



学 校 代 码 10459

学号或申请号 201212232638

密 级

郑 州 大 学

硕 士 学 位 论 文

氨基酸配体交换型手性固定相的合成
及其应用

作 者 姓 名：黄德友

导 师 姓 名：蒋登高 教授

学 科 门 类：工 学

专 业 名 称：化学工程

培 养 院 系：化工与能源学院

完 成 时 间：2015 年 5 月



学号或申请号 201212232638

密 级

郑 州 大 学

硕 士 学 位 论 文

氨基酸配体交换型手性固定相的合成
及其应用

作 者 姓 名：黄德友

导 师 姓 名：蒋登高 教授

学 科 门 类：工 学

专 业 名 称：化学工程

培 养 院 系：化工与能源学院

完 成 时 间：2015 年 5 月

A thesis submitted to
Zhengzhou University
for the degree of Master

Synthesis and Application of Amino Acid Chiral
Ligand-Exchange Chromatography Stationary Phase

By: Deyou Huang

Supervisor: Prof. Denggao Jiang

chemical engineering

School of Chemical Engineering and Energy

May 2015

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者：黄德友

日期：2015年5月27日

学位论文使用授权声明

本人在导师指导下完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属郑州大学。根据郑州大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权郑州大学可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为郑州大学。保密论文在解密后应遵守此规定。

学位论文作者：黄德友

日期：2015年5月27日

摘要

生命科学研究发现不同对映体之间在生物体内存在不同的生理活性和药理活性，手性拆分实现对映体的分离其意义在于探究其药理、毒理活性并制备低毒、低副作用的药物。到目前为止，色谱法是拆分外消旋体最有效的方法之一，而手性配体交换色谱法是色谱法中拆分未衍生化氨基酸最有效的手段，并且配体交换色谱法由于具有较强的环保性和较好的经济性而得到较为广泛的应用。

本文以手性识别能力较强的 L-苯丙氨酸和 L-脯氨酸为手性源，选择较强硬度和耐酸性的硅胶为固定相载体，选择 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂和特殊三角结构的三聚氯氰为连接臂，利用化学键合法合成出两种新型的双齿型氨基酸手性配体交换色谱固定相—L-苯丙氨酸配体交换手性固定相(CSP-1)和 L-脯氨酸配体交换手性固定相(CSP-2)，并得到了两种手性固定相的具体合成工艺条件。进而通过元素分析、热重分析以及红外分析对固定相进行了定性和定量表征，所得数据表明新型固定相 CSP-1 和 CSP-2 合成是成功的。

利用所合成的固定相 CSP-1 成功拆分了五种对映体，分别是：DL-氯苯那敏、DL-色氨酸、DL-苹果酸、DL-缬氨酸和 DL-异亮氨酸。为探索较佳的拆分条件，考察了金属离子的种类和浓度，缓冲溶液的种类和浓度，流动相的流速和 pH 值对 CSP-1 拆分效果的影响。实验得到铜离子作为中心金属离子和磷酸盐作为缓冲溶液，且磷酸盐缓冲溶液为 0.02 mol/L 时拆分效果较好，但不同对映体拆分时其流动相的流速是不同的，以异亮氨酸为研究对象，得到流动相 pH 对拆分效果也有影响。根据 CSP-1 的拆分经验，探讨了 CSP-2 对氯苯那敏拆分影响因素，得到较佳拆分条件是：铜离子浓度 0.7 mmol/L、缓冲溶液浓度 0.01 mol/L、流动相 pH=7.0 和柱温 35 °C，在此条件下氯苯那敏的分离度 $R=2.85$ ，超过标准分离度。

在合成出的两种固定相中，CSP-2 对拆分手性药物氯苯那敏的效果优于 CSP-1，而 CSP-1 在拆分对映体的数量上要优于 CSP-2。

关键词：L-苯丙氨酸；L-脯氨酸；手性配体交换色谱固定相；拆分

Abstract

Through the study of life sciences, people found the enantiomers have different physiological and pharmacological activity in a living body. The significance of chiral separation is to explore pharmacological and toxicological activity of drugs, and to prepare drugs of low toxicity and low side-effect. In the current the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has become the most effective way to separate chiral Drugs. The chiral ligand exchange chromatography stationary phase is the most effective means of separating underivatized amino acids, and is used widely for its environmental protection and better economy.

