

# 芳香族氨基酸的配体交换毛细管区带电泳 手性拆分研究

赵艳芳<sup>1,2</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 蒋生祥<sup>1</sup>, 李永民<sup>1\*</sup>

(1、中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000 2、中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**以铜(II)-L-谷氨酸配合物为手性分离选择剂,对苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸3种非衍生芳香族氨基酸的手性对映体拆分进行了研究,建立了一种快速、简便拆分未衍生化的芳香族氨基酸对映体的配体交换毛细管电泳方法。在使用10 mmol/L NH<sub>4</sub>AC (pH 5.0), 5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>和10 mmol/L L-谷氨酸的条件下,成功的拆分了苯丙氨酸、酪氨酸手性对映体,色氨酸手性对映体也得到部分分离;考察了电泳缓冲液组成、pH值等影响分离效果的因素。

**关键词:**手性配体毛细管电泳;手性分离;L-谷氨酸;氨基酸

氨基酸的手性拆分在多肽、蛋白质的研究,有机化学不对称合成、医药、食品以及生命的起源、发育、病变及衰老的研究中,均具有重要意义。在构成蛋白质的20种氨基酸中,只有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸3种芳香族氨基酸在紫外区有吸收,可用紫外光度法或紫外荧光法直接测定。L-氨基酸长期以来被认为是生物体内唯一的氨基酸存在形式,但上述3种芳香族氨基酸的D-型光学异构体已被发现存在于人的尿液和血清中<sup>[1]</sup>。为了准确测定生物体内这些氨基酸的D-型光学异构体的含量,必须建立相应的手性分离方法。分离氨基酸对映体的方法主要有高效毛细管电泳(HPCE)法、高效液相色谱(HPLC)法和气相色谱(GC)法等。但GC的分离对象仅限于易挥发物质,HPLC则存在费用偏高、分离效率偏低等不足。毛细管电泳具有微量、灵敏和柱效高的特点,适合于氨基酸的手性分离。Altria<sup>[2]</sup>和Dzygiel<sup>[3]</sup>曾以 $\alpha$ -环糊精为手性选择剂,赵书林<sup>[4]</sup>等以羟丙基- $\alpha$ -环糊精为手性选择剂,Kuhn等<sup>[5]</sup>以手性冠醚为手性选择剂,采用毛细管电泳技术分离了这些氨基酸对映体。配体交换是分离手性氨基酸的一种较早的方法,而利用CE进行手性化合物分离分析的第一例就是建立在金属络合物配体交换原理基础上的<sup>[6]</sup>。Gassman等<sup>[6]</sup>以铜(II)-L-组氨酸配合物,Schmid<sup>[7]</sup>等以Cu(II)-L-脯氨酸、L-羟基脯氨酸配合物,Yuan等<sup>[8]</sup>以Cu(II)-L-精氨酸配合物,Soontornniyomkij等<sup>[9]</sup>以Cu(II)-天冬酰胺配合物作为电泳添加剂分离了多种未衍生化的及衍生化的氨基酸,此后,手性配体交换毛细管电泳的应用报道日益增多。本文首次以铜(II)-L-谷氨酸配合物作为手性选择剂,研究了3种含有芳环结构的天然氨基酸的手性拆分,并考察了缓冲液pH值,铜(II)与L-谷氨酸络合物浓度以及摩尔比对氨基酸对映体拆分的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE System MDQ 毛细管电泳仪(美国贝克曼公司),未涂层石英毛细管(ID. 75  $\mu$ m, OD. 375  $\mu$ m, 河北永年光导纤维厂),毛细管总长 60.2cm,有效长度 50cm。Mettler Toledo 320 pH

本文系国家自然科学基金(No.20375045)和中国科学院“西部之光”资助项目

\* 通讯联系人赵艳芳,电话:0931-4968262, E-mail: zyftoday@sohu.com

计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

*L*-谷氨酸(*L*-Glu)、*DL*-苯丙氨酸(*DL*-Phe)、*DL*-酪氨酸(*DL*-Tyr)、*DL*-色氨酸(*DL*-Trp)(上海华美生物工程公司), 乙酸铵、硫酸铜等试剂均为分析纯, 所用水为二次去离子水。

