

气相色谱法在手性药物分析中的应用进展

马 波^{1,2}, 雷勇胜¹, 蒋庆峰^{1*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 河南大学, 河南 开封 475000

摘 要: 手性化合物作为特殊的物质群体, 使用普通的分析方法往往很难实现对其进行定量或定性分析。气相色谱虽然只适用于易挥发且热稳定的化合物, 但将气相色谱与质谱、手性固定相等联用或对手性化合物进行衍生以及特异性内标后, 使用气相色谱对手性化合物进行分析依然能取得理想效果。对近年来气相色谱在手性分析中的应用和相关研究进展进行综述。

关键词: 气相色谱; 手性分析; 手性固定相法; 手性衍生化法; 色谱联用技术

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)06-00647-05

Progress of the application of gas chromatography in chiral drug analysis

MA Bo^{1,2}, LEI Yong-sheng¹, JIANG Qing-feng¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, china

2. Henan University, Kaifeng 475000, China

Abstract: Chiral compounds as a special group of substances, the use of ordinary analytical methods are often difficult to achieve its quantitative or qualitative analysis. Although gas chromatography is only applicable in the volatile and thermally stable compounds, gas chromatography with mass spectrometry and chiral stationary equal or chiral compounds were derived as well as specific internal standard using gas chromatography for analysis of chiral compounds is still able to achieve the desired effect. In this article, will have in recent years, gas chromatography in chiral analysis and related research progress are reviewed.

Key words: gas chromatography; chiral analysis; chiral stationary phases; chiral derivatization; hyphenated chromatographic techniques

近年来随着对手性化合物研究的深入, 手性化合物的分析和分离已经成为了当前分析学中的一个研究热点。手性化合物的对映体之间虽然在理化性质上的差异较小, 但需要指出的是这些化合物在机体内的代谢、药理作用和作用机制等都存在着较大的差异, 甚至会产生相反的效应^[1]。由于手性化合物的特殊性, 使用普通的分析方法无法实现对其进行有效的分析。目前在手性化合物的分析中, 手性药物的拆分主要有化学拆分法、结晶法、生物拆分法和色谱法等等, 其中色谱法由于简便快捷, 分离效果好而被认为是手性异构体拆分最有效的方法。手性拆分色谱方法主要有: 超临界流体色谱(SFC)法、气相色谱(GC)法、毛细管电泳(CE)法、薄层色谱(TLC)法、高效液相色谱(HPLC)法等。气相色谱法相对于其他的手性分析方法具有快捷、精确、识别能力强等优点, 且与质谱(MS)、液相

色谱(LC)等联合使用时还能够对所测定的未知物质进行精确的定量和定性分析; 其优点已经在手性分析中得到了较为广泛的应用。但是, 在使用 GC 对手性物质进行分析时, 所测样品必须要具有高度的挥发性, 且要具有热稳定的特点。对一些不易挥发或热稳定较差的物质进行分析时, 需要对其进行衍生化处理, 以提高其挥发性、热稳定性或可检性, 相对于其他方法较为繁琐。因此, GC 还无法满足各种手性物质的分析要求。

GC 法虽然在手性分析的应用中具有较多局限性, 但是随着新型手性固定相的(如手相固定相法、手性衍生化法等)以及其他辅助设备的联合应用, 使其在手性药物的分析领域中取得了诸多的实质性成果。新型的 GC 分析方法不仅提高了对手性物质的检测能力, 对手性化合物的最低检测限和定量限也有了较大改善。本文从固定相法联用、色谱联用

收稿日期: 2012-08-28

作者简介: 马 波(1988—), 男, 河南大学药物分析学在读硕士, 研究方向为药物质量控制与研究。E-mail: 161625188@qq.com

*通讯作者 蒋庆峰(1964—), 研究员, 主要从事于药物质量控制与研究。E-mail: qingfeng-jiang@263.net

技术两大方面进行综述。

1 固定相法联用

1.1 手性固定相法

手性固定相(chiral stationary phases, CSP)按照其分离手性化合物的机制,主要可以分为 3 种^[2]。(1)通过氢键作用实现分离的固定相,主要为氨基酸类;(2)通过包合作用实现分离的环糊精类固定相;(3)通过配位作用实现分离的手性金属配合物固定相。相对于前两种固定相而言,手性金属配合物固定相由于是通过与 π 电子、孤对电子相互作用而实现对物质的分离,因此其使用范围更广,且比较适合拆分低沸点的手性化合物。

