

液相色谱手性识别机理的研究进展

黄君珉 陈 慧 王琴孙

(南开大学元素有机化学研究所 天津 300071)

摘 要 从手性分离热力学和手性识别模型的角度, 侧重于高效液相色谱手性固定相方法, 综述了近年来对映异构体色谱分离的手性识别机理研究进展状况。

关键词 高效液相色谱 对映异构体 手性识别机理

Progress in the Studies of Chiral Recognition Mechanism in High-performance Liquid Chromatography

HUANG Junmin, CHEN Hui, WANG Qinsun

(Institute of Elemento-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract A review of progress on chiral recognition mechanism in high performance-liquid chromatography is presented, focusing on the chiral recognition model and the thermodynamic study of chiral chromatographic behavior.

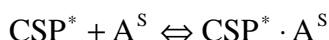
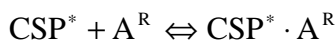
Key words High-performance liquid chromatography, Enantiomer, Chiral recognition mechanism

近 20 年来人们对于用高效液相色谱分离对映体的兴趣与日俱增, 发展高效的手性固定相(简称 CSP)成为这一领域最活跃的部分, 而与之相应的色谱手性识别机理的研究相对来说比较少。但研究色谱拆分机理又是非常重要的, 这有利于获得对手性识别更深入的理解, 可以指导研制高效的 CSPs 及预示手性拆分的可能性, 而且对理解手性药物的药理、药物设计、生命化学中的立体化学问题等都具有重要意义^[1]。

物质对映异构体, 仅在分子结构上具有不可重叠性。在对称的环境里, 无论是气体、固体、或是溶液、液体状态都表现出完全相同的物理化学性质。不管哪一种色谱, 为了使互为对映体的物质转化为化学和物理性质不同的非对映体, 多宜提供一个手性源, 使欲分离的对映体(样品)和手性源(例如: 手性固定相)之间形成一个非对映异构分子络合物^[2]。非对映分子复合体属于不同的点群。仅对称性的不同, 在色谱上是不能被“识别”的, 从热力学过程的角度来说, 二者必须有一定的自由能差别。

1 手性分离的热力学

液相色谱手性固定相法直接拆分对映体, 在色谱柱内存在着如下的平衡^[3]:



经典热力学中自由能变化(ΔG)与焓(ΔH)、熵(ΔS)的关系遵从 Gibbs 方程:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

在液相色谱中, 保留参数即容量因子 k' 与溶质在流动相-固定相的热力学平衡常数 K 的关系为: $k' = fK$ (f 是色谱柱相比)。对映异构体选择性 $\alpha = k'_R / k'_S$ ($k'_R > k'_S$)。色谱过程的自由能变化可以表示成: $\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln (k'/f)$

$$\text{因此, 不难导出: } \ln K = (-\Delta H/R) \times 1/T + \Delta S/R \quad (1)$$

$$\text{而 } -\Delta_{R,S} \Delta G^0 = RT \ln \alpha = -\Delta_{R,S} \Delta H^0 + T \Delta_{R,S} \Delta S^0$$

$$\ln \alpha = (-\Delta_{R,S} \Delta H^0/R) \times 1/T + \Delta_{R,S} \Delta S^0/R \quad (2)$$

式(1)、(2)表明 $\ln K \sim 1/T$ 、 $\ln \alpha \sim 1/T$ 呈线性关系, 如图 1^[4,5]所示:

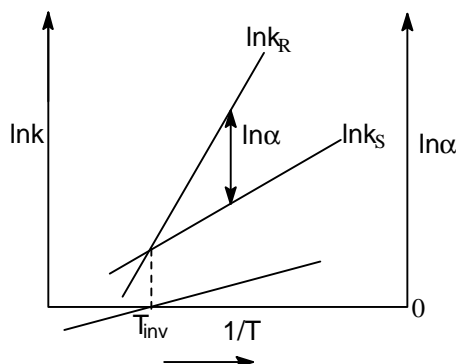


图 1 温度对形成非对映异构分子络合物的热力学平衡常数和对映异构体选择性的影响

在倒转温度 T_{inv} 时, 非对映异构分子络合物的热力学平衡常数 $K_R = K_S$, 对映异构体同时流出, 在该温度时无对映异构体选择性, $\alpha_{R,S} = 1$, 理论上是由于:

