

联苯类对映体在纤维素类手性固定相上的 高效液相色谱法直接拆分

刘月启 刘霞 蒋生祥 陈立仁*

(中国科学院兰州化学物理研究所 兰州 730000)

常俊标

(河南省化学研究所 郑州 450002)

摘要 涂敷纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)于自制的球形氨基硅胶上,制备了手性固定相.用该固定相直接拆分了一系列外消旋联苯类保肝药物.考察了柱温和流动相中乙醇含量对样品的保留和立体选择性的影响,升高柱温或增大流动相中乙醇含量都会使对映体的保留因子和分离因子降低.所考察样品的分离因子的对数与温度的倒数成线性关系.确定了对映体从流动相传递到固定相的吉布斯自由能变之差值、焓变之差值及熵变之差值.

关键词 手性拆分, 温度影响, 纤维素类手性固定相, 联苯类化合物

Direct Optical Resolution of the Enantiomers of Biphenyl Compounds by High-Performance Liquid Chromatography on Cellulose Tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) Stationary Phase

LIU Yue-Qi LIU Xia JIANG Sheng-Xiang CHEN Li-Ren*

(Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 730000)

CHANG Jun-Biao

(Institute of Chemistry of Henan Province, Zhengzhou, 450003)

Abstract A chiral stationary phase (CSP) was prepared by coating cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) onto aminopropylated spherical silica gel. The enantioselective separation of a series of biphenyl compounds with antihepatitis activity was achieved for the first time on the CSP, using the normal-phase mode. The effects of temperature and concentration of ethanol in the mobile phase on the chiral separation were studied. The retention factors and separation factors for the enantiomers of all investigated compounds decreased with increasing temperature or increasing ethanol concentration in the eluent. The natural logarithms of the separation factors ($\ln \alpha$) of the investigated compounds depended linearly on the reciprocal of temperature ($1/T$). The thermodynamic parameters, such as the difference in enthalpy $\Delta(\Delta H^\circ)$, entropy $\Delta(\Delta S^\circ)$ and Gibbs free energy $\Delta(\Delta G^\circ)$ for the transfer of analyte from the mobile phase to the CSP were calculated.

Keywords enantiomer separation, temperature effects, biphenyl compounds, cellulose-based CSP

* E-mail: yueqi-liu@hotmail.com

收稿日期: 2000-03-28, 修回日期: 2000-05-16, 定稿日期: 2000-06-30, 中国科学院重点基金(KY95-S1-205)资助课题
(Received March 28, 2000. Revised May 16, 2000. Accepted June 30, 2000)

联苯结构广泛存在于具有不同结构和生物活性的天然产物如萜烯、木酯素、香豆素、单宁酸、肽和合成药物中.由于它们不仅可作为药物活性化合物而且可作为手性试剂等,因此天然和合成联苯类化合物已受到人们越来越多的关注.本文所研究的5种光学活性异构体为人工合成的联苯类化合物(见图1),它们为轴向手性异构体.经药理筛选,具有显著降低血清谷丙转氨酶效果,能减轻肝脏病理损伤和增强肝脏解毒功能,对肝癌的标记物甲胎蛋白(AFP)有向正常方向逆转的作用,对于人体免疫缺乏病毒(HIV)的复制亦有抑制作用^[1].由于药物对映体在药理、毒理和临床疗效等方面存在较大差异,故其拆分工作具有重要意义.高效液相色谱手性固定相(HPLC-CSP)法是达到这一目的的有效手段.Okamoto等制备了一系列带有不同取代基的苯异氰

酸酯衍生化纤维素手性固定相,比较其拆分性能发现,纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)具有最好的手性识别能力,该固定相由于拆分范围广而得到广泛应用^[2].本文报道了利用自制的纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相对一系列外消旋联苯类药物进行了直接拆分的结果.

对映体拆分的保留机理受温度影响比一般的色谱分离更大一些.温度对环糊精^[3]、手性冠醚^[4]、 α -糖蛋白^[5]及直链淀粉^[6]等固定相手性拆分的影响已有文献报道.然而,正相条件下温度对纤维素类固定相手性分离的影响尚未有文献报道,本文的目的是考察正相条件下温度对这类固定相手性拆分的影响,以便能获得更多关于手性保留机理方面的信息.

