

# 高效液相色谱手性固定相法直接拆分 4 种吡啶类衍生物

李秀娟<sup>1,2,3</sup> 赵亮<sup>2</sup> 明永飞<sup>2,3</sup> 彭先芝<sup>1</sup> 周永章<sup>\*1</sup> 陈立仁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640)

<sup>2</sup>(中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

<sup>3</sup>(中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** 将纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)涂敷于自制的球形氨基硅胶上,制备成了纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(CDMPC-CSP)。利用正相高效液相色谱,在该固定相上对新合成的 4 种吡啶类衍生物对映体进行了手性拆分。通过选择不同结构和浓度的醇类改性剂,优化了色谱分离条件,同时探讨了醇的结构和浓度对于对映体拆分和保留的影响。结果表明,适合 II ~ IV 号样品拆分的醇类改性剂分别为正丁醇、乙醇和乙二醇,而适合 I 号样品的醇类改性剂为乙醇和正丙醇组成的混合体系。在优化的各流动相体系下,4 种吡啶类衍生物的对映体都得到了很好的分离。在此基础上计算了它们的对映体过量值(*e. e.* 值)。实验结果令人满意,表明高效液相色谱手性固定相法是拆分这类化合物的一种理想方法。

**关键词** 高效液相色谱,手性拆分,吡啶类衍生物,纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相

## 1 引言

高效液相色谱手性固定相法拆分手性化合物,在近 20 年来得到了迅速的发展。各种类型的手性固定相相继被合成,用于分离众多的手性化合物<sup>[1]</sup>。其中多糖类手性固定相是应用最为广泛、手性拆分能力最强的一类<sup>[2]</sup>。在所有的纤维素衍生物中,纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)对众多类型的手性化合物都表现出了较高的手性识别性能<sup>[3,4]</sup>。Okamoto 等<sup>[5]</sup>曾在此固定相上对 510 种旋光物质进行了拆分,结果大约 60% ~ 70% 的旋光物质能够得到分离。

吡啶类衍生物是一类广泛应用的有机反应中间体,它们具有一个手性中心,因而有一对旋光性对映体。实验进程中,合成具有单一旋光性的吡啶类衍生物对映体对于不对称合成反应的进一步开展具有关键意义。因此,有必要对合成的吡啶类衍生物对映体进行手性拆分及其对映体过量值(*e. e.* 值)的测定。

本研究在自制的纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相(CDMPC-CSP)上首次拆分了新合成的 4 种吡啶类衍生物对映体。在此基础上,测定了该簇合物的 *e. e.* 值。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统为 Waters 515 HPLC 色谱泵、2487 型紫外可见双波长检测器(美国 Waters 公司);SEPU3000 色谱数据处理器(杭州);色谱柱为  $3.7 \times 10^7$  Pa 压力下采用匀浆法填充而成的 CDMPC 手性柱(250 mm × 4.6 mm i. d.);柱温:室温;紫外检测器检测波长:230nm;流动相流速:1.0 mL/min。4 种吡啶类衍生物样品由兰州化学物理研究所羰基合成与选择氧化国家重点实验室(OSSO)提供,其结构式如表 1 所示。所用试剂均为分析纯,购自天津化学试剂有限公司。

### 2.2 色谱计算

色谱柱死时间  $t_0$  由 1,3,5-三叔丁基苯测定;容量因子  $k' = (t_1 - t_0)/t_0$ ,它反映了物质在色谱柱中保留的强弱。 $k'$  数值增大,对映体保留增强,出峰时间增加。 $k'_1$ 、 $k'_2$  分别代表样品第一、二色谱峰的容量因子; $k'_1 = (t_1 - t_0)/t_0$ ,  $k'_2 = (t_2 - t_0)/t_0$ ;分离因子  $\alpha = k'_2/k'_1$ ;分离度  $R_s = 1.18(t_1 - t_0)/(w_{(1/2)1} + w_{(1/2)2})$ 。 $R_s$  的大小表明了对映体分离程度的优劣,通常  $R_s$  的增大表明分离程度的增强。其中,  $w_{(1/2)1}$

2006-08-24 收稿;2006-10-31 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20375045)、中国科学院“西部之光”(2003)和广东省自然科学基金(No. 021428)资助项目

