

## L-异亮氨酸型配体交换固定相对 DL-氨基酸的拆分研究

黄晓佳<sup>1</sup>, 王秋泉<sup>1</sup>, 王俊德<sup>2</sup>, 黄本立<sup>1</sup>

(1. 厦门大学化学系 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 用自制的新型 L-异亮氨酸配体交换固定相在配体交换模式下对 11 种 DL-氨基酸进行了拆分研究, 详细考察了流动相中铜离子浓度、甲醇含量、流速及温度对拆分效果的影响, 并探讨了可能的拆分机理。研究结果表明: 流动相中高浓度的铜离子不利于 DL-氨基酸的拆分; 增加流动相中甲醇的含量, 降低流动相流速以及提高色谱柱温度均可改善拆分效果。

**关键词:** 手性配体交换色谱; 手性固定相; L-异亮氨酸; DL-氨基酸; 对映体分离

**中图分类号:** O658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-8713(2005)02-0172-04

## Study of Enantiomeric Separation of DL-Amino Acids on L-Isoleucine-Type Chiral Ligand-Exchange Stationary Phase

HUANG Xiaojia<sup>1</sup>, WANG Qi quan<sup>1</sup>, WANG Junde<sup>2</sup>, HUANG Benli<sup>1</sup>

(1. The Key Laboratory of Analytical Science of Ministry of Education, Department of Chemistry,

Xiam en University, Xiam en 361005, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics,

The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract** Some underivatized DL-amino acid enantiomers were separated on L-isoleucine-type chiral ligand-exchange stationary phase (EILE). The effects of contents of copper ion and methanol in mobile phase, temperature of column and flow rate of eluent on the efficiency and resolution of DL-amino acids were investigated in detail. The results showed that Cu( ) ion played an important role in the separation. When there was no Cu( ) ion in mobile phase, the DL-amino acids could not be enantio-separated, while the content of Cu( ) increased from 0.3 mmol/L to 1.2 mmol/L, the efficiency of resolution and retention time decreased. The increases of the content of methanol and column temperature are in favor of the resolution for most of DL-amino acids. The flow rate also affected the resolution results. Good results could be obtained in reducing flow rate but it prolongs the retention time. The mechanisms of different chiral separation results on the new stationary phase under different conditions were also investigated.

**Key words** chiral ligand-exchange chromatography; chiral stationary phase; L-isoleucine; DL-amino acids; enantiomeric separation

DL-氨基酸的分离是生命科学的基础, 在蛋白质多肽的研究、有机化学中的不对称合成以及医药、食品、卫生等领域的研究中都具有重要意义。目前, 配体交换色谱 (LEC) 法已成为拆分未衍生化 DL-氨基酸的最简便有效的方法<sup>[1, 2]</sup>。配体交换色谱法可分为手性固定相配体交换色谱法和手性流动相配体交换色谱法<sup>[3]</sup>。相比之下, 手性固定相配体交换色谱法具有使用方便、分离样品种类多的优势, 因而受到人们的关注。在众多的手性配体交换固定相中, 所用的手性选择剂大多具有刚性环状结构, 如

脯氨酸、羟脯氨酸<sup>[4-6]</sup>、(S)-1, 2, 3, 4-四氢-3-异喹啉羧酸<sup>[7, 8]</sup>等, 但这些固定相对 DL-氨基酸的分离时间较长, 且需在 50 °C 的高温下进行分离, 这对色谱柱的使用寿命有很大的影响。我们曾报道了以分子中不具有刚性环状结构的 L-异亮氨酸为手性选择剂, 通过  $\beta$ -(3, 4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷键合到硅胶上制得 L-异亮氨酸型手性配体交换固定相 (EILE), 并在配体交换模式下实现了对 11 种 DL-氨基酸的快速拆分<sup>[9]</sup>。本工作进一步考察了流动相中铜离子浓度、甲醇含量及流动相的流速、色谱柱的