$$\ln \alpha = (-\Delta_{R,S} \Delta H/R) \times 1/T + \Delta_{R,S} \Delta S/R = 0$$

$$\text{即: } (-\Delta_{R,S} \Delta H/R) \times 1/T_{inv} = \Delta_{R,S} \Delta S/R$$

$$-\Delta_{R,S} \Delta H = T_{inv} \Delta_{R,S} \Delta S$$

在该点的两边, 温度对对映异构体选择性系数的影响刚好相反, 而且溶质对映体流出顺序相反。该点的右边, 即: $T < T_{inv}$, 色谱手性识别过程为焓变占优势, 随着温度的升高, α 减小。该点的左边, 即: $T > T_{inv}$, 色谱手性识别过程为熵变占优势, 随着温度的升高, α 增大。在手性识别研究中, 对映异构体流出顺序在不同温度下倒转的现象迄今只有少量的报道。由于高效液相色谱的温度变化范围较窄, 大多数情况下, T_{inv} 不在该温度范围内, 并且 $T < T_{inv}$, 色谱手性识别过程焓变占优势, α 值随着温度的升高而降低^[6]。

手性色谱的对映体分离是一个复杂的色谱过程, Pirkle^[7]曾报道了 $\ln K \sim 1/T$ 非线性的实验结果。因此, 在不同温度下得到不同的对映体流出顺序也可能是手性色谱保留和拆分机理的改变造成的。

Pirkle^[2]和 Davankov 等曾分别研究了手性色谱分离对映异构体选择性 α 和非对映异构体络合物自由能之差 ($\Delta\Delta G$) 之间的关系: $\Delta_{R,S} \Delta G = -RT \ln \alpha$, 考虑到实际的色谱分离过程, 非常小的热力学选择性 $\Delta\Delta G$, 如果 $\Delta\Delta G = 0.024 \text{ kJ/mol}$, 就可以得到一定的拆分, $\alpha = 1.01$ 。随着 $\Delta\Delta G$ 的增加, 对映体选择性将表现为相应的指数级增长。Pirkle 等用实验印证了这种关系^[8], 在图 2 所示的 CSP 上, 用 30% 异丙醇/正己烷为流动相, *N*-(3, 5-二硝基苯甲酰基)-亮氨酸正己酰胺的对

映异构体选择性测定值 $a = 10.5$, 其中(S)-对映体保留较长, 相互作用能之差 $\Delta\Delta G = -5.93 \text{ kJ/mol}$ 。

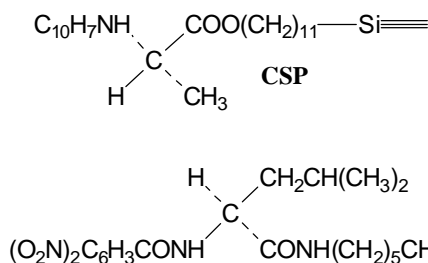


图 2 N-(3, 5-二硝基苯甲酰基)-亮氨酸正己酰胺及所用手性固定相的结构

同样, 对具有两个手性中心如图 3 所示化合物的(SS), (RR)对映体, 可以预料: 由于手性中心相隔较远, 与 CSP 作用的自由能之差为 $2\Delta\Delta G^m$, 实验所得的手性选择性 a 为 121, 大致为前者的平方值 a^2 。后来, Pirkle 等再次通过设计出相应的实验提出了这样的论断^[9]: 具有两个溶质-CSP 相互作用部位产生的对映异构体选择性大致为只有一个作用部位所取得的对映异构体选择性的平方。

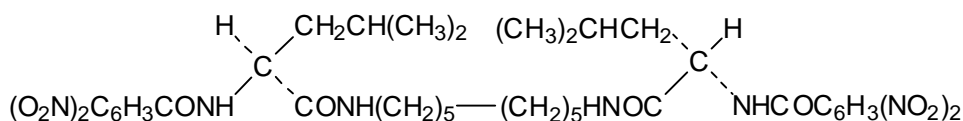


图 3 (SS),(RR)对映体化合物的结构

Boehm 等^[10]用统计热力学理论研究了化学键合手性固定相上溶质对映异构体(A^R 、 A^S)的保留行为和分离模式:

$$k' = \exp(-b\Delta A)$$

其中 $b = 1/(kT)$, $b\Delta A$ 为溶质由流动相到固定相传质过程的 Helmholtz 自由能, 因此:

$$\alpha = \sum_i \exp(-bE_{iR}) / \sum_j \exp(-bE_{jS})$$

其中 E_{iR} 和 E_{jS} 分别为 R-体(A^R)和 S-体(A^S)在 CSP 上第 i 种和第 j 种作用能。并认为 CSP 与 A 的 4 种一点作用、36 种两点作用、12 种三点和四点作用中, 只有三点和四点作用存在手性识别能力。如果只有一种优势识别模型, 则 $\ln\alpha$ 与 $1/T$ 呈线性关系。