\* E-mail: eezhou@zsu.edu.cn

和  $w_{(1/2)2}$  分别为第一个洗脱峰和第二个洗脱峰之半高峰宽。

e. e. 值的计算:  $e. e. = \frac{|(R) - (S)|}{|(R) + (S)|} \times 100\%$ , 其中,  $(R)$ ,  $(S)$  分别是  $R$ -,  $S$ -对映体的色谱峰面积。

### 3 结果和讨论

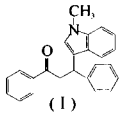
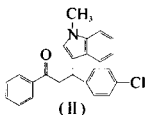
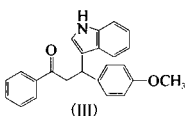
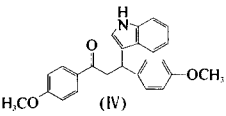
#### 3.1 4种吲哚类衍生物的分选-醇类改性剂的优选

实验中选用了5种常见的脂肪醇作为流动相改性剂,在正己烷/醇(80:20, V/V)流动相体系中对上述4种吲哚类衍生物在CDMPC-CSP上的色谱分离行为进行了考察,实验结果见表1。

从表1可以看出,当用乙醇作为流动相改性剂时, I、III、IV号样品都获得了较好的分离( $k'_1$ 、 $k'_2$ 较小,  $R_s$ 较大)。由乙醇经正丙醇到正丁醇,随着醇类改性剂碳链的变长,四种吲哚类衍生物在固定相上的保留均呈逐渐增大的趋势; I、II、III号样品的分离因子 $\alpha$ 和分离度 $R_s$ 均趋于增大,对于IV号样品,其分离因子 $\alpha$ 先增大后减小,分离度 $R_s$ 则呈一直减小的趋势。

表1 不同醇类改性剂对4种吲哚类衍生物分离的影响

Table 1 Influence of different alcoholic modifier on the separation of the investigated four indole derivatives

样品 Sample	醇类改性剂 Alcoholic modifier	容量因子1 Capacity factor 1 $k'_1$	容量因子2 Capacity factor 2 $k'_2$	分离因子 Separation factor $\alpha$	分离度 Resolution $R_s$
 (I)	乙醇 Ethanol	2.60	3.17	1.22	1.43
	正丙醇 Propanol	3.07	3.97	1.29	1.69
	异丙醇 Isopropanol	4.23	5.41	1.28	1.68
	正丁醇 Butanol	3.74	5.54	1.48	2.43
	异丁醇 Isobutanol	4.07	5.21	1.28	1.40
 (II)	乙醇 Ethanol	3.19	3.54	1.11	0.66
	正丙醇 Propanol	3.97	4.82	1.21	1.36
	异丙醇 Isopropanol	4.18	4.83	1.16	0.67
	正丁醇 Butanol	4.36	6.29	1.44	2.44
	异丁醇 Isobutanol	5.17	6.33	1.22	1.16
 (III)	乙醇 Ethanol	7.30	10.79	1.48	3.01
	正丙醇 Propanol	10.15	15.98	1.57	3.44
	异丙醇 Isopropanol	15.04	24.49	1.63	3.14
	正丁醇 Butanol			无分离现象 No separation	
	异丁醇 Isobutanol			无分离现象 No separation	
 (IV)	乙醇 Ethanol	9.08	13.76	1.52	3.42
	正丙醇 Propanol	12.97	21.56	1.66	3.40
	异丙醇 Isopropanol	17.89	32.23	1.80	3.68
	正丁醇 Butanol	17.86	23.08	1.29	1.53
	异丁醇 Isobutanol			无分离现象 No separation	

由异丙醇到异丁醇, I号样品的分离因子 $\alpha$ 基本不变,分离度 $R_s$ 由大变小; II号样品的分离度 $R_s$ 由小变大; III号样品在异丁醇体系中无明显分离; IV号样品在异丁醇体系中65 min内没有出现分离现象。由此可以看出,相同浓度下不同结构的醇类改性剂对吲哚类衍生物有不同的选择分离效果;不同结构的吲哚类衍生物在相同的醇类改性剂体系中分离效果也明显不同。