氨基酸衍生物固定相主要基于氢键作用,结构中含有酰胺基或羧酸酯基,可以与手性药物分子中的活泼基团通过氢键作用缔合,形成非对映异构体缔合物,由于立体因素和氢键作用的不同,所形成的非对映异构体缔合物的稳定性也不同,导致对映体通过色谱柱所需时间不同而将它们分离开^[3]。Yano 等^[4]首先合成出一种缬氨酸的衍生物,然后以其为功能单体,制备出对多肽衍生物具有选择分离能力的印迹聚合物。郑文丽等^[5]用手性源(*R*)-苯基甘氨酸,采用非对称合成方法制备了 3,5-二硝基苯甲酰-(*R*)-苯基甘氨酸手性固定相(DNB-PG CSP),并利用它直接拆分了药物丙卡特罗的部分对映体,取得了良好的拆分效果,其分离因子 α 为 1.54~1.67。

环糊精类固定相因独特的结构能与客体分子形成超分子体系,从而产生手性识别。除了常见的烷基化和酰基化衍生外,目前环糊精类固定相的研究重点是在环糊精分子上引入新的功能基团,以达到更好的分离效果。申刚义等^[6]制备了一种新的含多氮五元杂环类 β -环糊精固定相 2,6-二-*O*-甲基-3-*O*-亚甲基-[1-(1,2,4)-三唑基]- β -环糊精,并对其 GC 分离性能进行了研究。实验结果表明杂环官能团的引入较大提高了该固定相的柱表面性能和色谱分离能力;不但对二甲苯、硝基甲苯等难分离的芳香族位置异构体,而且对醇、胺、酯等多种类型的手性异构体均有很好的分离能力和手性选择能力。

手性金属有机骨架(MOFs)是由含氧、氮等多齿有机配体(大多为芳香多酸和多碱)与过渡金属离子自组装而成的配位聚合物,其主要成分 $[[\text{Cu}(\text{sala})_2(\text{H}_2\text{O})]_n]$ 。将该化合物涂布于手性柱内部则能通过配位作用与手性化合物结合,以达到分离的目的。由于该化合物在 220 °C 以下具有较好的热

稳定性,因此比较适合作为 GC 的手性固定相^[7]。谢生明等^[8]使用 MOFs 对酮类化合物、氨基酸等进行了分析,结果显示该化合物具有较高的手性选择能力,其对手性化合物的最低分离比例达到了 85%。

1.2 手性衍生化法

手性衍生化(Chiral derivatization, CDR)法又称间接拆分法。其原理是光学活性药物与手性试剂于柱前衍生化,形成的共价结合非对映体对与固定相之间的键合力产生差速迁移而被分离^[9]。优点是可使用已有的非手性固定相,花费少;选用强烈发色团或荧光的手性试剂,提高检测灵敏度。缺点是对衍生化试剂要求高,要求对映体的衍生化反应迅速且反应速率一致,衍生化和色谱过程不能发生消旋化,被分析的药物需有可衍生化的基团。

章立等^[10]采用柱前手性衍生化方法,氯仿为提取溶剂,以 *N*-三氟乙酰基-脯氨酸为手性衍生化试剂,三乙胺为催化剂,将安非他明转变成相应的酰胺类非对映异构体对,用常规非手性毛细管柱 GC,程序升温法分离了大鼠肝微粒体中 *R*-和 *S*-安非他明,在 5~250 $\mu\text{g/mL}$ 线性良好,*R*-(-)-安非他明和 *S*-(+)-安非他明的线性方程分别为: $Y=6.92+62.18X$ ($r=0.9988$)、 $Y=6.47+56.05X$ ($r=0.9979$)。方法检测限为 12.5 ng,定量限为 125 ng(RSD<11%)。重现性和精密度均良好,RSD 值小于 4.8%。通过测定安非他明在大鼠肝微粒体中一相代谢时间反应曲线,表明安非他明在大鼠肝微粒体中经历了立体选择性代谢,左旋安非他明在大鼠肝微粒体中的代谢速率大于右旋安非他明。

