

逆流色谱技术在抗生素分离纯化中的应用

Application of counter-current chromatography in the separation of antibiotics

郑卫

Zheng Wei

(福建省微生物研究所, 福州 350007)

(Fujian Institute of microbiology, Fuzhou 350007)

摘要: 本文对逆流色谱技术的起源、发展、应用和现状,特别对离心分配色谱(CPC)和高速逆流色谱(HSCCC)的原理以及它们在抗生素分离纯化等方面的应用作了比较全面的综述。介绍了溶剂系统在逆流色谱中的重要性以及如何选择溶剂系统。对梯度洗脱逆流色谱、pH 区带逆流色谱、离子交换顶替离心分配色谱、手性分离逆流色谱和手性 CCC&CPC 反应器这些逆流色谱的新技术和新进展也进行比较详细的综述。

关键词: 逆流色谱; 抗生素; 分离纯化; 新技术

中图分类号: O652.63 **文献标识码:** A

1 逆流色谱技术简介

现代逆流色谱技术起源于 20 世纪 50 年代的逆流分溶法(counter current distribution, CCD),它利用不同物质在所选择的液相溶剂中的分配系数不同通过多次逆流分溶对物质进行分离。它采用数百个分离管进行操作,每一次操作后,上层液体被转移至盛有新的下层溶剂的分离管中,而往原分离管中加入新的上层溶剂,看起来好似两相的液体以相反的方向流动,故称为逆流分溶法。逆流分溶法存在许多缺点,如使用玻璃仪器,易破碎,分离时间长,需要连续稀释样品。但与液相色谱相比,它无需固体作固定相,避免了因此而带来的一系列问题。因此,在 CCD 基础上发展起来的逆流色谱(counter current chromatography, CCC)在采用了与液相色谱相似的连续洗脱、检测和分布收集技术后从 20 世纪 70 年代开始迅速发展,并在天然和合成化合物的分离纯化中发挥了日益重要的作用。

20 世纪 70 年代出现的液滴逆流色谱(droplet counter current chromatography, DCCC)使流动相形成液滴,通过作为固定相的液柱达到分离纯化的目的。其装置主要由输液部分、检测收集部分和玻璃管液柱部分(300~500 根 60cm×1.8mm 的玻璃管)组成。由于流动相形成液滴,在细玻璃管中与液体固定相有效地接触,摩擦不断形成新的表面,促进溶质在两相溶剂

中的分配,所以分离效果好,且不产生乳化现象。对于易氧化的物质,还可用氮气驱动流动相。采用 DCCC 分离纯化了许多包括中草药和抗生素在内的天然产物如柴胡皂甙和短杆菌肽,短杆菌酪肽和四环素等。

液滴逆流色谱解决了操作自动化的问题,但仍存在分离时间长,使用易破碎的玻璃管,分离度还不高等问题。逆流色谱技术的重大突破出现在 20 世纪 80 年代,根据被分离混合物的理化特性,选择二元或多元的两相溶剂体系,以上相或下相为固定相,将其注满色谱柱后使色谱柱作特定的高速旋转运动,并用由此产生的离心力场支撑柱内的液体固定相,然后以另一相为流动相,携带溶解的混合物由输入泵推入色谱柱,穿过两个液相对流的管柱,各组分根据在两相中的分配系数不同得到分离。根据离心力场的不同可将现代逆流色谱分为离心分配色谱(centrifugal partition chromatography, CPC),也称盘管行星离心色谱(coil planet centrifuge, CPC)和高速逆流色谱(high speed counter current chromatography, HSCCC),前者属流体静力平衡系统,色谱柱由一系列刻在圆盘或圆筒内的导管相联的柱体组成,通过单轴旋转产生恒定的重力场,两个旋转密封的接口分别连接流动相的进口和出口;后者属流体动力平衡系统,由聚四氟乙烯软管绕制成的色谱柱除绕离心轴旋转外,还围绕自轴旋转,产生变化

收稿日期:2004-06-30

作者简介:郑卫,男,生于 1957 年,博士,研究员。主要从事微生物药物的研发工作。

的重力场,并采用无旋转密封的连接方式。分离时两相液体被剧烈振动的离心力场依其界面特征被甩成极细的微粒,样品各组分在两相微粒的表面上分配并在微粒振荡与对流的环境中有效传递,相当于把通常的溶剂萃取高效(13次/s以上)、自动、连续地予以完成。

泡沫逆流色谱(foam counter current chromatography, Foam CCC)技术是在 HSCCC 的基础上发展起来的。使用时,氮气和流动相同时从相反方向注入管柱中形成气体和流动相的逆流,然后从盘管中部注入的混合物根据形成泡沫的能力得到分离,易形成泡沫的组分随气相被洗脱收集在泡沫流出部分,而其它组分则随流动相流出。在盘管行星离心色谱基础上还发展了交叉轴盘管行星离心色谱(cross-axis coil planet centrifuge, X-axis CPC),这种仪器在使用中产生一种行星式运动,使得盘管支架在围绕离心中轴转动(公转)的同时还沿着自己的水平方向轴旋转(自转),使得部分的离心力矢量作用于盘管的半径方向,以防止因两相乳化而降低固定相保留率的现象出现。因此, X-axis CPC 大大稳定了固定相的保留率,特别适用于大量制备性分离纯化。

现代逆流色谱技术为化合物的分离纯化提供了一个新的手段,与 HPLC 等液-固色谱技术比较,由于分离原理不同,二者间存在很强的互补性。它无需固体作固定相,不存在固体对样品组分的吸附、玷污、变性、失活、拖尾等现象,能实现很高的回收率,节省昂贵的材料消耗和溶剂消耗(HPLC 的 1/10 以下),运行使用的后续投入较低。逆流色谱在无需更换不同极性的色谱柱情况下,通过提高极性溶剂或非极性溶剂比例的方法,可以实现流动相从弱极性到强极性或相反的转变。由于色谱柱容积大,无填料,柱内空间全部是有效空间,因此,样品负载能力强,制备量大,重现性好。实验室规模的盘管总体积为 100ml 的逆流色谱仪一次可分离 0.5~2g 的粗品,而 3000ml 容量的制备型逆流色谱仪一次可分离 15~60g 的粗品。

但是,与气相色谱和高效液相色谱等相比,逆流色谱的分离效率即理论塔板数还不高(一般在 1000 以下),一次分离所需时间还较长(以小时计),因此,还不宜用于组成复杂的混合物的全谱分离分析。逆流色谱技术在基本原理以及溶剂系统选择等方面还有待于进一步的普及、研究、开发与应用。

目前, HSCCC 等技术在生物化学、医药学、农业、环境、材料、化工、海洋生物以及无机离子等众多领域已得到成功应用,1996 年美国出版的《High-Speed Countercurrent Chromatography》一书被选编为著名

