

高效液相色谱中的手性两相协同作用

孟 磊^{1,2}, 李方楼², 袁黎明²

(1. 河南农业大学基础科学院, 河南 郑州 450002; 2. 云南师范大学化学化工学院, 云南 昆明 650092)

摘要 : 在高效液相色谱中, 以纤维素三苯基甲酸酯、纤维素三苯基氨基甲酸酯为手性固定相, 以正己烷-异丙醇(体积比为 9: 1)为流动相, 柱温 25 °C, 分别以 β -环糊精(β -CD)、2,6-二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)、2,3,6-三甲基- β -环糊精(TM- β -CD)为流动相添加剂, 分离了 DL-色氨酸和 DL-苯丙氨酸两种手性化合物, 考察是否存在手性固定相和手性添加剂的协同作用。实验结果表明, 在流动相中添加 β -CD 或 DM- β -CD 至饱和, 协同作用不明显; 在流动相中添加少量 TM- β -CD(即浓度小于 0.60 mmol/L)时, 分离促进作用不明显; 当 TM- β -CD 浓度高于 0.60 mmol/L 时, 手性两相协同作用明显, 表明在一定浓度条件下 TM- β -CD 与两种固定相存在明显的手性两相协同作用。

关键词 : 高效液相色谱法; 纤维素衍生物; β -环糊精衍生物; 手性固定相; 手性流动相添加剂; 手性两相协同作用
中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713(2004)02-0124-04

Chiral Two-Phase Synergistic Effect in High Performance Liquid Chromatography

MENG Lei^{1,2}, LI Fanglou², YUAN Liming²

(1. Basic Science College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

Abstract : Cellulose tribenzoate (CTB) and cellulose triphenylcarbamate (CTPC) were synthesized for the coating of high performance liquid chromatographic stationary phases. Elemental analysis and IR spectra indicated that most of the hydroxy groups of the microcrystalline cellulose had been converted into ester groups. The silanized gel was coated with CTB/CTPC by using tetrahydrofuran as solvent. The enantiomeric resolutions of phenylalanine (flow rate : 0.5 mL/min) and tryptophan were carried out with a hexane/2-propanol (9: 1, v/v) mixture at 25 °C, when β -cyclodextrin (β -CD), dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) and trimethyl- β -cyclodextrin (TM- β -CD) were used as mobile phase additives. The results showed that TM- β -CD at the concentrations higher than 0.60 mmol/L had an explicit chiral two-phase synergistic effect with chiral stationary phase, but β -CD and DM- β -CD at any concentrations and TM- β -CD at low concentrations had no effect.

Key words : high performance liquid chromatography; cellulose derivative; β -cyclodextrin derivative; chiral stationary phase; chiral mobile phase additive; chiral two-phase synergistic effect

手性是自然界普遍存在的一种现象, 随着生命科学的发展, 对光学纯物质的需求量也越来越大, 而外消旋体的拆分则是获取手性物质的重要来源。近几年来, 高效液相色谱(HPLC)手性固定相法或手性添加剂法拆分对映体显示出了独特的优势。在液相色谱方面, 改进其手性分离能力的工作主要从两个方面进行: 一是改进本身有手性作用中心的手性固定相; 二是合成更好的可溶于流动相的手性流动相添加剂, 添加到非手性柱分离体系中。前者工作

中多糖、纤维素类手性固定相是其中非常重要的一类, 纤维素衍生物被涂敷在硅胶上用作手性固定相, 它们能直接分离许多对映体; 后者工作中 β -环糊精类手性添加剂向 ODS 柱体系中的添加是这类研究的典型。即液相色谱对映体分离分别采用手性固定相或流动相手性添加剂两种色谱分离模式, 国内已有许多这两方面的工作^[1-8]。本文同时使用手性固定相和含手性添加剂的流动相分离两种氨基酸手性化合物, 即以 DL-色氨酸、DL-苯丙氨酸为分离对象,