Berthod 等^[11]用热力学方法研究手性识别中手性碳原子所连四个基团各自对手性识别的贡献, 分析了 126 个化合物中 81 种与手性碳相连的基团, 并设氢取代时 $\Delta G = 0$, 化合物上各基团独立与 CSP 作用, 在 $E = \sum |\alpha_{cal} - \alpha_{obs}|$ 最小化条件下解下方程:

$$\Delta(\Delta G_A) = (\Delta G_{A11} - \Delta G_{A12}) + (\Delta G_{A21} - \Delta G_{A22}) + (\Delta G_{A31} - \Delta G_{A32}) + (\Delta G_{A41} - \Delta G_{A42})$$

定量给出了各个基团对手性识别的贡献(CSP 为 S-NEC-CD 和 R-NEC-CD), 并发现 sp^2 杂化的碳与手性中心相连比 sp^3 杂化的碳手性识别能力强。该方法只能预示对映体能否被拆分, 而不能预示流出顺序。

2 手性识别模型

目前, 关于手性识别的一般机理众说纷纭。在手性色谱学这一领域, 早在 1952 年, Dalglish^[12]采用纸层析研究氨基酸对映体的分离时就提出了色谱直接拆分“三点作用”分离理论。后来,

Lochmüller 和 Dobashi 提出“两点作用”模型; Lochmüller 和 Wainer 提出“单点作用”机理, Lochmüller 进一步提出某些系统存在“环境手性”而没有专一的作用点。对映体的拆分过程可以是熵控制的, 手性识别源于形状选择性的识别模型(图 4)。也就是说, 在没有结合点(如氢键、色散力、偶极作用、 π - π 相互作用等)的手性环境里, 熵控制下, 对映体在色谱过程中是可以被拆分的。事实上, 由于熵变化值较小, 从而导致 α 值不够显著, 因此, 能够通过增加作用点来提高手性选择性值, 识别模型如图 5 所示, 对映体的拆分源于分子形状和相互作用力的共同贡献。

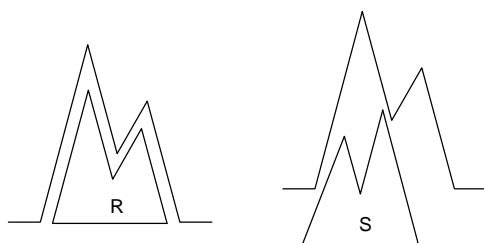


图 4 形状选择性的识别模型

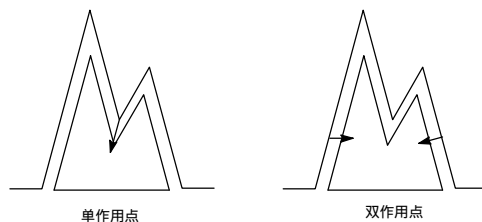


图 5 分子形状和相互作用力共同参与而形成手性识别的模型

近些年来, Pirkle 等^[12]在深入研究手性固定相以及手性色谱立体识别机理的过程中, 发展了 Dalglish 观点, 再一次阐述了“三点作用”分离理论: 手性识别要求手性固定相和对映异构体之间至少有三个同时存在的作用力, 这些作用力中至少有一个依赖于立体化学。也就是说, 用其中的另一对映异构体(不作任何构象改变)来替代后, 至少有一个作用力不复存在或明显改变其性质。用如图 6 所示的手性识别模型表达: 在手性固定相上有三个作用点 A、B、C, 与之作用的对映异构体也同样有三个作用点 A'、B'、C'。对映体 I 与 CSP 形成 A-A'、B-B'、C-C' 三个作用力, 对映体 II 则不存在 C-C' 作用力。如果 C-C' 作用力使形成的非对映分子络合物稳定化, 那么, 色谱分离过程中对映体 I 比 II 滞后; 反之, 对映体 I 由于 C-C' 的排斥作用先流出色谱柱。如果 C-C' 作用力很小, 则对映体 I、II 不能被色谱拆分。