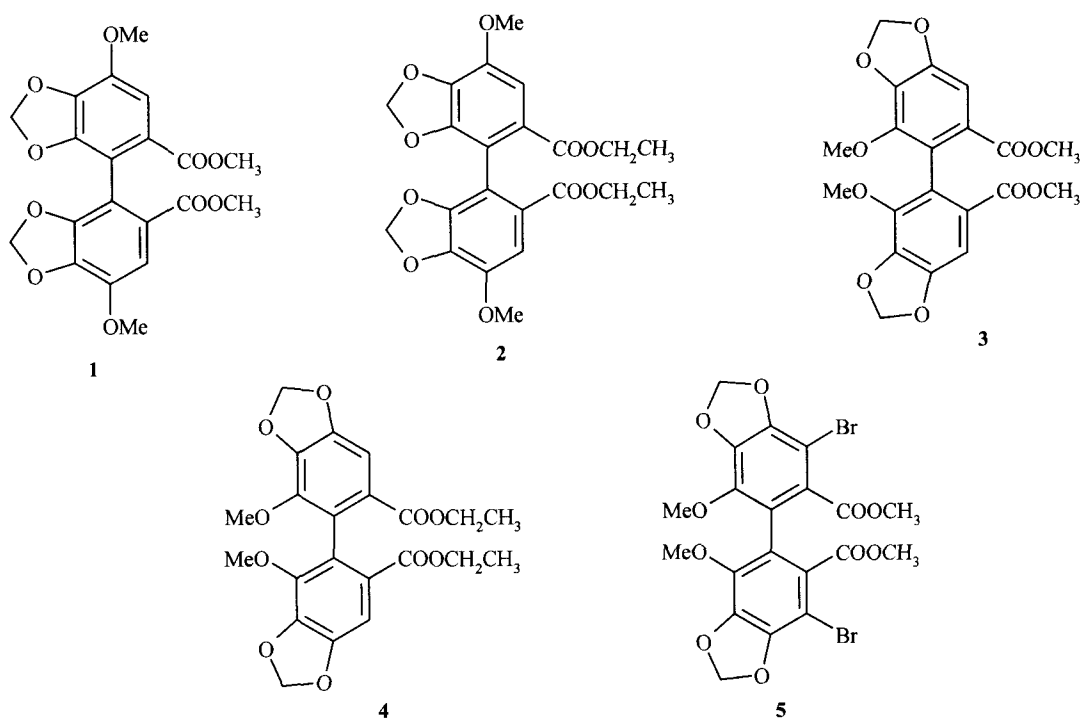


图1 联苯类对映体分子的结构式

1 实验

1.1 试剂和仪器

球形硅胶系本实验室合成,粒径 $5 \sim 6 \mu\text{m}$,比表面积 $110 \text{ m}^2/\text{g}$,平均孔径 13 nm ; γ -氨基丙基三乙氧基硅烷(KH-550)(辽宁盖县化工厂);微晶纤维素(上海试剂厂);3,5-二甲基苯基异氰酸酯(ACROS, New

Jersey, USA);外消旋样品由常俊标教授提供.

色谱系统包括 M6000 泵(Waters, Milford, MA, USA), SPD-1 型紫外-可见波长检测器(日本岛津), C-R2A 色谱数据处理器(日本岛津).

1.2 手性柱的制备

参照文献^[7]方法,将3g经酸活化并干燥的球形硅珠和5mL γ -氨基丙基三乙氧基硅烷(KH-550),于20mL甲苯中 110°C 回流24h,制得氨基丙烷化硅胶(APS).元素分析(%):C,2.39;H,0.48;N,

0.70.

参照文献[8]方法,将 1g 干燥的微晶纤维素在干燥吡啶中回流 24h,然后加入 3.5 倍量的 3,5-二甲基苯基异氰酸酯并继续回流 24h,冷却后,加入甲醇使产物沉淀,经过滤、洗涤后于真空下 50℃干燥至恒重.经红外光谱证实,微晶纤维素中的 OH 已与 3,5-二甲基苯基异氰酸酯进行了充分的反应.元素分析(% ,括号内为计算值):C, 64.56(65.66);H, 6.05(6.18);N, 6.56(6.98).

将 0.45g CDMPC 溶于 30mL 四氢呋喃中,将该溶液 10mL 加入 3g APS 硅胶中,真空旋转蒸发除去溶剂.此过程重复 3 次,最终得到涂敷量为 15% (质量分数)的固定相.