以纤维素三苯基甲酸酯(CTB)、纤维素三苯基氨基甲酸酯(CTPC)为手性固定相,以 β -环糊精(β -CD)、2,6-二甲基- β -环糊精(DM- β -CD)和2,3,6-三甲基- β -环糊精(TM- β -CD)为流动相添加剂的色谱体系,探讨流动相手性添加剂对映体选择性的影响。这种把手性固定相和手性流动相结合使用的方法在国内报道较少,其前后手性分离能力的变化说明所选手性添加剂对手性柱的手性分离能力有不同程度的促进作用。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

LC-6A 高效液相色谱仪,SPD-10AVP 紫外-可见波长检测器,C-R5A 色谱数据处理器(日本岛津),液相色谱装柱机(美国,Alltech),FTS135 红外光谱仪(美国,Bio-rad),1106R 型元素分析仪(意大利,Carlo);色谱柱:250 mm \times 4.6 mm i. d.,湿法装填,Hypersil ODS 型填料(大连依利特公司)。

微晶纤维素(Fluka), β -环糊精(上海化学试剂公司),3-氨基丙基-三乙氧基硅烷、DL-色氨酸、DL-苯丙氨酸(Fluka),球形硅胶(青岛海洋化工厂),正己烷、异丙醇(HPLC级,Tedia),DM- β -CD 和 TM- β -CD 由本实验室合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 手性固定相的制备

3-氨基丙基硅烷化硅胶(APS)的合成:参照文献[9],将10 g 经酸活化并干燥的硅胶置于烧瓶中,加入50 mL 干燥甲苯、15 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷回流12 h 后过滤、洗涤,在60 $^{\circ}$ C 下真空干燥24 h。元素分析结果为:C 2.39%,H 0.48%,N 0.70%。

纤维素三苯基甲酸酯的合成:参照文献[10],在2 g 干燥的微晶纤维素中加入80 mL 吡啶,室温下溶胀6 h 后,加入相当于微晶纤维素3.5 倍量的苯甲酰氯,在40~45 $^{\circ}$ C 下超声反应4 h,静置过夜,加入无水乙醇使产物析出,过滤,洗涤至无氯离子,50 $^{\circ}$ C 下真空干燥12 h。经红外光谱证实:微晶纤维素中羟基在3395.13 cm^{-1} 处的吸收峰几乎完全消失,说明已基本上酯化完全,同时在1733.11 cm^{-1} 出现苯甲酰基的—CO 吸收峰。元素分析结果为(括号内为计算值):C 67.55% (68.40%),H 4.35% (4.70%)。

纤维素三苯基氨基甲酸酯(CTPC)的合成:参照文献[11],将2 g 干燥的微晶纤维素置于80 mL 干燥吡啶中回流12 h,然后加入相当于微晶纤维素3.5 倍量的苯基异氰酸酯,继续回流48 h,冷却后加入无水乙醇使产物析出,过滤,洗涤,真空干燥12 h。经红外光谱证实:微晶纤维素中的羟基在

3395.13 cm^{-1} 处的吸收峰几乎完全消失,同时在3390.46,3331.89 cm^{-1} 处出现—NH 吸收峰,1742.85 cm^{-1} 处为酯羰基 C=O 吸收峰,说明微晶纤维素已基本酯化完全,元素分析结果为(括号内为计算值):C 61.10% (64.46%),H 4.71% (5.35%),N 7.65% (8.32%)。

CTB/APS(或CTPC/APS)的涂敷:将0.5 g CTB 或CTPC 溶于30 mL 四氢呋喃中,将该溶液加入经四氢呋喃润湿的APS 硅胶中,旋转蒸发除去溶剂,得到的填料于60 $^{\circ}$ C 下真空干燥12 h,最终得到涂敷量为15%(质量分数)的手性固定相。

