

脲衍生物型手性固定相分离 α -氨基酸对映体的研究

吕海涛 云自厚

(北京师范大学化学系 北京 100875)

摘要 利用脲衍生物型手性色谱柱,作正相和反相液相色谱拆分 *N*-3,5-二硝基苯甲酰化氨基酸丁酯衍生物。结果表明,正相色谱的手性分离效果比反相色谱要好得多,并且手性洗脱顺序完全相反。认为在固定相对拆分起主要作用的可能是(*R*)-1-(α -萘基)乙胺部分的手性碳原子,而另外一个手性碳原子在拆分过程中起辅助作用。流动相在拆分过程中起着很重要的作用。

关键词 高效液相色谱,脲衍生物型手性固定相, α -氨基酸,对映体分离

1 前言

近年来,利用手性色谱柱拆分对映体得到不断发展^[1-4],它比利用对映体与旋光衍生试剂反应生成非对映异构体后再拆分更简单。手性柱拆分是利用对映体与手性固定相(CSP)之间的立体作用差异而进行的。本文所用的 CSP 结构如图 1 所示。它含有两个手性碳原子,分别连接在脲基的两个亚胺基

氮原子上,被分析物与 CSP 之间有 π - π 作用力和授质子的氢键作用力等,根据它与对映体空间作用力的不同,可用于氨基酸对映体的拆分。一般来说,高效液相色谱流动相在分离过程中起着特殊重要的作用。有关流动相对于拆分对映体影响的研究未见报道。本文比较系统地讨论了在正相色谱和反相色谱中不同流动相及其组成对手性分离的影响。

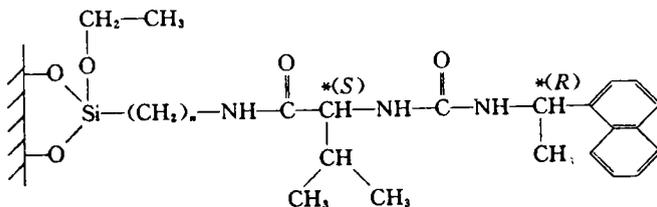


图 1 CSP 结构式

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Varian 5000 型液相色谱仪,UV-100 型紫外可见分光检测器。美国 Phenomenex 公司生产的手性色谱柱 [(*S*)-valine & (*R*)-1-(α -naphthyl) ethylamine, 共价键合], 4.6mm \times 250mm。

缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)皆为分析纯;正己烷、二氯乙烷、甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯、乙腈、二氧六环、四氢呋喃均干燥、重蒸;碳酸氢钠、3,5-二硝基苯甲酰氯(DNBC)为分析纯;HCl 的正丁醇溶液(4.5mol/L),二次蒸馏水。

2.2 色谱条件

在正相色谱中,以正己烷和二氯乙烷为基础溶剂,极性溶剂分别是甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、乙腈、四氢呋喃、二氧六环等。

在反相色谱中,以水为基础溶剂,有机改性剂分别是甲醇、乙腈和四氢呋喃。流动相中含 0.15% NaHCO₃(pH 8.3)。

流量:1mL/min,检测波长:254nm,柱温:30℃。

2.3 衍生反应

2.3.1 *N*-DNB-氨基酸丁酯的衍生

将 1mg 氨基酸和 1mL HCl/正丁醇加入聚四氟乙烯高压反应器中,密封,经超声混合后,于 110℃ 下反应 30min。反应完毕,在红外灯下(约 60℃)烤干,加入 0.5mL CH₂Cl₂ 共沸去水,再烤干。加入 1mL

DNBC 的乙酸乙酯溶液(10mg/mL)后,密封,再于 165 C 下反应 30min。冷却后,先用 1mL 2mol/L NaOH 溶液洗两遍,再用 1mL 二次蒸馏水洗两遍,取有机层进样分析。

2.3.2 N-DNB-氨基酸的衍生

将 1mg 氨基酸和 1mL DNBC 的乙腈溶液(10mg/mL)加入聚四氟乙烯高压反应器中,密封,经超声混合后,于 165 C 下反应 30min。冷却后,加入 0.5mL 1%NaHCO₃ 溶液,振荡,静置 1 小时后,进样分析。

3 结果与讨论

3.1 正相色谱

3.1.1 二氯乙烷的影响

当乙醇含量不变,改变正己烷和二氯乙烷的相对含量时,随着二氯乙烷含量的增大,则流动相极性增强,洗脱加快,而对映体相对保留值 α 基本不变,但对分离度有较大影响,拆分效果明显下降。结果如表 1 所示。

