



键合支链淀粉(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) 手性固定相的制备及手性拆分应用

韩小茜 崔红 李鸿瑜 安丽丽 常静

(兰州交通大学化学与生物工程学院, 兰州, 730070)

摘要 采用双官能团键合法,以六亚甲基异氰酸酯为键合试剂,自制了键合支链淀粉(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相。在所制得的固定相上,以正相、反相、极性有机相多种色谱分离模式对 8 种含苯环的手性化合物进行了拆分。实验结果发现,正相模式下,在流动相正己烷或正己烷/异丙醇中添加二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃有利于手性化合物的拆分。在反相和极性有机相色谱条件下,此固定相仍具有手性拆分能力;除样品 7 外,其余手性样品均获得不同程度的手性分离。

关键词 键合型支链淀粉 3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯 手性固定相 对映异构体 手性拆分

1 前言

随着科学技术的发展,人们对手性化合物的认识不断深入,不同旋光性化合物表现出来的不同、有体化便时甚至相反的生理活性和毒理特性引起了人们的高度重视,因此手性化合物对映异构体的分离及测定,对于手性化合物的合成、生产过程的质量监控以及药理学研究等具有十分重要的意义^[1,2]。在各种手性分离方法中,常采用操作相对简便的高效液相色谱法手性固定相。目前研究和应用最多的是涂敷型多糖衍生物手性固定相^[3-6],此类涂敷型手性固定相耐溶剂性能比较差,只能选用烷烃/低链碳醇的弱极性流动相体系来拆分手性化合物。为解决这一矛盾,近年来出现了各种化学键合的方法^[7-10]来制备键合型多糖衍生物手性固定相,因为键合型多糖固定相是通过化学键将多糖衍生物键合在硅胶等载体上,所以化学性质稳定,对流动相没有特殊的要求,有更好的发展前景。目前此类键合型手性固定相的研制主要集中在键合纤维素和直链淀粉衍生物手性固定相上,未见键合支链淀粉衍生物手性固定相的制备及应用报道。支链淀粉是葡萄糖以 α -

1,4-糖苷键连接为主链,并有 α -1,6-糖苷键连接作为分支点而形成的葡聚糖,分子很大,是一种树形结构,天然淀粉中 70%~80%为支链淀粉。

Felix^[4]、周志强^[6]等报道了用支链淀粉衍生物涂敷在硅胶表面制备手性固定相,并考察了流动相中不同醇及其含量对拆分的影响。明永飞等^[7]利用 4,4-二苯基甲基二异氰酸酯作为连接臂,采用 6-位选择键合法制备了键合型纤维素(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相,并将其应用于戊唑醇的手性分离。本文参照文献^[7]以支链淀粉代替纤维素,以六亚甲基异氰酸酯作为连接臂,制得了键合支链淀粉(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(键合 APDMPC-CSP)。六亚甲基二异氰酸酯作为连接臂,比 4,4-二苯基甲基二异氰酸酯的空间位阻小,更利于键合。用制得的键合 APDMPC-CSP 在正相、反相及有机相等多种色谱模式下对 8 个含苯环的手性化合物进行了拆分。考察了在正相模式下往流动相中添加 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 、THF 等溶剂对键合 APDMPC-CSP 手性识别能力的影响,除样品 7 始终未获分离外,其余 7 个样品在不同的色谱分离模式下均获得不同程度的拆分。

基金项目:甘肃省科技攻关计划(2GS064-A52-036-06);兰州交通大学“青蓝”人才工程基金(QL-04-01A)。

作者简介:韩小茜,女,1965年11月出生,博士、教授;兰州交通大学化工学院。E-mail: hanxq@mail.lzjtu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

色谱系统包括 LC-10AT 泵, SPD-10A 紫外可见波长检测器和 SCL-10ASP 色谱数据处理器(日本, 岛津)。样品溶解在流动相中, 色谱拆分在室温下进行, 检测波长 254nm, 灵敏度 0.02A. U. F. S。

