

分子印迹手性整体柱的制备及对非对映异构体的分离

黄晓冬, 邹汉法, 毛希琴, 罗权舟, 陈小明, 肖湘竹

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116011)

摘要 采用原位分子印迹技术, 单步制备了一种辛可宁印迹的手性整体柱。为了提高柱效和选择性, 选择了相对低极性的甲苯/十二醇复合致孔体系。在等度及梯度洗脱条件下, 非对映异构体辛可宁与辛可尼丁被完全分离。等度洗脱中相对较宽的色谱峰可以在梯度洗脱中得到改善。同时考察了流动相中醋酸浓度、流速以及温度对分离的影响。由于柱中存在大的流通孔, 大大降低了分离过程中的柱压降, 从而使这种色谱柱能够在相对高的流速下使用。提高温度可以提高分离因子, 在 60 °C 获得最大分离因子 5.40。

关键词 分子印迹 原位聚合 手性分离 非对映异构体

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2002)05-0436-03

Preparation of Molecularly Imprinted Chiral Monolithic Column and Its Applications for Separation of Diastereomers

HUANG Xiao-dong, ZOU Han-fa, MAO Xi-qin, LUO Quan-zhou,

CHEN Xiao-ming, XIAO Xiang-zhu

(National Chromatographic Research & Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics,
The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)

Abstract: A cinchonine imprinted chiral monolithic column was prepared for the separation of the diastereomers of cinchonine and cinchonidine by in-situ molecular imprinting technique. This type of molecularly imprinted column can be prepared only by a single-step procedure. In order to improve the selectivity and efficiency, a new in-situ molecular imprinting polymerization system was introduced by adopting porogenic solvents of toluene and 1-dodecanol with relatively low polarity and appropriate ratios of polymerization mixture. Diastereomers of cinchonine and cinchonidine were fully separated both under isocratic and gradient elutions on the chiral monolithic column. The broad peak shown in isocratic elution could be improved in gradient elution. Effects of mobile phase composition, flow rate and temperature on retention and separation factor were investigated. Due to the large throughput pores in the chiral monolithic column, low backpressure was observed during the separation process and a separation factor of 3.18 was obtained at 1.0 mL/min. The increase of temperature could improve the separation factor and a maximum separation factor of 5.40 was obtained at 60 °C.

Key words: molecular imprinting; in-situ polymerization; chiral separation; diastereomer

分子印迹聚合物是一种新兴的人工亲和介质, 对印迹分子具有“预定”的识别能力^[1]。以分子印迹聚合物作为高效液相色谱和毛细管电色谱固定相分离手性化合物已得到了广泛的应用^[2,3]。传统的制备一般都采取本体聚合法, 得到的聚合物要经过机械破碎和研磨, 最后经过筛分得到 25 μm 左右的不规则颗粒。这种方法本身虽然很简单, 但其后处理步骤过于冗长和费时, 并且得到的颗粒是不规则的, 严重影响了色谱柱的柱效。Matsui 等人首先采

用原位聚合法合成了分子印迹聚合物^[4], 并证明其对手性化合物具有一定的识别能力^[4-6]。此方法没有冗长的后处理过程, 只需要经过简单的单步制备过程就可以在色谱柱内直接获得所需的印迹聚合物, 但是, 手性化合物还未能在他们所采用的聚合体系制备的分子印迹柱上得到分离。本文采用新的聚合体系, 以原位聚合法制备了辛可宁印迹的手性整体柱, 成功地分离了非对映异构体抗疟药物辛可宁和辛可尼丁, 并考察了流动相中醋酸浓度、流速以及

收稿日期 2002-02-09

作者简介 黄晓冬, 男, 1976 年生, 博士研究生。

通讯联系人 邹汉法, 研究员, 博士生导师, 电话 (0411) 3693409。

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 29725512)。

温度对分离的影响。

1 实验部分

1.1 试剂

辛可宁(CN)和辛可尼丁(CD)(北京百灵威化学试剂公司);乙腈(色谱纯,山东禹王化工厂);甲基丙烯酸(MAA,化学纯,北京化工厂,减压蒸馏后使用);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA,美国Sigma公司,使用前用100 g/L的氢氧化钠溶液萃取除去阻聚剂);其余所用试剂均为分析纯。

1.2 分子印迹手性整体柱的制备

将模板分子辛可宁(78 mg, 0.265 mmol)引发剂偶氮二异丁腈(AIBN, 8.75 mg)溶解在由功能单体MAA(91 mg, 1.06 mmol)交联剂EDMA(830 mg)甲苯(200 mg)和十二醇(1.30 g)组成的混合溶液中,超声后通氮气5 min。然后将此溶液加入到一个不锈钢柱管中(150 mm×4 mm i.d.),两端密封,在45℃下恒温反应12 h。更换柱头后将其接到高效液相色谱(HPLC)泵上,用甲醇-醋酸(体积比为4:1)溶液充分冲洗至基线水平。空白柱除不加模板分子外均按上述方法等同制备和处理。

