

# 以纤维素苯甲酸酯类为薄层色谱 固定相对手性化合物的拆分

王 伟<sup>1,2</sup>, 闫焕英<sup>1</sup>, 张静涛<sup>1</sup>, 董英茹<sup>1</sup>, 李宝林<sup>1,2</sup>

(1. 陕西师范大学 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062; 2 陕西师范大学  
教育部“药用植物资源与天然药物化学 重点实验室, 陕西 西安 710062)

**摘 要:** 用超声方法合成了 3 种纤维素苯甲酸酯类手性固定相: 三(苯甲酰基)纤维素 (CTB), 三(4 氯苯甲酰基)纤维素 (CTPCB) 和三(2 氯苯甲酰基)纤维素 (CTOCB); 用红外光谱和元素分析对其进行了结构鉴定。将该类手性固定相 (CSP) 用于薄层色谱分离手性化合物, 分别采用 TEAA, 乙腈 - TEAA (体积比 2 : 1), 乙酸乙酯 - 水 - 冰醋酸 (体积比 6 : 2 : 1), 正丁醇 - 冰醋酸 - 水 (体积比 4 : 1 : 1) 及乙酸乙酯 - 甲醇 - 30% (体积分数) 醋酸 (体积比 5 : 3 : 2) 作为展开剂, 使 2-(9 蒽基)-2 甲氧基乙酸、2-(9 蒽基)-2 羟基乙酸、苯丙氨酸、组氨酸及扑尔敏 5 种手性物质都获得了完全分离; 在合成的 3 种手性固定相中, CTB 的手性拆分能力较强, CTPCB 和 CTOCB 的拆分能力稍差。

**关键词:** 三(苯甲酰基)纤维素; 三(4 氯苯甲酰基)纤维素; 三(2 氯苯甲酰基)纤维素; 薄层色谱; 手性拆分  
**中图分类号:** O657.73; O636.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)02 - 0131 - 05

## Chiral Separation of Optical Isomers with Cellulose Tris(benzoate)s as Stationary Phase

WANG Wei<sup>1,2</sup>, YAN Huan-ying<sup>1</sup>, ZHANG Jing-tao<sup>1</sup>, DONG Ying-ru<sup>1</sup>, LI Bao-lin<sup>1,2</sup>

(1. School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;  
2. Key Laboratory of Medicinal Plant Resources and Nature Pharmaceutical Chemistry (Ministry of  
Education), Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** Three cellulose derivatives, viz cellulose tribenzoyl (CTB), cellulose tris(*p*-chlorobenzoate) (CTPCB) and cellulose tris(*o*-chlorobenzoate) (CTOCB) were ultrasonically prepared and characterized by IR spectrometry and elemental analysis. They were used as chiral stationary phase of thin-layer chromatography to separate five chiral molecules, viz 2-(9-anthryl)-2-methoxyacetic acid, 2-(9-anthryl)-2-hydroxyacetic acid, 2-amino-3-phenylpropanoic acid, histidine and chlorpheniramine. The five chiral molecules were completely separated with their respective developing solvents, viz TEAA, acetonitrile - TEAA (2 : 1, by volume), ethyl acetate - H<sub>2</sub>O - acetic acid (6 : 2 : 1, by volume), *n*-butyl alcohol - acetic acid - H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1, by volume) and ethyl acetate - methyl alcohol - 30% acetic acid (5 : 3 : 2, by volume). The three chiral stationary phases were compared and the results showed that CTB was the best stationary phase for the chiral separation. **Key words:** cellulose tribenzoyl; cellulose tris(*p*-chlorobenzoate); cellulose tris(*o*-chlorobenzoate); thin-layer chromatography; chiral separation