表 1 正相色谱中二氯乙烷对分离的影响

流动相*	N-DNB-氨基酸丁酯	$t_R(\text{min})$		α	R_s
		L	D		
80 : 13 : 7	Val	5.29	8.40	2.22	6.99
	Phe	9.65	8.07	1.30	2.65
	Thr	9.23	14.67	1.84	6.71
	Ser	12.50	20.67	1.84	6.62
75 : 18 : 7	Val	4.66	6.90	2.17	5.76
	Phe	7.77	6.69	1.27	2.23
	Thr	8.07	12.34	1.80	6.30
	Ser	10.85	17.34	1.80	6.80
70 : 23 : 7	Val	4.16	5.94	2.26	5.43
	Phe	6.50	5.67	1.28	2.09
	Thr	6.79	10.12	1.82	5.60
	Ser	9.01	14.10	1.81	6.17

* 流动相为正己烷-二氯乙烷-乙醇。

3.1.2 乙醇量的影响

如表 2 所示,当二氯乙烷的含量不变,乙醇的含量增大时,结果与 3.1.1 所述类似,相对保留值 α 基本不变,但对分离度有很大影响,分离效果明显下降。与表 1 比较,乙醇含量只变化 2% 时,其 R_s 的变化比二氯乙烷含量变化 5% 时要大得多,这可能是由于乙醇的极性很强,且易形成氢键所致。

3.1.3 不同极性调节剂的影响

当固定三元溶剂的含量,改变极性调节剂时,发现各种氨基酸的相对保留值 α 及分离度 R_s 变化都很大,这是由于有机改性剂性质不同而引起的,结果汇

于表 3。

表 2 正相色谱中乙醇对分离的影响

流动相*	N-DNB-氨基酸丁酯	$t_R(\text{min})$		α	R_s
		L	D		
77 : 18 : 5	Val	5.24	8.24	2.20	6.95
	Phe	9.48	8.04	1.27	2.51
	Thr	10.61	17.01	1.81	6.70
	Ser	15.03	25.25	1.83	7.14
75 : 18 : 7	Val	4.46	6.90	2.17	5.76
	Phe	7.77	6.69	1.27	2.23
	Thr	8.07	12.34	1.80	6.30
	Ser	10.85	17.34	1.80	6.80
73 : 18 : 9	Val	4.22	5.91	2.15	5.13
	Phe	6.48	5.70	1.26	1.94
	Thr	6.23	8.99	1.79	5.37
	Ser	7.93	11.95	1.78	5.86
71 : 18 : 11	Val	3.96	5.36	2.16	4.59
	Phe	5.77	5.10	1.29	1.90
	Thr	5.29	7.31	1.80	4.85
	Ser	6.47	9.30	1.79	5.26

* 流动相为正己烷-二氯乙烷-乙醇。

氨基酸衍生物与 CSP 间的作用是以偶极-偶极重叠占优势,氢键处于次要地位。二者之间的作用力主要有:(1)CSP 上萘环与 DNB 上苯环间的 π - π 作用力;(2)衍生物的酰胺基与 CSP 脲基间的偶极重叠作用;(3)衍生物上的酯基平行于 CSP 连接臂,指向载体表面,与 CSP 上其余基团之间的作用^[3]。其中(2)是依赖于氨基酸空间结构的,只有 D 型氨基酸对映体重叠得较好,“面对面”接近,保留较强,而 L 型的较差(苯丙氨酸除外),使二者分开。这种拆分仅限于伯胺。对于仲胺则分不开,因衍生后,酰胺基上无活泼氢,不能给出质子形成氢键,如脯氨酸。

CSP 与衍生物之间的作用力很强,在正相色谱中不易洗脱,必须在流动相中添加一些极性很强的、能授受质子形成氢键的醇类如甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇等才能洗脱。其中以甲醇的极性最强,最易形成氢键,洗脱最快,但因部分地参与了与 CSP 间的作用,导致相对保留值 α 有所减小;乙腈、四氢呋喃和二氧六环极性也很强,但只能得到质子,不能给出质子形成氢键,洗脱较慢,甚至要三四个小时以上;对于非极性或不能形成氢键的极性调节剂,洗脱会更慢,甚至不能洗脱。