温度对拆分效果的影响,并探讨了可能的拆分机理。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Kromasil-5  $\mu\text{m}$  硅球 (瑞典 Eka Nobel 公司, 孔径 10 nm, 比表面积  $340 \text{ m}^2/\text{g}$ ),  $\beta$ -(3,4-环氧环己基)乙基三甲氧基硅烷 ( $\beta$ -ECTS) (纯度 98%, Fluck 公司),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (分析纯, 沈阳试剂三厂), 甲醇 (色谱纯, 山东禹城化工厂), 水 (二次蒸馏, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤)。实验中所用的 DL-氨基酸均购自美国 Sigma 公司, 其他试剂皆为分析纯。

高效液相色谱 (HPLC) 系统由日本岛津公司的 LC-10AD 泵和 SPD-10A 多波长紫外分光检测器、Rheodyne 7125 进样阀及江申色谱工作站 JS-3000 组成。柱温由循环水浴控制 (4SK15A-A Japan)。

### 1.2 EILE 固定相的制备

EILE 固定相的制备及表征见文献 [9], 最后的配体交换固定相结构式如图 1 所示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相中 $\text{Cu}(\text{II})$ 浓度的影响

流动相中  $\text{Cu}(\text{II})$  浓度对 DL-氨基酸的手性分离有较大的影响, 其结果如表 1 所列。从表 1 中数据可见, 流动相中没有  $\text{Cu}(\text{II})$  时, D 型和 L 型同时在较短时间内被洗脱而没有得到拆分; 而当流动

相中有一定浓度的  $\text{Cu}(\text{II})$  存在时, DL-氨基酸得到了分离, 这说明所制备的 EILE 固定相是在配体交换模式下对 DL-氨基酸进行手性拆分的。当  $\text{Cu}(\text{II})$  浓度从 0.3 mmol/L 升高到 1.2 mmol/L 时, DL-氨基酸保留时间变短, 同时拆分效果变差 (DL-Phe 除外), 在  $\text{Cu}(\text{II})$  浓度为 1.2 mmol/L 时, 一些 DL-氨基酸没有得到拆分。这是因为当流动相中  $\text{Cu}(\text{II})$  浓度增加时, 待拆分的 DL-氨基酸进入色谱柱后, 先与流动相中的  $\text{Cu}(\text{II})$  形成配合物而难以进入固定相进行配体交换, 因此保留时间变短, 拆分效果下降。

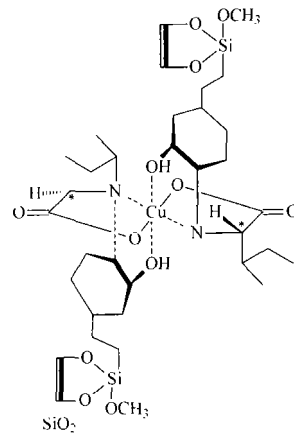


图 1 EILE 的结构示意图

Fig 1 The structure of L-isoleucine-type chiral ligand-exchange stationary phase (EILE)

表 1 铜离子浓度对 DL-氨基酸拆分的影响

Table 1 Effect of  $\text{Cu}(\text{II})$  concentrations separation on enantiomeric separation of DL-amino acids