5 μ m 球形硅胶购自中国科学院兰州化学物理研究所; 三苯基氯甲烷、吡啶、甲苯、盐酸、正己烷、异丙醇、无水甲醇等均为国产试剂(分析纯)。支链淀粉、3,5-二甲基苯基异氰酸酯、六亚甲基二异氰酸酯购自 Fluka 公司。流动相经超声波脱气后使用, 流速 0.5 mL/min。

2.2 手性固定相的制备

键合 APDMP-CSP 参照文献[7]由本实验室自行合成: 3g 支链淀粉悬浮于 50mL 吡啶中, 与 10.0g 三苯基氯甲烷在 100 $^{\circ}$ C 下反应 24h, 再与 10g 3,5-二甲基苯基异氰酸酯在 100 $^{\circ}$ C 下继续反应 24h, 冷却后, 将反应产物(a)倒入 300mL 含少量盐酸的甲醇溶液中, 室温下搅拌 24h, 过滤并用甲醇洗涤; 产物(b)在 50 $^{\circ}$ C 下真空干燥 12h 后, 取 0.5g 溶于 30mL THF 中, 加入 2.0g 氨基硅胶, 缓慢蒸除去 THF 后, 移入烧瓶, 加入新干燥的甲苯和吡啶 5mL, 20mg 六亚甲基二异氰酸酯, 90 $^{\circ}$ C 下反应 5h, 冷却后, 分别用甲醇、THF 洗涤产物(c), 真空干燥。产物(c)即所得填料。采用匀浆法装柱(15cm 4.6 mm id), 顶替液为正己烷/异丙醇(90:10, v/v)。

2.3 色谱参数计算

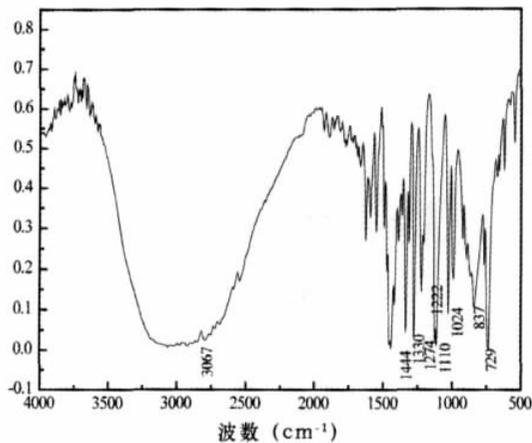
色谱柱死时间(t_0), 在正相、极性有机相色谱模式下用 1,3,5-三叔丁基苯测定, 在反相色谱模式下用乙腈测定。保留因子(k')按 $k'_1 = (t_1 - t_0)/t_0$, $k'_2 = (t_2 - t_0)/t_0$ 计算; 分离因子(α)按 $\alpha = k'_2/k'_1$, 分离度(R_s)按 $R_s = 2(t_2 - t_1)/(\omega_1 + \omega_2)$ 计算; 这里的 t_1 和 t_2 分别为先后洗脱的对映体的保留时间, ω_1 和 ω_2 分别为先后洗脱峰之基线峰宽。