的分析化学丛书第 132 卷,2000 年 9 月在英国 Brunel 大学召开了逆流色谱技术第一届国际学术会议,每年一度的国际分析化学与应用光谱学学术会议上,都设有 CCC 的专题组,“Journal of Chromatography”,“Journal of Liquid Chromatography”等重要学术刊物都有这一技术的论文发表。我国在 CCC 技术及其应用研究方面与国际发展同步,1980 年研制出了我国第一台逆流色谱仪,并用于国产多粘菌素 E 成分的分离与分析检定,发表了一大批用 HSCCC 等分离制备中草药和茶叶等天然产物活性成分的论文,引起国际同行的瞩目,2002 年在北京召开了逆流色谱技术的第二届国际学术会议。但是,在逆流色谱技术应用于抗生素的分离纯化方面,我国与国际上发展趋势相比还存在很大差距,相关论文甚少,因此,在我国开展高速逆流色谱技术分离纯化抗生素的工作有着广阔的应用和发展前景。

2 溶剂选择

无论是用 HPLC 或 CCC 技术分离混合物,分离度(R_s)是一个很重要的参数,如图 1 所示,在 HPLC 中,提高分离度是通过使峰形变窄的方法达到的,而在 CCC 或 CPC 中,则是通过改进选择性来实现的,这种选择性主要取决于样品在两相溶剂中的分配系数。因此,溶剂系统的选择在 CCC 技术中尤为重要。

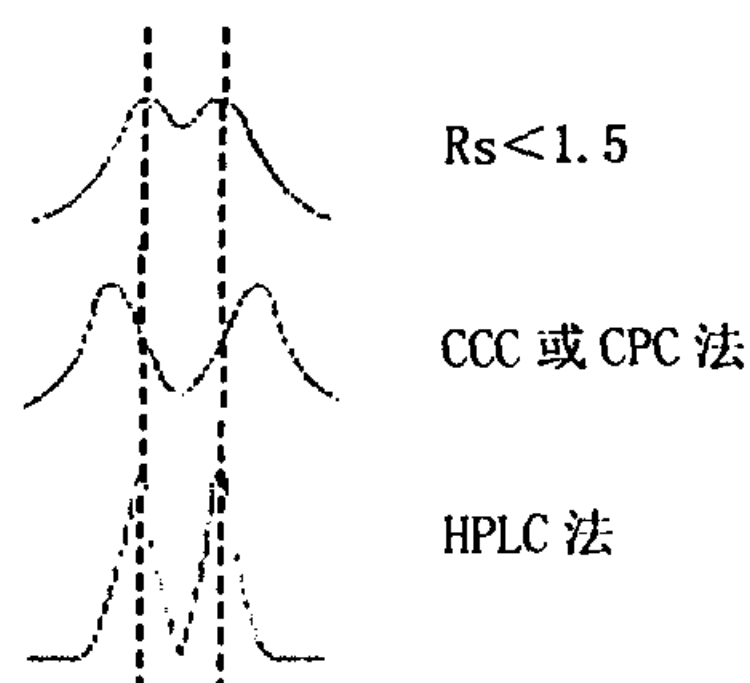


图 1 不同方法的分离度比较

选择溶剂时要考虑到样品的极性、溶解度、电荷态和形成复合物的能力等,溶剂体系的沉降时间应小于 30s,以得到满意的固定相保留率。测定方法如下:各取 2ml 平衡后的上相和下相液体移入一个 5ml 的刻度玻璃管中,密封上下摇动 5 次后静置于水平面上并测定两相分层的时间即沉降时间。样品的分配系数 K 值($K = \text{上相中样品浓度} / \text{下相中样品浓度}$,可由 HPLC 方法得出)最好在 1 左右,一般在 0.2 到 2 之间。以上相作固定相时为例,若 $K \ll 1$,样品很快随流动相流出,达不到分离效果;若 $K \gg 1$,样品出峰时间拉长,形成宽峰。由于 CCC 的理论塔板数在 800 左右,因此

要得到高的分离度,样品各组分间的分离因子(α ,各组分 K 值之比)应大于 1.5。此外,两相溶剂的体积应尽量相同以避免溶剂的浪费,溶剂最好挥发性强,这样完成操作后只要将洗脱液浓缩即可得到纯样品。

选择溶剂体系时,首先选出一个能使样品全部溶解的溶剂体系,然后调整各溶剂的比例使得被分离各组分满足 K 值和 α 值的要求,以提高分离度。可以采用相图来研究改变某一相的组成对另一相组成的影响, Serensen 等对近百种三元溶剂相图研究后,总结归纳出三类溶剂体系:乙酸乙酯:正丁醇:水(EtOAc: BuOH: H₂O),适用于极性弱的样品;水:二甲基亚砷:四氢呋喃(H₂O: DMSO: THF),适用于极性强的难溶性样品如两性霉素 B;氯仿:甲醇:水(CHCl₃: MeOH: H₂O),适用于大部分样品。此后又发展了其它通用的多元溶剂体系如正庚烷:乙酸乙酯:甲醇:水体系和正庚烷:甲醇:甲基叔丁基醚:甘醇二甲醚:水体系等。

常用溶剂体系的选择可参考表 1,首先根据样品的理化特性选出最佳溶剂,然后在左右两栏中再选择相应的数种溶剂,以组成选择性最好的多元溶剂体系。

3 逆流色谱技术在抗生素分离纯化中的应用

逆流色谱技术已经成功用于许多抗生素的分离纯化,这些抗生素的结构类型有肽类、大环内酯类、四环素类、萜环类、放线菌素类、多烯类、核苷类、糖类和头孢类等(表 2)。

本文作者等用国产分析型 TBE-300 高速逆流色谱仪(深圳同田生化技术有限公司)对含环孢菌素 A、B、C、D 的混合物进行分离,以石油醚/丙酮/水(3:3:2, V/V)为溶剂系统,下相为流动相,运行 8h 后得到纯度大于 98.5%的 A、B、C、D 各组分,收率高于 85%。事实证明高速逆流色谱技术在抗生素分离纯化方面大有可为。