由于在大多数生命活动过程中的蛋白质、核酸、糖及萜类等天然产物的大多数构型只涉及一种对映体形态, 许多生物活性只为一种特定的绝对构型所专有, 所以对分子绝对构型的确定已经成为立体化学研究中最主要、最活跃的部分<sup>[1]</sup>。2-(9 蒽基)-2 甲氧基乙酸、2-(9 蒽基)-2 羟基乙酸在手性原子绝对构型表征方面具有广泛的应用, 所以研究两者的拆分有很重要的意义; 苯丙氨酸是一种重要的药物中间体; *D* 组氨酸参与动物机体蛋白质合成, 是生物体内生血素形成的必需条件之一<sup>[2]</sup>; 扑尔敏是一种抗过敏药, 同时有一定的副作用, 其 *R*、*S* 构型作用不明了。本实验对这 5 种物质进行了拆分。

收稿日期: 2006 - 12 - 27; 修回日期: 2007 - 03 - 21

基金项目: 教育部重点科学技术研究资助项目 (105153)

第一作者: 王 伟 (1967 - ), 女, 吉林梨树人, 副教授, 博士, Tel: 029 - 85303858, E-mail: wwz@tom.com

在手性固定相中,纤维素是一类天然手性物质,它是  $\beta$ -D 葡萄糖单元由 1,4 糖苷键形成的高度有序、呈螺旋形空穴结构的光学活性天然高分子。衍生化的葡萄糖单元可以作为手性活性点作用于手性对映体,并具有很好的拆分能力。前人作了许多纤维素苯甲酸酯类的衍生物,其拆分能力与苯环上的取代基有很大关系,取代基的诱导效应对纤维素衍生物手性拆分能力有明显的影响<sup>[3]</sup>。本实验采用超声的方法合成了三(苯甲酰基)纤维素(CTB),三(4-氯苯甲酰基)纤维素(CTPCB)和三(2-氯苯甲酰基)纤维素(CTOCB),它们显示了一定的手性识别能力,结构如图 1 所示。用红外光谱、元素分析对产物进行了结构表征,并将其与等比例的纤维素混合制成薄层板。通过优化展开剂对 5 种手性化合物进行了拆分。该方法操作方便、设备简单、分析速度快,且能快速更换展开剂系统。到目前为止对以上 5 种手性物质利用此类纤维素苯甲酸酯类手性固定相薄层色谱分离还未见文献报道。

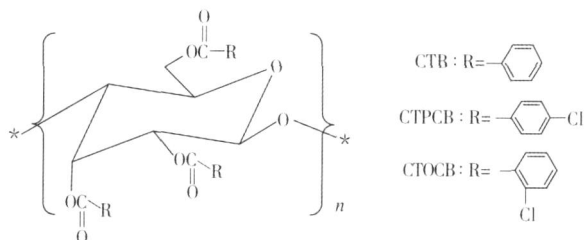


图 1 纤维素苯甲酸酯类的结构式

Fig. 1 Structures of cellulose tris(benzoate)s

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

微晶纤维素(柱层析用,上海恒信化学试剂有限公司)、吡啶(AR,西安试剂厂)、苯甲酰氯(AR,天津市化学试剂厂)、4-氯苯甲酰氯(AR,国药集团化学试剂有限公司)、2-氯苯甲酰氯(AR,上海金山亭新化工试剂厂);吡啶用分子筛干燥备用;TEAA为1%(体积分数)乙酸三乙胺溶液,即1 mL三乙胺加99 mL水混合,再用稀释过的乙酸调成pH 4.1;茚三酮制成丙酮溶液。

KQ-400KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),德国Vario EL元素分析仪,德国Bruker公司EQU NX55型傅立叶变换红外光谱仪。

### 1.2 手性固定相的合成

手性固定相的合成参考文献[4-5]。在室温条件下,取一定量的微晶纤维素于烧瓶中,每克微晶纤维素用40 mL吡啶溶胀2 h。然后向烧瓶中加入一定比例的酰氯,混合均匀后,放入超声场中于45℃左右反应2 h,静置过夜。然后用乙醚、甲醇交替洗涤至无Cl<sup>-</sup>(用AgNO<sub>3</sub>检验滤液),向粗产品中缓慢滴加三氯甲烷(CTOCB用二氯甲烷),至完全溶解,再加入无水乙醇沉淀,直到不再出现白色絮状物为止。抽滤后将所得固体置于小烧杯中,60℃下真空干燥12 h,得到固体产品。