3 结果与讨论

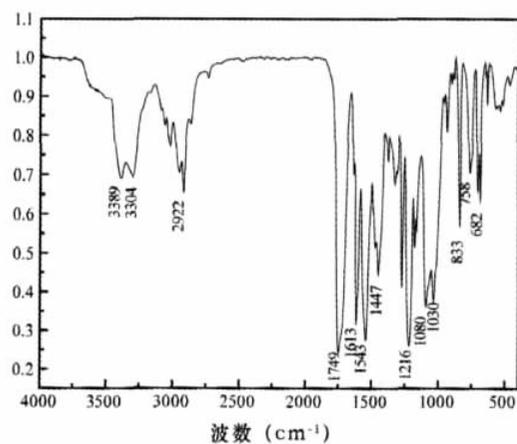
3.1 手性固定相的表征

图 1 为支链淀粉及其衍生物的红外光谱图。

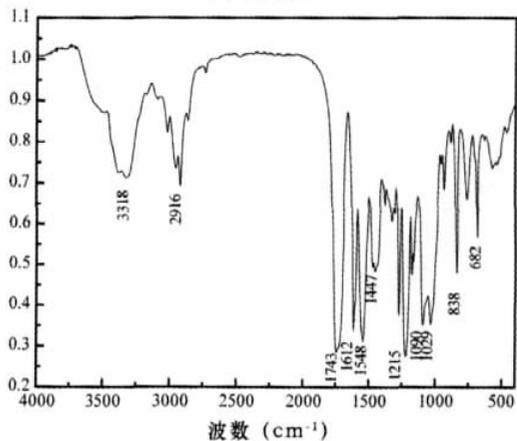
图 1b 显示, 在 3067 cm^{-1} 处的羟基吸收峰完全消失, 在 3389 cm^{-1} 处出现了酰胺 N-H 吸收峰, 在 1740 cm^{-1} 处出现了羰基吸收峰, 在 1607 cm^{-1}



(a) 支链淀粉



(b) 衍生物1



(c) 衍生物2

图 1 支链淀粉及其衍生物的红外光谱图

和 1444 cm^{-1} 处出现了苯环骨架的 C=C 伸缩振动吸收峰, 表明三苯基氯甲烷、3,5-二甲基苯基异氰酸酯都已经和支链淀粉上的羟基发生了反应。

图 1c 显示, 用含盐酸的无水甲醇洗涤后, 在支链淀粉上的三苯基被除去, 在 3318 cm^{-1} 处出现了羟

基吸收峰。

3.2 不同流动相模式对手性拆分的影响

依据8种含苯环手性样品的分子结构(见图2)推断,样品与键合APDMPC-CSP之间可能存在氢键作用、偶极-偶极作用,及 $\pi-\pi$ 作用,流动相中醇、

水等溶剂有可能与样品分子竞争而与键合APDMPC-CSP发生相互作用,从而影响样品分子在键合APDMPC-CSP上的保留和分离,同时样品分子本身的立体空间位阻也有可能影响到手性分离。

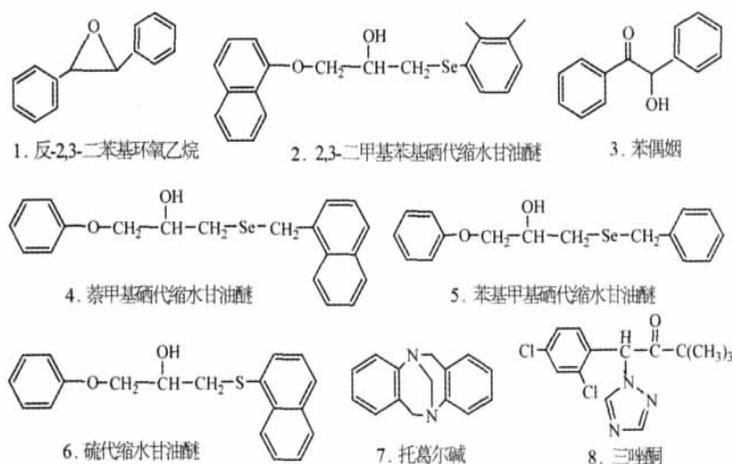


图2 手性化合物的结构

3.2.1 正相模式下的手性拆分

目前,无论是在涂敷型还是键合型多糖衍生物手性固定相的应用或研究过程中,最常使用的流动相组成还是正己烷与醇的混合溶剂。为此,在常规

正相色谱模式下,我们以不同体积比的正己烷/异丙醇为流动相对8种手性样品在键合APDMPC-CSP上进行了拆分,结果见表1。

表1 手性化合物在正相模式下正己烷/异丙醇中的色谱拆分结果

流动相 正己烷:异丙醇(v/v)	色谱 参数	手性化合物							
		1	2	3	4	5	6	7	8
80:20	k'_1	0.56	2.01	2.37	2.61	1.75	2.54	0.79	1.38
	α	1.03	1.00	1.19	1.00	1.15	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.36	0.00	0.36	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00
90:10	k'_1	0.66	2.70	4.43	5.96	3.84	5.62	1.14	2.81
	α	1.22	1.00	1.20	1.00	1.19	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.47	0.00	0.69	0.00	0.21	0.00	0.00	0.00
95:5	k'_1	0.76	4.85	6.41	8.56	5.13	7.83	1.51	5.21
	α	1.27	1.00	1.22	1.12	1.16	1.16	1.00	1.00
	R_s	0.55	0.00	0.73	0.26	0.37	0.32	0.00	0.00