对上述现象的可能解释为:手性固定相中的氨基甲酸酯基与被分离物和醇类改性剂之间均有可能形成氢键,被分离物和流动相中的醇之间存在着竞争作用,不同的醇与固定相之间的氢键作用不同。当采用极性较大立体位阻较小的醇(如乙醇)作为改性剂时,醇与固定相之间的氢键作用相对较强,对映体与固定相之间的氢键作用相对较弱,从而使得被分离物的保留降低<sup>[6]</sup>。同时,醇的结构对于对映体选择性的影响更为复杂。流动相中的醇不仅能与被分离物竞争固定相上的吸附位,而且还会影响固定相中手性空穴的立体环境。不同结构的醇对于手性环境的影响不同,因而采用不同的醇作改性剂时对映体的选择性也不相同。对映异构体的手性拆分可通过它们对手性环境所具有的不同适应性来实现。

II 号样品的分离因子  $\alpha$  和分离度  $R_s$  在正丁醇体系中达到最大,基线平稳、峰的对称性好;III 号和 IV 号在乙醇作为流动相改性剂时出峰快,分离度高,基线无漂移。因此,分别将正丁醇、正丙醇和乙醇作为对 II、III、IV 号样品进行进一步优化分离的醇类改性剂。

I 号样品在正丁醇体系中虽具有最大分离度  $R_s$ ,但峰高很小,峰形不好;在乙醇体系中出峰最快,而在正丙醇体系中分离度  $R_s$  较大且峰形较好。而单独采用乙醇或正丙醇作醇类改性剂都无法达到满意的分离效果,故采用乙醇/正丙醇组成的醇类改性剂体系对 I 号样品进行优化分离考察。

### 3.2 4 种吡啶类衍生物的分-醇类改性剂含量的优化

实验在不同比例的正己烷/乙醇/正丙醇体系中考察了 I 号样品分离情况,结果见表 2。

实验观察到, I 号样品在 90/5/5 的体系中虽有较大分离度,但基线严重下降;在 70/15/15 的体系中虽然出峰很快,但第一峰与它前面的杂峰重叠较严重;而 80/10/10 的体系容量因子  $k'_1$  和  $k'_2$  适中,分离度  $R_s$  较大且峰形较好。因此,将其选为 I 号分离的优化流动相体系, I 号样品在这一体系中的分离见图 2a。

图 1 为 II、III、IV 号样品分别在正己烷/正丁醇、正己烷/乙醇和正己烷/乙醇体系中的优化分离过程。观察图 1 中 a、b、c 图可以发现,随着流动相体系中各醇类改性剂浓度的降低,各样品的容量因子  $k'_1$ 、 $k'_2$  均增大,但分离因子  $\alpha$  的变化并不明显。分离度  $R_s$  随着醇浓度的减小整体上呈现增加的趋势,但过低的浓度则会使峰形变宽,甚至严重拖尾,降低分离度  $R_s$ 。

为了对 II 号样品流动相中正丁醇的含量进行优化,考察了正丁醇含量为 10%、15%、20%、25% 和 30% 的 5 种情况。实验表明,在正丁醇含量为 10% 的体系中,II 号样品 24 min 内未出第二峰,且基线严重下降,峰形明显拖尾,其分离度  $R_s$  计算困难。

由图 1 还可以看出,正丁醇体积分数在 15% ~ 30% 之间变化时, II 号样品能达到较好基线分离。对映体的容量因子  $k'_1$ 、 $k'_2$  分别由 4.88、7.12 减至 2.56、3.50;分离度  $R_s$  先由 2.40 增加至 2.44,再逐渐降低至 1.66;分离因子  $\alpha$  则呈现变化不大的波状起伏。但从分离时间、分离度  $R_s$ 、色谱峰对称性等方面综合考虑,选用正丁醇含量为 20% 的流动相体系出峰时间较短( $k'_1$ 、 $k'_2$  较小),且分离度  $R_s$  最大,为分离 II 号样品的理想体系(见图 2b)。

