

液相色谱手性拆分机理的热力学方法研究*

翁 文^{1*} 姚碧霞¹ 陈秀琴¹ 陈友遵¹ 林文士¹ 曾庆乐²
(1. 漳州师范学院化学与环境科学系 漳州 363000; 2. 厦门大学化学系 厦门 361005)

摘 要 手性识别是分子识别的一个重要组成部分。液相色谱手性拆分机理研究有助于色谱条件的优化和新型手性固定相的设计,也有助于理解手性识别机制。本文就线性色谱与非线性色谱条件下手性拆分过程对应热力学参数的推求方法进行了评述,阐述了相关热力学参数的涵义及其在色谱保留及手性拆分机理探讨中的应用,并展望了该领域的研究前景。

关键词 液相色谱 手性拆分 手性识别 热力学参数

中图分类号: O657.7; O642.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2006)07/8 1056-09

Thermodynamic Studies on Mechanism of Chiral
Resolution by Liquid ChromatographyWeng Wen^{1*} Yao Bixia¹ Chen Xiuqin¹ Chen Youzun¹ Lin Wenshi¹ Zeng Qingle²

(1. Department of Chemistry and Environmental Science, Zhangzhou Teachers College, Zhangzhou 363000, China;
2. Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Chiral recognition is an important part of molecular recognition. Studies of mechanistic aspects of chiral resolution by liquid chromatography are helpful to optimize chromatographic conditions, to design novel chiral stationary phases and to understand chiral recognition mechanisms. In this paper, the methodologies for deriving corresponding thermodynamic parameters in the chiral resolution processes by linear or nonlinear chromatography are reviewed. The meaning of correlative parameters is explained. The applications of these parameters in the studies of mechanistic aspects of retentions and chiral resolutions by liquid chromatography are expatiated, and corresponding research prospects are put forward.

Key words liquid chromatography; chiral resolution; chiral recognition; thermodynamic parameters

高效液相色谱(HPLC)手性拆分过程中,柱温是一个重要的影响因素。柱温的变化不仅影响对映体在固定相上吸附、解吸的速率,影响保留因子、分离因子和分离度,甚至还可能导致固定相构型发生大的变化,从而影响溶质与手性固定相(CSP)间的作用,对映体的洗脱顺序可能因此而反转^[1],所以柱温常作为优化色谱分离的一个重要参数。另外,通过建立色谱数据与柱温之间的关系还可以进一步导出溶质吸附分离过程的热力学参数,从而提供了一种阐明手性识别机理的方法。

1 线性色谱条件下热力学参数的推导与讨论

线性色谱条件下,色谱信号(如峰面积)与底物浓度成线性关系,溶质的保留时间基本上不随进样浓度的变化而变化(可以通过浓度实验确定线性区域),由色谱数据(保留因子、分离因子等)导出的热力学参数不受进样浓度的影响。分析型的低浓度区域即为线性色谱条件。

1.1 理论部分

色谱分离过程中,某一异构体在固定相与流动

收稿: 2005 年 9 月, 收修改稿: 2006 年 1 月

* 福建省自然科学基金(No. C0540024)和福建省教育厅课题(No. JA05301)资助

** 通讯联系人 e-mail: wengwen@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

相间的分配系数 K 与该异构体在二相间的自由能变 ΔG^0 的关系可表示为:

$$RT \ln K = -\Delta G^0 = -(\Delta H^0 - T\Delta S^0) \quad (1)$$

其中 R 为气体常数, T 为柱温, ΔH^0 、 ΔS^0 分别代表该异构体在固定相与流动相间分配的摩尔焓变和熵变。分配系数 K 以 k'/Φ 代替则得:

$$RT \ln(k'/\Phi) = -(\Delta H^0 - T\Delta S^0) \quad (2)$$

重排得:

$$\ln k' = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R + \ln \Phi = -\Delta H^0/RT + \Delta S^* \quad (3)$$

此即色谱保留过程的 van't Hoff 方程, 式中 k' 为保留因子, Φ 为相比, ΔS^* 用以代替 $\Delta S^0/R + \ln \Phi$ 。结合 Gibbs-Helmholz 关系式:

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta H^0 - T\Delta\Delta S^0 \quad (4)$$

可得色谱手性拆分中重要的数据分离因子 α 与热力学函数之间的关系:

$$\ln \alpha = \ln(k_2'/k_1') = -\Delta\Delta G^0/RT = -\Delta\Delta H^0/RT + \Delta\Delta S^0/R \quad (5)$$

其中 k_1' 、 k_2' 分别为前、后出峰异构体的保留因子, Gibbs-Helmholz 参数 $\Delta\Delta G^0$ 、 $\Delta\Delta H^0$ 、 $\Delta\Delta S^0$ 分别代表后出峰异构体与前出峰异构体在两相间分配的自由能变、焓变及熵变之差。若某一温度范围内, $\ln k'$ 或 $\ln \alpha$ 对温度的倒数作图得一直线, 则从直线的斜率或截距可求得手性拆分过程对应的热力学参数。线性关系说明这些热力学参数及相比在实验温度范围内为定值, 固定相构型未发生明显变化, 保留机制及对映选择作用不变, 其它因素如可离解化合物的离解平衡等不受温度的影响。若固定相构型在某温度处发生变化, 则保留过程对应的热力学参数将改变, van't Hoff 图形将出现转折^[2]。

结合溶质结构, 利用推导出的热力学参数可对手性拆分机理(特别是溶质与固定相间的作用模式、手性识别的热力学驱动力等)进行探讨。热力学参数中, ΔH^0 衡量溶质在固定相上吸附过程的放热情况, 表征溶质与固定相的作用力大小。 ΔH^0 值越负, 说明溶质与固定相的作用越强, 与固定相的结合在能量上更有利。 ΔS^0 或 ΔS^* 表示溶质吸附过程自由度的变化情况, 越负说明自由度降低越多, 分子总体变得更有序(绝对值大也说明吸附过程构象变化大)。 $\Delta\Delta H^0$ 表示两对映体与固定相的作用强度之差, $\Delta\Delta S^0$ 表示自由度变化之差(也反映两个对映体与手性选择剂作用过程构象匹配性的差别程度)。若 $\Delta\Delta H^0$ 和 $\Delta\Delta S^0$ 都为负, 说明手性拆分为焓驱动(式 5 中焓项对分离因子有正贡献), 后出峰异构体