表 1 最佳溶剂体系选择表

极性较弱溶剂	最佳溶剂	极性较强溶剂
正庚烷,氯仿	四氢呋喃	水
正庚烷,甲苯,甲基异丁基酮,氯仿,乙酸乙酯	丙酮	水
正庚烷	甲基乙基酮	水
四氢呋喃	二甲基亚砷	水
甲苯,甲基叔丁基醚,甲基异丁基酮,乙酸乙酯	乙腈	水
正庚烷,甲苯,氯仿,乙酸乙酯	正丁醇	水
正庚烷,甲苯,氯仿,乙酸乙酯	正丙醇	水
正庚烷,氯仿,乙酸乙酯	乙醇	水
正庚烷,甲苯,氯仿,乙酸乙酯,正丁醇	甲醇	水
正庚烷,甲苯,氯仿,甲基异丁基酮,乙酸乙酯,正丁醇	乙酸	水
氯仿	甲酸	水
非水体系		
正庚烷	甲氢呋喃, N,N-二甲基甲酰胺, 乙酸乙酯, 正丙醇, 乙醇	甲醇, 乙腈

4 逆流色谱技术的新进展

4.1 梯度洗脱逆流色谱

高速逆流色谱通常使用恒定比例的溶剂系统,但是对于组分极性变化大的样品,用恒定比例的溶剂系统难以达到分离效果。此时可以像 HPLC 一样采用梯度洗脱的方法进行分离。先用简单的梯度洗脱系统如水:乙腈(100:0→0:100)用 HPLC 对样品进行极性扫描分析,将分析结果与图 2 比较得出样品的极性范围,再选择适当的溶剂系统,如正己烷:正丁醇:甲醇:水(极性化合物);正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水(中极性化合物)和正己烷:乙腈(非极性化合物)。然后逐渐改变系统中某一溶剂的比例,如将正己烷:乙酸乙酯:甲醇:水体系中甲醇的比例从 0.1 逐渐提高到 2.5 并求出不同甲醇比例时的分配系数以优化溶剂

表 2 逆流色谱分离的部分抗生素

样品	仪器	溶剂系统	流动相	发表时间
肽类				
短杆菌肽 A,B,C	DCCC	苯:氯仿:甲醇:水	下层	1974
	HSCCC	苯:氯仿:甲醇:水	下层	1982
短杆菌酪肽	DCCC	氯仿:甲醇:0.1mol/L 盐酸	下层	1974
多粘菌素 E(抗敌素)	CPC	正丁醇:2% 二氯乙酸(5%氯化钠)	下层	1984
多粘菌素	分析 HSCCC	正丁醇:0.04mol/L 三氯乙酸(1%甘油)	下层	1991
杆菌肽	x-axisCCC	氯仿:95%乙酸乙酯:水	下层	1989
	Foam CCC	氮,水		1989,1991
	HSCCC	氯仿:甲醇:水	下层	1991
	HSCCC	氯仿:乙醇:甲醇:水	下层	1991
WAP-8294A	HSCCC	正丁醇:乙酸乙酯:0.005mol/L 三氟乙酸	下层	2001

续表 2

样 品	仪 器	溶剂系统	流动相	发表时间
四环素类				
土霉素/氯霉素	CPC	正丁醇: 0.01mol/L 盐酸	下层	1984
四环素/杂质	CPC	硝基甲烷: 氯仿: 吡啶: 0.1mol/L EDTA(pH7)	下层	1984
四环素	DCCC	氯仿: 甲醇: 正丙醇: 0.01mol/L 盐酸	下层	1984
大环内酯类				
Niphimycin	DCCC	氯仿: 甲醇: 水	下层	1983
红霉素	CPC	甲基异丁酮: 丙酮: 0.2mol/L 磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液(pH6.5)	下层	1984
2-去甲基红霉素	HSCCC	正庚烷: 苯: 丙酮: 异丙醇: 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.3)	上层	1988
尼达霉素	HSCCC	四氯化碳: 甲醇: 0.01mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7)	上层	1988
Tiacumicins	HSCCC	四氯化碳: 氯仿: 甲醇: 水	上层	1988
Coloradocin	HSCCC	氯仿: 甲醇: 水	上层	1987,1988
孢绿菌素	HSCCC	正丁醇: 乙醚: 水	下层	1990
霉菌素	分析 HSCCC	正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 8%氨水	下层	1991
Dunaimycin	HSCCC	正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	上层	1991
原始霉素	HSCCC	氯仿: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	上层	1992
伊维菌素	HSCCC	正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	下层	1996
螺旋霉素	HSCCC	正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	上层	2000
蒽环类				
柔红霉素衍生物	HSCCC	氯仿: 二氯甲烷: 正己烷: 甲醇: 水	上层	1981
多柔比星/柔红霉素/代谢物	CPC	正丁醇: 0.3mol/L 磷酸氢二钠	下层	1984
Benzanthrins A,B	HSCCC	四氯化碳: 氯仿: 甲醇: 水	上层	1986
Altromycins	CCC	四氯化碳: 甲醇: 水: 正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	下层	1990
喹啉类				
棘霉素/醌霉素	CPC	丙酮: 水: 正庚烷: 乙酸乙酯	下层	1978
三骨菌素 A/棘霉素	CPC	三氯乙烷: 甲醇: 水	上层	1978
放线菌素类				
放线菌素混合物	HSCCC	乙醚: 正己烷: 甲醇: 水	上层	1986
多烯类				
曲古霉素	CPC	氯仿: 甲醇: 硼酸盐缓冲液	上层	1984
Globoroseamycin	CPC	氯仿: 甲醇: 硼酸盐缓冲液	上层	1984
制霉菌素	CPC	氯仿: 甲醇: 硼酸盐缓冲液	下层	1984
吠罗托霉素	HSCCC	四氯化碳: 氯仿: 甲醇: 水	上层	1985
克念菌素	HSCCC	氯仿: 甲醇: 水	上层	1987
核苷类				
Herbicidins A,B	CCD	氯仿: 甲醇: 水	下层	1976
头孢类				
头孢菌素 C 及脱乙酰头孢菌素 C	HSCCC	PEG600 15%(W/W): 硫酸铵 17.5%(W/W)	下层	1995
其它				
Pentalenolactone(内酯)	HSCCC	氯仿: 甲醇: 水	上层	1985
Tirandamycin A,B	HSCCC	正己烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水	上层	1985
Siderochelin A	HSCCC	氯仿: 甲醇: 水	上层	1985
A201E	HSCCC	四氯化碳: 氯仿: 甲醇: 水	上层	1985
Bu2313B	HSCCC	正己烷: 二氯甲烷: 甲醇: 水	下层	1985
SCH42282 (含糖大环内酰胺)	HSCCC	氯仿: 甲醇: 水	上层	1998