Sample	$c(\text{Cu}(\text{II})) = 0$			$c(\text{Cu}(\text{II})) = 0.3 \text{ mmol/L}$			$c(\text{Cu}(\text{II})) = 0.6 \text{ mmol/L}$			$c(\text{Cu}(\text{II})) = 0.9 \text{ mmol/L}$			$c(\text{Cu}(\text{II})) = 1.2 \text{ mmol/L}$		
	$k_L$	$\alpha$	$R_S$	$k_L$	$\alpha$	$R_S$	$k_L$	$\alpha$	$R_S$	$k_L$	$\alpha$	$R_S$	$k_L$	$\alpha$	$R_S$
DL-Met	0.42	1	0	1.18	1.32	0.88	0.78	1	0	0.62	1	0	0.48	1	0
DL-Ser	0.12	1	0	0.68	1.52	1.06	0.65	1.52	1.06	0.53	1.49	0.79	0.51	1.47	0.56
DL-Thr	0.13	1	0	1.12	1.42	1.16	0.88	1.39	0.87	0.55	1	0	0.47	1	0
DL-Phe	0.48	1	0	2.84	1.88	1.47	1.67	1.87	1.73	1.54	2.20	2.26	1.50	2.79	2.75
DL-Try	1.16	1	0	7.34	1.61	1.53	7.69	1.72	1.53	6.74	1.68	1.37	6.46	1.63	1.23
DL-Ile	0.24	1	0	1.10	1.76	0.87	0.85	1.38	0.42	0.57	1	0	0.49	1	0
DL-Asn	0.21	1	0	0.87	1.44	0.95	0.74	1.43	0.72	0.58	1.37	0.60	0.39	1	0
DL-Val	0.18	1	0	0.78	1.67	1.05	0.74	1.58	0.93	0.62	1.46	0.85	0.39	1	0
DL-Asp	0.38	1	0	0.77	1.20	0.85	0.69	1.12	0.71	0.50	1	0	0.11	1	0
DL-Orn	0.28	1	0	0.64	1.29	0.96	0.56	1.29	0.89	0.49	1.28	0.87	0.44	1.20	0.51
DL-His	0.24	1	0	2.72	2.63	2.54	1.97	2.32	1.98	1.59	2.18	1.03	1.37	1.54	0.78

Conditions: mobile phase: 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  containing different concentrations of  $\text{CuSO}_4$ ; flow rate: 0.7 mL/min; column temperature: 20  $^\circ\text{C}$ ; detection wavelength: 223 nm.

\* Orn: ornithine monohydrochloride

### 2.2 流动相中甲醇含量的影响

流动相中甲醇含量对 EILE 固定相拆分 DL-氨基酸能力的影响如表 2 所示。实验结果表明, 与通常疏水作用力表现的规律相反, 随着流动相中甲醇含量的增加, DL-氨基酸的保留因子增加 (DL-His 和 DL-Orn 除外), 同时分离度有所提高 (DL-Met 和 DL-

Phe, DL-Asn 和 DL-His 除外)。这可能是由于 DL-氨基酸进入色谱柱后, 先与流动相中的水分子和铜离子形成六配位化合物, 然后再与固定相进行配体交换。流动相中甲醇含量增加时, 相应的流动相中的水分子减少, 难以形成六配位化合物, 使得 DL-氨基酸较容易与固定相中的配体产生交换作用, 从而表

表 2 流动相中甲醇含量对 DL-氨基酸拆分的影响

Table 2 Effect of the content of methanol in mobile phase on enantiomeric separation of DL-amino acids

Sample	$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 5\%$			$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 10\%$			$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 15\%$		
	$k_L$	$\alpha$	$R_s$	$k_L$	$\alpha$	$R_s$	$k_L$	$\alpha$	$R_s$
DL-Met	1.30	1.36	0.95	1.33	1.36	0.90	2.18	1.38	0.91
DL-Ser	0.81	1.56	1.08	0.93	1.57	1.07	1.45	1.58	1.24
DL-Thr	1.38	1.47	1.24	1.39	1.46	1.23	2.36	1.48	1.33
DL-Phe	2.39	1.57	1.26	2.45	1.56	1.20	3.07	1.59	1.22
DL-Try	7.05	1.67	1.32	7.99	1.71	1.46	10.36	1.73	1.64
DL-Ile	1.15	1.82	1.20	1.22	1.82	1.26	1.69	1.98	1.23
DL-Asn	1.13	1.50	1.08	1.28	1.48	1.05	1.99	1.50	0.91
DL-Val	0.87	1.74	1.13	0.94	1.77	1.11	1.14	1.82	1.20
DL-Asp	0.90	1.18	0.90	0.90	1.18	0.92	1.53	1.21	0.93
DL-Ori	0.81	1.29	0.96	0.77	1.31	0.96	1.19	1.32	0.99
DL-His	4.74	2.85	3.03	4.34	2.84	3.07	7.05	2.42	2.93

Conditions: mobile phase: 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.1 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  containing different contents of methanol. The others are the same as in Table 1.