较前出峰异构体与固定相存在较强的相互作用, 且与固定相形成络合物后分子总体变得更有序, 温度升高分离因子下降。若两者皆为正, 说明手性拆分为熵驱动, 分离因子和柱效都随柱温的升高而升高。若 $\Delta\Delta H^0$ 为负而 $\Delta\Delta S^0$ 为正, 两者对手性识别都有贡献。

1.2 色谱拆分实验及热力学参数的推导

大部分液相色谱手性拆分为焓驱动过程^[3]。Goossens 等^[4]利用多糖类 CSP 正相条件下拆分抗癌药物, 从线性 van't Hoff 图推得 ΔH^0 、 ΔS^* 、 $\Delta\Delta H^0$ 及 $\Delta\Delta S^0$ 都为负值且绝对值较大, 说明底物在固定相上的保留及手性拆分都为典型的焓驱动过程。Pirkle 等^[5]利用氨基柱衍生的离子键合手性固定相拆分联萘酚及其同系物, 证明手性拆分为焓驱动。任其龙等利用 Chiral AGP 手性柱拆分萘普生和布洛芬, 从求得的热力学函数判断手性拆分为焓控过程^[6]。利用去甲万古霉素键合手性固定相拆分 β 受体阻滞剂类药物, 证实也为焓控过程^[7]。

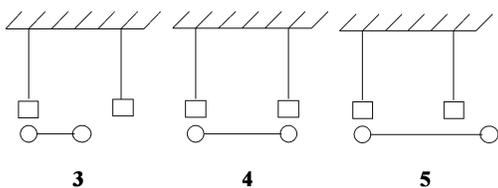
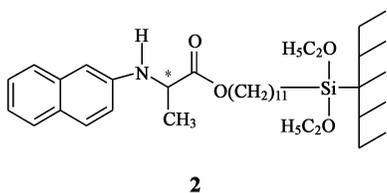
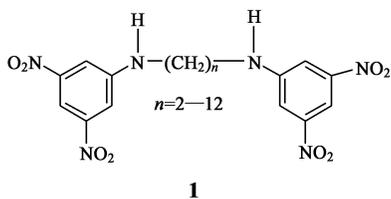
刘月启等^[8]利用苯基氨基甲酸纤维素酯拆分联苯类药物, 发现拆分为焓驱动过程。联苯二甲酸甲酯类对应的 $-\Delta\Delta H^0$ 值明显较联苯二甲酸乙酯类的大, 而苯环上其它位置取代基的影响较小, 认为甲酯类对映体的空间位阻较小, 容易进入纤维素衍生物的螺旋槽, 与固定相形成氢键、偶极-偶极作用等, 从而获得更有效的手性识别。

Michaud 等^[9]利用 DNA 修饰手性固定相拆分生物活性小分子腺苷和酪氨酸酰胺, 实验表明该固定相显示出专一性识别的特点, 如后者分离因子高达 78(前出峰异构体基本上不被识别保留)。对后出峰 D 构型的腺苷, 其与 CSP 的键合焓 ΔH^0 为 -71.4 kJ/mol, 对后出峰 L 构型的酪氨酸酰胺, ΔH^0 为 -139.4 kJ/mol。如此高的 $-\Delta H^0$ 值表明后出峰异构体与 CSP 形成了很强的络合物, 手性拆分为焓驱动。

孟子晖等^[10, 11]利用光引发聚合的分子印迹聚合物(MIPs)进行手性拆分, 热力学函数表明保留及拆分都为焓控制, 对 L 构型氨基酸烙印的 CSP, L 构型氨基酸底物与 CSP 的作用焓变及熵变总是大于 D 构型的, 显示出 CSP 的烙印空穴对烙印分子及其立体结构相似的对映体分子间存在较强的作用力, 具有“预定”的识别能力, 在构型上也是有利的, 结合后将导致分子有序性较大的增加。特定烙印分子对应的 $-\Delta\Delta H^0$ 值和 $-\Delta\Delta S^0$ 值也明显大于其它同系物, 说明烙印空穴对烙印分子的手性识别能力最强,

具有最好的空间匹配性,在能量和构型上都是有利的。孙瑞丰等^[12]的工作表明,对于光引发聚合(聚合温度为 4 ℃)的 MIPs,对映体分离过程存在有利的焓减少($\Delta\Delta H^0$ 为负);而对于热引发聚合(聚合温度为 60 ℃)的 MIPs,对映体分离过程存在不利的焓增加($\Delta\Delta H^0$ 为正)。认为前者两对映体与固定相作用的能量变化与构象调整的能量变化同向,而后者是反向的。

Pirkle 等^[13]利用这种热力学方法对手性键合固定相的带间距离进行了测定。从 $\ln k' - 1/T$ 图计算得系列化合物 1 (含不同数目的亚甲基)在“刷型”手性固定相 2 上的吸附焓变和熵变,比较发现当 n 取某一数值时,底物 1 和 2 的作用放热最大,熵减最多,所对应的化合物 1 可作为“分子标尺”衡量带间距离。放热最大意味着底物两端的 π 酸基团可同时和固定相中相邻两条键连带末端的 π 碱基团发生作用而不需特别地调整构型(如 4 所示),故可用于计算带间距离。当底物太短或太长时与固定相中相邻两条带的作用较小(如 3 和 5 所示)或必须调整构型。实验还发现,不管硅胶表面手性带的键合程度如何,放热最大时所对应的亚甲基数目不变($n = 5$),这说明手性键连带不是随机分布在硅胶表面,而是成簇的,且带间距离一定,只是簇的大小随键合度的改变而改变,支持了“补钉模型”。