2 结果与讨论

2.1 样品

选择含芳香环的色氨酸和苯丙氨酸作分离目标物,一是因为它们在外紫外区有较强的吸收,省去了衍生化;二是在纤维素类固定相上有手性分离现象,其芳香环在 β -环糊精空腔中有明显的手性选择包结作用,这样为考察两相在手性分离过程中是否有协同作用提供了最基本的条件。

2.2 在纤维素类手性固定相上的分离情况

以正己烷-异丙醇为流动相,在合适的流速、柱温、检测波长下,色氨酸、苯丙氨酸在纤维素类手性固定相上有一定的分离效果。如在纤维素三苯基甲酸酯柱上分离DL-色氨酸时,分离的最佳条件为:正己烷和异丙醇的体积比为9:1,流速为1.0 mL/min,柱温为25 $^{\circ}$ C,D-构型先于L-构型流出。对于DL-苯丙氨酸来说,最佳分离条件则是:正己烷和异丙醇的体积比为9:1,流速为0.5 mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C,L-构型先流出,D-构型后流出。

2.3 在含 β -环糊精类添加剂的流动相、ODS 柱上的分离情况

以ODS 为固定相,流动相中不论加入手性添加剂 β -CD、DM- β -CD 还是TM- β -CD 都不能使色氨酸和苯丙氨酸达到手性分离的目的。这可能与所用的TM- β -CD 的键合度有一定的关系, β -CD 空腔结构有21 个羟基,若其中有部分羟基未能甲基化,则可能对分离产生影响(因为甲基越多,越易形成动态的“假”固定相,则分离效果越好,反之会影响分离效果^[12])。

2.4 在含 β -环糊精类添加剂的流动相、纤维素类手性固定相上的分离情况

依据对氨基酸对映体拆分的考察,大多数情况下流动相中正己烷与异丙醇的体积比为9:1 时最优。因此,选择此比例的流动相,考察了不同 β -环糊精类手性添加剂及不同纤维素手性固定相对对映

体选择性的影响。

考察了几种流动相体系下的拆分情况,表 1 给出了不同流动相组成下样品的保留因子和拆分情况,如在纤维素三苯基甲酸酯柱上 DL-苯丙氨酸的 R_s 值由 1.380 变化到 1.459,DL-色氨酸的 R_s 值由 1.580 变化到 2.063。由表 1 可知 DL-色氨酸、DL-苯

丙氨酸在纤维素三苯基甲酸酯和纤维素三苯基氨基甲酸酯柱上均能达到良好的分离效果(DL-色氨酸在两种手性柱上的流出顺序是相反的,其分离图见图 1),说明手性固定相与手性流动相共同存在下对所分离的物质有明显的促进作用,我们把这种两相之间的促进作用称之为“两相协同效应”。

表 1 不同流动相对 DL-苯丙氨酸、DL-色氨酸分离能力的影响

Table 1 Effect of different mobile phases on separation of DL-phenylalanine and DL-tryptophan

CSP	Compound	Parameter	MP ₁	MP ₂	MP ₃	MP ₄
CTB-CSP	DL-Phe	k_1	0.764	0.763	0.762	0.764
		k_2	1.778	1.778	1.779	1.866
		α	2.328	2.330	2.352	2.442
		R_s	1.380	1.376	1.384	1.459
	DL-Try	k_1	0.927	0.929	0.929	0.930
		k_2	1.197	1.201	1.198	1.268
		α	1.292	1.293	1.198	1.363
		R_s	1.580	1.579	1.561	2.063
CTPC-CSP	DL-Phe	k_1	0.367	0.368	0.400	0.395
		k_2	0.533	0.534	0.583	0.606
		α	1.453	1.451	1.457	1.534
		R_s	1.612	1.587	1.624	1.856
	DL-Try	k_1	0.656	0.656	0.677	0.677
		k_2	0.770	0.781	0.806	0.935
		α	1.168	1.180	1.186	1.296
		R_s	1.834	1.830	1.841	2.236

CSP : chiral stationary phase ; CTB : cellulose tribenzoate ; CTPC : cellulose triphenylcarbamate ; MP : mobile phase ; MP₁ : hexane-2-propano(9 : 1, v/v) ; MP₂ : MP₁ saturated with β -cyclodextrin (β -CD) ; MP₃ : MP₁ saturated with dimethyl- β -CD ; MP₄ : MP₁ added with 0.6 mmol/L trimethyl- β -CD.

