进展 [J]. 国外医学·药学分册, 2005, 32(6): 413.
- [4] Bhushan R, Gupta D. HPLC resolution of thiazidazine enantiomers from pharmaceutical dosage form using cyclodextrin-based chiral stationary phase [J]. Chromatogr B, 2006, 837(1-2): 133.
- [5] 徐颖, 邓小燕, 李树刚, 等. 环糊精手性流动相添加剂法拆分佐匹克隆对映体 [J]. 药学进展, 2006, 30(9): 418.
- [6] Shengli Maa, Sherry Shena, Nizar Haddad. Chromatographic and spectroscopic studies on the chiral recognition of sulfated γ -cyclodextrin as chiral mobile phase additive: Enantiomeric separation next term of a chiral amine [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(8): 1232.
- [7] Takahisa E, Engel KH. 2, 3-Di-O-methoxymethyl-6-O-tert-butyl dimethylsilyl- γ -cyclodextrin: a new class of cyclodextrin derivatives for gas chromatographic separation of enantiomers [J]. Chromatogr A, 2005, 1063(1-2): 181.
- [8] Wang DX, Abdul M. Separation of Enantiomers of a Chiral Lactone on Sol-Gel Gas Chromatography Capillary Columns of Poly(methyldisiloxane) Stationary Phase with Pendant Permethylated γ -Cyclodextrin [J]. Chin J Anal Chem, 2007, 35(3): 360.
- [9] 周美杨, 凌云, 申刚义, 等. 新型噻吩杂环衍生化环糊精手性固定相合成及其气相色谱分离性能 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3): 493.
- [10] 侯经国, 王柱命, 何天稀, 等. 毛果芸香碱对映体的毛细管电泳手性分离 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(1): 64.
- [11] 陈德英, 陈玉英, 戴荣继, 等. 毛细管区带电泳法拆分盐酸舍曲林对映体 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 440.
- [12] 黄碧云, 赵鑫, 袁牧, 等. 苯磺酸氨氯地平对映体的高效毛细管电泳手性分离 [J]. 药学进展, 2009, 33(5): 222.
- [13] Mohanty A, Dey J. A giant vesicle forming single tailed chiral surfactant for enantioseparation by micellar electrokinetic chromatography [J]. Chem Commun, 2003, 12: 1384.
- [14] Mohanty A, Dey J. Vesicles as pseudostationary phase for enantiomer separation by capillary electrophoresis [J]. Chromatogr A, 2005, 1070: 185.
- [15] Dey J, Mohanty A, Roy S, et al. Cationic vesicles as chiral selector for enantioseparations of nonsteroidal antiinflammatory drugs by micellar electrokinetic chromatography [J]. Chromatogr A, 2004, 1048(1): 127.
- [16] 黄宗玉, 杜加秋, 蔡文. 高效毛细管电泳法测定酒石酸托特罗定中左旋对映体杂质 [J]. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 351.
- [17] 赵卫, 杭太俊, 葛萍. 罗哌卡因对映异构体的三甲基-环糊精 HPCE 手性拆分研究 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1183.
- [18] Lin B, Shi ZG, Zhang HJ, et al. Phephenylcarbamoylated- γ -cyclodextrin bonded-silica particles as chiral stationary phase for enantioseparation by pressure-assisted capillary electrochromatography [J]. ELECTROPHORESIS, 2006, 27(15): 3057.
- [19] Grigorean G, Cong X, Lebrilla CB. Chiral analyses of peptides by ion/molecule reactions [J]. Int J Mass Spectrom, 2004, 23(3): 71.
- [20] 于湛, 闫存玉, 宋凤瑞, 等. 七-(2,6-二-O-甲基)-环糊精对薄荷醇对映体手性识别的电喷雾质谱研究 [J]. 分析化学, 2006, 34(5): 671.
- [21] 张敏, 史真, 白银娟, 等. 环糊精对 (R)、(S)-2-丁醇手性分子识别的电喷雾电离质谱研究分 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 56.
- [22] Claudia D, Diana VR, Fabio P, et al. Enantiomeric separation of baclofen by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry with sulfobutylether- γ -cyclodextrin as chiral selector in partial filling mode [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 875(1): 280.
- [23] Wang RQ, Ong TT, Ng SC. Synthesis of cationic γ -cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography [J]. Chromatogr A, 2008, 1203(2): 185.
- [24] Kasai HF, Tsubuki M, Takahashi K, et al. Separation of stereoisomers of several furan derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry, supercritical fluid chromatography, and liquid chromatography using chiral stationary phases [J]. Chromatogr A, 2002, 977(1): 125.
- [25] 李伟, 谢剑炜, 翟言强, 等. D, L-色氨酸对映体的环糊精手性识别荧光定量分析 [J]. 军事医学科学院院刊, 2002, (2): 20.

[收稿日期] 2009-12-24

[修回日期] 2010-02-19