现出保留时间延长,同时拆分效果变好<sup>[10]</sup>。

### 2.3 温度的影响

EILE在拆分 DL-氨基酸时,拆分能力和拆分效果受温度影响较大,其结果如表 3 所示。从表 3 中数据可见,随着温度的升高,多数 DL-氨基酸的选择因子  $\alpha$  和分离度  $R_s$  都有所增大,峰形变好(见图 2)。这是因为温度升高,流动相粘度降低,传质阻力减少,扩散速度变快,从而使得待分离氨基酸与固定相进行配体交换的速度加快,因此分离效果变

好<sup>[11]</sup>。实验还发现,随着温度的升高,所有氨基酸的保留因子  $k$  缓慢增加。产生这一现象的具体原因还不是很清楚,可能的原因是:一方面,温度升高使得传质阻力减少,扩散速度变快,导致  $k$  下降;但另一方面,温度的升高也使待测的氨基酸进入固定相的机会和速率加大,参与配体交换的氨基酸分子增多且几率增大,而这一过程需要更多的时间;在两方面相反因素作用中,后者占优势,因此总体上使得保留时间延长。

表 3 温度对 DL-氨基酸拆分的影响

Table 3 Effect of temperatures on enantiomeric separation of DL-amino acids

Sample	25 °C			30 °C			35 °C			40 °C		
	$k_L$	$\alpha$	$R_s$	$k_L$	$\alpha$	$R_s$	$k_L$	$\alpha$	$R_s$	$k_L$	$\alpha$	$R_s$
DL-Met	0.82	1.30	0.93	0.87	1.32	0.93	0.96	1.34	0.91	1.06	1.34	0.92
DL-Ser	0.47	1.53	1.02	0.52	1.50	1.03	0.60	1.45	1.03	0.62	1.47	1.08
DL-Thr	0.81	1.45	1.10	0.87	1.43	1.20	0.96	1.44	1.29	1.07	1.41	1.36
DL-Phe	1.74	1.51	1.03	1.85	1.54	1.14	2.06	1.55	1.26	2.39	1.58	1.46
DL-Try	5.07	1.58	1.15	5.32	1.60	1.31	5.64	1.59	1.55	5.97	1.60	1.74
DL-Ile	0.72	1.61	0.98	0.78	1.66	1.06	0.94	1.68	1.20	1.05	1.69	1.36
DL-Asn	0.65	1.47	0.98	0.72	1.44	1.00	0.82	1.41	1.01	0.86	1.41	1.04
DL-Val	0.52	1.61	1.03	0.55	1.64	1.06	0.68	1.61	1.16	0.72	1.69	1.21
DL-Asp	0.51	1.17	0.84	0.54	1.17	0.85	0.63	1.16	0.88	0.69	1.17	0.90
DL-Ori	0.45	1.26	0.96	0.51	1.26	0.96	0.58	1.25	0.96	0.61	1.27	1.00
DL-His	1.52	1.68	0.97	1.61	1.66	1.04	1.81	1.65	1.03	2.03	1.63	1.04

Conditions: mobile phase: 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -0.1 mmol/L  $\text{CuSO}_4$ . The others are the same as in Table 1.

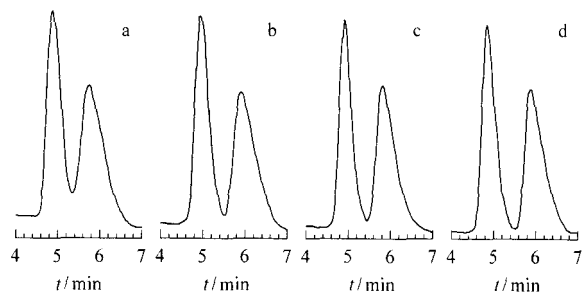


图 2 温度对 DL-苏氨酸拆分效果的影响

Fig 2 Effect of temperature on enantiomeric separation of DL-Thr

a 25 °C; b 30 °C; c 35 °C; d 40 °C.