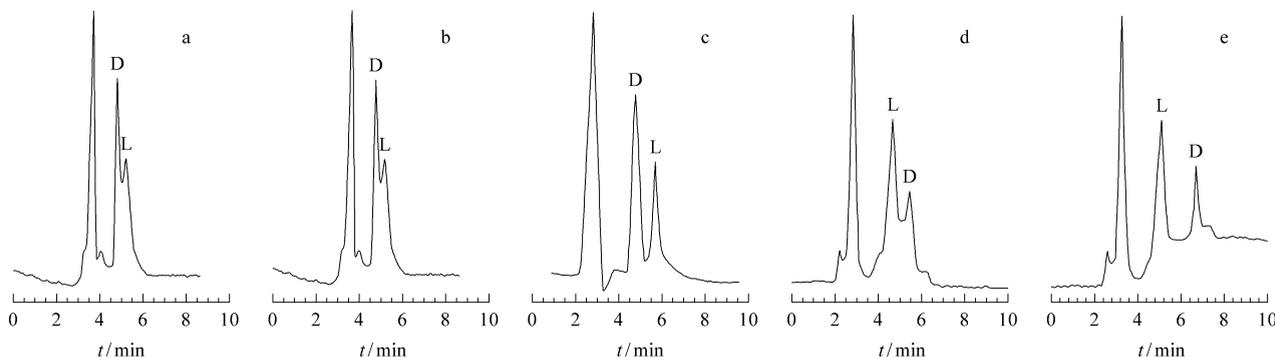


图 1 DL-色氨酸在不同流动相中的分离色谱图

Fig.1 Chromatograms of DL-tryptophan with different mobile phases

Chiral stationary phases : a, b, c. CTB ; d, e. CTPC. Mobile phases : a, d. MP₁ ; b. MP₂ ; c, e. MP₄. Flow rate : 1 mL/min. Detection wavelength : 280 nm. Room temperature. For MP₁, MP₃, MP₄, see the notes in Table 1.

以含有不同浓度的 β -CD 和 DM- β -CD 溶液作流动相发现,增加 β -CD 和 DM- β -CD 的浓度至饱和,均与流动相中不加添加剂时的情况相似,DL-色氨酸和 DL-苯丙氨酸只能部分分离。以不同浓度 TM- β -CD 作流动相添加剂时:若 TM- β -CD 的浓度太低,即浓度小于 0.60 mmol/L 时,分离促进作用不明显;当 TM- β -CD 浓度高于 0.60 mmol/L 时,手性两相协同作用明显;当其浓度在 0.60 ~ 1.50

mmol/L 时,分离度变化不大。这说明浓度是环糊精类手性添加剂产生明显手性分离促进作用的一个重要因素,这可能主要与 β -CD 上羟基甲基化的程度有关。

从微观角度讲,纤维素衍生物具有左旋 3/2 结构,纤维素中葡萄糖残基沿螺旋轴排列,在该螺旋的外侧是疏水性的芳基形成许多手性空穴。一般认为在正己烷/异丙醇体系中,消旋体与手性固定相间的

苯基-苯基间的 π - π 键相互作用以及偶极-偶极作用使消旋体穿插到 CTB/APS 或 CTPC/APS 手性固定相的手性空穴中, 形成非对映体配合物; 由于形成的配合物在手性空穴中所受作用不同, 从而导致其对映体的分离^[13, 14]。而对于环糊精来说, 由于环糊精的每个葡萄糖单元有 5 个手性碳原子, 其中有 2 个位于 C-2 和 C-3 上, C-2 位于环糊精空穴入口处指向顺时针方向, C-3 位于环糊精空穴腔外, 且指向逆时针方向, 这种结构特征产生一种手性排斥力, 从而起到手性识别作用; 并且对映体分子可与环糊精在液相中形成包结物也已由 X-Ray 及 ¹H-NMR 实验证实^[15, 16]。