1.3 色谱实验

所有色谱实验均在岛津LC-10A高效液相色谱仪上完成(Shimadzu, Kyoto, Japan)。数据采集和处理在WDL-95色谱工作站上完成(国家色谱研究分析中心,大连化学物理研究所)。流动相为不同体积比的乙腈-醋酸溶液。除温度实验外,其余色谱实验均在室温下进行。检测波长为280 nm。保留因子 k' 按公式 $k' = (t_R - t_0) / t_0$ 计算,其中 t_R 是样品的

保留时间, t_0 是采用丙酮测定的死时间;分离因子 α 按照公式 $\alpha = k_{CN}' / k_{CD}'$ 计算,其中 k_{CN}' 和 k_{CD}' 分别是辛可宁和辛可尼丁的保留因子。

2 结果与讨论

2.1 致孔剂的选择

致孔剂的选择在分子印迹手性整体柱的制备中最为重要。选择的致孔剂要满足以下3个条件:(1)能溶解模板分子和功能单体;(2)能形成大的流通孔,从而保证流动相能在较低的压力下流过色谱柱;(3)对模板分子与功能单体之间的相互作用干扰小。本文选择了甲苯/十二醇的复合致孔体系,它基本满足了以上3个条件。相比于Matsui等人选用的环己醇/十二醇体系^[4],甲苯/十二醇体系对模板分子与功能单体之间的氢键相互作用干扰更小,并且良溶剂甲苯的存在大大增加了所得聚合物的比表面积(120 m²/g)^[7]。同时为了保证所得识别“孔穴”的稳定性,还采用了高的交联剂比例(90%)。

2.2 非对映异构体的分离

在分子印迹柱的分离中,一般都采用等度洗脱,但由于所得的分子印迹柱对模板分子有高的亲和作用以及作用位点的不均一性,常常导致第二个峰拖尾严重^[8],大大降低了柱效,同时也增长了分离所需的时间,采用梯度洗脱方式则可改善分离效果。本文采用了等度、台阶梯度和线性梯度3种洗脱方式来分离非对映异构体辛可宁和辛可尼丁,其色谱图分别见图1-a、b、c。图1-a中峰2严重拖尾;图1-b和图1-c中,拖尾峰均被压缩,大大提高了柱效并缩短了分离时间。

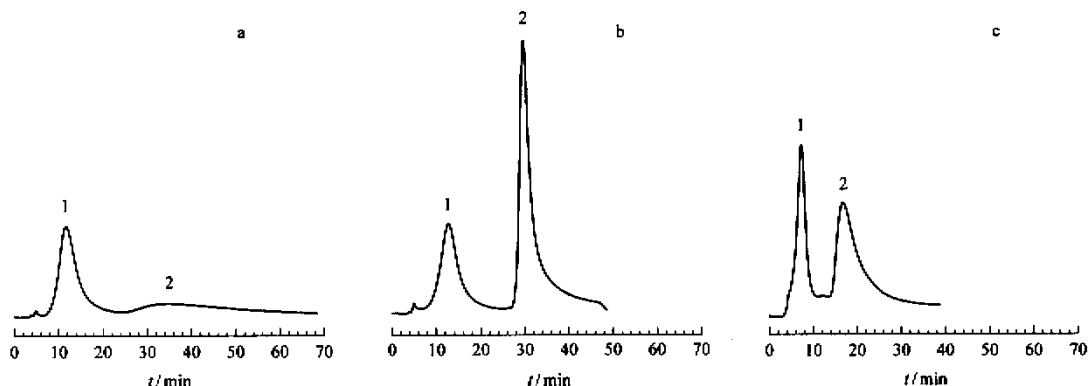


图1 辛可宁和辛可尼丁的等度(a)、台阶梯度(b)和线性梯度(c)洗脱色谱图

Fig.1 Chromatograms of cinchonine (CN) and cinchonidine (CD) under isocratic (a), stepwise gradient (b) and linear gradient (c) elutions

Conditions: (a) acetonitrile-acetic acid (98:2 in volume ratio); (b) stepwise gradient program: 0 min-20 min, acetonitrile-acetic acid (98:2 in volume ratio), 20 min-50 min, acetonitrile-acetic acid (90:10 in volume ratio); (c) linear gradient elution was run from 99:1 to 90:10 (in volume ratio) for acetonitrile-acetic acid within 15 min and hold for 25 min. Flow rate, 0.5 mL/min. Sample size: 4 μ L containing 10 μ g CN and 10 μ g CD.

Peaks: 1. CD; 2. CN.