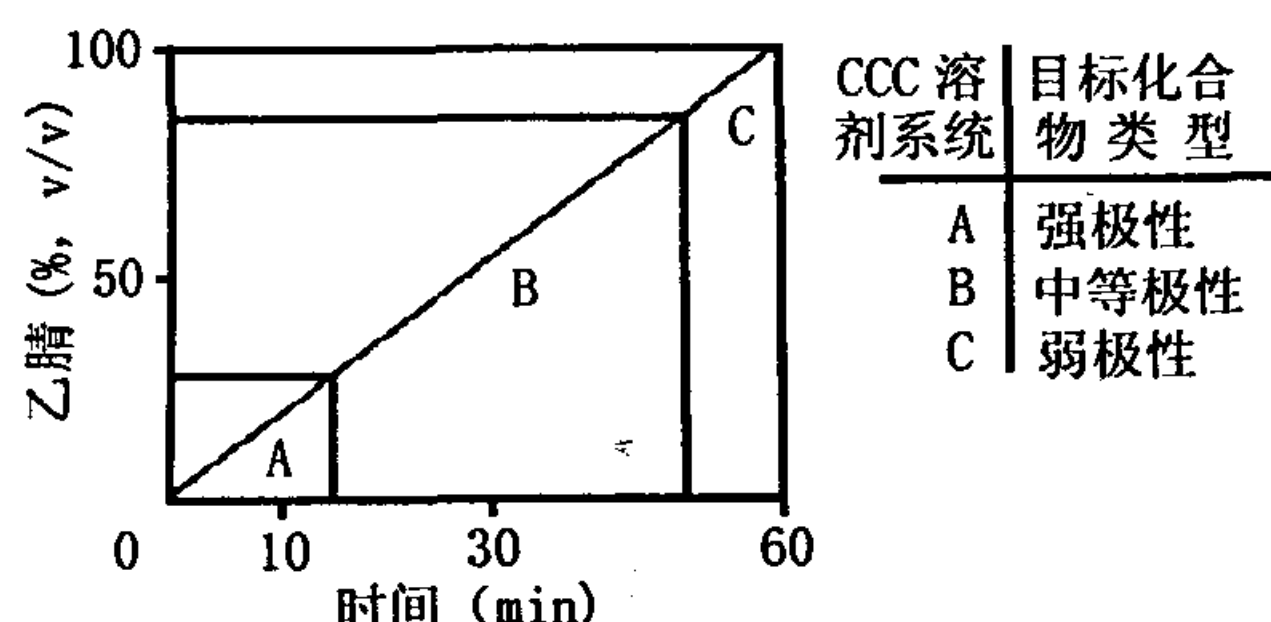


图 2 不同极性化合物的梯度洗脱逆流色谱

系统,最终得出最佳梯度洗脱系统。花色素苷(anthocyanins)是一种类黄酮类植物色素,是很好的抗氧化剂和自由基清除剂。由于结构中羟基和糖苷基的数目不同而使各组分的极性不同。以乙酸乙酯:正丁醇:水(0.2%三氟乙酸)为溶剂系统,采用逐渐提高流动相中正丁醇比例的方法对样品进行梯度洗脱逆流色谱,可分离出 5 个活性成分。

4.2 pH 区带逆流色谱

pH 区带逆流色谱(pH-zone-refining CCC)的洗脱色谱图形与顶替色谱和等速电泳相似,主要组分的峰组成一系列矩形色谱峰,各色谱峰之间很少重叠,一般针对可离子化的分子如羧酸、胺等。操作时选择两相体系如甲基叔丁基醚:水,平衡后取上层溶剂加入适量的作为“保留剂”的酸如三氟乙酸并作为固定相,下层溶剂加入适量的作为“取代剂”的碱如氨水并作为流动相。以分离有机酸 R_1COOH 、 R_2COOH 、 R_3COOH ($pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{a3}$) 为例(图 3),首先将酸化的固定相注入色谱柱中,然后加入用固定相溶解的样品。泵入流动相后,在色谱柱足够长的情况下整个体系达到“等速”状态,与氨水界面移动的速度同步。酸性较强的 R_1COOH 先与氨水作用,转化为 R_1COO^- 和 NH_4^+ ,但 R_1COO^- 随即被酸性更强的 CF_3COOH 质子化,又变为 R_1COOH 回到固定相, CF_3COO^- 和 NH_4^+ 先洗脱出。同样,在 CF_3COOH 消耗完变为 CF_3COO^- 后, R_1COOH 提供质子,使 R_2COO^- 转化为 R_1COOH 留在固定相,直至所有的 R_1COOH 转变为 R_1COO^- ,并随流动相洗脱出,形成 R_1COO^- 的矩形色谱峰。与此类