1.3 与手性固定相法或衍生化法联用

单独使用手性固定相法或手性衍生化法都有其自身的局限性,为了使 GC 的检测性能得到全面提高,GC 常与手性固定相或衍生化法联用,进而实现对手性化合物的分析。但是手性试剂衍生化法往往只能用于分析氨基酸衍生物和糖类衍生物等,适用的范围较小且处理过程较为麻烦。相对于手性试剂衍生化法,GC 与手性固定相法联用具有更多的优势。Morrison 等^[11]使用 β -环糊精衍生物作为固定相的手性色谱柱与手性试剂衍生化法联合使用,对安非他明进行了手性分析。使用三氟乙酸酐(TFAA)、五氟丙酸酐(PFPA)对安非他明进行了衍生化以降低其极性,结果将手性固定相与手性衍生化试剂联合应用后对安非他明的检测能力较普通 GC 具有很大的提高。

2 色谱联用技术

2.1 GC 与质谱的联合应用

在单独使用 GC 时,一般只能将毛细管 GC 法与手性固定相或衍生化法联合应用。但是由于其自身的检测能力有限,要想达到较理想的检测效果往往需要与其他检测器联用。目前常与 GC 联用的检测器主要有火焰离子化检测器(FID)、电子捕获检测器(ECD)、热导检测器(TCD)、MS^[12]。相对于前几种检测器,MS 的应用范围和识别能力均有较强优势。MS 对离子碎片具有较强的检测能力,已与 GC 联合应用于手性药物的分析中。

将 GC-毛细管法或柱前衍生化法与 MS 联合应用后不仅能有效地提高 GC 的检测灵敏度,其检测限也更能趋于理想。因为将样品衍生化后进行气-质联用分析,可以有效地避免样品中复杂基质的干扰,能够达到较高的灵敏度,通过选择离子检测(SIM)的方式而实现对手性物质的分离^[13]。此方法的灵敏度高,且衍生化法通过提高小相对分子质量离子的质荷比可有效地改善 GC 的分离度和 MS 的检测能力,有较好的协同作用。Ranieri 等^[14]将麻黄碱(左旋)用甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(MSTFA-TMCS)进行衍生化后,通过 GC-MS-SIM 进行了分析。分析条件:麻黄碱药材预处理后,与 MSTFA-TMCS 于 70 °C 发生衍生化反应后,于 Restek Rtx-5MS(35 mm×0.25 mm×0.25 μm)柱进行 GC-MS 分析。结果显示 GC-MS-SIM 法分析麻黄碱的线性较好,回收率达 88%~102%,最低检测限达到 5 μg/mL,说明 GC-MS-SIM 法对麻黄碱具有较理想的分析和分离效果。

GC 与 MS 联用虽然能够通过 MS 实现对离子碎片的检测而提高 GC 的分析和识别能力。但若要实现痕量分析以及定量分析成分较为复杂的手性化合物还需与其他方法合用。

在 GC 中应用的同位素法主要有稳定同位素稀释法和燃烧-同位素比率法两种,将这两种方法分别应用到 GC-MS 中后能较大程度地提高对手性化合物痕量的检测^[15]。但是有些手性化合物的量较低,很难达到 GC 的检测限。为了精确地检测到该化合物,常需要对该化合物进行同位素标记,并向样品中加入已知量的含有同类同位素的化合物,以增加被检同位素的“比丰度”,即为稳定同位素稀释法。将该方法与 GC-MS 联用后能够有效地提高 GC 对微量手性化合物的分析能力。此外,当手性化

物的种类繁多且不易拆分时,则可通过同位素 ¹³C、¹²C 进行标记,经燃烧并测定同位素比来对相应的化合物定量^[16]。Bonaccorsi 等^[17]使用 GC-MS 与燃烧-同位素比率法通过标记 ¹³C 对柠檬精油、侧柏烯等手性化合物进行了分析。对柠檬精油的溶液按 1:2 的体积进行稀释,连同 ¹³C 一起倒入进样器进行反应,于 SLB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)柱进行分析,并与 GC-MS 的分析结果进行比较。结果联用燃烧-同位素比率法的定量限和检测限更低,且能够实现对多种手性化合物的定量。