2.3 流动相中含酸量对保留的影响

在本印迹过程中,辛可宁分子与甲基丙烯酸羧基之间的氢键作用是主要的识别驱动力,而流动相中氢离子的存在必然会削弱它们之间的氢键作用。从表 1 可以看出,随着流动相中醋酸体积分数的增加,CN 和 CD 的保留因子都不断减小。当流动相中醋酸的体积分数小于 1% 时,CN 的保留非常强。而当流动相为纯乙腈时,CN 不能被洗脱下来。相反在流动相中醋酸的体积分数大于 5% 时,CN 和 CD 都趋向于不保留。此外,我们发现非模板印迹的空白柱对二者没有识别能力,从而证明了该柱的手性识别能力是由印迹过程产生的。

表 1 流动相中酸体积分数对保留值的影响

Table 1 Effect of acid content in mobile phase on retention

α (acetic acid) (%)	k_{CN}'	k_{CD}'
1	23.76	7.54
3	3.05	0.99
5	0.25	0.04

Mobile phase: acetonitrile containing different concentrations of acetic acid under isocratic elution at a flow rate of 0.5 mL/min. Individual sample was injected to determine the retention time. Sample size: 4 μ L containing 10 μ g cinchonine or 10 μ g cinchonidine.

2.4 流速对分离的影响

通过原位聚合法制得的是具有微孔和大的流通孔双层孔结构的整体柱^[9],这些大孔的存在大大降低了分离过程中的柱压降,使这种色谱柱能够在较高的流速下使用。在流速为 0 mL/min ~ 2.0 mL/min 时,柱压和流速成线性关系,且在 2.0 mL/min 时柱压仅为 1.08 MPa。

从表 2 可以看出,随着流速的增加,CN 和 CD 的保留因子逐渐减小,这可能是由于二者在分子印迹柱上慢的传质过程造成的^[10]。但是分离因子 α 却变化不大,在流速 1.0 mL/min 时,得到最大值为 3.18。

表 2 不同流速下辛可宁和辛可尼丁的保留因子和分离因子

Table 2 Retention factors and separation factors of CN and CD at different flow rates

Flow rate (mL/min)	k_{CN}'	k_{CD}'	α
0.5	3.05	0.99	3.07
1.0	2.69	0.85	3.18
1.5	2.67	0.80	2.84
2.0	2.04	0.72	2.82

Mobile phase: acetonitrile-acetic acid (97:3 in volume ratio) under isocratic elution. Individual sample was injected to determine the retention time. Sample size: 4 μ L containing 10 μ g cinchonine or 10 μ g cinchonidine.

2.5 温度对分离的影响

本文考察了 20 $^{\circ}$ C ~ 70 $^{\circ}$ C 时 CN 和 CD 的保留因子和分离因子的变化情况。从表 3 可以看出,随着温度的增加,CN 和 CD 的保留因子不断增大(总体趋势)。但 CN 增大的幅度要大于 CD,从而导致了分离因子 α 也不断增加,在 60 $^{\circ}$ C 达到最高值 5.40。这表明二者在分离过程中与固定相之间具有不同的热力学值^[8,11]。

表 3 不同温度下辛可宁和辛可尼丁的保留因子和分离因子

Table 3 Retention factors and separation factors of CN and CD at different temperatures

$\theta/^{\circ}$ C	k_{CN}'	k_{CD}'	α
20	2.96	0.81	3.66
30	3.83	0.90	4.24
40	4.23	0.86	4.91
50	5.19	1.05	4.95
60	6.59	1.22	5.40
70	7.97	1.48	5.40

Mobile phase: acetonitrile-acetic acid (97:3 in volume ratio) under isocratic elution at a flow rate of 0.5 mL/min. Individual sample was injected to determine the retention time. Sample size: 4 μ L containing 10 μ g cinchonine or 10 μ g cinchonidine.

参考文献:

- [1] Wulff G. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, 34(17): 1812
- [2] Remcho V T, Tan Z J. *Anal Chem*, 1999, 71(7): 248A
- [3] Schweitz L, Spégel P, Nilsson S. *Electrophoresis*, 2001, 22(19): 4053
- [4] Matsui J, Kato T, Takeuchi T, Suzuki M, Yokoyama K, Tamiya E, Karube I. *Anal Chem*, 1993, 65: 2223
- [5] Matsui J, Nicholls I A, Takeuchi T. *Anal Chim Acta*, 1998, 365(1-3): 89
- [6] Takeuchi T, Matsui J. *J High Resol Chromatogr*, 2000, 23: 44
- [7] Viklund C, Svec F, Fréchet J M J. *Chem Mater*, 1996, 8: 744
- [8] Sellergren B, Shea K J. *J Chromatogr A*, 1995, 690: 29
- [9] WEI Yin-mao, HUANG Xiao-dong, GENG Xin-du. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2001, 22(10): 1664
卫引茂,黄晓冬,耿信笃. *高等学校化学学报*, 2001, 22(10): 1664
- [10] Haginaka J, Sanbe H. *J Chromatogr A*, 2001, 913: 141
- [11] Lin J M, Nakagama T, Uchiyama K, Hobo T. *Biomed Chromatogr*, 1997, 11(5): 298