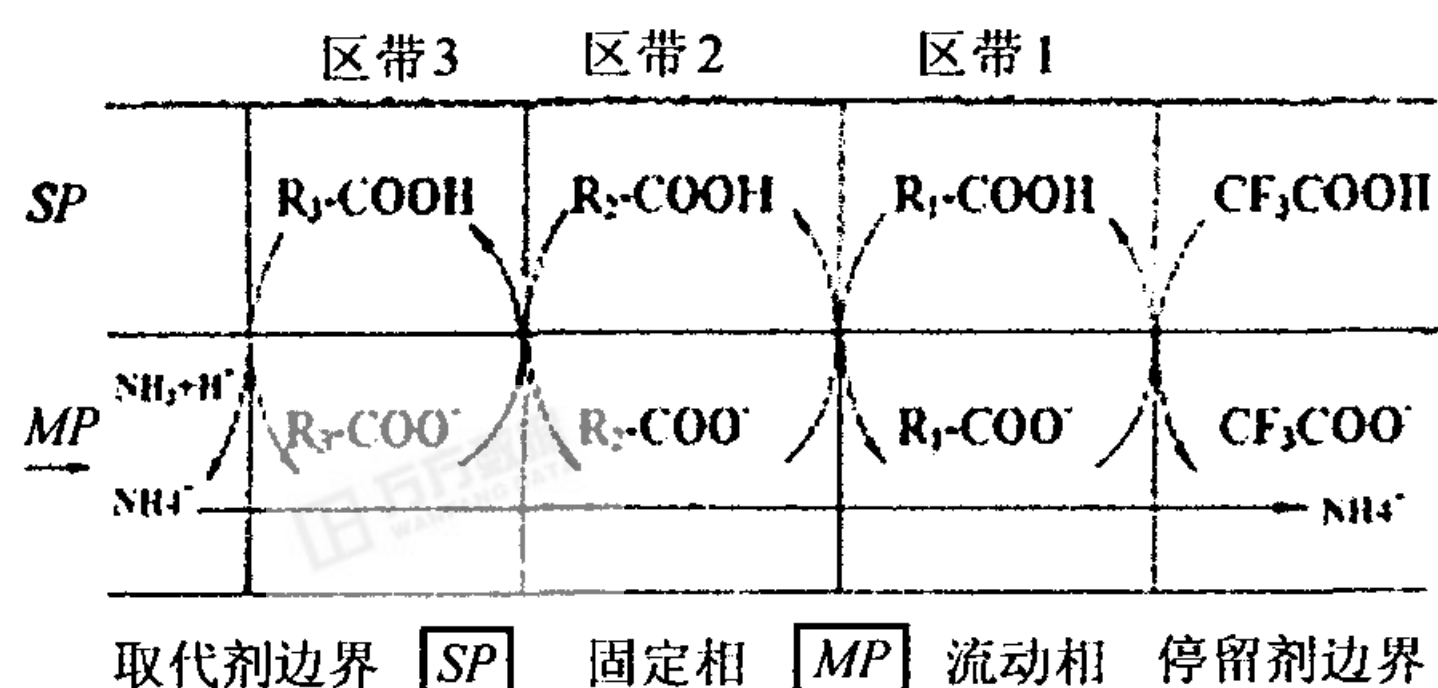


图 3 pH 区带逆流色谱分离有机酸示意图

推,其次洗脱出的是 R_2COO^- 矩形峰,最后是 R_3COO^- 的矩形峰。由于在所有的 R_1COOH 转变为 R_1COO^- 前, R_2COO^- 不会洗脱出,因此, R_1COO^- 在色谱图上形成矩形峰,与 R_2COO^- 很少重叠, R_2COO^- 和 R_3COO^- 的峰也是如此。

二硝基苯亮氨酸(DNP-Leu)、丙氨酸(DNP-Ala)和天冬氨酸(DNP-Asp)的 pK_a 值分别为 2.33、2.35 和 1.99、3.90(β -COOH),以 MtBE- H_2O 平衡后的上相为固定相并加入适量三氟乙酸,下相为流动相并加入适量的氨水,它们 pH 区带逆流色谱行为如图 3 所示,得到很好的分离效果(图 4)。

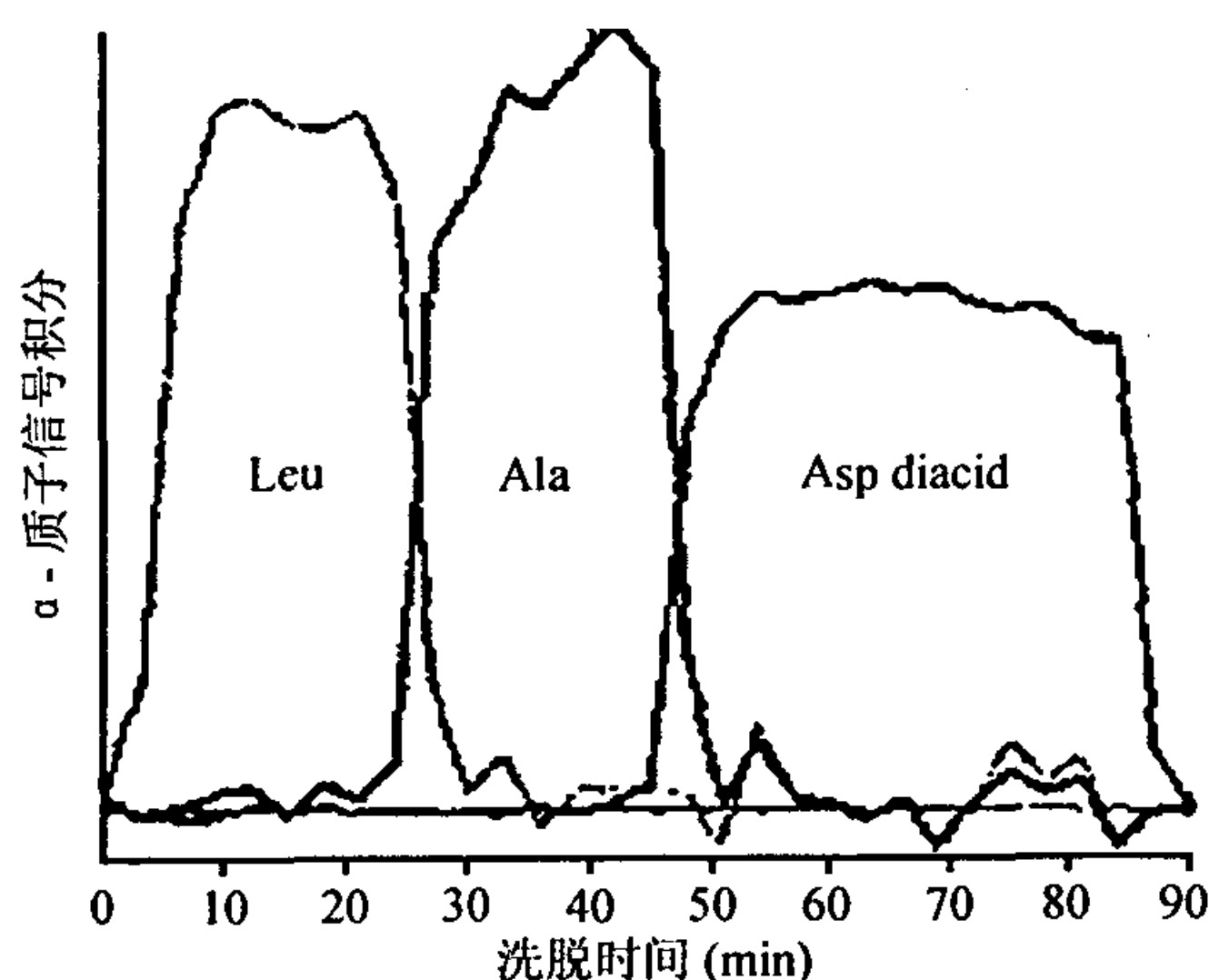


图 4 pH 区带逆流色谱分离 DNP-Leu、DNP-Ala 和 DNP-Asp

同样,若被分离的样品是碱类如生物碱等,也可以碱为保留剂,酸为取代剂,进行 pH 区带逆流色谱分离。此外,也可以选择下相溶剂为固定相,上相溶剂为流动相,因此,pH 区带逆流色谱扩大了逆流色谱的应用范围,提高了样品的进样量,可进行制备性的样品分离,在氨基酸及其衍生物、多肽、氧杂葱染料、生物碱、多酚和异黄酮类等化合物的分离方面得到应用。如用正丁醇:0.03mol 三氟乙酸(1:1)分离了粘菌素;用正丁醇:0.2mol 甲酰胺分离了缩胆囊素。pH 区带逆流色谱也可以用于有机酸对映体的分离,1-甲基-4-甲氧甲基环己基甲酸的两个异构体由于立体位阻效应不同使酸性产生差异(图 5),从而得到分离。