* 实验条件: 流速 0.5 mL/min, 紫外检测波长 254 nm, 灵敏度 0.02 A. U. F; 手性化合物编号同图2。

从表1可以看到,随着流动相中异丙醇含量的减少,流动相的极性下降,溶质的保留时间增长。从图2样品的结构可以看到,被拆分的8种手性化合物分

别含有羟基,苯环和萘环等官能团,其中化合物3和5含有两个苯环,一个羟基,因此较容易与手性固定相中的分子形成氢键,还可能有额外的偶极-偶极作

用, $\pi-\pi$ 作用。化合物 4 和 5 的不同之处在于化合物 4 的硒端是萘环, 化合物 5 的硒端是苯环, 萘环增加了空间位阻和 $\pi-\pi$ 作用, 进入手性空腔的程度就小些, 与手性固定相上的苯环形成的 $\pi-\pi$ 电荷迁移作用也较小, 从而不利于手性拆分, 样品 1, 3~6 被部分拆分, 2, 7 和 8 未被拆分。

对于键合 APDMPC-CSP, 正相条件下, 流动相中极性改性剂还可选用 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 或 THF, 以改善填料对样品的选择性。我们以 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 或 THF 为流动相中的极性改性剂, 对 8 种手性样品在键合 APDMPC-CSP 上的色谱行为进行了研究, 结果见表 2 和表 3。

表 2 流动相组成为正己烷/极性改性剂条件下的色谱拆分结果

流动相 90:10(v/v)	色谱 参数	手性化合物							
		1	2	3	4	5	6	7	8
正己烷: CH_2Cl_2	k'_1	0.52	3.43	4.27	6.72	4.53	6.74	1.17	3.28
	α	1.23	1.52	1.19	1.12	1.12	1.17	1.00	1.00
	R_s	0.42	1.31	0.73	0.29	0.25	0.35	0.00	0.00
正己烷: νCHCl_3	k'_1	0.54	9.40	6.30	5.23	7.45	5.13	1.38	5.14
	α	1.43	1.62	1.22	1.00	1.17	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.51	1.68	0.83	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00
正己烷:THF	k'_1	1.15	3.43	6.32	10.7	3.42	11.1	1.47	1.83
	α	1.00	2.28	1.24	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.00	2.11	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* 实验条件同表 1; 手性化合物编号同图 2。

表 3 流动相组成为正己烷/异丙醇/极性改性剂条件下的色谱拆分结果

流动相 90:5:5(v/v/v)	色谱 参数	手性化合物							
		1	2	3	4	5	6	7	8
正己烷:异丙醇: CH_2Cl_2	k'_1	0.19	2.36	2.94	4.29	2.53	4.03	0.64	2.26
	α	1.74	1.30	1.21	1.11	1.13	1.00	1.00	1.60
	R_s	0.68	0.68	0.71	0.22	0.27	0.00	0.00	1.52
正己烷:异丙醇: CHCl_3	k'_1	0.69	3.34	3.92	5.41	3.46	5.13	0.94	2.80
	α	1.25	1.00	1.12	1.12	1.22	1.00	1.00	1.50
	R_s	0.65	0.00	0.80	0.27	0.31	0.00	0.00	1.47
正己烷:异丙醇:THF	k'_1	0.59	2.29	3.80	4.96	3.22	4.96	1.08	2.59
	α	1.21	1.50	1.19	1.00	1.00	1.00	1.00	1.40
	R_s	0.31	1.30	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00	1.05

* 实验条件同表 1; 手性化合物编号同图 2。

从表 2 和表 3 可以看到, 手性样品的保留、立体选择性和分离度随着极性改性剂的变化而变化。在流动相为正己烷/异丙醇时, 未获拆分的 2 号和 8 号手性样品分别在流动相为正己烷/异丙醇/THF、正

