

丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯对映体分析的气相色谱方法研究

胡 伟¹, 唐世平¹, 杨立荣², 黄荣斌¹, 毕春晖¹

(1. 浙江工业大学化工学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江大学材料化工学院, 浙江 杭州 310027)

摘要 建立了基于手性毛细管柱直接测定丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯对映体含量的气相色谱法。采用 HP-5890 气相色谱仪, 以 WCOT CD-Chiral-DEX CB (30 m×0.25 mm i.d.) 为色谱柱, 在 148 °C 柱温、3.7 mL/min 载气(N₂)流量下, 两对对映体均可达到接近基线分离。用内标法对样品进行测定, 线性(相关系数 0.996 5~0.998 5)和重复性(RSD 1.08%~1.25%)均很好。采用该方法测定丙烯酮醇转化为 R-丙烯酮乙酸酯过程中反应物及其产物的对映体含量, 并跟踪分析酶的活性和评价酶的拆分反应的选择性, 结果令人满意。

关键词 毛细管气相色谱; 丙烯酮醇; 丙烯酮乙酸酯; 手性化合物; 酶

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)04-0359-03

Development of Gas Chromatographic Method for Chiral Analysis of Acrylic Ketone Alcohol and Acrylic Ketone Acetate

HU Wei¹, TANG Shi-ping¹, YANG Li-rong², HUANG Rong-bin¹, BI Chun-hui¹

(1. College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Institute of Materials and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: A gas chromatographic method was developed to directly determine the enantiomers of acrylic ketone alcohol and acrylic ketone acetate. Two pairs of enantiomers were nearly baseline-separated by using Model HP-5890 Gas Chromatograph with flame ionization detector and WCOT CD-Chiral-DEX CB (30 m×0.25 mm i.d.) column. The optimum conditions were the split ratio of 30:1 for the sample injected, the flow rates of 3.7 mL/min for the carrier gas (nitrogen), 60 mL/min for the hydrogen, and 250 mL/min for the oxygen, and temperatures of 148 °C for the column, 230 °C for the injector, and 230 °C for the detector. The linearity and reproducibility were satisfactory. The regression coefficients were over 0.996 5. The RSDs obtained were less than 1.25%. The method was further used to trace the reactants and products, and to evaluate the enzyme catalyst activity and selectivity under different conditions. The results show that the method developed is very successful.

Key words: capillary gas chromatography; acrylic ketone alcohol; acrylic ketone acetate; chiral compound; enzyme

随着生命科学尤其是生命化学和药物化学的发展, 人们认识到并开始重视手性药物异构体在生物体内代谢和药理作用的差异^[1]。研究和分离手性化合物具有重要的学术意义和实用价值。

丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯是合成卫生用拟除虫菊酯杀虫剂的主要中间体。自 20 世纪 50 年代开始, 菊酯在美国投入工业化生产, 产品是 8 个异构体的混合物。随着科学技术的发展, 人们分别对其不同异构体的生物活性、杀虫活性和毒性进行了系统的研究, 发现这些异构体之间的杀虫活性存在巨大的差异, 因而对这些对映体的分析显得非常重要。

目前, 对映体的分离主要表现在测定手性药物

中的对映体纯度, 研究植物挥发油和香料组成中的香味和绝对构型, 以及测定不对称合成中对映体过量值及探讨化学反应机理等^[2]。1966 年 Gil-Av 等^[3]提出气相色谱在对映体分离中的应用, 此后又有人合成手性固定相并用于氨基酸、氨基醇的多种对映体的分离。目前用得最多的手性固定相为环糊精类化合物^[4~9]。有关同时测定丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯对映体的色谱分析方法, 目前还未见报道。为了测定丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯对映体含量, 本研究建立了采用 WCOT CD-Chiral-DEX CB (30 m×0.25 mm i.d.) 手性毛细管气相色谱柱同时测定丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯对映体的色谱方法, 并应用

此方法跟踪分析了酶的活性和酶的拆分反应的选择性。通过测定丙烯酮醇酶转化产生 *R*-丙烯酮乙酸酯的含量来探测酶活性的大小,比常规酶活性测定方法简捷,测定结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP-5890 色谱仪,配备火焰离子化检测器(FID);CDMC-2 处理机(惠普上海分析仪器有限公司);THZ-82A 台式恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂);电子天平(上海天平仪器厂)。

正十六烷烃为色谱纯(上海化学试剂分装厂),醋酸乙酯、丙烯酮乙酸酯、丙烯酮醇均为分析纯(江苏启东精细化工厂),1[#]~3[#]活性酶(浙江大学生物化工实验室制备)。

1.2 色谱条件

WCOT CD-Chiral-DEX CB(30 m × 0.25 mm i.d.) 手性毛细管柱;FID 检测;载气(N₂)流量 3.7 mL/min;氢气流量 60 mL/min;氧气流量 250 mL/min;尾吹气流量 20 mL/min;分流比 30:1;柱温 148 °C;汽化室温度 230 °C;检测器温度 230 °C。