Galli 等^[14]利用手性配体交换色谱拆分氨基酸衍生物,拆分为焓驱动, $\Delta\Delta S^0$ 为负但接近零。底物及固定相分子的去溶剂化、两者间络合物的形成、络合后的重新溶剂化及构型的变化等过程的熵变可能

相互抵消,导致 $\Delta\Delta S^0$ 值接近零。Küstners 等^[3]在利用纤维素型手性固定相 Chiracel OD 拆分 rolipram 及其类似物时发现了较少见的熵控拆分,8 个底物中有 3 个分离因子随温度的升高而升高。Chiracel OB 手性固定相拆分亚砷化合物时也观察到这一点,如对甲氧基苯甲亚砷的拆分为焓控制,而对羟基苯甲亚砷的拆分却为熵控制^[15]。淀粉基手性固定相也表现出对不同的底物或不同的色谱条件,手性拆分的热力学起源不尽相同^[16]。

从热力学函数值的大小可以判断主客体间作用力的类型。Küstners 等^[15]认为 $\Delta\Delta H^0$ 的绝对值小于 0.1 kcal/mol 时,手性识别仅归因于立体阻碍,而不包括其它类型的作用力。在 0.5 至 1.0 kcal/mol 区间时,立体阻碍的贡献被弱相互作用如弱 $\pi-\pi$ 作用、弱氢键作用等放大。大于 1.0 kcal/mol 时,认为后出峰异构体受到额外的强 $\pi-\pi$ 作用或强氢键作用,从而导致手性拆分。

实验中观察到 van't Hoff 图呈非线性的情况。O'Brien 等^[2]在利用对甲基苯甲酸纤维素酯拆分一双醇化合物中发现, van't Hoff 图在约 18 ℃ 时发生转折,可分为两个线性区域: 18—50 ℃ 的高温区域, 5—18 ℃ 的低温区域。两个区域图形的线性关系都很好,说明固定相构型在 18 ℃ 时发生了某种变化。两个区域的拆分机理不同,高温区域为焓驱动分离,固定相与两对映体的作用差异导致拆分。低温区域为熵驱动分离,包结作用可能是主要的拆分驱动力。差示扫描量热(DSC)及 IR 分析支持构型发生变化的观点。固定相构型的变化也反映在溶质的吸附/解吸速率(吸附动力学)上。低温区域后出峰异构体的色谱峰展宽厉害,有效塔板高度大,属慢吸附/解吸过程(与包结作用有关)。随着温度的升高,有效塔板高度迅速降低,并在高温区域趋向缓和(高温区域对应快吸附/解吸过程)。先出峰异构体的吸附/解吸速率受温度的影响小。

1.3 等对映选择温度 T_{iso}

若 $\Delta\Delta H^0$ 与 $\Delta\Delta S^0$ 都为负值,拆分为焓驱动。根据式(5)可以求得 $\alpha = 1$ 时对应的等对映选择温度 T_{iso} 。 T_{iso} 定义为 $\Delta\Delta H^0 / \Delta\Delta S^0$,在该温度处熵焓因素对手性拆分的贡献相互抵消。柱温在 T_{iso} 以下时,分离因子随温度的升高而降低。柱温等于 T_{iso} 时,两异构体同时洗脱。超过 T_{iso} 时,推测对映体的洗脱顺序将发生反转, $\Delta\Delta H^0$ 与 $\Delta\Delta S^0$ 值相应变为正值,手性拆分成熵控过程^[17]。

Cirilli 等^[18] 利用蛋白柱反相条件下拆分药物 benazepril 等, 对应的 $\Delta\Delta H^0$ 及 $\Delta\Delta S^0$ 值较负, 等对映选择温度 T_{iso} 为 67 °C。但因高温可能破坏色谱柱, 验证实验没有进行。

我们^[19-21] 利用酒石酸衍生的手性键合网状聚合物固定相对氨基酸衍生物、联萘系列化合物等进行了拆分, 考察了流动相中极性添加剂的种类及含量、柱温等对手性拆分效果的影响, 并通过计算得到保留及拆分过程对应的热力学参数。对氨基酸衍生物, 手性拆分为典型的焓驱动过程, 氨基衍生基团对热力学参数的影响大, 衍生基团为 $-NHCOPh$, 其 $\Delta\Delta H^0$ 和 $\Delta\Delta S^0$ 的绝对值明显比衍生基团为 $-NHCOCH_3$ 的大, 分离效果也较好。进一步分析 ΔH^0 , 表明氨基衍生基团主要影响后出峰异构体与固定相之间的作用。考察流动相中极性醇含量对热力学参数的影响, 发现当极性醇含量降至某一比例 (3%) 时, 对应的热力学参数及 T_{iso} 值发生比较明显的变化, 认为极性醇含量降低导致固定相构型收缩, 从而使固定相与底物间的作用发生变化。联萘酚等表现出与氨基酸衍生物不同的拆分热力学性质, 大多数情况下为焓焓共同驱动的拆分, 且热力学参数 $\Delta\Delta H^0$ 和 $\Delta\Delta S^0$ 的绝对值都较小, 说明相同的色谱条件下, 不同类型底物的拆分驱动力也可能是不同的。

Stringham 等^[17] 对影响焓焓分离的因素进行了探讨, 考察了流动相组成对 T_{iso} 的影响, 并在实验中观察到了对映异构体洗脱顺序发生变化的现象。Schurig 等^[22] 利用金属络合物拆分螺环化合物(气相色谱条件), 根据热力学数据预测了 T_{iso} , 并得到了实验的证实, 异构体洗脱顺序确实发生了反转。在利用手性金属络合物拆分环氧乙烷类化合物中也观察到了这个现象, 且 $\Delta_{S,R} \Delta G/T - 1/T$ 图在实验温度范围(含焓焓和焓焓区域)内呈线性关系, 计算得到的 T_{iso} 值与实验相符。固定相或底物结构的微小变化都会导致 T_{iso} 大的变化^[23], 其本质原因值得探讨。