1.3 色谱条件

湿法装柱(150mm × 4.6mm i. d.),采用 90:10 (体积比)正己烷-乙醇作悬浮液和顶替液,匀浆法在 3.7×10^7 Pa 压力下填充.流动相为不同体积比的正己烷-乙醇溶液,在此流动相体系中,所考察的样品具有较适宜的保留时间,并能被较好的拆分.流速为 1mL/min,检测波长为 254nm.色谱柱的死时间(t_0)用 1,3,5-三叔丁基苯来测定.分离因子 $\alpha = k_2'/k_1'$;容量因子 $k_1' = (t_1 - t_0)/t_0$, $k_2' = (t_2 - t_0)/t_0$; $R_s = 2(t_2 - t_1)/(W_1 + W_2)$,这里 t_1 和 t_2 分别为先后洗脱的对映体的保留时间.

2 结果与讨论

2.1 柱温对联苯类对映体在纤维素类固定相上保留行为的影响

实验中分别考察了柱温在 14, 23, 32 和 42℃ 时五种联苯类对映体的色谱分离,柱温对各对映体的容量因子(k_1' , k_2')、分离因子(α)、分离度(R_s)及对映体与固定相相互作用的自由能变之差值影响结果如表 1 所示.从中可见,随着柱温从 14℃ 升高到 42℃,对映体的容量因子、分离因子、分离度逐渐降低,各对映体从流动相传递到固定相并与固定相形成缔合物所需的自由能变之差 $\Delta(\Delta G^\circ)$ 逐渐减小,这说明升高柱温会使对映体与固定相所形成缔合物的稳定性之差减小.

色谱分离过程中,样品容量因子 k' 与热力学平衡常数 K 有如下关系:

$$k' = K\phi$$

式中, ϕ 为色谱柱的相比率.分离过程的自由能

变 ΔG° 可表示为:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT\ln K$$

$$= -RT\ln(k'/\phi)$$

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT\ln(k_2'/\phi) - [-RT\ln(k_1'/\phi)]$$

$$= -RT\ln(k_2'/k_1') = -RT\ln\alpha$$

$$\text{因此, } \ln\alpha = -\Delta(\Delta H^\circ)/RT + \Delta(\Delta S^\circ)/R$$

式中, k_1' —先洗脱的对映体的容量因子, k_2' —后洗脱的对映体的容量因子, $\Delta(\Delta H^\circ)$ —对映体从流动相传递到固定相并与固定相形成缔合物所需的焓变之差, $\Delta(\Delta S^\circ)$ —对映体从流动相传递到固定相并与固定相形成缔合物所需的熵变之差, α —对映体的分离因子, R —气体常数, T —绝对温度.

如果 $\Delta(\Delta H^\circ)$ 在所考察的温度范围内是不变的,那么,以一对对映体在不同温度下的分离因子的对数(即 $\ln\alpha$)对 $1/T$ 作图,则得到一条直线,斜率为 $-\Delta(\Delta H^\circ)/R$,截距为 $\Delta(\Delta S^\circ)/R$.因此,可计算出对映体的 $\Delta(\Delta H^\circ)$ 和 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 之值,各对映体的 $\ln\alpha - 1/T$ 关系如图 2 所示,所得的焓变之差 $[\Delta(\Delta H^\circ)]$ 和熵变之差 $[\Delta(\Delta S^\circ)]$ 归结于表 1.