4.3 离子交换顶替离心分配色谱

离子交换顶替离心分配色谱(Ion-exchange displacement CPC)的原理与 pH 区带逆流色谱相同,但后者针对可离子化的分子如羧酸和胺类,而前者特指离子化的化合物即在任何 pH 值的情况下都带电的化合物如有机磺酸盐和季胺盐等。从褐色海藻中提取出一种多取代硫酸多糖,以硫酸岩藻糖为基本单元的聚

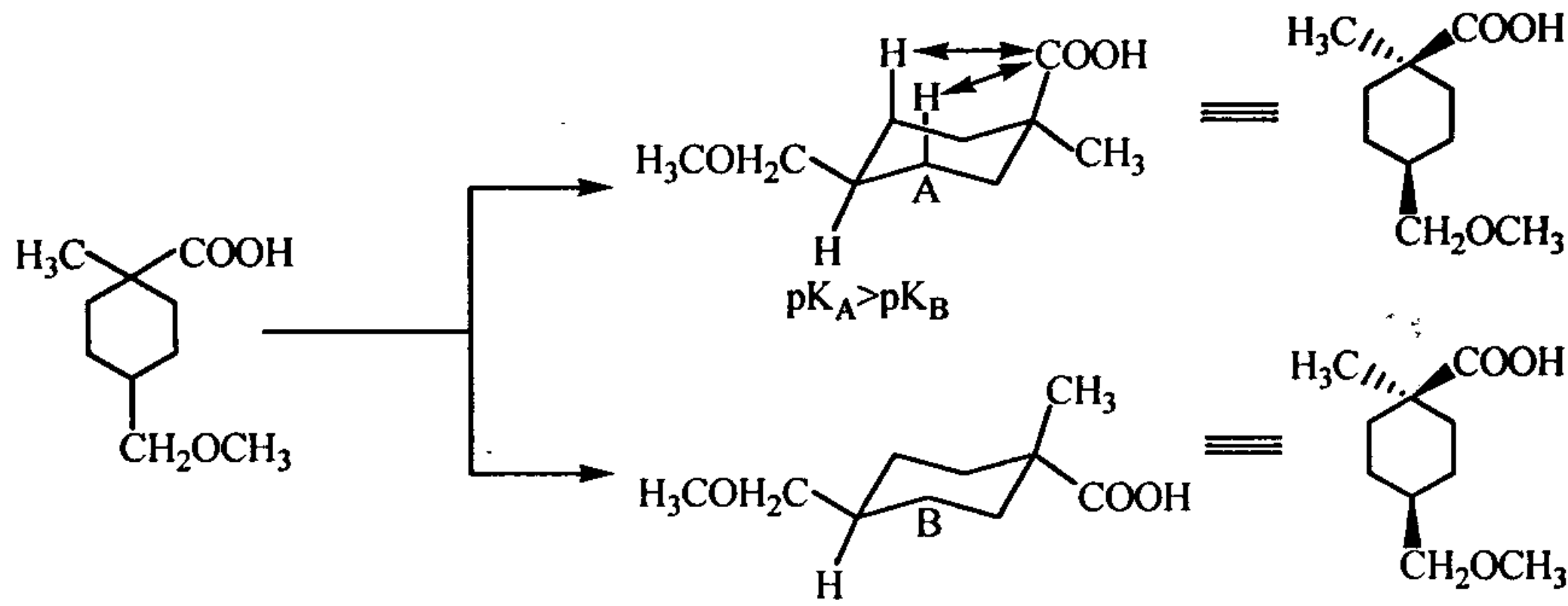


图5 1-甲基-4-甲氧甲基环己基甲酸的对映体分离

合体上还含有半乳糖、木糖和糖醛酸。这种带多个负电荷的高极性聚合物(F_n^- , F_{n-1}^- , F_2^- , F_1^- 等)易溶于水,不适合用离心分配色谱等进行分离,但引入离子交换顶替方法后可以用CPC等逆流色谱予以分离。操作中采用了一种液相离子交换树脂 Amberlite LA2,这是一种高分子油溶性二级胺,在大部分有机溶剂中溶解性良好而在水相中溶解性极低。将LA2溶解在甲基异丁基酮等有机溶剂中并用盐酸质子化,将有机相作为固定相,样品用固定相溶解后注入色谱柱,以含 OH^- 的溶液为流动相进行离子交换顶替离心分配色谱分离,其分离原理与pH区带逆流色谱相同(图6),最终被树脂吸附最弱的多糖先洗脱出,最后出来的是吸附最强的组分。

4.4 手性分离逆流色谱

手性分离技术已经在高压液相(HPLC)、气相(GC)和毛细管电泳(CE)中得到广泛应用,但在逆流色谱中应用很少。主要困难在于寻找适合的手性选择剂,它们在液相和混合溶剂中都要有很高的选择性,并且能将所要分离的手性异构体洗脱出。尽管进展不大,但下列开拓性的工作值得重视:源自HPLC技术的以N-十二烷酰-L-脯氨酸-3,5-二甲基苯胺,双(和2-乙基己基)磷酸(DEHPA)万古霉素为手性选择剂的工作以及源自CE技术的以 β -环糊精为手性选择剂的工作。

N-十二烷酰-L-脯氨酸-3,5-二甲基苯胺是 π 电子供体化合物,能将天然氨基酸的N-(3,5-二硝基苯甲

酰基)-叔丁基衍生物(DNB-氨基酸)的对映体快速和完全分离。研究发现若增加固定相中手性选择剂的量或浓度以及调整溶剂系统的憎水性使对映体的分配系数在0.6和0.8之间(pH区带逆流色谱除外),可以在330ml的色谱柱中用CCC仪器将1g DNB-氨基酸外消旋体分离,采用pH区带逆流色谱,分离量达2g。

以甲基叔丁基醚:0.1mol/L KH_2PO_4 平衡后的上相为固定相并加入10%的DEHPA为手性选择剂,下相为流动相,对四对二肽异构体 gly-tyr、tyr-gly、ala-tyr、tyr-ala、val-tyr、tyr-val、leu-tyr、tyr-leu 进行,得到很好的效果。

(3R,4R)-7-des-methyl-ormeloxifene 是部分雌激素受体激动剂(-)-(3R,4R)-levormeloxifene 的主要体内代谢产物,对(3R,4R)-7-des-methyl-ormeloxifene 及其(3S,4S)的对映体进行毛细管电泳分离时,以硫酸化 β -环糊精为手性选择剂,分离度可增加十倍,达到100以上。但毛细管电泳的分离量太少,于是,将此技术应用于逆流色谱,选择取代度为7到11的硫酸化 β -环糊精为手性选择剂,以10:1:9的乙酸乙酯:甲醇:三乙铵乙酸盐溶液为溶剂系统并在固定相中加入2%(W/V)的硫酸化 β -环糊精,可很好地将上述对映体拆分。