In this article, two new bonded chiral ligand-exchange chromatography stationary phases of L-phenylalanine chiral ligand-exchange chromatography stationary phase (CSP-1) and L-proline chiral ligand-exchange chromatography stationary phase (CSP-2) had been synthesized by using 3-aminopropyl triethoxysilane reagent and trigonal cyanuric chloride as the link arm, and using silica gel as the carrier. We also got specific conditions of synthesizing the two chiral stationary phase. Then the chiral stationary phases were characterized by elemental analysis, thermal analysis and infrared analysis, and the experimental data showed the new stationary phase of CSP-1 and CSP-2 is success to synthesis.

The CSP-1 has separated five pairs of enantiomers: DL-Malic acid, DL-Isoleucine, DL-Tryptophan, DL-Valine and DL-Chlorpheniramine. The effect of resolution on the type and concentration of the metal ions and the buffer solution, flow rate and pH of the mobile phase were systematically investigated in the two stationary phase that have already synthesized. Through the experiments we obtained the central metal ion of copper ions and phosphate buffer solution is the best choice, and the preferable concentration of phosphate buffer solution is 0.02mol/L. But when separating different enantiomers, the flow rates of mobile phase are different. We obtained the pH has effects on enantioseparation by studying the amino acids of isoleucine. Based on the experience of separation of CSP-1, the effect of separating

chlorpheniramine was systematically investigated by using CSP-2. The better conditions of separation of CSP-2: the concentration of copper ion is 0.7mmol/L, the concentration of buffer concentration is 0.01mol/L, the pH of mobile phase is 7.0 and the temperature of column is 35 °C. Under these conditions, the separation of chlorpheniramine is $R = 2.85$, and is higher than the standard resolution.

In the two stationary phases, CSP-2 is better than CSP-1 on enantioseparation of chlorpheniramine, but in the number of separating enantiomers the CSP-1 is superior the CSP-2.

Key Words: L-phenylalanine; L-proline; chiral ligand-exchange chromatography stationary phase; separat

目录

摘要	I
Abstract.....	II
目录	IV
1 绪论	1
1.1 手性拆分的意义.....	1
1.2 手性拆分方法.....	2
1.2.1 结晶拆分法	2
1.2.2 化学拆分法	3
1.2.3 微生物酶拆分法	3
1.2.4 膜技术拆分法	4
1.2.5 色谱拆分法	4
1.3 氨基酸类手性固定相.....	5
1.3.1 刷型手性固定相	6
1.3.2 手性配体交换型手性固定相.....	8
1.3.3 多肽手性固定相	10
1.3.4 其它含氨基酸的手性固定相.....	14
1.4 本文研究内容及意义.....	14
2 CSP-1 的合成及其拆分性能.....	16
2.1 实验试剂和仪器.....	17
2.2 CSP-1 的合成	18
2.2.1 硅胶的表面处理、活化和除水.....	19

2.2.2 氨丙基硅胶(APS)的合成.....	20
2.2.3 APS-三聚氯氰的合成.....	21
2.2.4 苯丙氨酸钠盐的合成.....	21
2.2.5 CSP-1 的合成.....	22
2.3 CSP-1 的表征.....	22
2.3.1 APS 的表征.....	22
2.3.2 APS-三聚氯氰的表征.....	23
2.3.3 苯丙氨酸钠盐的表征.....	24
2.3.4 终产物 CSP-1 的表征.....	25
2.4 CSP-1 拆分性能研究.....	26
2.4.1 HPLC 色谱条件和分离参数.....	26
2.4.2 装柱和柱子的预处理.....	27
2.4.3 CSP-1 拆分影响因素.....	29
2.4.3.1 金属离子种类对拆分效果的影响.....	29
2.4.3.2 Cu^{2+} 浓度对拆分效果的影响.....	30
2.4.3.3 不同种类缓冲溶液对拆分效果的影响.....	32
2.4.3.4 缓冲溶液浓度对拆分效果的影响.....	33
2.4.3.5 流动相 pH 值对拆分效果的影响.....	34
2.4.3.6 流动相流速对拆分效果的影响.....	36
2.5 本章小结.....	36
3 CSP-2 的合成及对氯苯那敏的拆分.....	38
3.1 CSP-2 的合成.....	38
3.2 CSP-2 的表征.....	39
3.2.1 APS 的表征.....	39