1.3 酶的活性和选择性跟踪分析实验

(1) 配制标样:准确称取丙烯酮醇(纯度为 93.0%) 0.135 0 g,丙烯酮乙酸酯(纯度为 96.0%) 0.111 0 g,正十六烷烃 0.117 0 g 及溶剂(醋酸乙酯) 4.494 0 g,可得各物质的质量分数分别为 2.58%、2.19% 和 2.41%。

(2) 编制组分参数表(即 ID 表)求校正因子:在已选定的色谱条件下,进标样 0.4 μL,利用标样的保留时间及其进样浓度编制 ID 表,求出各手性峰的校正因子。

(3) 在已配制好的丙烯酮醇的醋酸乙酯溶液底物中,加入 1[#]~3[#] 种活性酶,放在 55 °C 恒温台式振荡器中反应,每隔 1 h 取上清液 0.4 μL,在最佳

色谱条件下测定转化率和各手性物质的含量。选取最佳反应时间后,改变恒温条件为 37 °C 和 45 °C,重复上述实验。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确定

(1) 气路条件的选择:固定其他条件,通过制作范氏曲线确定最佳实用线速,从而确定最佳载气(N₂)流量为 3.7 mL/min。再分别改变氢气、氧气和尾吹气的流量,准确定量进样,测定其峰高响应值等参数。分别根据峰高响应值、分离度与气体流量的关系曲线,确定最佳氢气流量为 60 mL/min,氧气流量为 250 mL/min,尾吹气流量为 20 mL/min。

(2) 分流比的选择:在已选定的条件下,改变分流比,分别测定手性化合物丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯的分离度,根据两者各自的分离度与分流比的关系曲线,确定最佳分流比为 30:1。

(3) 温度的选择:在其他条件选定的情况下,改变柱温,测定丙烯酮醇和丙烯酮乙酸酯的分离度,根据柱温与分离度的关系,确定最佳柱温为 148 °C;再分别改变检测器、汽化室温度,定量进标样 0.4 μL,测定各温度下的峰高响应值,根据温度与峰高响应值的关系曲线,确定最佳汽化室温度为 230 °C,检测器温度为 230 °C。

根据上述实验方法,得最佳条件下的标准样品色谱图(见图 1-a)及实样色谱图(见图 1-b)。从中可知,两对对映体均接近基线分离。

2.2 标准曲线及分析测定的重复性

在最佳色谱条件下,将配制好的标准样品(*R*-及 *S*-丙烯酮乙酸酯和 *R*-及 *S*-丙烯酮醇)分别进样 0.1 μL, 0.2 μL, 0.3 μL, 0.4 μL, 0.5 μL, 0.6 μL, 0.7 μL, 测定其峰高 *Y* 响应值,以峰高对样品的进样量 *X* (μL) 作图,可得标准曲线。其中 *R*-丙烯酮乙酸酯的线性方程为: $Y = 125.79X + 0.764$, $r =$

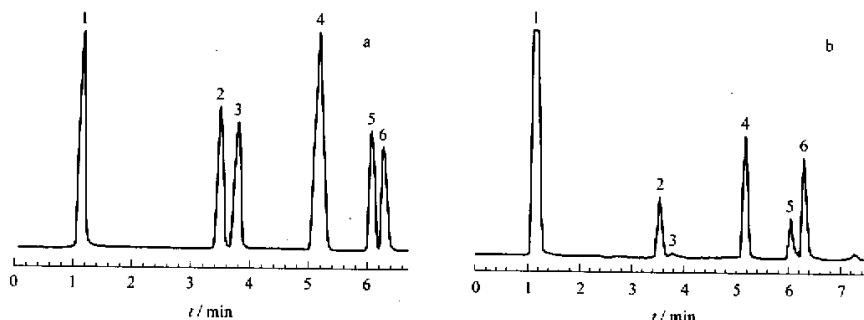


图 1 最佳条件下标准样品(a)和 1[#]酶在 55 °C 时反应 3 h 后的实样(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard sample (a) and sample from reaction at 55 °C for 3 h with enzyme 1[#] (b) under optimum conditions

1. ethenyl acetate; 2. (*R*)-acrylic ketone acetate; 3. (*S*)-acrylic ketone acetate; 4. *n*-hexadecane; 5. (*R*)-acrylic ketone alcohol; 6. (*S*)-acrylic ketone alcohol.