对 T_{iso} 的研究可以加深人们对手性拆分机理的了解, 进一步验证所求热力学参数的可靠性。对一些拆分不好的实验可以通过改变温度远离 T_{iso} 而获得拆分。但要注意的是洗脱顺序的改变也有可能是因为温度导致固定相构型的变化, 或温度导致手性识别机制发生变化引起的。另外, 液相色谱手性拆分中 T_{iso} 经常超出实验范围, 也阻碍了其应用与验证。

1.4 焓焓补偿关系

研究焓焓补偿关系可进一步讨论色谱保留与手性拆分机制。焓焓补偿关系指色谱保留过程的焓变被相应的焓变所补偿, 对一组溶质保留过程的焓变与焓变成线性关系, 即 ΔH^0 对 ΔS^0 作图可拟合出一直线, 直线的斜率为补偿温度, 以 β 表示, 截距可表示为 ΔG_{β}^0 , 物理意义为补偿温度 β 下的 Gibbs 自由能变。用数学公式可表示为:

$$\Delta H^0 = \beta \Delta S^0 + \Delta G_{\beta}^0 \quad (6)$$

其中 β 和 ΔG_{β}^0 都为常数。以 $T \Delta S^0$ 对 ΔH^0 作图也可得一直线, 设该直线斜率为 α , 截距为 $T \Delta S^0$, 则该关系可表示为:

$$T \Delta S^0 = \alpha \Delta H^0 + T \Delta S_0 \quad (7)$$

其中 α 与 $T \Delta S^0$ 分别反映色谱保留过程的构象变化和去溶剂化程度^[24]。焓焓补偿效应已被证明普遍存在于主客体化学中。存在焓焓补偿效应说明一组底物与 CSP 的作用机理相似, 具有相同或基本一致的保留机理。根据式 (1) 和 (6), 可得某温度下的 ΔG_T^0 为:

$$\Delta G_T^0 = \Delta H^0 (1 - T/\beta) + (T \Delta G_{\beta}^0)/\beta \quad (8)$$

对系列底物 ΔG_T^0 与 ΔH^0 成线性关系, 补偿温度 β 可从拟合直线的斜率求得, 或变换为:

$$\ln k' = - (\Delta H^0/R) (1/T - 1/\beta) - \Delta G_{\beta}^0/R\beta + \ln \Phi \quad (9)$$

若 $\ln k' - \Delta H^0$ 图为直线也说明存在焓焓补偿关系。

若 $\Delta\Delta H$ 与 $\Delta\Delta S$ 成线性关系, 说明手性拆分过程存在焓焓补偿, 一组底物的拆分机理一致。实验调和平均温度下的 $\Delta\Delta G$ 对 $\Delta\Delta H$ 存在线性关系, 也说明手性拆分存在焓焓补偿关系。

Péter 等^[25] 利用含大环抗生素 teicoplanin 的手性固定相拆分 β -甲基氨基酸, 发现 L 构型和 D 构型底物的焓焓补偿图形基本一致, 说明两种构型底物与固定相的作用机理类似, 靠强电荷-电荷作用完成最初的对接, 然后靠二级作用如氢键作用、憎水作用及立体阻碍等产生差异。

Slama 等^[26] 利用大环抗生素 vancomycin 拆分氨基酸衍生物, 从线性 van't Hoff 图推得 ΔH^0 值都为负。对缬氨酸、亮氨酸及苯丙氨酸的丹磺酸酯, $-\Delta H^0$ 值较大, 而色氨酸酯衍生物对应的 $-\Delta H^0$ 值较小。前三者观察到了焓焓补偿现象, 说明与 CSP 的作用方式相似, 而后者数据与拟合直线相离甚远, 进一步说明保留机理不同。色氨酸酯衍生物完全无法拆分, 认为是其非极性侧链大, 增强了与 CSP 间

长程的疏水-疏水相互作用,阻碍了短程的氢键作用、范德华力等,从而降低了与手性识别有关的作用,导致拆分效果不好。

André 等^[27]利用胃蛋白酶拆分氨基酸丹磺酸酯,考察了流动相中 NaCl 添加剂的含量对保留及拆分的影响,并求得不同 NaCl 浓度时各对映体与蛋白质作用的焓变和熵变。保留皆为焓驱动,说明溶剂-蛋白质之间的弱相互作用被强的对映体-蛋白质作用所取代。 ΔH^0 和 ΔS^* 值与 NaCl 浓度成抛物线关系,随 NaCl 浓度的升高先降后升。保留因子与分离因子随 NaCl 浓度的升高也呈先降后升趋势,转折处的 NaCl 浓度约为 0.15 mol/L。认为存在两种不同的保留机制,当 NaCl 浓度在 0—0.15 mol/L 时,离子作用为主要决定因素,NaCl 浓度升高导致蛋白质与底物间的离子作用降低,分离因子下降;而大于 0.15 mol/L 时,憎水作用为主控因素,NaCl 浓度升高使蛋白质与底物间的憎水作用显著增强,分离因子升高。不同浓度区间两种作用的相对贡献不同。焓焓补偿关系分析进一步支持了这个观点,两个浓度区间的焓焓补偿图形斜率明显不同。

Booth 等^[28]利用淀粉基 CSP(Chiralpak AD)拆分美西律及其类似物,焓焓补偿曲线明显分成两条,各对应含羟基和不含羟基的底物,说明存在两种不同的保留机制,也暗示氢键的影响大。

Danel 等^[29]利用淀粉基 CSP 正相条件下拆分几种芳酶抑制剂,从热力学函数判断保留及拆分都为焓驱动,当流动相中极性醇含量增加时, $|\Delta H^0|$ 值变小,说明溶剂的竞争吸附变大。 $|\Delta\Delta H^0|$ 值也变小,说明后出峰异构体对应的 $|\Delta H^0|$ 值随流动相中极性醇含量的增加降低得更多。在 $|\Delta\Delta H^0|$ 值变小的同时 $|\Delta\Delta S^0|$ 值也成比例减小 ($\Delta\Delta H^0 - \Delta\Delta S^0$ 图成线性),存在焓焓补偿效应。

