

三元非对映异构体复合物的直接实验证据 及其在对映体手性分离中的作用

于 擎, 曹 洁, 张成根

(中国科学院研究生院化学与化学工程学院, 北京 100049)

摘要 以含 *L*-苯丙氨酸铜配位络合物的溶液作为手性流动相, 采用反相高效液相色谱法拆分了非衍生苯甘氨酸对映体, 使用质谱对拆分组分进行了结构鉴定, 得到了拆分组分的化学结构, 用量子化学计算预测了该结构的最稳定构象. 质谱实验结果表明, 拆分组分是一对铜混合配体复合物离子, 其中的一个配体是提供手性环境的流动相添加剂(*L*-苯丙氨酸), 另一配体是待拆物质的某一构型对映体, 这对铜混合配体复合物离子本质上属于非对映异构体. 在色谱分离实验中还考察了手性流动相 pH 值、甲醇含量以及 *L*-苯丙氨酸与 Cu^{2+} 的摩尔比等因素对分离效果的影响.

关键词 手性流动相; 反相高效液相色谱法; 苯甘氨酸; 质谱; 理论计算

中图分类号 O641; O657.63

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)05-0988-04

氨基酸的手性拆分在各个领域都得到了广泛的关注^[1~5]. 通过键合到固定相上^[6]或作为添加剂添加到流动相中^[7], 一系列由 Cu(II) 和氨基酸或衍生化的氨基酸形成的非共价复合物对氨基酸对映体进行手性拆分的配体交换色谱法(LEC)^[8]已经获得了成功. 其中, 手性流动相法是通过向流动相中添加一种氨基酸和 Cu(II) 的手性金属复合物离子, 从而实现对另一种氨基酸的分离^[1]. 该方法的优点是易操作并具有很高的选择性^[2]. 质谱在非共价复合物的研究方面起到越来越重要的作用. 由于电喷雾电离(ESI)^[9]等软电离方法的出现以及质谱技术本身所具备的灵敏、专一和快速等特点, 使得研究气相复合物离子的结构及分子间的相互作用成为可能. 手性质谱是指通过引入一个手性环境的方法, 使对映异构体和手性环境之间形成非对映异构体, 再使用串联质谱的方法对形成的非对映异构体进行区分. 近年来, 手性质谱方法的使用逐渐增多^[10].

本文以未衍生化的 *D/L* 苯甘氨酸对映体作为模型化合物, 以含 *L*-苯丙氨酸铜配位复合物的溶液作手性流动相进行手性拆分方法的研究, 并考察了不同因素对拆分效果的影响; 同时, 对流过 C_{18} 柱的馏出组分通过串联质谱法对其结构进行了鉴定, 并根据非对映异构体复合物离子的 CID 数据, 得出这对非对映异构体复合物离子相对稳定性, 为解释被拆分组分的化学结构提供了实验依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

YoungLin ACME 9000 型高效液相色谱仪. SP930D 型泵, UV730D 型紫外-可见检测器, CTS30 柱温箱, 安捷伦 TC- C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), AutoChro2000 色谱工作站. LCQ 电喷雾质谱仪(德国布鲁克公司). 喷雾源电压为 4.5 kV, 源电流为 1.0 μA , 金属毛细管电压 25 V, 管透镜补偿电压 15 V, 毛细管温度 50 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气 N_2 , 流速 35 r/min, He 为 CID 气体; 使用流动注射泵进样, 样品流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. 所得质谱图均为 200 次累加得到的平均值.

苯甘氨酸(pGly)消旋体和 *L*-苯丙氨酸(Phe)购自比利时 Acros 试剂公司; *D*-, *L*-苯甘氨酸对映体购自美国 Aldrich 试剂公司; 甲醇(色谱纯)购自美国 Fisher Scientific 试剂公司; 自制二次蒸馏水.

收稿日期: 2008-07-14.

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(批准号: 106064)资助.