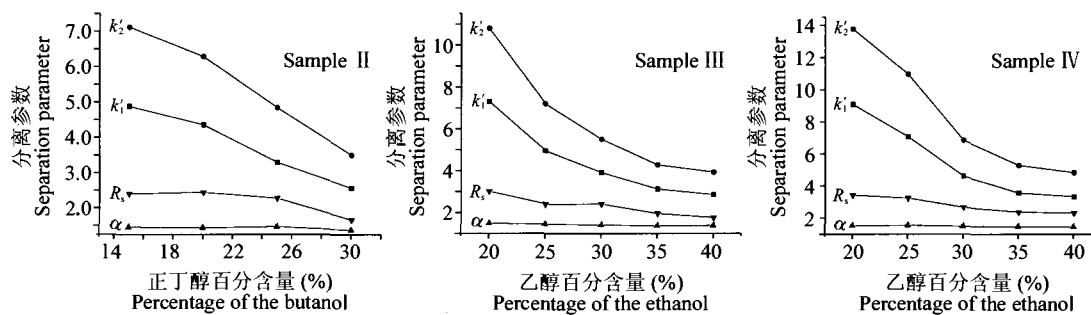


图 1 流动相中醇类改性剂的含量对 II、III、IV 号样品分离的影响

Fig. 1 Influence of alcoholic modifier fraction in the mobile phase on the separation of sample II, sample III and sample IV

对于 III 和 IV 号样品,流动相中乙醇含量从 20% 增至 40% 时,其容量因子  $k'_1$ 、 $k'_2$  逐渐减小,分离因子  $\alpha$  的变化不十分明显。对于 III 号样品来说,分离度  $R_s$  呈减小-增大-减小的变化趋势,而 IV 号样品分离度  $R_s$  的变化则是先增大再减小。综合考虑洗脱时间、分离因子  $\alpha$ 、分离度  $R_s$  以及峰形,III 号样品的最佳流动相选为乙醇含量 20% 的体系。而 IV 号样品在各体系中都能达到很好基线分离,分离度  $R_s \geq$

2.32, 基线也没有出现漂移。从出峰时间考虑, 含乙醇40%的体系, 可以在16 min内将两峰完全洗脱, 作为分析体系最佳。而含乙醇20%的体系分离度  $R_s$  高达3.42, 用于半制备分离时可考虑选用。

Ⅲ和Ⅳ号在乙醇含量为20%、40%体系中的色谱分离图见图2c和d。

### 3.3 吲哚类衍生物在 CDMPC-CSP 上的分离谱图

图2为在 CDMPC-CSP 上, 4种吲哚类衍生物在各自优化流动相体系中的分离谱图。

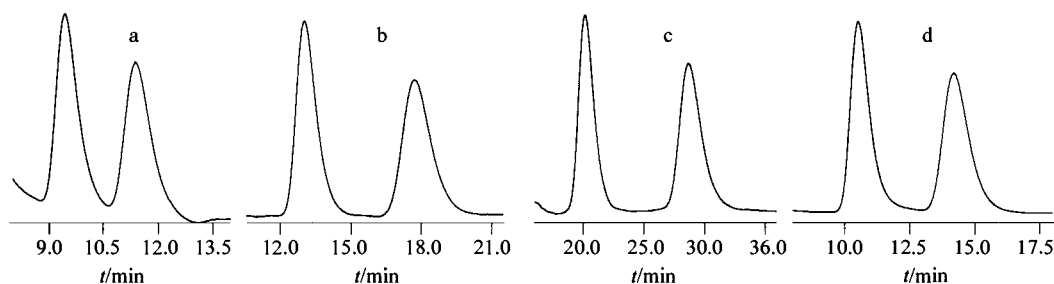


图2 4种吲哚类衍生物的拆分谱图

Fig.2 Chromatograms of the chiral separation of the investigated four indole derivatives

I. 正己烷/乙醇/正丙醇(hexane/ethanol/propanol) 80/10/10 (V/V); II. 正己烷/正丁醇(hexane/butanol) 80/20 (V/V); III. 正己烷/乙醇(hexane/ethanol) 80/20 (V/V); IV. 正己烷/乙醇(hexane/ethanol) 60/40 (V/V)。

### 3.4 吲哚类衍生物结构对其拆分的影响

当手性吲哚类衍生物分子进入 CDMPC 衍生物大分子手性螺旋沟槽时, 会通过相互作用形成动态的固定相-被分析物包结配合物; 而吲哚类衍生物对映体间立体结构的不同, 造成了它们与固定相间作用强弱的差别。这样就产生了被分析物、流动相与固定相之间相互作用的竞争, 对映体中与固定相作用弱的先被洗脱, 强的后洗脱, 从而实现了手性化合物对映体的分离。4种吲哚类衍生物中, I号与II号具有相似结构(II号仅比I号多一个Cl原子); III与IV号具有相似结构(IV号仅比III号多一个  $\text{CH}_3\text{O}-$ ), 结构上的相似导致了其在同种醇类改性剂中分离的相似。