## 1.2 实验方法

背景电解质溶液为 10mmol/L 乙酸铵缓冲液, 并用  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  或 HAC 调整为合适的 pH 值, Cu(II)-*L*-谷氨酸配合物以不同浓度加入到缓冲液中。毛细管柱在使用前首先用 0.1mol/L NaOH、 $\text{H}_2\text{O}$  冲洗 10min, 两次运行之间用背景电解质冲洗 2min。紫外检测波长为 190 nm, 柱温 25℃, 运行电压为 15kV, 压力进样 0.2psi, 3s。

## 2 结果与讨论

在手性配体交换毛细管区带电泳分离中, 手性配体 *L*(通常为 *L* 型氨基酸及其衍生物)与金属离子(*M*)形成络合物( $\text{M}[\text{L}]_n$ )并与待测对映体发生交换作用, 对映体 *D*-和 *L*-型与手性配体、金属离子形成的三元络合物稳定性不同, 决定了它们在电泳力作用下迁移时间的不同, 因而可以进行 *DL* 对映异构体的拆分。

### 2.1 缓冲液 pH 值的影响

pH 值是配体交换分离中的一个重要影响因素, pH 值通过影响待测氨基酸以及手性配体的高解程度从而影响配合物的形成。我们选择 Cu(II)与 *L*-谷氨酸的浓度分别为 5mM 和 10mM 的条件, 在 pH 值 4.5-9.0 之间考察了 pH 值对三种氨基酸手性拆分的分离度的影响。结果显示, 缓冲溶液的 pH 为 4.5 时, 三种氨基酸的对映体几乎没有得到分离; 而 pH 值在 5-6 之间时, 苯丙氨酸和酪氨酸达到基线拆分, 色氨酸也得到部分拆分。而当 pH 值超过 6 时分离度下降, 几乎不能拆分。上述结果可能是由于随着 pH 值的升高, 谷氨酸(其等电点  $pI=3.22$ )离子化程度增大, 其与 Cu(II)离子结合形成配合物的稳定性增大, 手性识别能力也随之增强, 故而得到良好的拆分; 然而, 随着 pH 值的进一步升高, 生成的 Cu(II)-*L*-谷氨酸配合物的稳定性太强以至于不能与待测氨基酸间发生配体交换作用, 所以拆分能力又随之下降。因而选择 pH 5.0 进行下一步的实验。

### 2.2 Cu(II)与 *L*-谷氨酸摩尔浓度比及浓度对分离的影响

本实验中的手性分离是基于待测氨基酸与 *L*-谷氨酸和 Cu(II)形成混配物的稳定程度来决定, 因此通过优化 Cu(II)与 *L*-谷氨酸的摩尔浓度比可以提高分离效率。固定 Cu(II)的浓度为 5mM 改变 *L*-谷氨酸的浓度来考察二者摩尔浓度比对分离的影响, 结果显示, 浓度比为 1:2 时分离度较好, 增大对比对分离度的影响不大。

保持 Cu(II)与 *L*-谷氨酸摩尔浓度比为 1:2, 考察选择剂浓度对分离度的影响。随着铜(II)-*L*-谷氨酸配合物浓度的增加, 分离情况越来越好。并且当选择剂浓度为 5mmol/L: 10mmol/L (Cu(II):*L*-谷氨酸)时, 苯丙氨酸和酪氨酸对映体达到基线拆分, 色氨酸也得到部分拆分。增大选择剂浓度时, 对三种氨基酸分离度的影响不大, 为了减小基线噪音, 缩短分析时间, 故选择 Cu(II)为 5mmol/L, *L*-谷氨酸为 10mol/L。