万古霉素作为一种通用和高效的手性选择剂已应用于液相色谱、薄层色谱和毛细管电泳,并成功地拆分了许多对映体如氯杀鼠灵、华法林、萘氧丙草胺、5-甲

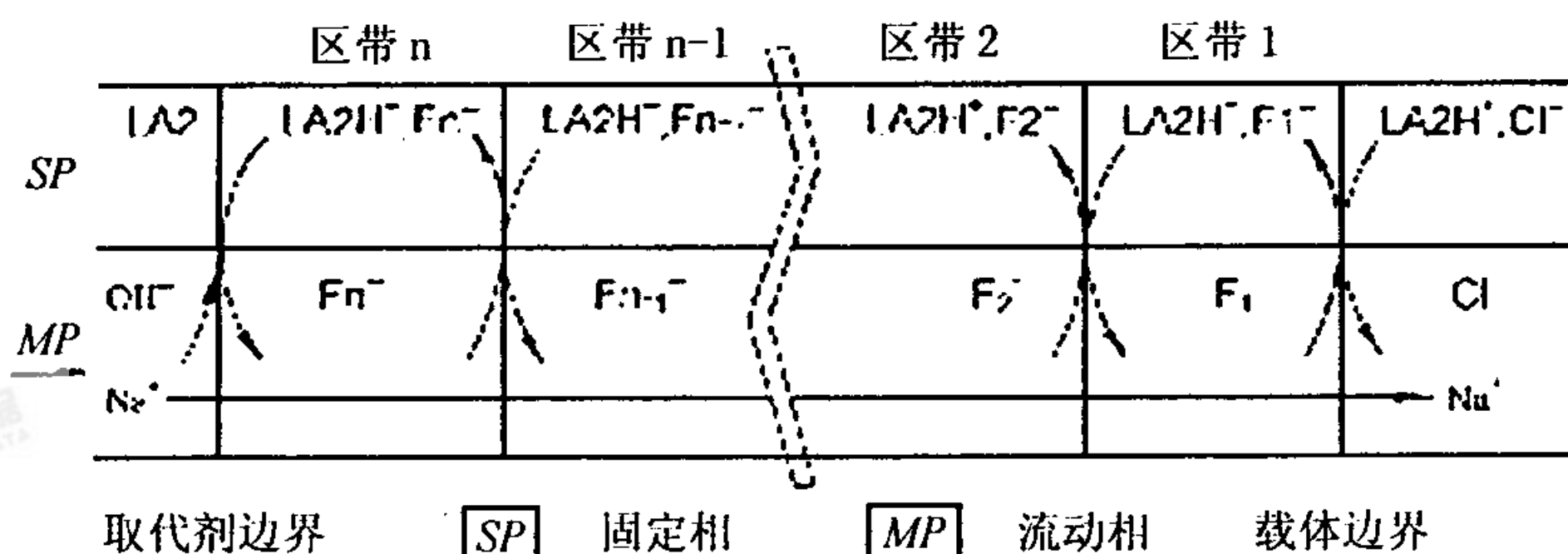


图6 离子交换顶替离心分配色谱分离硫酸多糖示意图

基-5-苯基乙内酰胺和各种氨基酸衍生物。万古霉素易溶于水,在甲醇中也有一定的溶解度,但不溶于高级醇和其它较低极性的有机溶剂。因此,以万古霉素为手性选择剂进行 CCC 和 CPC 拆分时,通常采用两相系统(含万古霉素的水相固定相和富含对映体的低极性的有机流动相)。这样,分配系数 K 值在 0.5 到 1 之间,有利于快速回收。采用甲苯和 140mg/ml 万古霉素溶液 (pH4.7) 组成的两相系统,分别以 CCC 仪器(13ml 分离柱)和 CPC 仪器(90ml 分离柱)对正亮氨酸的丹磺酰衍生物进行对映体拆分。由于 D 对映体倾向于保留在万古霉素溶液相中,而 L 对映体倾向于保留在有机相中,因此,D,L 对映体与作为固定相的万古霉素溶液一起注入,当 L 对映体随有机流动相洗脱出后,以有机相为固定相,万古霉素溶液相为流动相,将 D 对映体洗脱出,达到拆分目的。使用 CPC 仪器,在 50min 内可将 50mg 的对映体拆分开。

4.5 手性 CCC&CPC 反应器

在酶促反应中,活性位点(亲脂性区域)被包围在亲水性环境中,形成稳定的酶促反应系统,底物和反应物通过特定的相转移进出活性位点,形成连续的反应传输体系。而在 CCC&CPC 反应器中,以加酶的固定(有机)相为催化反应区域,流动相为亲水性环境,由此形成酶促反应系统。底物(反应物)通过注射加入固定相,催化反应产物则被流动相带走,固定相与流动相不断动态接触、反应、分离,形成连续的反应体系。目前手性 CCC&CPC 反应器的研究还处于起步阶段,但在选择性酶催化水解 N-乙酰氨基酸(图 7)方面有所进展。

以手性 CCC&CPC 反应器选择性酶催化水解、分离 N-乙酰蛋氨酸为例,选择磷酸钾(16%) : PEG600 : 水为溶剂系统,上相(固定相)中加入酰化酶(0.2 g/L),下相为流动相。底物 N-乙酰蛋氨酸(70 mmol/L, 2ml)注入上相,转速 800r/min,流速 4ml/min,选择性酶催化水解后的亲水性 L-蛋氨酸随流动相流出,而亲脂性的 N-乙酰-D-蛋氨酸则留在固定相中,从而起到反应、分离的目的(图 8)。