3.2.2 APS-三聚氯氰的表征	39
3.2.3 脯氨酸钠盐的表征	39
3.2.4 终产物 CSP-2 的表征	40
3.3 CSP-2 拆分性能研究	42
3.3.1 不同的 Cu^{2+} 浓度对拆分效果的影响	42
3.3.2 缓冲溶液的浓度对拆分效果的影响	43
3.3.3 流动相 pH 值对拆分效果的影响	44
3.3.4 柱温对拆分效果的影响	45
3.4 本章小结	46
4 结论	47
参考文献	49
个人简历、在校期间发表的学术论文	56
致谢	57

1 绪论

1.1 手性拆分的意义

自然界中手性现象是普遍存在的，在天然的产物中手性物质是以单一的对映体形式存在，这种现象称为手性优择(Chiral preference)，手性优择是自然界的一种天然属性。例如：构成生物体内蛋白质的左旋氨基酸，构成生物遗传物质的核酸右旋 DNA，以及新陈代谢中所涉及的酶、受体和载体等都具有相应的手性^[1]。所以当具有手性的物质进入人体内时，将受到人体内手性受体、酶和载体等不同的识别，由于手性物质的 D 型和 L 型或是 S 型和 R 型具有不同的空间结构，在人体的机理作用中对映体之间会有不同的药动学和药效学作用。而外在则表现出不同的生理反应，甚至毒副作用^[2-3]。

发生在上个世纪 60 年代的“反应停”畸形儿事件最能宣示了不同对映体有不同的药理活性，甚至毒副作用。“反应停”的化学名称是沙利度胺(Thalidomide)，其分子中只有一个手性中心，对于孕妇其 R-异构体具有镇静和安眠的作用^[4]，但是其 S-异构体则会致使胎儿畸变。其最终导致的结果是大约有 12000 例的畸形儿出现。此外还有许多类似的手性药物：手性药物青霉素胺，它的 S-异构体是抗关节炎药，但是 R-异构体却是突变剂，在者手性药物乙胺丁醇，它的 S, S-异构体有抗结核菌的作用，而 R, R-异构体却能导致失明。同时还有其他手性药物，如：心得安、酮基布洛芬、氯霉素和多巴酚丁胺等，它们不同的对映体也具有不同的药理活性和生理作用。鉴于此，在 1992 年美国食品药品监督管理局(FDA)规定了手性药物研发的相关政策，要求在美国上市的所有消旋体手性药物，必须对其不同对映体的药理作用做出说明。我国也对手性药物方面的研发和应用做出了相关规定^[5]。近几年，由于酶催化和不对称合成的发展，出现了许多新型的手性药物^[6-7]。由于手性药物较好的医疗作用，使得含有手性中心的手性药物在世界市场中所占的比重不断上升，资料显示，几乎所有的天然药物以及半合成的药物都是手性的，且全世界目前正在合成的药物中至少有三分之二是含有手性中心的。随着手性拆分的不断发展，使得市场上的单一手性对映体药物所占比重逐渐增大，在 1999 年，据统计在世界市场上单一的手性对映体药物达到 1150 亿美元，占当时世界市场药品总额的 32%。2001 年单一对映体药物在世界市场容量为 1470 亿美元，占世界药品市场 4100 亿美元的 36%，2002 年，全球

单一对映体手性药物销售总额为 1600 亿美元^[8]。

尤其是近几年手性药物研究更快、生产周期更短，直接促使单一对映体的手性药物在世界药物市场上所占的份额持续增加。新出现的手性药物所涉及的药动学和药效学更为复杂和广泛，所以进行手性拆分实现对映体的分离其意义在于探究其药理、毒理活性并制备低毒、低副作用的药物。由于手性药物优越的医疗效果和持续增长的市场比重，所以实现对映体的分离和单一对映体药理作用的研究存在巨大的经济效益和社会效益，同时亦可促进与手性有关的化学行业和生物行业的发展。