### 1.3 手性薄层板的制备

手性薄层板的制备参考文献[6],称取相同质量的微晶纤维素和手性固定相,于研钵中研磨均匀,在不断研磨下慢慢滴入质量分数为0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液,最后滴入少量乙醇除气泡。混合均匀后,涂布在干净的载玻片上,使其厚度均匀、表面光滑,室温下水平晾干,于100℃烘箱中活化10 min,置于干燥器中备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 手性固定相的合成与表征

在纤维素三苯甲酸酯类的制备过程中,由于空间位阻的影响,其每一个葡萄糖残基C<sub>6</sub>上的羟基易被酯化,而对C<sub>2</sub>和C<sub>3</sub>上的羟基,其中1个易被酯化,但3个羟基完全被酯化有一定困难。实验表明,当酰氯与微晶纤维素的羟基的摩尔比达到1.8以上,超声反应2 h,加入适量的三乙胺,就能使纤维素的羟基基本衍生完全。与传统的加热回流法比较,具有操作简单、反应条件温和、大大缩短反应时间及产率较高等优点。转化率均达到90%以上。为了得到长链的纤维素苯甲酸酯类手性固定相,用氯仿溶解产物,再用无水乙醇使之沉淀出来。这样得到的长分子链产物具有手性螺旋结构,可以对手性物质起空间识别作用,更有利于手性物质的分离<sup>[7]</sup>。

2.1.1 红外光谱分析 将合成的CTB与原料微晶纤维素进行红外光谱分析,结果如表1所示。从表1可以看出,3种手性固定相中原来MC在3354 cm<sup>-1</sup>羟基(—OH)的吸收峰已基本消失,相继出现苯环

的骨架振动吸收峰 ( $1\ 620\sim 1\ 430\ \text{cm}^{-1}$ )、酯羰基吸收峰 ( $1\ 740\sim 1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ )及其他相关吸收峰。

表 1 手性固定相的红外图谱数据

Table 1 IR spectrometric data of chiral stationary phases

Chiral stationary phase	(—OH) / $\text{cm}^{-1}$	(—C O) / $\text{cm}^{-1}$	(—C—O—C) / $\text{cm}^{-1}$	(—C C—(benzene)) / $\text{cm}^{-1}$
Microcellulose (MC) (微晶纤维素)	3 354	-	-	-
Cellulose tribenzoyl (CTB) (三(苯甲酰基)纤维素)	-	1 731.18	1 267.68	1 599.72
Cellulose tris( <i>p</i> -chlorobenzoyl) (CTPCB) (三(4-氯苯甲酰基)纤维素)	-	1 735.40	1 264.11	1 593.85
Cellulose tris( <i>o</i> -chlorobenzoyl) (CTOCB) (三(2-氯苯甲酰基)纤维素)	-	1 720.55	1 260.23	1 600.00

2.1.2 元素分析 元素分析结果见表 2。结果表明微晶纤维素中羟基衍生化完全, 所得产物为目标产物。

表 2 手性固定相的元素分析数据

Table 2 Elemental analysis data of chiral stationary phases

Analytical item	CTB		CTPCB		CTOCB	
Color(颜色)	Buff(浅黄色)		White(白色)		White(白色)	
Elemental analysis (元素分析)	C	Found $w_F$ / %	68.35	55.83	55.55	
		Calculated $w_C$ / %	66.82	55.36	55.36	
	H	Found $w_F$ / %	4.571	3.052	3.086	
		Calculated $w_C$ / %	4.673	3.017	3.017	
	N	Found $w_F$ / %	0.073	0.031	0.059	
		Calculated $w_C$ / %	0	0	0	