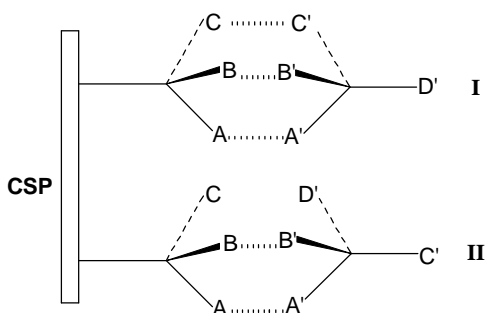
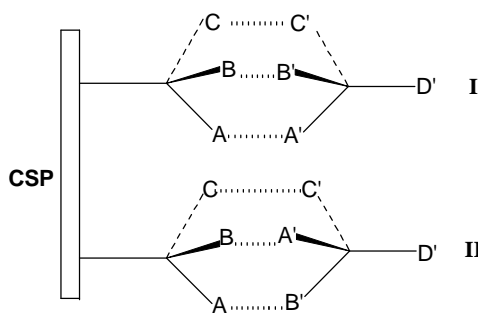


图 6 色谱手性识别的“三点作用”模型

图 7 相似的相互作用力(A-A', B-B')导致
色谱手性识别能力的降低或消失

1992 年, Taylor 等^[13]对“三点作用”原理评述认为: 对映体与 CSP 的三个作用力中, 至少有一个力具有立体选择性即依赖于对映异构体和 CSP 的立体化学, 而另外两个作用力必须是两种不同类型的作用力, 如氢键、偶极作用、 π - π 作用等, 否则如果存在两个相同的作用力, 则可能产生不利的作用, 使得 CSP 的手性识别能力降低或消失, 例如当 A-A' 和 B-B' 作用力相同时, 就可能使 CSP 失去手性分离能力(图 7)。

事实上, 手性色谱分离中有的对映体确实是靠氢键这一种类型的力在 CSP 上识别的^[13, 14], 这种手性识别可以认为是对映异构体和手性固定相形成非对映异构络合物的分子构象不同, 使得其平衡常数 K_1 、 K_2 不同。另一方面, “三点作用”原理要求 CSP 分子和待分离对映异构体的手性中心附近都要有一定的刚性, 柔韧性过强将会使手性识别能力丧失, 如图 8 所示。

“三点作用”原理与 Ogston^[15]为解释酶催化反应的立体专一性而提出的“三点键合”原理不同, 二者的区别在于: “三点作用”原理没有要求三点都是吸引力。在许多情况下, 手性识别可以靠空间位阻的排斥力和两个吸引力来实现(图 9), 对映体 II 由于其大基团的空间位阻, 使得其另外的氢键和 π - π 作用明显减弱。这种作用已被 NMR 分子间的核极化效应^[16]和分子机理计算^[3, 17]所证实。表现在色谱过程中, 对映体 II 的保留时间会低于对映体 I。

分子间作用力的单点性和多点性的特征由 Pirkle 等给出了明晰的描述^[2]: 两个凸圆面相互接触时, 接触处形成一个理想的点, 于是将凸圆形电子轨道的相互作用描述成单点性的, 如氢键、尾-尾偶极相互作用是单点性质作用力。通过线或面的基团的相互作用, 如偶极堆积, π - π 作用则为多点性质的。基于这些思想, 可以将“三点作用”原理扩展: 并不强调手性识别仅仅源于两个手性四面体的角顶点的相互作用, 也可以沿着 AB 和 A'B'的偶极基团, 通过多点性质的偶极堆积作用同样达到两个点作用的效果; 芳环间的 π - π 作用亦是如此, 手性识别模型如图 10 所示。