2.2 多维 GC 联合应用

在使用 GC 对手性化合物进行分析时,单独使用一根色谱柱对复杂手性化合物的分析能力是有限的。为了提高 GC 对复杂手性化合物的识别和分析能力,将两根色谱柱联用已经成为了当前手性分析中的一个新颖方法。到目前为止多维气相(multidimensional gas chromatography, MDGC)已经凭借突出的优势在植物提取物和精油的手性分析中得到了较好的应用^[18]。Sciarrone 等^[19]以 β-环糊精衍生物作为手性固定相,使用 MDGC 对桔子精油进行了分。联用两根不同的 GC 柱,分别为 GC1 柱 SLB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm)和 GC2 柱 DETTBS-β(25 m×0.25 mm×0.25 μm)通过 FID 检测器进行分析,并将分析结果与普通 GC 进行了对比。结果显示 MDGC 的分析能力和检测限均比普通 GC 优越。但是使用 MDGC 法时,需要对手性化合物进行纯化或增加“丰度”处理,以到达检测限^[20]。而且对化合物进行处理的过程中还可能会出现异构化现象,会导致检测结果的可信度较差。

2.3 GC 与液相色谱联合应用

将 GC 与液相色谱(LC)联用时,LC 可以首先对被分析物起到纯化作用,随后再进入具有手性选择性的 GC 柱进行分析。将正相液相色谱(NPLC)与 GC 联用时,虽然在 LC 的纯化过程中比较容易将洗脱液除去^[21],但是由于在 GC 分离中使用的都是极性洗脱液,因此将 GC 与反相液相色谱(RPLC)合用更为恰当。因此,从综合因素考虑,将 GC 与 RPLC 联用是比较恰当的。将 GC 与 LC 联用时可以使用极性较大的洗脱液,且能在 GC 与 LC 的界面处发挥重要的作用。GC 与 LC 的接触界面被称为“通过老化室的转化吸附解吸界面”(TOTAD),通过该界面能够对手性化合物的连续分析,且能够有效地降低手性化合物外消旋的风险^[22]。根据

GC 与 LC 接触面的不同,与 GC 联用的程序控温的气化进样器也有所不同。当 GC-RPLC-MS 联用时,一些极性的洗脱液在进入 GC 柱前必须被完全除尽,否则会导致分析结果误差较大。Barba 等^[23]使用 GC-RPLC-MS 对小茴香和柠檬精油进行了定量分析,并建立了较为精确的分析方法。分析结果与其他分析方法相比,具有精确度高、识别能力强的特点,并且对于复杂的手性化合物具有更好的效果。

3 结语

目前随着医药食品等行业的迅猛发展,手性分析已经逐渐成为医药食品领域中的研究重点和热点。在药物研发过程中,介入手性分析不仅能够保证目标产物的正确合成,而且对于保障临床安全也有重要意义。由于临床治疗的需求不断上升,大量的新型化合物也被开发了出来。但是很多新化合物中都伴有一定的旋光异构体。GC 凭借其敏感、快捷的优势被逐步应用到手性化合物的分析中。衍生化法以及手性固定相法虽然能够提高 GC 的敏感度和精确度,但是其经济成本和处理工艺等方面依然不够理想。GC 与其他的仪器或方法联用是目前较为精确的方法,但由于设备比较昂贵,依然阻碍其广泛应用。但随着科技的发展,随着手性分析要求的不断提高,开发出更为简便、经济、高效的手性分析方法依然是手性药物分析的一项重要任务。相信在不久的将来会有更多优质的手性固定相和相关联用设备出现,使 GC 法应用更为广泛。