己烷/异丙醇/ CH_2Cl_2 中获得基线拆分; 在流动相为正己烷/异丙醇时, 获部分拆分的 1 号和 3~6 号手性样品在以 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 或 THF 为极性改性剂的流动相中拆分结果均有所改善, 流动相中添加

CH_2Cl_2 、 CHCl_3 或 THF 导致对映异构体分离情况的改变或许是因为这些极性改性剂的存在改变了样

品与固定相之间的相互作用。部分样品的色谱拆分图如图 3 所示。

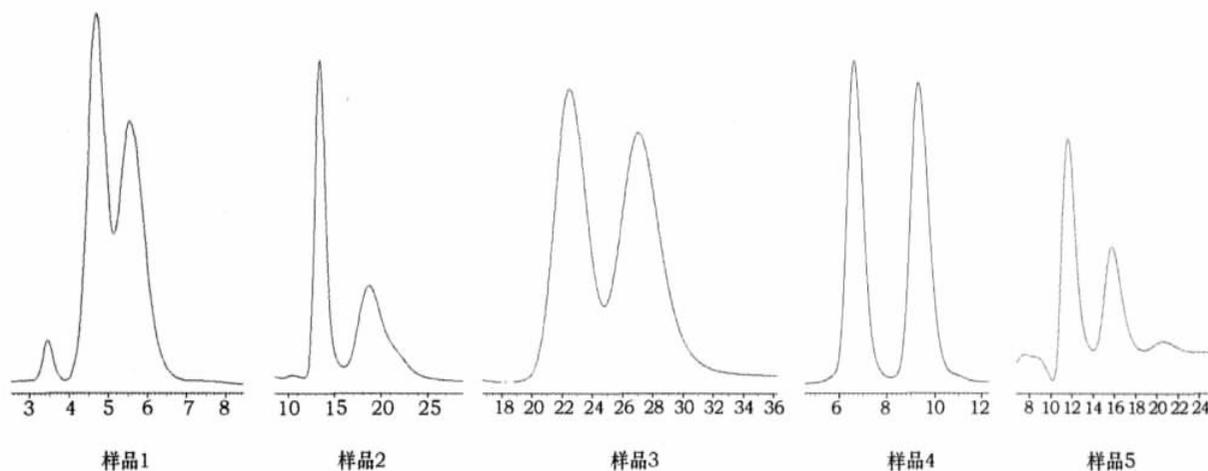


图 3 部分样品的色谱拆分图

样品 1: 正己烷: $\text{CHCl}_3 = 90:10(v/v)$ 样品 2: 正乙烷: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 90:10(v/v)$
 样品 3: 正己烷: THF = 90:10(v/v) 样品 4: 电醇: 水 = 90:10(v/v)
 样品 5: 正己烷: 异丙醇: $\text{CHCl}_3 = 90:5:5(v/v/v)$

3.2.2 反相、极性有机相模式下的保留和拆分

多糖衍生物手性固定相可在正相、反相及极性有机相等多种色谱模式中使用, 通过改变洗脱模式, 可以在某种色谱模式下未能获得手性分离的样品在另一种色谱模式下获得分离。因此我们在反相模式下以甲醇/水、乙腈/水为流动相对 8 个手性样品进行了拆分, 随着流动相中水的比例的增加, 流动相的极性增大, 溶质的保留增大, 符合反相色谱保留机

理; 对于相同比例的甲醇/水和乙腈/水流动相, 样品在前者中的保留比在后者中的保留强, 键合 AP-DMPC-CSP 仍表现出手性识别能力, 在正相模式下仅获部分拆分的样品 5 在甲醇/水中获基线拆分, 样品 2 在乙腈/水中获较好分离。在极性有机相色谱模式下, 流动相为甲醇/异丙醇时, 仅样品 5 获得部分拆分; 流动相为乙腈/异丙醇时, 样品 4 获得近基线分离, 样品 5 获得部分拆分, 实验结果见表 4。