纤维素衍生物 CSP(Chiralcel OD-RH)反相模式下拆分治疗糖尿病的潜在药物,对应的 ΔH^0 和 ΔS^* 都为负值,当流动相中乙腈含量为 60%—75% 时两者数值随乙腈含量的增加而变大,乙腈含量为 50%—60% 时随乙腈含量的增加而变小,认为存在两种不同的作用机制。 $\Delta\Delta H^0$ 和 $\Delta\Delta S^0$ 都为负值,并随乙腈含量的增加而增加, $\Delta\Delta H^0 - \Delta\Delta S^0$ 图成线性,存在焓焓补偿现象^[30]。

1.5 线性色谱条件下求导热力学参数的局限性

以上方法求导热力学参数较方便,且固定相结构或底物结构、色谱条件等的变化常导致热力学参数明显的改变,但值得注意的是所求得的热力学参

数都为“表现”热力学参数而非“本质”热力学参数。实际上,很多手性固定相是手性基团负载(物理吸附或化学键连)到一些无机载体如官能化硅胶的表面,所以底物和固定相之间的作用包含和手性基团间的对映选择(enantioselective, es)作用以及和载体间的非对映选择作用(non enantioselective, ns),两者对底物的保留都有贡献,以式子表示为:

$$k'_{app,R} = k'_{ns} + k'_{es,R} \quad (10)$$

$$k'_{app,S} = k'_{ns} + k'_{es,S} \quad (11)$$

故表现分离因子(设 R 为后出峰异构体)

$$\alpha_{app} = k'_{app,R}/k'_{app,S} = (k'_{ns} + k'_{es,R})/(k'_{ns} + k'_{es,S}) \quad (12)$$

而本质分离因子

$$\alpha_{intr} = k'_{es,R}/k'_{es,S} \quad (13)$$

若 $k'_{ns} > 0$, 表现分离因子 α_{app} 将低于本质分离因子 α_{intr} 。这时利用式(3)和(5)推导出的热力学参数并不能反映本质问题。只有当非对映选择项 $k'_{ns} = 0$ 或 $k'_{ns} \ll k'_{es}$ 时,推导出的热力学参数才比较可靠^[31,32]。分析色谱保留及拆分过程非手性作用的贡献大小是必要的。如 Oberleitner 等^[31]利用键连到巯基丙基硅胶上的金鸡钠碱的氨基甲酸酯作为手性选择剂,利用水-有机溶剂作为流动相拆分 N-酰化氨基酸,认为载体巯基丙基硅胶在极性流动相中与底物的作用小,且手性选择剂的高覆盖度也抑制了底物与载体之间的作用。利用仅含载体的参考柱进行对照实验进一步证实了这一点,底物的保留因子 $k' < 0.1$, 故表现热力学参数被直接推导并用于手性识别机理的探讨中。0—80℃ 区间 $\ln k' - 1/T$ 图表现出显著的非线性,而 $\ln \alpha - 1/T$ 图的线性关系好,说明引起 $\ln k' - 1/T$ 图非线性的因素对两个异构体的影响一样,与手性识别无关。0—25℃ 区间 $\ln k' - 1/T$ 图的线性关系尚好,25℃ 以上分离因子随温度的升高下降明显,认为可能是底物与手性主体的去溶剂化与温度有关的缘故。拆分均为焓驱动,不同 N-酰化基团对应的 $\Delta\Delta H^0$ 与 $\Delta\Delta S^0$ 值明显不同,说明底物的 N-酰化基团与手性识别过程密切相关,如 π 酸基团 DNB 衍生的氨基酸对应的 $-\Delta\Delta H^0$ 与 $-\Delta\Delta S^0$ 值明显较大,可能 $\pi\pi$ 作用对手性识别有贡献。氨基酸侧链憎水性越强,对应的热力学函数越负,拆分越好,说明了疏水作用的重要性。

Gilpin 等^[33]利用负载 BSA(牛血清白蛋白)手性固定相拆分色氨酸,柱容量测定发现, D 构型色氨酸的保留因子不随进样浓度的改变而明显改变,而 L

构型的保留因子在进样浓度超过一定值时出现降低状况,说明手性固定相对 L 构型色氨酸存在特异吸附位,且具有一定的吸附容量。线性色谱区域 D 构型对映体对应的 $\ln k' - 1/T$ 图呈线性,而 L 构型的不呈线性,而是有一个最高点,说明存在比较复杂的保留机理。实际上,对蛋白质负载型 CSP,由于负载量有限(一般每克载体负载量小于 1 μmol),手性作用位点少,且存在大量的非对映选择位(源于蛋白质的其它非特异吸附位或载体的吸附),故非手性作用的贡献不可忽略,直接利用式(3)和(5)推导热力学参数将大大低估对映选择作用。Guiochon 等^[34]指出,线性色谱条件下直接推导热力学参数的前提是 CSP 吸附位均一,若 CSP 含有不同类型的吸附位,运用该法不仅不能给出不同吸附位的吸附特征,甚至可能得出错误的结论。为了解决这个问题,Schurig 等^[35-37]在气相色谱手性拆分中引进了一个方法用于推导“真实”的热力学参数,通过引进不含手性选择剂的“参考柱”将手性作用与非手性作用分开。液相色谱手性拆分中,通过非线性色谱条件下建立溶质吸附等温线,求解更可靠精确的热力学参数可以将对映选择作用和非对映选择作用分开,从而使人们对色谱保留机理及拆分机理有更加深入细致的了解。

2 非线性色谱条件下热力学参数的推导与讨论

色谱保留过程的溶质吸附等温线描绘出吸附平衡时流动相中底物浓度与固定相中底物浓度之间的关系,它在更宽的底物浓度区间获得,超出了线性色谱中底物的浓度范围。研究溶质的吸附等温线及相关信息也有助于制备型色谱条件的开发。