参考文献

- [1] Magrans J O, Alonso-Prados J L, García-Baudín J M. Importance of considering pesticide stereoisomerism-proposal of a scheme to apply Directive 91/414/EEC framework to pesticide active substances manufactured as isomeric mixtures [J]. *J Chemosphere*, 2002, 49(5): 461-469.
- [2] Li B, Shi J H, Yang G S. Cellulose-based chiral stationary phase in high performance liquid chromatography [J]. *Chem Bull*, 2003(3): 169.
- [3] 张 玮, 尚 平, 姚 军, 等. 手性药物与手性药物的分离分析技术 [J]. *河北化工*, 2004(5): 3-12.
- [4] Yano K, Nakagiri T, Takaeuchi T, *et al*. Stereoselective recognition of dipeptide derivatives in molecularly imprinted polymers which incorporate an L-valine derivative as a novel functional monomer [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 357(1/2): 91-98.
- [5] 郑文丽, 宋 航, 梁彦明, 等. 利用二硝基苯甲酰-苯基甘氨酸型手性固定相直接拆分丙卡特罗药物对映体 [J]. *色谱*, 2003, 21(3): 239.
- [6] 申刚义, 崔 箭, 杨新玲, 等. 一种五元杂环 β -环糊精固定相的合成及气相色谱性能研究 [J]. *分析测试学报*, 2009, 3: 262-266.
- [7] 穆翠枝, 徐 峰, 雷 威, 等. 功能金属-有机骨架材料的应用 [J]. *化学进展*, 2007, 9(19): 1345-1356.
- [8] Xie S M, Zhang Z J, Wang Z Y. Chiral metal-organic frameworks for high-resolution gas chromatographic separations [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(31): 11892-11895.
- [9] 曾 苏. 高效液相色谱手性试剂衍生化法及其应用 [J]. *色谱*, 1994, 12(6): 406.
- [10] 章 立, 姚彤炜, 曾 苏, 等. 柱前手性衍生化-毛细管气相色谱测定大鼠肝微粒体中安非他明对映体 [J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(5): 291.
- [11] Morrison C, Smith F J, Tomaszewski T. Chiral gas chromatography as a tool for investigations into illicitly manufactured methylamphetamine [J]. *J Chirality*, 2011, 23(7): 519-522.
- [12] Biedermann M, Haase-Aschoff P, Grob K. Wax ester fraction of edible oils: analysis by on-line LC-GC-MS and GC-GC-FID [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2008, 110(12): 1084-1094.
- [13] Liang C Y, Chen Y H, Deng H M. Investigation of 13 kinds of typical environmental endocrine disruptors (EEDs) in human serum by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring (GC-MS-SIM). *ICBBE*, 2010, 55(1): 4770-4774.
- [14] Ranieri T L, Ciolino L A. Rapid selective screening and determination of ephedrine alkaloids using GC-MS footnote mark [J]. *Phytochem Anal*, 2008, 19(2): 127-135.
- [15] Hasegawa H, Shinohara Y, Masuda N, *et al*. Simultaneous determination of serine enantiomers in plasma using Mosher's reagent and stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2011, 46(5): 502-507.
- [16] Mosandl A, Berger R G. *Flavours and Fragrances-Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* [M]. Hannover: Heidelberg, 2007: 379.
- [17] Bonaccorsi I, Sciarrone D, Schipilliti L, *et al*. Multidimensional enantio gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography combustion-isotopic ratio mass spectrometry for the authenticity assessment of lime essential oils [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1226: 87-95.
- [18] Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, *et al*. Essential oils and

- volatiles: sample preparation and analysis. A review [J]. *Flav Fragr J*, 2010, 25(5): 282-290.
- [19] Sciarrone D, Schipilliti L, Ragonese C, *et al.* Thorough evaluation of the validity of conventional enantio-gas chromatography in the analysis of volatile chiral compounds in mandarin essential oil: A comparative investigation with multidimensional gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(7): 1101-1105.
- [20] Grob K. Development of the transfer techniques for on-line high-performance liquid chromatography- capillary gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 703(1/2): 265-276.
- [21] Grob K. Efficiency through combining high-performance liquid chromatography and high resolution gas chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 892(1/2): 407-420.
- [22] Pérez M, Alario J, Vázquez A, *et al.* Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed phase LC-GC using the through-oven-transfer adsorption/ desorption interface [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(4): 846- 852.
- [23] Barba C, Martínez R M, Calvo M M, *et al.* Chiral analysis by online coupling of reversed-phase liquid chromatography to gas chromatography and mass spectrometry [J]. *J Chirality*, 2012, 24(5): 420-426.