### 2.4 流速的影响

流速对拆分效果也有较大影响。流速越低,拆分效果越好,但所需时间也越长。如当流速从 0.2 mL/min 增加到 0.8 mL/min 时, DL-Ile 的分离度  $R_s$  从 1.29 降到 0.95。这是因为流速越低,配体交换色谱动力学过程相对越慢,这有利于配体的充分交换,因而拆分效果变好<sup>[12]</sup>;反之,流速增加,待拆分氨基酸与固定相之间进行的配体交换不充分,使得拆分效果变差。由图 3 可以看出流速对 DL-异亮氨酸拆分效果的影响。

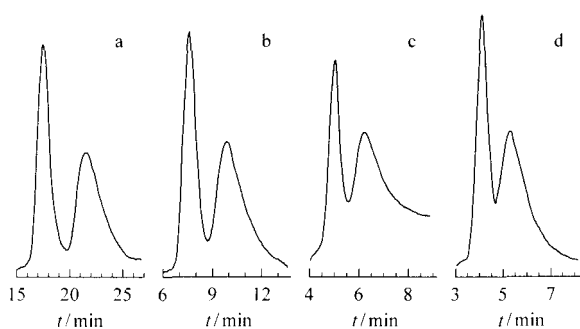


图 3 流速对 DL-异亮氨酸拆分效果的影响

Fig 3 Effect of different flow rates on enantiomeric separation of DL-Ile

Conditions: column temperature, 20 °C. The others are the same as in Table 3

a 0.2 mL/min; b 0.4 mL/min; c 0.6 mL/min; d 0.8 mL/min

### 3 小结

本文主要报道了自制的新型配体交换固定相对 11 种 DL-氨基酸的拆分, 详细考察了各种条件对拆分效果的影响。研究表明, 流动相中铜离子的存在有利于氨基酸的手性拆分, 但增加铜离子的浓度会导致分离效果下降; 增加流动相中甲醇的含量和降低流动相的流速、提高温度等均有利于 DL-氨基酸的拆分, 但同时保留时间有所延长。

### 参考文献:

- [1] Rogozhin S, Davankov V. GP 1932190 1970
- [2] Davankov V A, Kurganov A A, Bochkov A S. Adv Chrom atogr 1983 22 71
- [3] Davankov V A, Kurganov A A, Ponomareva T M. J Chrom atogr 1988 452 309
- [4] Gubitz G, Volmann B, Cannazza G, Schmid M G. J Liq Chrom Rel Technol 1996, 19(17-18): 2933
- [5] Gubitz G, Miheljes S, Kobinger G, Wutte A. J Chrom atogr A 1994, 666 91
- [6] Huang Tianbao, Chen Tao, Long Yuande. Chinese Journal of Analytical Chemistry (黄天宝, 陈涛, 龙远德. 分析化学), 1996 24(6): 709
- [7] Wang Qunbiao, Long Yuande, Huang Tianbao. Chinese Journal of Chromatography (王群标, 龙远德, 黄天宝. 色谱), 2000 18(2): 112
- [8] Long Yuande, Wang Qunbiao, Huang Tianbao. Chemical Journal of Chinese Universities (龙远德, 王群标, 黄天宝. 高等学校化学学报), 2001, 22(4): 566
- [9] Huang Xiaojia, Ding Guosheng, Wang Junde, Liu Xueliang. Chinese Journal of Chromatography (黄晓佳, 丁国生, 王俊德, 刘学良. 色谱), 2003 21(3): 230
- [10] Davankov V A, Navratil J D, Walton H F. Ligand Exchange Chrom atography. Boca Raton, FL (USA): CRC Press Inc, 1988 240
- [11] Davankov V. J Chrom atogr A 1994 666 55