### 2.3 氨基酸的手性分离

经过对分离条件的优化, 在 10mmol/L  $\text{NH}_4\text{AC}$ , pH5.0, 5mmol/L  $\text{Cu}(\text{AC})_2$  和 10mmol/L *L*-谷氨酸的最佳色谱条件下, 可得到三种芳香氨基酸的分离谱图, 如图 1 所示。

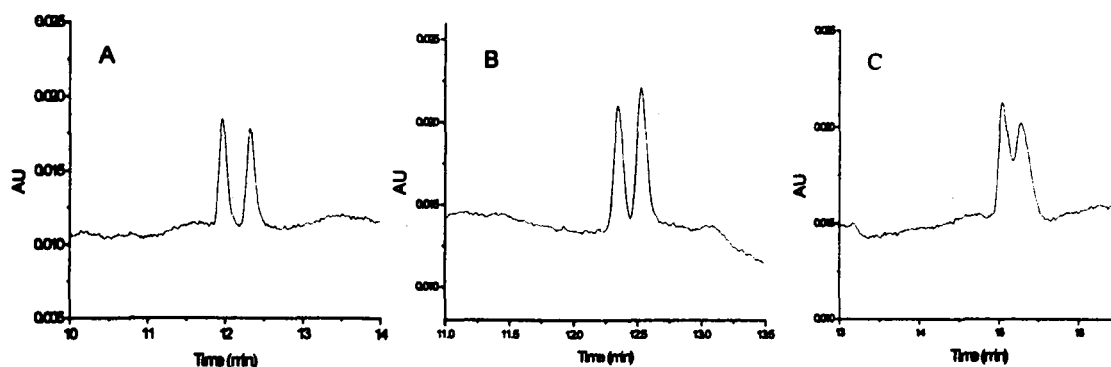


图1 DL-氨基酸的手性拆分

电泳条件(conditions): Running electrolyte kept at pH5.0 contains 5mmol/l Cu(II), 10mmol/l L-Glu. 其它条件同图1(Other conditions were described in Fig.1.)A) DL-苯丙氨酸(DL-phenylalanine); B) DL-酪氨酸(DL-tyrosine); C) DL-色氨酸(DL-tryptophan).

### 3 结论

在手性配体交换色谱中, 手性配体应符合以下要求: (1) 在手性中心附近需具有两个(或两个以上)的络合官能团; (2) 需存在一个较大的基团以产生空间排斥作用; (3) 应为光学纯度。不同的手性配体的手性拆分能力差别很大, 为了获得更好的分离效果, 应不断的开发和应用新的手性配体。本文首次应用 L-谷氨酸为手性配体, 以铜(II)-L-谷氨酸配合物作为手性选择剂研究了利用手性配体交换毛细管电泳对三种未衍生化氨基酸对映体的分离, 发现 pH 值, 选择剂浓度对分离的影响较大, 在缓冲溶液中加入胶束有可能提高分离效率, 这方面的研究正在进行中。

#### 参考文献:

1. Zhao S L, Liu Y M. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2769-2774
2. Altria K D, Harkin P, Hindson M G. *J. Chromatogr. B*, 1996, 686(1):103-110
3. Dzygiel P, Wieczorek P, Jönsson J Å. Enantiomeric. *J. Chromatogr. A*, 1998, 796:414-418
4. Zhao Shulin (赵书林), Lin Xiancheng (林向成), Shen Jiangshan (沈江珊), Li Shuting (李舒婷). *分析测试学报(Journal of Instrumental Analysis)*, 2003, 22 (6), 8-11
5. Huhn R, Erni F, Bereuter T. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 2815-2820
6. Gassmann E, Kuo J E, Zare R N. *Science*, 1985, 230: 813-814
7. Schmid MG, Gubitz G. *Enantiomer*, 1996, 1: 23-27
8. Yuan Z B, Yang L L, Zhang S S. *Electrophoresis*, 1999, 20: 1842-1845
9. Seontornniyomkij B, Scandrett K, Pietrzyk D J. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1998, 21: 2245-2263