



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102798656 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 201210287005.8

(22) 申请日 2012.08.14

(73) 专利权人 绍兴文理学院

地址 312000 浙江省绍兴市越城区环城西路
508 号

(72) 发明人 董华平 徐新 胡六江 占林军

(74) 专利代理机构 绍兴市越兴专利事务所
33220

代理人 蒋卫东

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101464431 A, 2009.06.24, 全文.

Hua-Ping Dong et al. "Quantitative
Analysis and Separation of Chiral
(S)-Ethyl 3-Hydroxyglutarate in

Bioconversion Mixtures by LC and TLC.

《Chromatographia》. 2009, 第 71 卷 (第 1/2 期),
第 85-89 页.

Hua-Ping Dong et al. "Enantioselective
hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to
ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized
Candida antarctica lipase B". 《Journal of
Molecular Catalysis B: Enzymatic》. 2010, 第
90-94 页.

审查员 许静

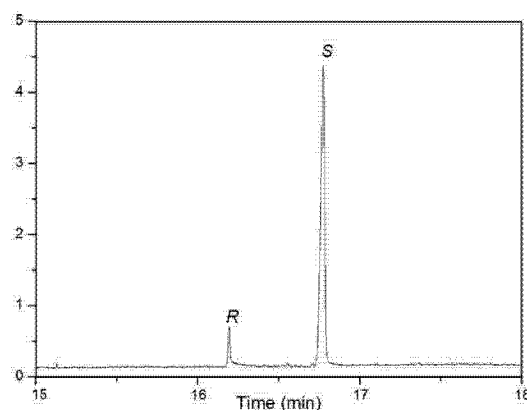
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸单
酯对映异构体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高效毛细管电泳分离
3-羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,包括如下
步骤:1)配置 3-羟基戊二酸单酯样品溶液;2)配
制 pH 为 5~7 的缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入
手性选择剂,超声脱气,用微孔滤膜过滤,过滤
完毕继续超声脱气,所得溶液为电泳缓冲液;3)
将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸单酯样品溶液在
毛细管电泳条件下,使用步骤 2)制得的电泳缓冲
液使 (R)-3-羟基戊二酸单酯和 (S)-3-羟基戊二
酸单酯对映体实现基线分离。本发明通过在高效
毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适
的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作
用差异进行分离,具有分离效果好、灵敏度高、准
确性好等特点。



1. 一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,其特征在于包括如下步骤:1)用二次重蒸水配置浓度为 0.1~1.0 mg/mL 的 3-羟基戊二酸单酯样品溶液;2)配制 pH 为 5~7 的缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入浓度为 0~50 mmol/L 的手性选择剂,超声脱气 20~40min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 10~20min,所得溶液为电泳缓冲液;3)将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸单酯样品溶液在毛细管电泳条件下,使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸单酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸单酯对映体实现基线分离,其中,

所述的 3-羟基戊二酸单酯采用 3-羟基戊二酸甲酯、3-羟基戊二酸乙酯、3-羟基戊二酸丙酯中的一种;所述的步骤 2)中的缓冲溶液为磷酸盐缓冲液;所述的手性选择剂采用 β -环糊精、羟甲基- β -环糊精、羟乙基- β -环糊精、羟丙基- β -环糊精中的一种;所述的毛细管电泳采用高效毛细管电泳仪,其电泳条件为:分离电压为 10~30 kV,柱温 20~30℃,检测波长为 190~250 nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。

一种高效毛细管电泳分离 3- 羟基戊二酸单酯对映异构体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高效毛细管电泳分离 3- 羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,属于对映体的拆分和检测技术领域。

背景技术

[0002] 建立一种快速且可靠的分离与检测方法是制备高纯度手性物质的前提。目前,常用的手性化合物的分离分析方法有高效液相色谱(或气相色谱)-手性柱分离法、酶(也包括微生物细胞)拆分法、化学衍生与色谱分离相结合等,但这些方法的成本较高、适用性和效率差、步骤繁琐,而且不易实现分析手段的自动化。相比之下,高效毛细管电泳具有效率高、速度快、所需样品和试剂少、检测模式多且可以和其他技术联用、试剂廉价易得、能够实现自动化的优点,近年来广泛应用于各种手性药物及中间体、以及多肽等样品的分离分析。此外,相比常规的高效液相色谱等分离方法,高效毛细管电泳具有柱效高、有机溶剂用量少、环境污染小、能多次循环使用等特点,与我国当前大力倡导的节能减排和循环经济的发展方式相符合。

[0003] (*R*)-和(*S*)-3-羟基戊二酸单酯(包括甲酯、乙酯等)是制备阿托伐他汀(Atorvastatin)、瑞舒伐他汀(Rosuvastatin)等他汀类药物以及减肥健美类药物左旋肉碱(L-carnitine)的关键中间体。目前,无论采用化学合成还是生物合成法,制备得到的都是(*R*)-和(*S*)-3-羟基戊二酸单酯的对映体混合产物。而且,研究人员运用了包括高效液相色谱-手性柱等分离手段在内的诸多分离分析方法,均不能对该对映体混合物进行有效分离。因此,迄今为止,无法对(*R*)-和(*S*)-3-羟基戊二酸单酯的光学纯度进行有效的分析。