表 4 反相和极性有机相模式下的色谱拆分结果

流动相 80/20(v/v)	色谱 参数	手性化合物							
		1	2	3	4	5	6	7	8
甲醇: 水	k'_1	1.50	2.34	0.79	2.37	1.32	2.37	1.59	0.53
	α	1.00	1.32	1.00	1.00	1.58	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.00	0.76	0.00	0.00	1.72	0.00	0.00	0.00
乙腈: 水	k'_1	0.70	1.16	0.42	1.17	0.68	1.20	0.74	0.39
	α	1.00	1.32	1.00	1.00	1.50	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.00	1.10	0.00	0.00	1.30	0.00	0.00	0.00
甲醇: 异丙醇	k'_1	0.42	0.61	0.31	0.59	0.35	0.60	0.62	0.13
	α	1.00	1.00	1.00	1.00	1.30	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.00	0.00	0.00

续表 4

流动相 80:20(v/v)	色谱 参考	手性化合物							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	k_1'	0.72	0.53	0.76	0.54	0.56	0.54	0.55	0.54
乙腈: 异丙醇	α	1.00	1.00	1.00	1.42	1.38	1.00	1.00	1.00
	R_s	0.00	0.00	0.00	1.40	0.54	0.00	0.00	0.00

* 实验条件同表 1; 手性化合物编号同图 2。

样品的拆分结果的不同是由于醇属于质子性溶剂, 而乙腈是非质子性溶剂, 质子性溶剂可以与溶质竞争, 代替溶质与手性固定相的极性氨基甲酸酯基团形成氢键, 而非质子性溶剂, 只是一个弱的氢键接受体, 对溶质和手性固定相之间的作用强度影响较小。

4 结 论

采用双官能团键合法, 以六亚甲基二异氰酸酯为双官能团试剂, 采用 6-位选择的方法, 制得新型键合 APDMPC-CSP。在正相, 反相及极性有机相中该 CSP 均表现出一定的手性识别能力, 可以在非常规流动相中使用, 且表现出较好手性识别能力。被拆分的 8 个手性样品中, 除样品 7 始终未获分离外, 其余 7 个样品在不同的色谱分离模式下获得了不同程度的拆分。

参考文献

[1] Nele M, Mohamed M, Yvan V H. J Chromatogr A, 2006, 1111: 48-61.

- [2] Maier N M, Franco P, Lindner W. J Chromatogr A, 2001, 906(1-2): 3-33.
- [3] Okamoto Y, Kaida Y. J. Chromatogr A, 2001, 906: 141-145.
- [4] Felix G, Zhang T. J Chromatogr A, 1993, 693: 141-145.
- [5] 许志刚, 艾萍, 周岩, 韩熠, 袁黎明. 化学世界, 2005, 12: 722-725.
- [6] 周志强, 侯经国, 陈立仁. 分子催化, 1997, 11(6): 465-467.
- [7] 明永飞, 赵亮, 张红丽. 高等学校化学学报, 2007, 28(2): 258-260
- [8] 秦峰, 陈小明, 刘月启, 孔亮, 邹汉法. 色谱, 2004, 22(6): 569-574.
- [9] 韩小茜, 李军, 员春林, 孙宇扬, 王海生. 分析测试学报, 2007, 26(1): 55-58.
- [10] Frangco P, Mingullon C, Oliverosa L. J Chromatogr, A, 1998, 793: 239-247.

收稿日期: 2010-07-14

Preparation of bonded amylopectin (3, 5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase and its application to chiral separation of racemic compounds. Han Xiaoqian, Cui Hong, Li Hongyu, An Lili, Chang Jing (College of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, 730070)

A bonded amylopectin (3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase was prepared by double-functional group bonding method with hexamethylene diisocyanate as bonding agent. Eight racemic compounds with benzene ring were chirally separated using this stationary phase under normal-phase, reversed-phase and polar organic-phase chromatographic separation modes. Experimental results showed that under normal-phase mode, adding CH_2Cl_2 , CHCl_3 and THF in mobile phase (hexence or hexene/isopropanol) was helpful for the separation of chiral compounds. Under reversed-phase (with methanol/water or CH_3CN /water as mobile phase) and polar organic-phase (with methanol/isopropanol or CH_3CN /isopropanol as mobile phase) modes, this stationary phase still has chiral separation ability. Except one sample, other seven chiral samples were all separated chirally with different degree.