2.1 理论部分

液相色谱手性拆分中,通过测定单一对映体的吸附等温线可以了解该对映体与 CSP 作用的详细信息。前沿分析法(frontal analysis)是测定单组分吸附等温线最可靠的方法之一^[38]。该法通过突破实验(breakthrough experiment)进行:首先以不含底物的流动相平衡色谱柱,再泵进添加最低浓度底物的流动相,待稳定的平台出现后再泵进含次低浓度底物的流动相,以此类推出现一个个的平台峰,直到含底物最多的流动相;最后用不含底物的流动相冲洗色谱柱,再在不同的温度下重复上述实验,处理突破峰即可求得流动相中不同底物浓度时固定相的吸附容量,拟合两者关系(吸附等温模型)可求得固定相对

溶质的吸附容量、键合能及平衡常数等参数,从而判断吸附保留行为^[39]。

3种单组分吸附模型常被用于吸附数据的拟合,分别为 Langmuir 模型、双 Langmuir 模型及 Freundlich 模型,分别以式子表示为:

$$q(C) = aC/(1 + bC) \quad (14)$$

$$q(C) = a_1 C/(1 + b_1 C) + a_2 C/(1 + b_2 C) \quad (15)$$

$$q(C) = aC^{1/n} \quad (16)$$

$q(C)$ 表示当流动相中底物浓度为 C , 吸附达平衡时固定相中底物的浓度, a 、 b 、 n 为常数。 a 即吸附平衡时对应的热力学平衡常数 K , b 衡量吸附位对底物的结合能大小, a/b 即饱和吸附容量 q_s 。Langmuir 模型适用于固定相只有一种吸附位的情况。双 Langmuir 模型是讨论非均一表面的最简单模型,可用于讨论手性固定相的吸附行为,表达式中的两项分别对应手性识别位和非手性识别位的贡献。拟合吸附模型可以判断固定相的均匀度^[40]。这些吸附模型都暗示吸附质之间的相互作用可以忽略或相对吸附质-吸附剂之间的作用小,即单层吸附的情况。Guiochon 等^[31]对更广泛的吸附等温模型进行了讨论分类。

通过拟合吸附等温线可求得各温度时对应的平衡常数 $K(a)$, 由公式

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -RT \ln a \quad (17)$$

即可求得 ΔG^0 , 根据公式

$$\frac{\partial(\ln K)}{\partial\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \quad (18)$$

由 $\ln K - 1/T$ 图的斜率可求得焓变 ΔH^0 , 由式(1)可求得 ΔS^0 , 符合双 Langmuir 模型的可分别求得不同吸附位的热力学函数^[31]。

2.2 实验研究

Guiochon 等^[41]利用前沿分析法探讨了苯丙氨酸衍生物 PA 在 L-PA 印迹 CSP 上的保留及拆分机理,发现吸附数据与双 Langmuir 模型及 Freundlich 模型吻合得都很好。从拟合双 Langmuir 模型得出的系数表明高键合能位对印迹 L-PA 显示出高的选择性,而对 D-PA 的饱和吸附容量低。高键合能吸附位对两对映体的饱和吸附容量都较低。从突破曲线可求得色谱保留过程的传质速率常数, L-PA 随样品浓度的升高增加很快,而 D 构型只有微小的增加。L-PA 在低浓度时质量转移速率低与其主要与高键合能位作用有关。

利用该法研究心得安药物在负载纤维素酶

CBH I 手性固定相上的拆分机理发现^[34], 吸附平衡数据和双 Langmuir 模型符合得很好, 表达式中的一项相应的参数 a 、 b 对两个构型底物基本一致, 对应非手性识别位, 位点多饱和容量高, 结合能小质量转移速率快。吸附容量受温度的影响不大, 说明温度对非手性识别位构型的影响不显著。另一项对应手性识别位, 只具有低的单层吸附容量, 结合能大质量转移速率慢。温度升高, R 构型在 CSP 上的饱和吸附容量降低, 说明是放热过程, 与线性色谱条件下保留因子随温度的变化趋势相同。 S 构型在高浓度区域的变化趋势与 R 构型相同, 而在低浓度区域却随温度的升高而升高, 说明为吸热过程, 与色谱实验相符, 吸附等温线转折处的浓度约为 0.025 mmol/L。由不同温度时的吸附等温数据可求得两种选择位与底物作用的焓变和熵变。当 pH 值为 5.5 时, 非手性识别位对二异构体的作用焓变和熵变分别为 -1.1 kcal/mol 和 0.1 cal/(mol·K), 而手性识别位对 R 构型心得安的作用焓变和熵变为 -1.9 kcal/mol 和 -2.6 cal/(mol K), 对 S 构型的为 1.6 kcal/mol 和 11.6 cal/(mol K)。这就解释了为什么在该 pH 值时前出峰异构体的保留时间随温度的升高而降低, 而后出峰异构体的保留时间却随温度的升高而升高, 从而导致分离因子随温度的升高而快速增加。 S 构型异构体保留过程对应的高熵变值使少见的吸热保留机制可以发生。

高的熵变值说明 S 构型异构体在手性选择位点上的吸附打乱了原先围绕在溶质及 CSP 周围水分子的有序性, 而 R 构型异构体在手性选择位点上的吸附及两对映体在非手性选择位点上的吸附对去溶剂化程度的影响较小。认为 S 构型异构体与蛋白质手性选择位点结构符合很好, 进入蛋白质的内部隧道, 从而挤出了较多的溶剂分子。

更广泛的 pH 范围内拟合吸附等温数据得到的双 Langmuir 参数表明, pH 值增加, 非手性识别位点增加; R 构型的对映选择位点增加, 但 S 构型的基本不变; 手性识别位对 R 构型的作用能基本不变, 但对 S 构型增加显著。线性色谱条件下分离因子随 pH 值的升高而升高。在研究的 pH 值范围内^[45], 底物氨基呈质子化的正电状态, pH 值的增加提高了固定相中带负电荷官能团的数量, 从而使底物与固定相间的离子作用增强。这种影响说明了离子作用的重要性^[42, 43]。