[0004] 通过在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离。目前,国内外文献还没有应用毛细管电泳分离(*R*)-和(*S*)-3-羟基戊二酸单酯、以及分离检测其光学纯度的相关报道,本发明利用该技术建立了一种分离效果好、灵敏度高、准确性好的分析方法应用于(*R*)-和(*S*)-3-羟基戊二酸单酯的分离分析。

[0005] 发明的内容

[0006] 本发明的目的在于提供了一种高效毛细管电泳分离 3- 羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,通过在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,具有分离效果好、灵敏度高、准确性好等特点。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案是:

[0008] 一种高效毛细管电泳分离 3- 羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,包括如下步骤:
1) 用二次重蒸水配置浓度为 0.1~1.0 mg/mL 的 3- 羟基戊二酸单酯样品溶液;2) 配制 pH 为 5~7 的缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入浓度为 0~50 mmol/L 的手性选择剂,超声脱气 20~40min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 10~20min 所得溶液为电泳缓

冲液 ;3)使用高效毛细管电泳仪将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸单酯样品溶液在毛细管电泳条件下,使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸单酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸单酯对映体实现基线分离。

[0009] 所述的 3-羟基戊二酸单酯采用 3-羟基戊二酸甲酯、3-羟基戊二酸乙酯、3-羟基戊二酸丙酯中的一种。

[0010] 所述的步骤 2)中的缓冲溶液为磷酸盐缓冲液。

[0011] 所述的手性选择剂采用 β -环糊精、羟甲基- β -环糊精、羟乙基- β -环糊精、羟丙基- β -环糊精中的一种。

[0012] 所述的毛细管电泳采用高效毛细管电泳仪,其电泳条件为:分离电压为 10~30 kV,柱温 20~30℃,检测波长为 190~250 nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。

[0013] 本发明的有益效果是:通过使用本发明提供的一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸单酯对映异构体的方法,通过在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,解决了高效液相色谱-手性柱法等传统分离方法难以有效分离 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸单酯对映体的难题,从而能够对 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸单酯的样品的光学纯度进行正确测定。该方法具有分离效果好、灵敏度高、准确性好、无污染、成本低以及易于自动化等优点。

附图说明

[0014] 图 1 是本发明实施例 1 中 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯样品的高效毛细管电泳分离图;

具体实施方式

[0015] 实施例 1

[0016] 下面结合具体详细实例对本发明所采用的分离方法及其带来的技术效果作进一步的说明,但本发明的保护范围并不仅限于此。

[0017] 1)用二次重蒸水配置浓度为 0.5 mg/mL 的 3-羟基戊二酸乙酯样品溶液;2)配制 pH 为 5.0 的磷酸盐缓冲溶液,在所述的磷酸盐缓冲溶液中加入浓度为 30 mmol/L 的 β -环糊精作为手性选择剂,超声脱气 30min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 10min 所得溶液为电泳缓冲液;3)将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸乙酯样品溶液在毛细管电泳条件下,(所用仪器为 G1600AX 型高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司)),使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸乙酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯对映体实现基线分离,所述的毛细管电泳条件为:分离电压为 20 kV,柱温 25℃,检测波长为 214nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。实验结果如图 1 所示, (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯的保留时间分别为 16.20 和 16.80min,完全达到了基线分离。通过使用本实施例的一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸乙酯对映异构体的方法,在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,解决了高效液相色谱-手性柱法等传统分离方法难以有效分离 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯对映体的难题,从而能够对 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯的样品的光学纯度进行正确测定。该方法具有分离效果好、灵敏度高、准确性好、无污染、成本低以及易于自动化等优点。

[0018] 实施例 2

[0019] 1)用二次重蒸水配置浓度为 1.0mg/mL 的 3-羟基戊二酸乙酯样品溶液;2)配制 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入浓度为 20 mmol/L 的 β -环糊精作为手性选择剂,超声脱气 40min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 20min 所得溶液为电泳缓冲液;3)将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸乙酯样品溶液在步骤 3)所述的毛细管电泳条件下,(所用仪器为 G1600AX 型高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司)),使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸乙酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯对映体实现基线分离,分离度 $R > 1.5$ 以上。所述的毛细管电泳条件为:分离电压为 25 kV,柱温 30℃,检测波长为 214nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。通过使用本实施例的一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸乙酯对映异构体的方法,在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,解决了高效液相色谱-手性柱法等传统分离方法难以有效分离 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯对映体的难题,从而能够对 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸乙酯的样品的光学纯度进行正确测定。该方法具有分离效果好、灵敏度高、准确性好、无污染、成本低以及易于自动化等优点。