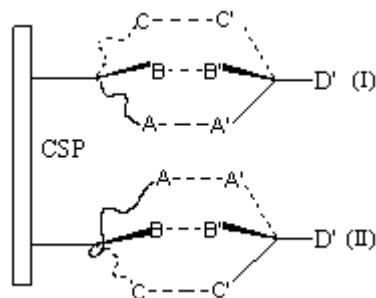


图 8 CSP 手性中心附近基团柔韧性过强导致
色谱手性识别能力丧失

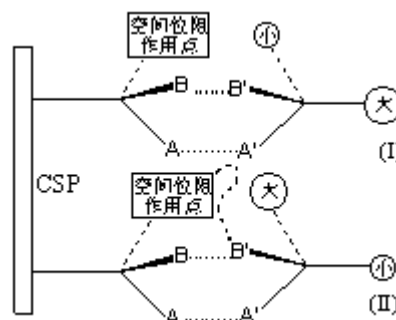


图 9 来源于一种排斥力和二种吸引力的
“三点作用”手性识别模型

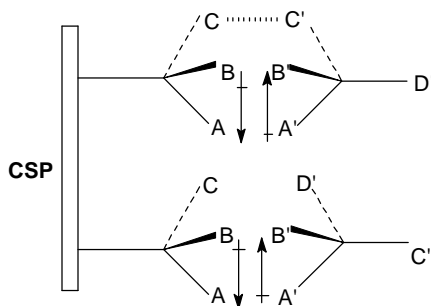


图 10 通过偶极堆积相互作用形成色谱手性识别

色谱手性识别是个复杂的过程, 模型的提出是将复杂过程简单明晰化。Pirkle 在运用和发展“三点作用”原理时, 强调形成非对映异构分子络合物的 CSP 和对映体二者分子构象不发生改变, 在模式上易于理解, 但事实上并不完全如同所描述的那样。色谱过程是时间的函数, 分

子不同的排列取向、不同的构象体、以及不同的相互作用（包括手性作用和非手性作用）都将影响到手性识别过程，大多数情况下考虑的是低能量的优势构象的贡献；再者手性识别也可能是多种机理的竞争。

近年来，手性色谱学领域，机理的研究是一种趋势^[18]。人们试图从理性的角度将手性色谱学导向深入。目前，用于手性识别机理研究的方法有三种^[19]：

(1) 色谱学研究，这是评估一种 CSP 特性的最通用的实验方法，通过拆分现象推测色谱手性分离过程的最基本信息。

(2) 光谱学研究，包括核磁共振、X-射线衍射、荧光分析和红外光谱等在 CSP 的性质和识别机理研究中的应用。这是最直接的研究手性识别机理的方法，然而在色谱手性分离系统中影响因素很多，此方法要求的条件非常严格。

(3) 计算机辅助分子模型和理论计算方法，这是一种基于计算机技术的方法。借助于计算机辅助技术，运用分子模型和理论计算方法设计新的手性固定相、开发已有的手性固定相的应用和研究手性识别机理已经成为近年来色谱手性分离的新领域。

参考文献

- [1] Topiol S, Sabio M, Moroz J et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110: 8367~8376.
- [2] Pirkle W H, Pochapsky T C. *Chem. Rev.*, 1989, 89(2): 347~362.
- [3] Lipkowitz K B, Demeter D A, Zegarra R et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110: 3446~3452.
- [4] Beitler U, Feibush B. *J. Chromatogr.*, 1976, 123: 149~166.
- [5] Koppenhoefer B, Bayer E. *Chromographia*, 1984, 19: 123~130.
- [6] 陈慧, 吕宪禹, 高如瑜 等. *高等学校化学学报*, 2000, 21(2): 233~236.
- [7] Pirkle W H. *J. Chromatogr.*, 1991, 558: 1~6.
- [8] Pirkle W H, Pochapsky T C. *J. Chromatogr.*, 1986, 369: 175~177.
- [9] Pirkle W H, Pochapsky T C. *Chromographia*, 1988, 25(7): 652~654.
- [10] Boehm R E, Martire D E, Armstrong D E. *Anal. Chem.*, 1988, 60: 522~528.
- [11] Berthod A, Chang S C, Armstrong D W. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 395~404.
- [12] Dalgliesh C E. *J. Chem. Soc.*, 1952, 47: 3940~3942.
- [13] Taylor D R, Maher K. *J. Chromatogr. Sci.*, 1992, 30: 67~85.
- [14] Feibush B, Figueroa A, Charles R et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108: 3310~3318.
- [15] Ogston A G. *Nature*, 1948, 162: 963.
- [16] Pirkle W H, Pochapsky T C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109: 5975~5982.
- [17] Lipkowitz K B. *J. Chromatogr. A*, 1994, 666: 493~503.
- [18] Lipkowitz K B. *J. Chromatogr. A*, 1995, 694: 15~37.
- [19] Lü X J, Rogers L B, de Haseth J A. *Anal. Chem.*, 1991, 63: 2939~2946.