X 射线晶体分析进一步证实, CBH I 手性固定相的手性识别位即它的酶催化活性位, 由几个 α 螺

旋和 β 折叠单元构成一个长约 40 Å 的隧道, 底物可高选择性地进入隧道中。隧道周围的羧基基团起重要作用, 其中谷氨酸残基的两个羧基基团分别位于底物质子化氨基的两侧, 可与底物形成两个强的离子对作用, 而合适位置上的两个色氨酸残基可与底物形成憎水作用。pH 值影响活性位中两个羧基基团的离子化程度, 使 S 构型与活性位的作用增强。而 R 构型与活性位符合不是很好, 故羧基基团离子化的增加对其键合常数的影响小, 只是增加了作用位而已。

与纤维素型 CSP 的吸附等温线数据比较发现, 纤维素型 CSP 手性识别位的饱和吸附容量明显比蛋白质型的大, 更适用于制备分离, 但蛋白质型 CSP 对特定底物的作用能高, 使它的对映选择性更高。

将前沿分析法得到的热力学数据与线性色谱条件下得到的热力学数据进行对比, 发现后者数据大致可看作非线性色谱条件下两种识别位对应热力学参数的平均值。线性色谱条件下得到的热力学数据没有将手性作用和非手性作用分开讨论, 不能很好地阐释手性识别机理。

Loun 等^[44] 利用前沿分析法研究了华法令在负载人血清白蛋白(HSA)上的键合行为, 证实两异构体在该 CSP 上只有一种键合位(即“华法令阿扎丙酮”位), 键合位点都较少, R 构型较 S 构型的多些, 可能是因为两种构型华法令和键合位中的不同氨基基团作用的缘故。 S 构型的键合常数比 R 构型的大, 温度升高差别减小。从键合常数与温度之间的关系可求得吸附过程的热力学参数值, 37 °C 时两异构体对应的吸附自由能变 ΔG^0 基本一致, 但 R 构型的吸附伴随较大的熵变, 暗示在键合过程中有更多的溶剂分子被释放出来, 这与 R 构型与 HSA 键合位的内部吸附模型相符。 S 构型的吸附放热较大 ($-\Delta H^0$ 值大), 说明其与 HSA 的分子间作用力更强, 可能是氢键作用、静电作用等存在差异的原因。

前沿分析法得益于 HPLC 高压溶剂输送系统的可靠方便, 可以得到较精确的热力学、动力学数据, 但较费时费试剂。利用前沿分析法研究双组分或多组分的竞争吸附作用更为麻烦^[45]。Cavazzini 等^[46] 利用竞争前沿分析法研究了 1-苯基-1-丙醇在纤维素三苯甲酸酯上的吸附行为。吸附数据与 Langmuir、双 Langmuir、Langmuir-Freundlich 及 Tóth 竞争吸附等温模型符合得都很好, 尤其是后两者。结合动力学模型模拟了柱过载时的色谱峰形, 与实验图形相符。该研究有利于制备型色谱拆分的进行。

干扰法(perturbation method)也可用来分开对映选择作用和非对映选择作用。该法通过向不同浓度底物平衡后的色谱柱中注入样品,通过建立干扰峰的保留时间与流动相中底物浓度之间的关系,求得 CSP 中不同吸附位对应的吸附热力学数据(如饱和吸附容量、吸附能等),从而分开两种吸附位对保留及手性拆分的贡献。从不同吸附位的保留因子与温度之间的关系可求得对应的吸附焓变和熵变值。André 等^[47]利用干扰法研究了苯氧异丙酸类除草剂在 teicoplanin 型手性固定相上的保留及拆分机理,发现吸附等温数据符合双 Langmuir 等温模型。低亲合能位对应的 van't Hoff 图在所研究的温度范围内呈线性,而高亲合能位的在约 30℃ 时出现转折。对高亲合能位, $\ln \alpha - 1/T$ 图也在 30℃ 时出现转折,说明作用机理在该温度处发生变化且只影响高亲合能位。对低亲合能位,不同构型的底物或苯环上不同位置氯取代的底物,存在焓焓补偿效应,说明在该位的作用机理一致。对高亲合能位,存在两条焓焓补偿拟合直线,各对应两个温度区间。3 条焓焓补偿直线斜率各不同,说明存在 3 种不同的保留机制。低亲合能位的吸附能数据对两异构体近似相等,对应非手性识别位,该位的吸附机制不受温度影响。高亲合能位的吸附能数据对两异构体差别较大,对应手性识别位。

3 展望

液相色谱手性拆分机理研究不仅将促使色谱拆分从经验走向理性,而且还将丰富手性识别研究的内涵。一些理论方法已被发展并应用于手性拆分机理的探讨中,如分子模型法、统计拟合法等^[48,49]。分子模型法应用分子对接技术(docking)及计算机图形学技术,通过量子力学(QM)、分子力学(MM)和分子动力学(MD)方法等给出手性识别的直观模式,但受计算机技术限制一般只适用于相对较小的手性固定相的识别研究,对高分子手性固定相的应用较少。另外,分子模型法尚难于讨论溶剂的影响,一般只模拟手性识别位,非手性识别作用(如无机载体等与底物的作用)常被忽略,计算出的两异构体与 CSP 的作用能差与实验值之间存在差距^[2]。应用于液相色谱手性拆分机理研究的统计拟合法——定量结构-对映保留关系(QSERR)法在底物结构参数的选择上有一定难度,且一般需要系列底物。液相色谱手性拆分机理的热力学方法研究在推导主客体结合过程的热力学函数上较简便,推导出的热力学参数对底

物结构的变化较敏感,研究的温度范围宽,可探讨溶剂的竞争吸附作用,可分开手性识别位与非手性识别位的作用贡献。今后应加强研究拆分过程的热力学效应与动力学效应之间的关系,以期更全面了解主客体之间的作用模式;加强竞争吸附行为研究;加强与分子模型法、QSERR 法及其它实验方法如量热滴定法、紫外-可见光谱滴定法、NMR 滴定法等之间的比较,互动发展,使经典的手性识别“三点作用”模型^[50]等理论更趋理性化、量化。