联系人简介: 曹 洁, 女, 博士, 副教授, 主要从事手性拆分及识别的质谱研究. E-mail: jcao@gucas.ac.cn

1.2 实验过程

RP-HPLC 部分: 0.1 mg/mL 的苯甘氨酸消旋体水溶液, 进样量为 20 μL , 检测波长为 288 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速: 1 mL/min. 流动相采用 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 体系, 流动相中 $V(\text{CH}_3\text{OH}):V(\text{H}_2\text{O})=20:80$, Cu^{2+} 离子浓度为 0.075 mmol/L, *L*-苯丙氨酸分别为 0.225, 0.3 和 0.375 mmol/L. 在不同的 Cu^{2+} 和 *L*-苯丙氨酸配比下分别调整流动相 pH 为 3.7, 3.8, 3.9, 4.0 来进行分离实验.

LCQ 部分: 馏出组分使用流动注射泵进样, 样品流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

量子化学计算使用从头算 HF 方法和密度泛函理论的 B3LYP 方法, 采用 LANL2DZ 和 6-31G(*d*) 基组. 先在 HF/LANL2DZ 级别上进行初步构型优化, 再在 B3LYP/6-31G(*d*) 级别上通过构型优化和频率分析计算确定平衡构型. 全部计算使用 Gaussian 03 程序包完成^[11].

2 结果与讨论

2.1 未衍生化 *D/L* 苯甘氨酸对映体模型化合物的手性拆分

2.1.1 流动相 pH 值的影响 改变流动相的 pH 值, 可以明显地改变系统的分离因子 α . 通常, 在一定的 pH 范围内, 碱性环境有利于 $\text{Cu}(\text{II})$ 复合物的形成, 组分的分离因子也会随 pH 的升高而增大. 但当流动相 pH = 5.0 时, 色谱峰会出现严重的拖尾现象. 对于本研究体系, pH 在 3.7 ~ 4.0 之间比较理想. pH 值对保留时间和分离因子 α 的影响见表 1. 流动相的 pH 值除了影响分离因子外, 还会改变色谱峰的形状和保留时间. 在相同 $\text{Cu}(\text{II}):L\text{-Phe}$ 配比下, pH 较低时, 保留时间较小, 色谱峰较窄; 而当 pH 升高后, 分离时间明显的延长, 谱峰也加宽. pH 值对色谱峰形的影响见图 1.

Table 1 Effects of the molar ratio of Cu^{2+} to *L*-Phe and pH on the retention time (t_{R}) and α

$n(\text{Cu}^{2+}):n(L\text{-Phe})$	pH	$t_{\text{R},L}/\text{min}$	$t_{\text{R},D}/\text{min}$	α	$n(\text{Cu}^{2+}):n(L\text{-Phe})$	pH	$t_{\text{R},L}/\text{min}$	$t_{\text{R},D}/\text{min}$	α
1:3	3.7	2.50	2.66	1.08	1:4	3.9	2.76	3.09	1.76
1:3	3.8	2.55	2.75	1.18	1:4	4.0	2.86	3.40	2.24
1:3	3.9	2.65	2.84	1.49	1:5	3.7	2.96	3.36	1.89
1:3	4.0	2.76	3.10	1.82	1:5	3.8	3.03	3.45	1.92
1:4	3.7	2.68	2.85	1.62	1:5	3.9	3.09	3.63	2.18
1:4	3.8	2.65	2.87	1.70	1:5	4.0	3.24	3.82	2.20