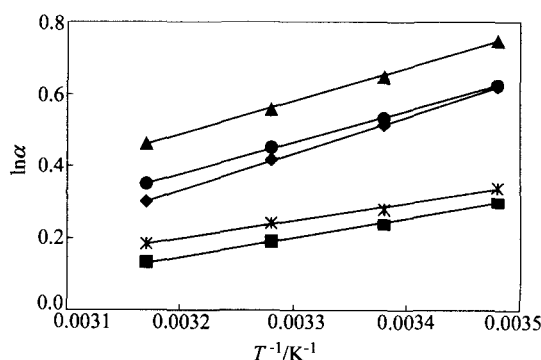


图 2 联苯类对映体分离过程的 $\ln\alpha - 1/T$ 图

◆—化合物 1; ■—化合物 2; ▲—化合物 3;
*—化合物 4; ●—化合物 5
色谱条件参见表 1

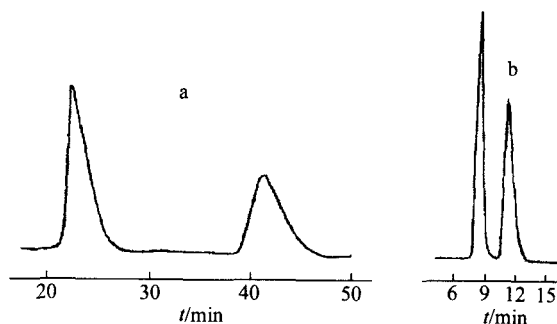


图 3 不同柱温时化合物 1 的色谱分离

柱温: a—14℃, b—42℃; 色谱条件参见表 1

表 1 不同柱温时联苯类对映体的容量因子、分离因子、分离度和热力学参数的变化结果

对映体	柱温/℃	k_1'	k_2'	α	R_S	$\Delta(\Delta G^\circ)/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta(\Delta H^\circ)/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta(\Delta S^\circ)/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	n
1	14	13.4	25.0	1.86	3.35	-1482			1025
	23	9.14	15.3	1.67	3.05	-1261			1324
	32	6.52	9.88	1.52	2.75	-1055	-8542	-24.58	1897
	42	4.53	6.11	1.35	2.50	-784			2091
2	14	7.25	9.76	1.35	1.45	-710			1282
	23	5.82	7.41	1.27	1.40	-595			1673
	32	3.81	4.60	1.21	1.35	-478	-4501	-13.19	2051
	42	3.22	3.66	1.14	1.30	-336			2336
3	14	5.31	11.3	2.12	3.60	-1793			1046
	23	3.85	7.36	1.91	3.15	-1596			1224
	32	2.87	5.02	1.75	2.80	-1419	-7687	-20.55	1761
	42	2.15	3.42	1.59	2.65	-1216			2137
4	14	3.36	4.68	1.40	1.40	-791			1198
	23	2.83	3.74	1.32	1.35	-687			1482
	32	1.91	2.43	1.27	1.28	-611	-4012	-11.20	1962
	42	1.70	2.04	1.20	1.25	-478			2287
5	14	5.29	9.86	1.86	2.25	-1487			1145
	23	4.49	7.63	1.70	2.05	-1306			1413
	32	3.16	4.95	1.57	1.80	-1139	-7321	-20.30	1948
	42	2.87	4.07	1.42	1.45	-915			2292

表中: k_1' —先洗脱对映体的容量因子; k_2' —后洗脱对映体的容量因子; α —分离因子; R_S —分离度; n —理论塔板数. 色谱条件: 洗脱液, $V(\text{正己烷}): V(\text{乙醇}) = 80:20$; 流速, 1.0mL/min .

从所得的 $\Delta(\Delta H^\circ)$ 和 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 的数据来看, 可分为两组, 甲酯类对映体, 如化合物 **1**, **3** 和 **5**, 具有较大的 $-\Delta(\Delta H^\circ)$ 和 $-\Delta(\Delta S^\circ)$ 值, 而乙酯类对映体, 如化合物 **2** 和 **4**, 却具有较小的 $-\Delta(\Delta H^\circ)$ 和 $-\Delta(\Delta S^\circ)$ 值. 乙酯类对映体较小的 $-\Delta(\Delta H^\circ)$ 值和较正的 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 值导致其分离度相对较差. 对甲酯类对映体的较负的 $\Delta(\Delta S^\circ)$ 值可用甲酯类 *D* 型对映体与 *L* 型对映体在固定相上的自由度之差异比乙酯类的大来给予解释, 这可能是由于甲酯类对映体具有较为有利的立体结构所致. 由此可推测联苯类化合物的酯基在手性识别过程中可能起着关键作用.

在高效液相色谱中, 温度对分离具有两种完全不同的影响作用. 一种是热力学效应, 分离因子 α 通

常随温度的升高而降低. 另一种完全不同的温度效应是动力学效应, 柱子的效率通常随温度的升高而增大. 我们从实验中发现, 对于分离度比较大的样品采用较高的柱温分离是有利的. 较高的柱温具有柱效高 (n 值较大)、分离耗时短 (k' 值较小)、灵敏度高等优点. 图 3 给出了不同柱温时化合物 **1** 的色谱分离结果.

2.2 流动相中乙醇含量对联苯类对映体在纤维素类固定相上保留行为的影响

实验中考察了柱温在 23°C 时, 流动相正己烷—乙醇 (V/V) 中乙醇含量对五种联苯类对映体的容量因子、分离因子和分离度的影响, 结果列于表 2.