参 考 文 献

- [1] Persson B A, Andersson S. J. Chromatogr. A, 2001, 906: 195-203
- [2] O'Brien T, Crocker L, Thompson R, et al. Anal. Chem., 1997, 69: 1999-2007
- [3] Küsters E, Spöndlin C. J. Chromatogr. A, 1996, 737: 333-337
- [4] Goossens J F, Foubin C, Bailly C, et al. Chromatographia, 2004, 59: 305-313
- [5] Pirkle W H, Schreiner J L. J. Org. Chem., 1981, 46(24): 4988-4991
- [6] 严全鸿 (Yan Q H), 吴彩娟 (Wu C J), 任其龙 (Ren Q L) 等. 色谱 (Chinese Journal of Chromatography), 2004, 22(4): 408-411
- [7] 丁国生 (Ding G S), 刘莺 (Liu Y), 王俊德 (Wang J D) 等. 色谱 (Chinese Journal of Chromatography), 2004, 22(4): 386-389
- [8] 刘月启 (Liu Y Q), 刘霞 (Liu X), 蒋生祥 (Jiang S X) 等. 化学学报 (Acta Chim. Sinica), 2000, 58(11): 1424-1428
- [9] Michaud M, Jourdan E, Ravelet C, et al. Anal. Chem., 2004, 76(4): 1015-1020
- [10] 孟子晖 (Meng Z H), 周良模 (Zhou L M), 王进防 (Wang J F) 等. 分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.), 2000, 28(8): 1017-1020
- [11] 王进防 (Wang J F), 周良模 (Zhou L M), 刘学良 (Liu X L) 等. 高等学校化学学报 (Chem. J. Chinese U.), 2000, 21(6): 930-933
- [12] 孙瑞丰 (Sun R F), 于慧敏 (Yu H M), 沈忠耀 (Shen Z Y) 等. 化学学报 (Acta Chimica Sinica), 2005, 63(3): 189-195
- [13] Pirkle W H, Readnour R S. Anal. Chem., 1991, 63(1): 16-20
- [14] Galli B, Gasparini F, Misiti D, et al. J. Chromatogr. A, 1994, 666: 77-89
- [15] Küsters E, Loux V, Schmid E. J. Chromatogr. A, 1994, 666: 421-432
- [16] Grilli R, Del Giudice M R, Ferretti R, et al. J. Chromatogr. A, 2001, 923: 27-36
- [17] Sringham R W, Blackwell J A. Anal. Chem., 1997, 69(7): 1414-1420
- [18] Grilli R, La Torre F. J. Chromatogr. A, 1998, 818: 53-60

- [19] Weng W, Wang Q H, Yao B X, et al. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1042: 81—87
- [20] Weng W, Zeng Q L, Yao B X, et al. *Chromatographia*, 2005, 61: 561—566
- [21] 翁文 (Weng W), 姚碧霞 (Yao B X), 尤秀丽 (You X L) 等. *应用化学 (Chinese J. Appl. Chem.)*, 2004, 21 (8): 853—855
- [22] Schurig V, Ossig J, Link R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1989, 28 (2): 194—196
- [23] Schurig V, Betschinger F. *Chem. Rev.*, 1992, 92: 873—888
- [24] Rekharsky M, Inoue Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122(18): 4418—4435
- [25] Péter A, Török G, Armstrong D W, et al. *J. Chromatogr. A*, 1998, 828: 177—190
- [26] Slama I, Jourdan E, Villet A, et al. *Chromatographia*, 2003, 58: 399—404
- [27] André C, Thomassin M, Robert J F, et al. *Chromatographia*, 2005, 61: 549—553
- [28] Booth T D, Wainer I W. *J. Chromatogr. A*, 1996, 741: 205—211
- [29] Danel C, Foulon C, Park C, et al. *Chromatographia*, 2004, 59: 181—188
- [30] Kazusaki M, Shoda T, Kawabata H, et al. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, 2001, 24 (2): 141—145
- [31] Oberleitner W R, Maier N M, Lindner W. *J. Chromatogr. A*, 2002, 960: 97—108
- [32] Špánik I, Krupčík J, Schurig V. *J. Chromatogr. A*, 1999, 843: 123—128
- [33] Gilpin R K, Ehtesham S E, Gregory R B. *Anal. Chem.*, 1991, 63(24): 2825—2828
- [34] Fomstedt T, Sajoz P, Guiochon G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 1254—1264
- [35] Schurig V, Schmidt R. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000: 311—324
- [36] Schurig V. *J. Chromatogr. A*, 2001, 906: 275—299
- [37] Jung M, Schmalzing D, Schurig V. *J. Chromatogr. A*, 1991, 552: 43—57
- [38] Gritti F, Felinger A, Guiochon G. *Chromatographia*, 2004, 60: S3—S12
- [39] Li H, Nie L H, Yao S Z. *Chromatographia*, 2004, 60: 425—431
- [40] Yang G, Wang D, Li Z, et al. *Chromatographia*, 2003, 58: 53—58
- [41] Sajoz P, Kele M, Zhong G M, et al. *J. Chromatogr. A*, 1998, 810: 1—17
- [42] Fomstedt T, Götmár G, Andersson M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121: 1164—1174
- [43] Fomstedt T, Guiochon G. *Thermochemica Acta*, 2003, 398: 73—74
- [44] Loun B, Hage D S. *Anal. Chem.*, 1994, 66(21): 3814—3822
- [45] Fomstedt T, Guiochon G. *Anal. Chem.*, 2001, 73 (21): 608A—617A
- [46] Cavazzini A, Kaczmarski K, Szabelski P, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5704—5715
- [47] André C, Guillaume Y C. *Chromatographia*, 2003, 58: 201—206
- [48] Lipkowitz K B. *J. Chromatogr. A*, 1995, 694: 15—37
- [49] 高如瑜 (Gao R Y), 王荷芳 (Wang H F). *有机化学 (Chinese J. Org. Chem.)*, 1999, 19: 135—140
- [50] Pirkle W H, House D W, Finn J M. *J. Chromatogr.*, 1980, 192: 143—158