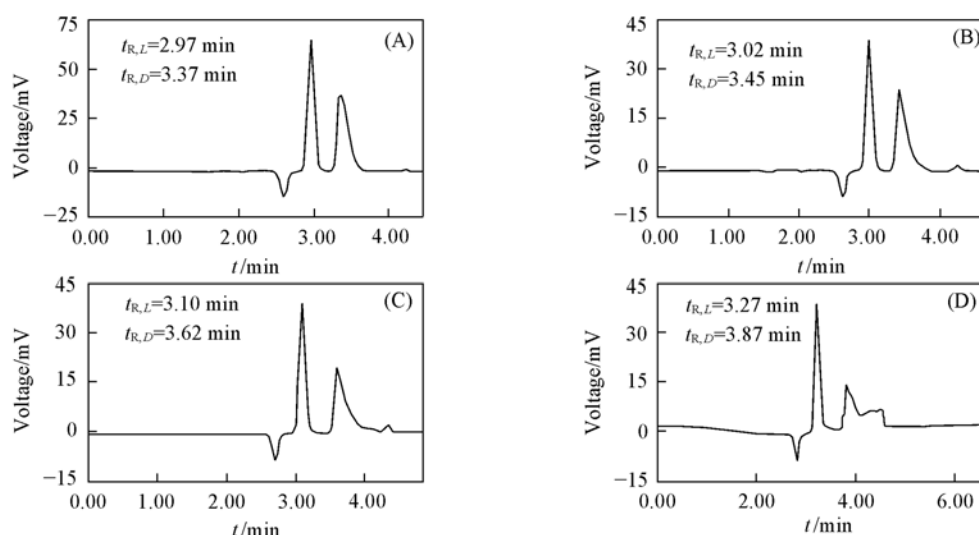


Fig. 1 Chromatographs of different pH values with $n(\text{Cu}^{2+}):n(L\text{-Phe})=1:5$

(A) pH=3.7; (B) pH=3.8; (C) pH=3.9; (D) pH=4.0.

2.1.2 甲醇含量的影响 使用甲醇作为有机改性剂 $V(\text{CH}_3\text{OH}):V(\text{H}_2\text{O})=20:80$. 降低流动相中的甲醇含量会延长保留时间并提高分离度. 反之, 会使非对映异构体络合物在固定相上的吸附变小^[2], 使色谱分离作用减弱.

2.1.3 流动相中 *L*-Phe 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 摩尔配比的影响 利用手性配体交换原理拆分对映体, 需要手性配

体与中心金属离子的同时参与. 表2列出了 *L*-Phe 与 Cu(II) 的摩尔配比对保留时间和分离因子 α 的影响结果. 可见, 在相同的 pH 下, 随着 *L*-Phe 和 Cu(II) 配比的增加, 分离因子 α 呈显著上升趋势.

Table 2 Effects of molar ratios between Cu²⁺ and *L*-Phe on the retention time(t_R) and α

pH	$n(L\text{-Phe}):n(\text{Cu}^{2+})$	$t_{R,L}/\text{min}$	$t_{R,D}/\text{min}$	α	pH	$n(L\text{-Phe}):n(\text{Cu}^{2+})$	$t_{R,L}/\text{min}$	$t_{R,D}/\text{min}$	α
3.7	3	2.50	2.66	1.08	3.9	3	2.65	2.84	1.49
3.7	4	2.68	2.85	1.62	3.9	4	2.76	3.09	1.76
3.7	5	2.96	3.36	1.89	3.9	5	3.09	3.63	2.18
3.8	3	2.55	2.75	1.18	4.0	3	2.76	3.10	1.82
3.8	4	2.65	2.87	1.70	4.0	4	2.86	3.40	2.24
3.8	5	3.03	3.45	1.92	4.0	5	3.24	3.82	2.20