0.998 5; S-丙酮乙酸酯的线性方程为: $Y = 99.03X + 1.109$, $r = 0.998 2$; R-丙酮醇的线性方程为: $Y = 52.12X + 0.629$, $r = 0.998 1$; S-丙酮醇的线性方程为: $Y = 40.13X + 0.920$, $r = 0.996 5$ 线性关系良好。分别对丙酮醇和丙酮乙酸酯进行 7 次测定,其相对标准偏差(RSD)分别为: R-丙酮醇 1.08%, S-丙酮醇 1.10%, R-丙酮乙酸酯 1.23%, S-丙酮乙酸酯 1.25%。

2.3 实际样品测定

为进一步验证本方法并显示其实用性,将其用于实际测定不同酶作用下丙酮醇转化为 R-丙酮乙酸酯过程中反应物的对映体含量,并由此评价酶的活性和优化反应条件。

首先,根据标样实验测得丙酮乙酸酯的校正因子为: $f_R = 1.863$, $f_S = 1.744$; 丙酮醇的校正因子为: $f_R = 1.936$, $f_S = 1.861$ 。

其次,根据初步试验可知,温度为 55 °C 时有利于反应进行,所以在该温度下进行酶促转化试验。用上述方法可以测得不同时间下丙酮醇转化为 R-丙酮乙酸酯的产率(见图 2)。从图 2 中可以看出,3 种酶的转化效果为 1# 酶较高,2# 酶次之,3# 酶较差。随着时间的增加,丙酮醇的转化率增加变慢,在反应时间为 6 h 时,丙酮醇的转化率基本上达到了最大值,因此,下面的实验选择反应时间为 6 h。在该反应时间下,改变温度,测得酶的转化率如表 1 所示。

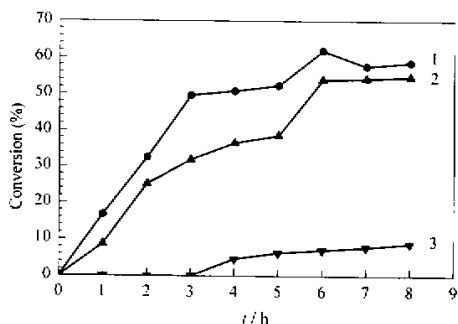


图 2 55 °C 下 3 种酶的转化效果

Fig. 2 Effect of conversion of three enzyme catalysts at 55 °C

1. enzyme 1#; 2. enzyme 2#; 3. enzyme 3#.

从表 1 中可看出,酶的转化率在 55 °C 时最高,37 °C 时一般,45 °C 时较差。各温度下转化率大小为: 1# 酶 > 2# 酶 > 3# 酶。由于 2# 酶的选择性一般,1# 酶的选择性较高,故选取 1# 酶在 55 °C 下进行 R-丙酮乙酸酯的合成反应,结果较好。

表 1 反应时间为 6 h 时不同温度下酶的转化率

Table 1 Effect of conversion by enzyme catalysts at different temperatures for 6 h

Enzyme	37 °C	45 °C	55 °C	%
1#	53.1	44.1	61.9	
2#	27.7	25.8	52.9	
3#	4.9	4.5	6.4	

3 结论

(1) 本文建立了一个基于 WCOT CD-Chiral-DEX CB 柱的毛细管气相色谱方法,它可将丙酮乙酸酯、丙酮醇的对映体近似基线分离。

(2) 根据上述方法可测定不同酶作用下,丙酮醇转化为 R-丙酮乙酸酯过程中反应物及其产物的各对映体含量,并由此评价酶的活性和优化反应条件。结果发现 1# 酶的活性强,选择性较高。选择 1# 酶在 55 °C 下进行 R-丙酮乙酸酯的合成反应约 6 h,产率可达 60% 以上,结果令人满意。

参考文献:

- [1] Ariens E. J. *Medi Res Rev*, 1986, (4): 451
- [2] LIN Bing-cheng. *Chinese Journal of Chromatography*, 1990, (6): 363
林炳承. *色谱*, 1990, (6): 363
- [3] Gil-Av E, Feibush B, Charles-Sigler R. *Tetrahedron Lett*, 1966, (10): 1 009
- [4] Hargitai T, Okamoto Y. *J Liq Chromatogr*, 1993, 16 (4): 843
- [5] XIE Jian-wei, ZHAI Yan-qiang, YANG Zao-ping, *et al.* *Chemical Journal of Chinese Universities*, 1997, 18 (9): 1 447
谢剑伟, 翟言强, 杨造萍, 等. *高等学校化学学报*, 1997, 18(9): 1 447
- [6] XU Xu, ZHANG Mei, WU Ru-jin, *et al.* *Chinese Journal of Chromatography*, 1998, 16(5): 379
许旭, 张梅, 吴如金, 等. *色谱*, 1998, 16(5): 379
- [7] RUAN Zong-qin, KANG Jing-wu, OU Qing-yu. *Chinese Journal of Chromatography*, 1998, 16(6): 481
阮宗琴, 康经武, 欧庆瑜. *色谱*, 1998, 16(6): 481
- [8] CHEN Hui, LÜ Xian-yu. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2000, 21(2): 233
陈慧, 吕宪禹. *高等学校化学学报*, 2000, 21(2): 233
- [9] FAN Rui-fang, SHI Xue-yan, GU Jun-ling, *et al.* *Chinese Journal of Chromatography*, 2000, 18(4): 357
范瑞芳, 史雪岩, 顾峻岭, 等. *色谱*, 2000, 18(4): 357