表 2 流动相中乙醇含量对联苯类对映体的保留和拆分的影响

对映体	乙醇含量(体积分数)											
	10%				20%				27%			
	k_1'	k_2'	α	R_S	k_1'	k_2'	α	R_S	k_1'	k_2'	α	R_S
1	17.9	33.8	1.90	3.30	9.14	15.3	1.67	3.05	6.19	10.2	1.65	2.65
2	8.58	11.2	1.30	1.55	5.82	7.41	1.27	1.40	2.99	3.77	1.26	1.30
3	7.34	14.3	1.96	3.85	3.85	7.36	1.91	3.15	2.77	5.26	1.90	2.70
4	3.80	5.29	1.39	1.50	2.83	3.79	1.34	1.35	1.47	1.97	1.34	1.30
5	6.27	10.9	1.74	2.20	4.49	7.63	1.70	2.05	2.27	3.84	1.68	1.55

从表 2 可以看出,随着流动相中乙醇含量的增加,各对映体的容量因子 k' 逐渐降低,表现出正相色谱的特征.分离因子 α 受乙醇含量的影响不大(化合物 1 除外),随着乙醇含量的增加, α 稍稍有所降低,分离度 R_s 也逐渐降低.

纤维素苯基氨基甲酸酯类手性固定相上的氨基甲酸酯结构单元被证实是决定手性识别的重要部位^[9].手性识别的形成是多种相互作用力共同作用的结果,这些作用力包括对映体与固定相之间的氢键作用、偶极-偶极作用及 $\pi-\pi$ 相互作用.由增加流动相中乙醇含量会使对映体的容量因子降低许多可知,手性固定相上氨基甲酸酯残基的 NH 基团与对映体的 C=O 基团间的氢键作用是主要作用力.流动相中乙醇与手性固定相上氨基甲酸酯残基的 C=O 基团也会形成氢键作用,此过程与对映体和固定相的氢键作用相竞争,当流动相中乙醇含量增加时,其竞争力增加,因而,对映体的容量因子降低.

衍生化纤维素固定相上手性作用点的高度有序结构也是决定手性识别的主要因素之一^[10],同样用 3,5-二甲基苯基异氰酸酯衍生化的纤维素与淀粉表现出截然不同的手性拆分能力.经 X 射线分析证实^[11],纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)具有左旋三重(3/2)螺旋构型而直链淀粉却具有左旋四重(4/1)螺旋构型.在这两种衍生化的多糖类手性聚合物分子中,极性的氨基甲酸酯基团和 3,5-二甲苯基团围绕着主链形成一个螺旋槽.样品分子调整构象进入螺旋槽中,通过上述氢键作用、偶极-偶极作用及 $\pi-\pi$ 相互作用与固定相形成缔合物.如果一对对映体与固定相所形成的缔合物稳定性不一

样,便可实现手性拆分.对于本文所拆分的 5 种联苯类对映体,不同构型的对映体与固定相形成的缔合物的稳定性应是不相同的.

比较甲酯类样品 1 和 3 与乙酯类样品 2 和 4 的拆分结果可以发现,甲酯类样品的保留值 k' 和分离因子 α 比相应的乙酯类样品大许多,这可能是由于甲酯类对映体的空间位阻相对较小,比较适宜进入固定相的螺旋槽中,对映体与固定相形成的氢键作用、偶极-偶极作用和 $\pi-\pi$ 相互作用就比较强,从而获得更为有效的手性识别.

References

- 1 D. F. Chen, S. X. Zhang, L. Xie, J. X. Xie, K. Chen, Y. Kashiwada, B. N. Zhou, P. Wang, L. M. Cosentino, K. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, 5(8), 1715.
- 2 Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr.*, **1994**, 666, 403.
- 3 H. J. Issaq, M. L. Glennon, D. E. Weiss, S. D. Fox, "Ordered Media and Chemical Separation", ed. by W. L. Hinze, D. W. Armstrong, American Chemical Society, Washington, DC, **1987**, p. 260.
- 4 S. Liu, N. J. Maddox, *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 1947.
- 5 J. Hermansson, *Trends Anal. Chem.*, **1989**, 8, 251.
- 6 M. Kummer, G. Werner, *J. Chromatogr.*, **1998**, 825, 107.
- 7 R. E. Huisden, J. C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, **1990**, 508, 289.
- 8 Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr.*, **1986**, 363, 173.
- 9 A. Kunath, F. Theil, K. Jahnisch, *J. Chromatogr.*, **1996**, 728, 249.
- 10 Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1020.
- 11 U. Vogt, P. Zugenmaier, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 1217.

(Ed. CHENG Biao)

(ZHENG Guo - Cheng)