2.2 非对映异构体复合物的结构及相对稳定性

手性配体交换色谱的拆分机理是配体交换机制, 形成混合配体复合物. 在本实验中应为 Cu(II) 混合配体三元复合物. 根据馏出组分的保留时间收集一定量的样品(约 0.5 mL), 将该样品进行结构研究. 图 2 是相同条件下流过 C₁₈ 柱的含 *L, D*-苯甘氨酸馏出组分的一级质谱图(正离子模式). 由图 2 可见, 馏出组分的一级质谱图完全相同. 除了 m/z 166(100%) 为质子化苯丙氨酸离子, m/z 152(3.1%) 为苯甘氨酸离子(图中均未显示)外, 在高质量端出现了 m/z 378(2.18%), 392(10.28%), 331(7.48%). 经过一级质谱图相应离子峰的同位素分布数据证明, 上述离子均为 Cu(II) 复合物离子, 其结构分别为: [pGly-Cu(II)-Phe - H⁺]⁺ (m/z 378), [Phe-Cu(II)-Phe - H⁺]⁺ (m/z 392) 和 [Phe - H⁺-Phe]⁺ (m/z 331). 其中, m/z 378 是 Cu(II) 混合配体离子. 表明流过 C₁₈ 柱的馏出组分是一对含铜非对映异构体复合物. 以 [pGly-Cu(II)-Phe - H⁺]⁺ (m/z 378) 为前体离子进行 CID 实验(图 3). 由图 3 可知, 主要碎片离子(m/z 334, 100%) 是由前体离子失去一分子 CO₂ 得到的. 由 CID 谱图

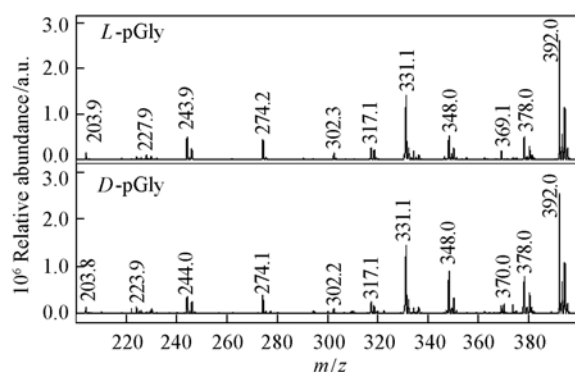


Fig. 2 Mass spectra of the diastereomeric complexes containing *L*- and *D*-phenylglycine

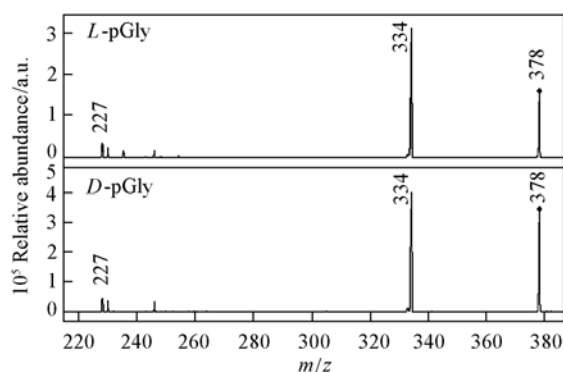


Fig. 3 CID of the diastereomeric ions(m/z 378) containing *L*- and *D*-phenylglycine

的相似性可以看出, 这对非对映异构体的裂解反应途径基本相同, 但碎裂程度不同, 这可由主要碎片离子与前体离子的相对丰度反映出来. 通常, 以该数值的百分比表示前体离子的解离效率, 解离效率的大小直接反映出复合物离子的稳定性. 由图 3 可见, 这对非对映异构体复合物离子的稳定性明显不同, 其解离效率分别为 1.95(*L*-苯甘氨酸) 和 1.18(*D*-苯甘氨酸). 即含 *D*-苯甘氨酸的复合物离子比含 *L*-苯甘氨酸的稳定, 这与色谱上的出峰顺序一致, 即不稳定的含 *L*-苯甘氨酸的复合物先被洗脱出来.