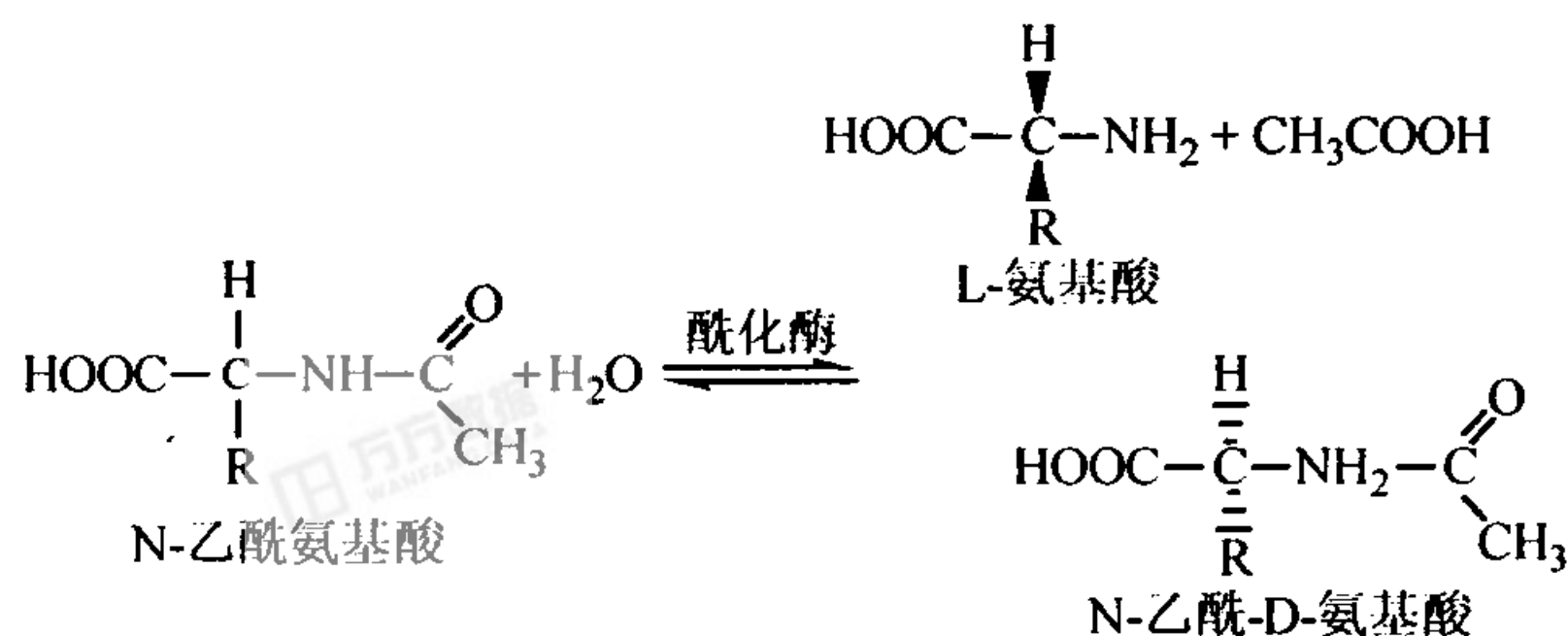


图 7 选择性酶催化水解 N-乙酰氨基酸

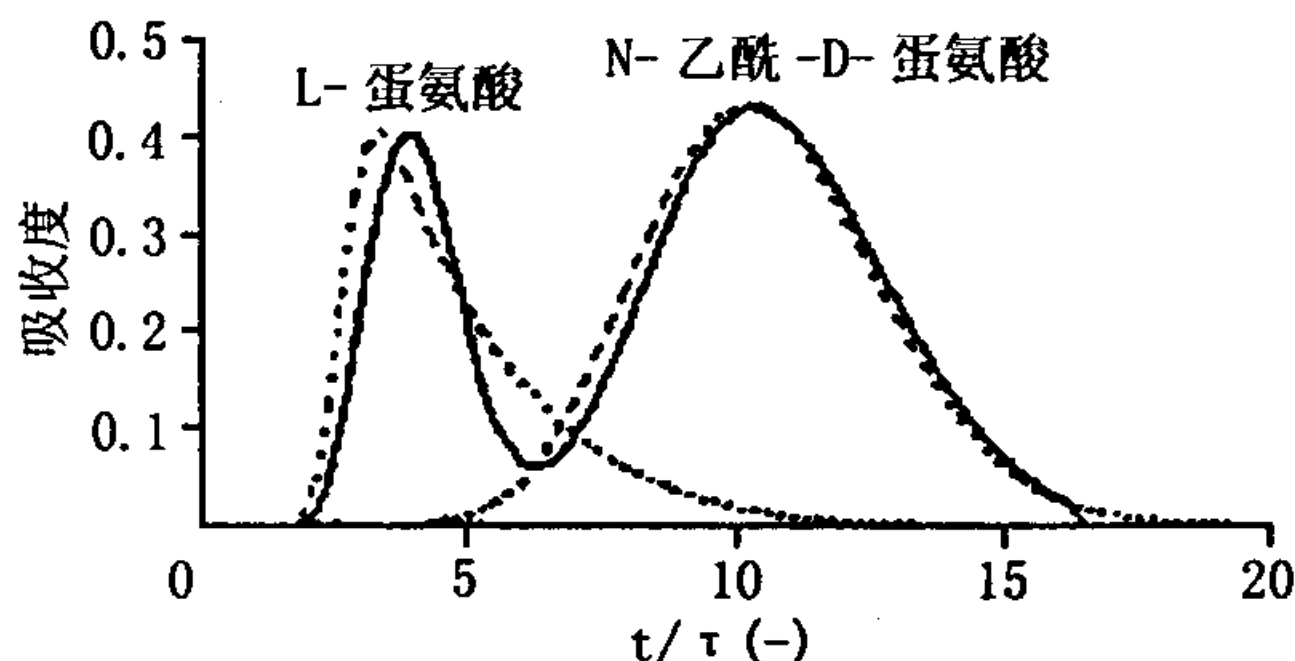


图 8 手性 CCC&CPC 反应器选择性酶催化水解分离 N-乙酰蛋氨酸

上述逆流色谱新技术的应用与其它色谱新技术相比,还有待于普及和推广,特别是在抗生素分离纯化方面,更显得薄弱不足。希望抗生素界的广大同行一起努力,学习、应用和推广逆流色谱这一分离技术,使它在抗生素行业异军突起,生根发芽,发挥它应有的作用。

致谢:本所方东升工程师在本文的写作过程中给予许多帮助,并在高速逆流色谱分离环孢菌素混合物中做了具体工作,特此致谢。

参考文献

- [1] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1993
- [2] 戴德舜,王义明,罗国安. 高速逆流色谱研究进展[J]. 分析化学, 2001, 29(5): 586
- [3] Foucault A P, Chevolut L. Countercurrent chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 808: 3
- [4] 毕汝仁,孔英梅,余方健,等. 国产抗敌素的分析鉴定[J]. 抗生素, 1982, 7(6): 370
- [5] Oka H, Harada K-I, Ito Y, et al. Separation of antibiotics by counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 812: 35
- [6] Lin P C, Chu I M. Separation of cephalosporin C and desacetyl cephalosporin C by high counter-current chromatography in aqueous two-phase system [J]. *Biotechnol Techniq*, 1995, 9(8): 549
- [7] Renault J H, Thépenier P, Zèches-Hanrot M, et al. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 763: 345
- [8] Ito Y, Ma Y. PH-Zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 753: 1
- [9] Chevolut L, Collic-Jouault S, Foucault A, et al. Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1998, 706: 43
- [10] Foucault A P. Enantioseparations in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 906: 365