产生协同效应的主要原因可能是分子之间的超分子作用^[17], 环糊精衍生物随流动相进入固定相后, 先与固定相结合成一种动态的假固定相, 对映体与固定相和假固定相同时作用产生包结物, 由于不同对映体形成的包结物所受分子间的作用力不同, 从而达到分离效果。

2.5 结论

从上述实验结果可以看出, 在环糊精类手性添加剂存在情况下纤维素类手性固定相对手性样品的手性分离加强, 我们把这种在特定的样品和分离材料组合下, 手性固定相和手性流动相添加剂能产生两相间的促进作用称为两相协同效应, 但具体的分离机理还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang Qiang, Zou Hanfa, Chen Xiaoming, Wang Hailin, Ni Jianyi, Zhang Zengzi, Yao Pingjing. Chinese Journal of Chromatography (张 强, 邹汉法, 陈小明, 汪海林, 倪坚毅, 张曾子, 姚平径. 色谱), 2001, 19(1): 9
- [2] Qi Bangfeng, Liu Yueqi, Han Xiaoqian, Zhu Xinyi, Chen Li-

- ren. Chinese Journal of Chromatography (齐邦峰, 刘月启, 韩小茜, 祝馨怡, 陈立仁. 色谱), 2001, 19(5): 443
- [3] Hou Shicong, Wang Min, Zhou Zhiqiang, Qiao Zhen, Guo Hongchao, Shi Xueyan. Chinese Journal of Chromatography (侯士聪, 王 敏, 周志强, 乔 振, 郭红超, 史雪岩. 色谱), 2002, 20(6): 537
- [4] Dun Huijuan, Liu Shujuan, Li Yongmin, Wei Yongju, Chen Liren. Chinese Journal of Chromatography (敦惠娟, 刘淑娟, 李永民, 魏永巨, 陈立仁. 色谱), 2003, 21(5): 456
- [5] Zhou Zhiqiang, Wang Peng, Jiang Shuren, Wang Min. Chinese Journal of Chromatography (周志强, 王 鹏, 江树人, 王 敏. 色谱), 2003, 21(1): 44
- [6] Wu Yongjiang, Fang Xin, Zhu Miaoqin. Chinese Journal of Analytical Chemistry (吴永江, 方 昕, 朱妙琴. 分析化学), 2003, 31(3): 332
- [7] Xie Jianwei, Yang Zaoping, Ruan Jinxiu. Acta Pharmaceutica Sinica (谢剑炜, 杨造萍, 阮金秀. 药学学报), 1998, 33(2): 143
- [8] Li Hua, Hu Xianming, Xie Yingfeng. Chinese Journal of Chromatography (李 桦, 胡先明, 谢颖峰. 色谱), 1998, 16(5): 424
- [9] Huisden R E, Kraak J C, Poppe H. J Chromatogr, 1990, 508(2): 289
- [10] Rimbock K H, Kastner F, Mannschreck A. J Chromatogr, 1986, 351(2): 346
- [11] Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. J Chromatogr, 1986, 363(2): 173
- [12] Bai Dongmei, Zhao Xueming, Hu Zongding. Chinese Journal of Analytical Chemistry (白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 分析化学), 2001, 29(4): 413
- [13] Wainer I W, Alembik M C. J Chromatogr, 1986, 358(1): 85
- [14] Okamoto Y, Aburatani R, Hatada K. J Chromatogr, 1987, 389(1): 95
- [15] Venema A, Henderiks H, Geest R V. HRC, 1991, 14(10): 676
- [16] Li S, Purdy W C. Anal Chem, 1992, 64(13): 1 405
- [17] Lehn J M. Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives. Weinheim: VCH Publishers, 1995. 11