用量子化学计算预测出该非对映异构复合物的最稳定构象(见图 4). 由图 4 可以看出, 该非对映异构复合物为四配位铜配合物, 每一个配体为二齿配体, 配位位点为氨基酸中羧基 O 原子和氨基 N 原子,

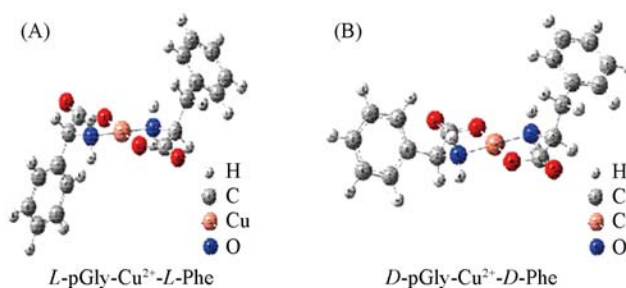


Fig. 4 Most stable conformation of diastereomers containing of *L*-(A) and *D*-phenylglycine(B)

这两个配位原子与中心铜离子分别形成稳定的五元环结构。

3 结 论

用手性流动相方法对苯甘氨酸模型化合物进行了拆分方法学研究, 使用串联质谱首次报道了拆分组分的化学结构, 量子化学计算预测了该结构的最稳定构象。质谱实验结果表明, 拆分组分是一对铜混合配体复合物离子非对映异构体, 同时, 质谱 CID 实验给出了这对非对映异构体的相对稳定性, 该趋势与色谱的出峰顺序吻合。说明该复合物在气相和液相的稳定性趋势相同。

感谢韩国英麟机器株式会社无偿提供的高效液相色谱仪及工作站, 并感谢国家食品药品监督管理局药品审评中心张哲峰教授在实验过程中提出的宝贵建议和帮助。

参 考 文 献

- [1] Lan S. J. . Chromatogr. Sci. [J], 1984, **22**(9): 416—423
- [2] Galaverna G. , Corradini R. , Demunari E. , *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 1993, **657**(1): 43—54
- [3] Davies J. S. . Peptides and Proteins[M], New York, Marcel Dekker, 1997: 1
- [4] Preston R. L. . Comp. Biochem. Physiol. B[J], 1987, **87**(1): 55—62
- [5] Aniello A. D' . , Giuditta A. . J. Neurochem. [J], 1977, **29**(6): 1053—1057
- [6] Roumeliotis P. , Unger K. K. , Kurganov A. A. , *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. Engl. [J], 1982, **21**(12): 930—931
- [7] Nimura N. , Suzuki T. , Kasahara Y. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 1981, **53**(9): 1380—1383
- [8] Davankov V. A. , Navratil J. D. , Walton H. F. . Ligand Exchange Chromatography[M], Boca Raton, CRC Press, 1988
- [9] John B. F. , Matthias M. , Chin K. M. , *et al.* . Mass Spectrom. Rev. [J], 1990, **9**(1): 37—70
- [10] Tao W. A. , Zhang D. , Nikolaev E. N. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2000, **122**(43): 10598—10609
- [11] Frisch M. J. , Trucks G. W. , Schlegel H. B. , *et al.* . Gaussian 03, Revision B.01[CP], Pittsburgh, PA: Gaussian, Inc. , 2004

Direct Experimental Evidence of Ternary Diastereomeric Complexes in Chiral Separations of Phenylglycine Enantiomers with Chiral Mobile Phase by RP-HPLC

YU Qing, CAO Jie* , ZHANG Cheng-Gen

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Chiral separation of *D*-, *L*-phenylglycine by RP-HPLC was accomplished by adding a complex of optically active *L*-Phe-Cu²⁺ to the mobile phase. Chiral separation mechanism was further elucidated in light of unambiguously assigning the structure of the elutents from RP-HPLC by taking advantage of tandem mass spectrometry due to its unique capability of structural identification of the unknowns. Mass spectrometry results revealed that the pair of elutents represented a pair of ternary copper complexes with mixed ligands, providing the first experimental evidence. These complexes are diastereoisomer in nature. The optimized configuration of the diastereoisomer was predicted by theoretical calculation. In addition, the effects of the ratio of Cu²⁺ to *L*-Phe, pH of chiral mobile phase as well as the concentrations of methanol were investigated.

Keywords Chiral mobile phase; RP-HPLC; Phenylglycine; Mass spectrometry; Theoretical calculation

(Ed. : S, I)