[0020] 实施例 3

[0021] 1)用二次重蒸水配置浓度为 0.2mg/mL 的 3-羟基戊二酸甲酯样品溶液;2)配制 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入浓度为 30mmol/L 的羟乙基- β -环糊精作为手性选择剂,超声脱气 20min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 15min 所得溶液为电泳缓冲液;3)将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸甲酯样品溶液在步骤 3)所述的毛细管电泳条件下,(所用仪器为 G1600AX 型高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司)),使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸甲酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸甲酯对映体实现基线分离,分离度 $R > 1.5$ 以上。所述的毛细管电泳条件为:分离电压为 30 kV,柱温 30℃,检测波长为 220nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。通过使用本实施例的一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸甲酯对映异构体的方法,在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,解决了高效液相色谱-手性柱法等传统分离方法难以有效分离 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸甲酯对映体的难题,从而能够对 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸甲酯的样品的光学纯度进行正确测定。该方法具有分离效果好、灵敏度高、准确性好、无污染、成本低以及易于自动化等优点。

[0022] 实施例 4

[0023] 1)用二次重蒸水配置浓度为 0.1mg/mL 的 3-羟基戊二酸丙酯样品溶液;2)配制 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液,在所述的缓冲溶液中加入浓度为 20mmol/L 的羟丙基- β -环糊精作为手性选择剂,超声脱气 20min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,过滤完毕继续超声脱气 10min 所得溶液为电泳缓冲液;3)将步骤 1)配制的 3-羟基戊二酸丙酯样品溶液在步骤 3)所述的毛细管电泳条件下,(所用仪器为 G1600AX 型高效毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司)),使用步骤 2)制得的电泳缓冲液使 (*R*)-3-羟基戊二酸丙酯和 (*S*)-3-羟基戊二酸丙酯对映体实现基线分离,分离度 $R > 1.5$ 以上。所述的毛细管电泳条件为:分离电压为 30 kV,柱温 25℃,检测波长为 220nm,压力进样为 50 mba $\times$ 4S。通过使用本实施例的一种高效毛细管电泳分离 3-羟基戊二酸丙酯对映异构体的方法,在高效毛细管电泳缓冲液中加入手性选择剂,构建合适的手性选择环境,利用其与对映异构体之间的作用差异进行分离,解

决了高效液相色谱-手性柱法等传统分离方法难以有效分离 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸丙酯对映体的难题,从而能够对 (*R*)-和 (*S*)-3-羟基戊二酸丙酯的样品的光学纯度进行正确测定。该方法具有分离效果好、灵敏度高、准确性好、无污染、成本低以及易于自动化等优点。

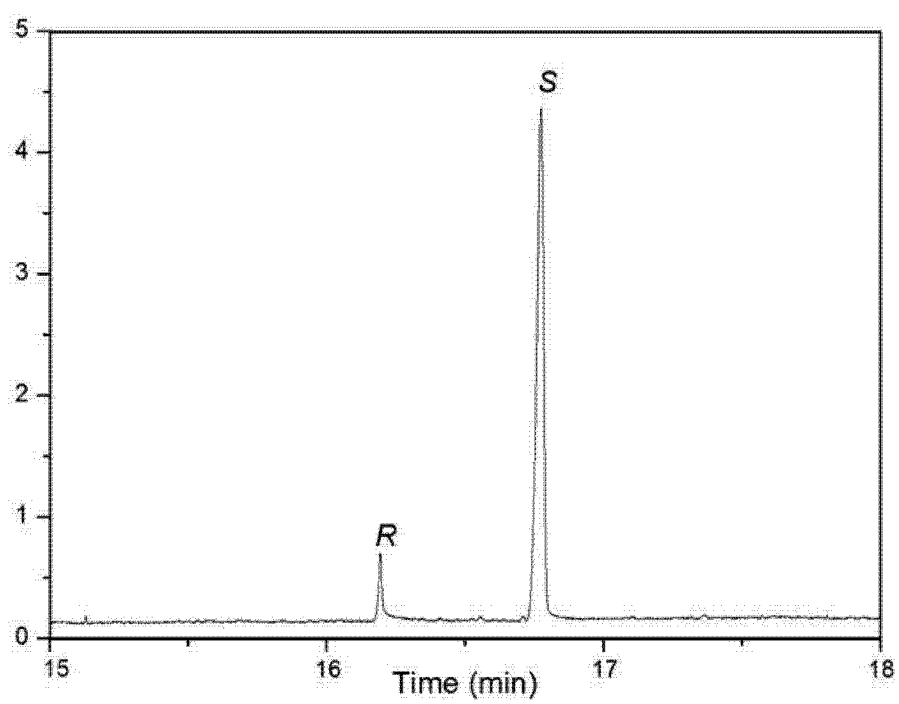


图 1