从3.1节可以看出, 结构相似的化合物表现出了相近的色谱性质: I、II号均在正丁醇体系具有最大分离度  $R_s$ ; III、IV号分离的最佳醇类改性剂均为乙醇。

### 3.5 e. e. 值的测定

在各自优化的色谱条件下, 将上述4种吲哚类衍生物各连续进样3次, 根据一对对映体的色谱峰面积测定出 e. e. 值的平均值及其相对标准偏差 RSD, 结果见表3。

表3 4种吲哚类衍生物的 e. e. 值

Table 3 Enantiomer excess value (e. e.) of the four indole derivatives

样品 Sample	I	II	III	IV
e. e. (%)	0.42	1.67	1.14	3.25
RSD (%)	0.35	0.41	0.43	0.39

### 3.6 机理浅析

Okamoto 等认为, CDMPC-CSP 上的苯基氨基甲酸酯单元在手性拆分过程中是很重要的作用点。被分析物分子中的羟基、羰基等质子给体或受体会与之发生不同程度的氢键作用; 而被分析物中带有富  $\pi$  电子的基团则会与之发生  $\pi-\pi$  作用<sup>[3]</sup>。对于本研究的4种吲哚类衍生物而言, 其对映体通过调整构象进入手性螺旋空腔中, 分子中的羰基可以与 CDMPC-CSP 中的氨基甲酸酯基发生氢键作用和偶极-偶极相互作用; 同时, 吲哚类衍生物的吲哚环容易和 CDMPC-CSP 中的氨基甲酸酯基间形成  $\pi-\pi$  相互作用和包夹作用, 由于一对对映体所受作用力不同而实现分离。

与I号相比, II号中多了一个Cl, 可与固定相形成比I号多的氢键作用, 拆分效果好于I号。III、IV号均比I、II多一个氮-氢键( $-\text{N}-\text{H}$ ), 形成氢键作用的方式又比I、II号增多, 因而其对映异构体的拆分相对于I、II号更容易。

**致谢** 在此谨向兰州化学物理研究所为本实验提供手性样品的周伟博士表示感谢!

## References

- 1 Yashima E. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906: 105
- 2 Yashima E, Okamoto Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, 68: 3289
- 3 Okamoto Y, Yashima E. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37: 1020 ~ 1043
- 4 Piras P, Roussel C, Pierrot-Sanders J. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906: 443 ~ 458
- 5 Okamoto Y, Kaida Y. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 666(2): 403 ~ 419
- 6 Kirkland K M. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 718(1): 9 ~ 26

## Direct Chiral Separation of Four Indole Derivatives by High Performance Liquid Chromatography with Chiral Stationary Phase

Li Xiu-Juan<sup>1,2,3</sup>, Zhao Liang<sup>2</sup>, Ming Yong-Fei<sup>2,3</sup>, Peng Xian-Zhi<sup>1</sup>, Zhou Yong-Zhang<sup>\*1</sup>, Chen Li-Ren<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640)

<sup>2</sup>(Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

<sup>3</sup>(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

**Abstract** A chiral stationary phase (CSP) was prepared by coating cellulose-tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) (CDMPC) onto lab-made aminopropylated spherical silica gel. Four new synthesised chiral indole derivatives were directly resolved on the CDMPC-CSP by normal-phase system. The influences of structure and concentration of the alcohol in mobile phases on the separation of indole derivatives by high performance liquid chromatography with CSP were investigated for the optimization of chromatographic conditions. Butanol, ethanol and ethanol were appropriate for the separation of sample II, sample III and sample IV as the modifiers respectively, while the mixture of ethanol and propanol was suitable for sample I. Under the optimal conditions, excellent enantioseparation was achieved and the enantiomer excess (e. e.) values of indole derivatives were determined. The satisfactory results indicated that the method is ideal for the separation of indole derivatives.

**Keywords** High performance liquid chromatography, enantioseparation, indole derivatives, cellulose-tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) chiral stationary phase

(Received 24 August 2006; accepted 31 October 2006)