## 2.2 对手性化合物的拆分结果

5种手性物质的化学结构见图 2, 在纤维素苯甲酸酯类手性薄层板上的拆分结果见表 3。

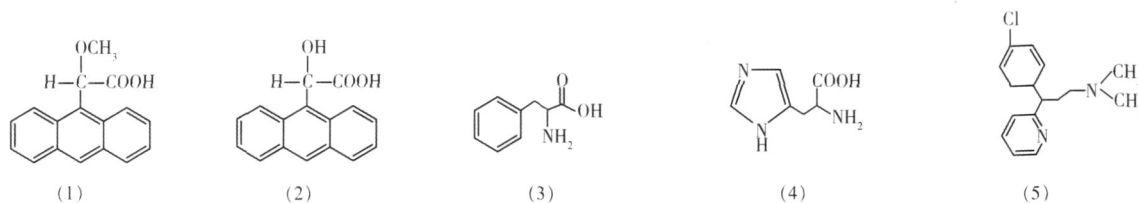


图 2 手性物质的化学结构式

Fig. 2 Chemical structures of chiral substances

- 2-(9-蒎基)-2-甲氧基乙酸 (2-(9-anthryl)-2-methoxyacetic acid);
- 2-(9-蒎基)-2-羟基乙酸 (2-(9-anthryl)-2-hydroxyacetic acid);
- 苯丙氨酸 (2-amino-3-phenylpropanoic acid);
- 组氨酸 (histidine);
- 扑尔敏 (chlorpheniramine)

表 3 5种手性物质在纤维素苯甲酸酯类手性薄层板上的拆分结果<sup>\*</sup>Table 3 TLC data of five chiral substances on the CSPs of cellulose tris(benzoate) s<sup>\*</sup>

Cellulose tris(benzoate) s	Chiral substance	$R_{F1}$	$R_{F2}$		Mobile phase	Visualization
Cellulose tribenzoyl (CTB) (三(苯甲酰基)纤维素)	(1)	0.75	0.41	1.82	A	a
	(2)	0.69	0.15	4.60	B(2 1)	a
	(3)	0.84	0.22	3.81	C(6 2 1)	b
	(4)	0.37	0.24	1.54	D(4 1 1)	b
	(5)	0.66	0.35	1.88	E(5 3 2)	a
Cellulose tris( <i>p</i> -chlorobenzoyl) (CTPCB) 三(4-氯苯甲酰基)纤维素	(1)	0.78	0.51	1.52	A	a
	(2)	0.71	0.20	3.55	B(2 1)	a
	(3)	0.86	0.25	3.44	C(6 2 1)	b
	(4)	0.39	0.27	1.44	D(4 1 1)	b
	(5)	0.69	0.40	1.72	E(5 3 2)	a

(续表 1)

Cellulose tris(benzoate)s	Chiral substance	$R_f$	$R_D$		Mobile phase	Visualization
Cellulose tris( <i>o</i> -chloro-benzoate) (CTOCB)	(1)	0.78	0.52	1.50	A	a
三(2-氯苯甲酰基)纤维素	(2)	0.69	0.18	3.83	B(2 1)	a
	(3)	0.85	0.24	3.54	C(6 2 1)	b
	(4)	0.40	0.28	1.42	D(4 1 1)	b
	(5)	0.65	0.38	1.71	E(5 3 2)	a

\*分离因子 (separation factor):  $=R_f/R_D$ ; 体积比 (volume ratio): A. TEAA; B. 乙腈 - TEAA (acetonitrile - TEAA); C. 乙酸乙酯 - 水 - 冰醋酸 (ethyl acetate - H<sub>2</sub>O - acetic acid); D. 正丁醇 - 冰醋酸 - 水 (*n*-butyl alcohol - acetic acid - H<sub>2</sub>O); E. 乙酸乙酯 - 甲醇 - 30% 醋酸溶液 (ethyl acetate - methyl alcohol - acetic acid); a: ultraviolet lamp (365 nm); b: 茚三酮的丙酮溶液 (solution of ninhydrin in acetone); (1) - (5) are the same as those in Fig. 2

由表 3 可知, 所合成的手性固定相不仅能拆分单个芳环的手性物质 (如苯丙氨酸), 而且对于含有两个或两个以上的芳环甚至是含有萘环的手性物质都具有良好的拆分能力, 说明所合成的手性固定相光学拆分适用范围广, 适于不同分子大小的手性化合物的拆分。