乙二醇、丙三醇、乙胺、二乙胺、三乙胺等授受质子能力更强,但前二者与正己烷不互溶,而后三者由于碱性太强,会破坏色谱柱,因此不宜采用。

二氯乙烷对分离有一定的影响,但它的主要作

用是使正己烷与极性有机调节剂互溶,起助溶“桥”的作用。

考虑到溶剂的互溶性、氨基酸的分离度和分析速度,选择最佳流动相组成为正己烷:二氯乙烷:乙醇=75:18:7。所得色谱图见图1。

表3 正相色谱中不同极性调节剂对分离的影响

C	N-DNB-氨基酸丁酯	t_R (min)		α	R_s
		L	D		
甲 醇	Val	4.67	6.03	1.71	4.06
	Phe	6.76	6.05	1.22	1.73
	Thr	6.93	9.63	1.65	5.21
	Ser	9.05	12.87	1.61	5.65
乙 醇	Val	4.66	6.90	2.17	5.76
	Phe	7.77	6.69	1.27	2.23
	Thr	8.07	12.34	1.80	6.30
	Ser	10.85	17.34	1.80	6.80
异 丙 醇	Val	5.63	9.49	2.34	6.85
	Phe	10.74	9.10	1.26	2.01
	Thr	12.38	20.03	1.80	5.03
	Ser	17.06	28.28	1.79	4.92
正 丁 醇	Val	5.39	9.00	2.37	6.21
	Phe	10.24	8.68	1.26	2.65
	Thr	13.49	21.51	1.75	6.71
	Ser	19.74	33.03	1.78	6.62
乙 腈	Val	8.38	12.47	1.73	6.39
	Phe	16.84	14.51	1.20	2.44
	Thr	46.54	很大	/	/
	Ser	很大	很大	/	/
二 氧 六 环	Val	20.39	36.21	1.90	6.36
	Phe	47.06	43.90	1.08	0.77
	Thr	很大	很大	/	/
	Ser	很大	很大	/	/
四 氢 呋 喃	Val	15.90	28.85	1.98	6.39
	Phe	38.95	35.17	1.12	1.19
	Thr	很大	很大	/	/
	Ser	很大	很大	/	/

*流动相为正己烷:二氯乙烷:C=75:18:7。

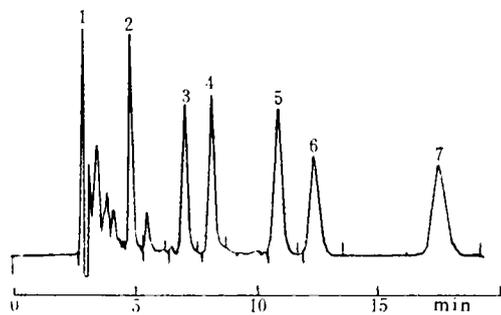


图1 N-DNB-DL-氨基酸丁酯的色谱图

流动相为正己烷:二氯乙烷:乙醇=75:18:7,流速1mL/min,柱温30℃,检测波长254nm。峰:1. 乙酸乙酯(2.72min), 2. L-Val(4.67min), 3. D-Val(6.93min), 4. L-Thr(8.07min), 5. L-Ser(10.85min), 6. D-Thr(12.34min), 7. D-Ser(17.34min), 其余各峰均为杂质峰。

3.2 反相色谱

由表4可见,与正相色谱相比,相对保留值 α 明显下降, R_s 值很小,分离效果较差,而手性洗脱顺序完全相反。

因流动相呈碱性,衍生物完全离子化,溶质亲水性加强,其极性羧基部分指向流动相,而在正相色谱中则指向载体,因而分离过程发生变化,氢键机理占据优势。其作用力主要有:(1)CSP上萘环与DNB苯环间的 $\pi-\pi$ 作用力;(2)DNB上硝基氧原子与CSP脲基的酰胺间的氢键作用力;(3)氨基酸衍生物的亚胺基与CSP的羰基间的氢键作用力;(4)二者间亲脂相互作用力。由于空间作用,(3)(4)在拆分氨基酸对映体过程中应起主导作用,故对L型保留较强^[5]。

流动相不仅与溶质间有作用力,而且与CSP间也有作用力,为CSP与溶质间亲脂作用提供了强键作用,并有利于手性识别,这在非极性流动相中是不可能的^[5]。当流动相变化时,对 α 值影响较大。随流动相极性的增大,洗脱减慢。

表4 反相色谱中有机改性剂对分离的影响

流动相	甲醇-水 (20:80)		甲醇-水 (10:90)		乙腈-水 (10:90)		四氢呋喃-水 (10:90)		
	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	
N-DNB-氨基酸									
t_R	D	5.69	5.04	6.37	5.54	5.13	4.58	6.03	5.24
(min)	L	5.98	5.32	6.69	5.84	5.26	4.75	6.34	5.53
α		1.09	1.11	1.08	1.10	1.05	1.08	1.09	1.10

在正相色谱流动相中加入少量醇,有利于洗脱,并不影响洗脱机理;而在反相色谱中,流动相与CSP间有强作用力,使两种具有相反选择性的相互竞争的手性识别过程发生变化,从而使洗脱顺序及 α 值

都有较大的变化。

本实验表明,在CSP两个手性碳原子中起主要作用的可能是(R)-1-(α -萘基)乙胺部分的手性碳原子,从出峰顺序也验证了这一点。另一个手性碳原