### 2.3 手性固定相的性能比较

2.3.1 手性固定相的稳定性比较 本实验分别在有机溶剂 (甲醇、乙醚) 和水中考察了 CTB 薄层板的耐溶剂性和重复使用性。把使用后的 CTB 用甲醇浸泡 6 h, 洗涤, 过滤干燥后, 再进行元素分析。结果表明, 此产品碳的含量为 68.26%, 而新制产品碳含量为 68.35%, 两者相差不大, 说明产物有较好的耐溶剂性和重复使用性能。刮取已用过的 CTB 薄层板的固定相, 用甲醇浸泡 24 h 后洗涤, 并重新干燥制板, 对所分离物质进行拆分, 仍有较好的分离效果, 相对比移值稍有降低, 但不影响分离。所以, CTB 对有机溶剂和水都是稳定的, 可用溶剂冲洗除去污染物后反复使用。

CTPCB 和 CTOCB 的极性较 CTB 的大, 对水的浸润性较好, 故两者在含水溶剂中易发泡成絮状物, 所以两者只是对正相展开系统稳定, 在含有水的展开剂系统中稳定性不好。

2.3.2 手性固定相对手性化合物拆分性能的比较 从表 3 中可以看出, CTB 的手性拆分能力较强, CTOCB 和 CTPCB 的拆分能力稍差, 原因可能是取代基的诱导效应对其拆分能力有明显的作用。CTB 酰基部分的苯环上没有取代基, 对苯环上的电子云密度影响不大, 而 Cl 的吸电子作用使苯环上的电子云密度降低, 从而减弱了后两者与被分离手性化合物之间的作用力<sup>[8]</sup>。CTOCB 和 CTPCB 相比较后者的拆分能力更好一些, 这是因为 Cl 处于邻位时, 增大了分子的空间位阻, 使得纤维素上的 3 个羟基不容易完全被取代, 所以其手性拆分能力有所降低。

2.3.3 手性固定相的手性识别机理 综合本实验的结果, 纤维素苯甲酸酯类手性薄层板之所以有良好的手性拆分性能, 其作用过程可能是: 靠近手性分子手性中心的芳环先以一定的构型嵌入纤维素衍生物的螺旋空腔结构中, 此时手性分子的芳环与手性固定相的芳环之间的偶极 - 偶极排列就决定了手性分子能否有效地与“空腔”结合, 之后纤维素衍生物上引入的羰基与具有羰基、氨基或羟基的手性化合物发生氢键作用, 这是一种立体选择作用, 可能是决定手性分离效能的主要因素。这种解释也符合 Dalglish 的“三点作用原理”<sup>[9]</sup>。

本实验在对展开剂优化的过程中发现, 通过增大极性较大的组分配比可使  $R_f$  值不同程度地增大, 分离度也相应提高, 但是存在拖尾现象。弱碱性物质加入少量碱性调节试剂 (三乙胺), 酸性物质加少量酸性调节剂 (乙酸), 能有效减少拖尾现象, 使斑点圆整清晰<sup>[10]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 林国强, 陈耀全, 陈新滋. 手性合成 - 不对称合成及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 21.
- [2] 张小林, 陶影, 漆剑. 不对称转化法制备 D 组氨酸的工艺研究 [J]. 化学世界, 2006, 6: 352 - 354.
- [3] YASH MA E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation [J]. J Chromatogr. A, 2001, 906: 105 - 125.
- [4] 王来来, 吕士杰, 高平. 三(4-甲基苯甲酰基)纤维素酯的合成及其涂敷手性固定相的制备和表征 [J]. 色谱, 1998, 16(4): 285 - 288.
- [5] 邵保海, 徐秀珠, 吕建德. 纤维素衍生物手性固定相用于高效液相色谱对映体分离 [J]. 分析化学, 2003, 31(2): 239 - 244.

(下转第 138 页)

## 2.7 样品分析

以原配制好的 NADH 为标准溶液, 将培养好的铜绿甲单胞菌细胞匀浆, 离心后取一定量的上清液, 按实验方法测定, NADH 的含量及方法回收率见表 1。

表 1 样品铜绿甲单胞菌细胞内中 NADH 的分析结果 ( $n=5$ )  
Table 1 Analytical result of NADH in the *Pseudomonas aeruginosa* ( $n=5$ )

Original $c_0 / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Added $c_A / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Total found $c_T / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $c_F / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R / \%$
4.85	5.00	9.74	4.89	98
	10.00	14.76	9.91	99

## 3 结 论

本文研究了将亚甲基蓝掺杂在单壁碳纳米管薄膜进而固定在玻碳电极上, 制得聚亚甲基蓝/单壁碳纳米管薄膜修饰电极; 电极对 NADH 有很好的电化学活性, 可以作为脱氢酶系电化学生物传感器的基底电极, 具有很大的潜在应用价值。

### 参考文献:

- [1] GHOU S T, TWNSHEND A. Flow injection method for the determination of thyroxine by inhibition of glutamate dehydrogenase[J]. *Anal Chim Acta*, 2000, 411: 45 - 49.
- [2] 杨文初, 俞爱民, 陈洪渊. 微量乳酸脱氢酶毛细管电泳在线反应电化学检测方法的研究[J]. *高等学校化学学报*, 2001, 22(4): 547 - 551.
- [3] 郑琦, 刘志洪, 蔡汝秀. 肌红蛋白作催化剂荧光分析法高灵敏检测 NADH[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2004, 50(2): 137 - 140.
- [4] BLUM L J, GAUTIER S M, COULET P R. Continuous-flow bioluminescent assay of NADH using a fiberoptic sensor[J]. *Anal Chim Acta*, 1989, 226(2): 331 - 336.
- [5] IMA S. Helical microtubes of graphite carbon[J]. *Nature*, 1991, 354(6348): 56 - 58.
- [6] 杨钰, 史海滨, 陈强, 等. 单壁纳米碳管制备葡萄糖生物传感器的研究[J]. *高技术通讯*, 2006, 16(2): 167 - 170.
- [7] 王宗花, 刘军, 罗国安, 等. 碳纳米管修饰电极的孔性界面对电分离多巴胺和抗坏血酸的影响[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(2): 236 - 240.
- [8] 王存嫦, 沈国励, 俞汝勤, 等. 基于碳纳米管和铁氰酸镍纳米颗粒协同作用的葡萄糖生物传感器[J]. *化学学报*, 2006, 64(13): 1355 - 1360.
- [9] 刘颜, 袁若, 柴雅琴, 等. 聚亚甲基蓝和纳米金修饰玻碳电极的葡萄糖生物传感器[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4): 24 - 27.
- [10] ZENG Jinxiang, WEI Wanzhi, ZHANG Xirong, et al. Low-potential nicotinamide adenine dinucleotide detection at a glassy carbon electrode modified with toluidine blue O functionalized multiwall carbon nanotubes[J]. *Anal Sci*, 2006, 22: 399 - 403.

(上接第 134 页)

- [6] 徐莉, 刘岚, 何建峰. 用三-(3, 5-二硝基苯甲酰基)纤维素薄层分离对映体[J]. *中山大学学报*, 2002, 41(5): 115 - 117.
- [7] 张湘东, 彭彩云, 方渡. 纤维素类手性固定相的研究进展及应用[J]. *中南药事*, 2003, 1(1): 39 - 40.
- [8] OKAMOTO Y, NOGUCHI J, YASHIMA E. Enantioseparation on 3, 5-dichloro- and 3, 5-dimethylphenylcarbamates of polysaccharides as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography[J]. *Reactive & Functional Polymers*, 1998, 37: 183 - 188.
- [9] PIRKLE W H, POCHAPSKY T C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers[J]. *Chem Rev*, 1989, 89(2): 347 - 362.
- [10] 徐莉, 何建峰, 刘岚. 薄层色谱用纤维素苯甲酸酯类手性固定相的制备及色谱性能[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(2): 1 - 4.