1.2 手性拆分方法

手性对映体的分离一直都是生物、化学等行业需要迫切解决的技术难题^[9]。尤其是近几年出现了许多新型的手性药物，也从侧面促进了手性分离技术的发展，逐渐发展形成了多种拆分外消旋体的方法，如结晶拆分法、化学拆分法、微生物酶拆分法、膜技术拆分法和色谱拆分法等拆分技术。不同的拆分方法有不同的应用范围，但是其中色谱拆分法由于良好的选择性和在现性成为应用范围最广和最有效的拆分手段。

1.2.1 结晶拆分法

结晶拆分法是利用对应异构体不同的空间结构与自身或是加入的纯对映体产生不同的作用力，从溶液中结晶出来或是先后结晶出来的不同晶体而实现手性对映体分离的方法。手性药物的结晶拆分法按结晶过程的不同可以分为直接结晶法和间接结晶法^[10]。直接结晶法是由 PASTEUR 在 1848 年发现的，通过放大镜，用镊子直接挑选出由外消旋酒石酸盐水溶液结晶出的不同形状的晶体，而实现了外消旋酒石酸盐对映体的拆分，具体的操作过程如图 1.1 所示。在实际的操作中通过直接结晶法而实现对映体分离的外消旋体是非常少的。而间接结晶法是在饱和的外消旋体溶液中加入与之对应的纯的对映体，通过缓慢降温同种的对映体将析出，从而达到手性对映体的分离。间接结晶法相对于直接结晶法具有较广的应用。

结晶拆分法具有操作简单、成本低等优点，并且对有些对映体可实现大规模生产，但是由于自身的局限性，它很难实现广泛的应用。

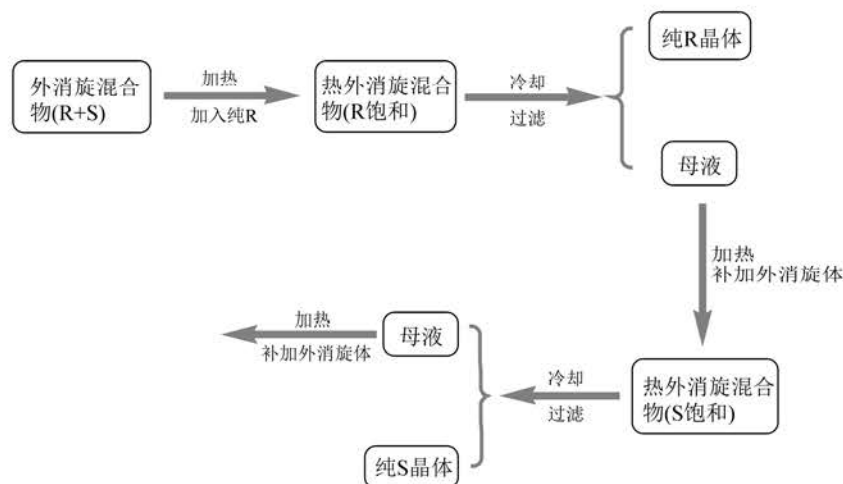


图 1.1 直接结晶法实验过程图

1.2.2 化学拆分法

含有活性官能团的外消旋分子，可与某种手性剂反应生成非对应异构体，由于反应生成的非对应异构体有不同的反应活化能，因而手性剂与各对映体会有不同的反应速度。通过不足量的手性剂反应掉反应快的那部分对映异构体，利用非对映异构体之间不同的化学、物理性质进行分离，之后再将衍生化的对映体还原，这就是化学拆分法。整体上来看化学拆分法更适合于拆分酸或是碱的对映异构体，运用此方法拆分对映体必须找到与之相配的酸或是碱的旋光手性剂，常用的旋光碱有：奎宁、马钱子碱等，常用的旋光酸有：酒石酸、樟脑- β -磺酸等^[11]。

化学拆分法在一些对映体拆分方面得到广泛应用，但是其本身也有一定的限制：（1）所形成的非对应异构体，经过分离后容易还原为原对映体；（2）所生成的非对应异构体本身要有较为明显的物理、化学性质，易于进一步的拆分。

（3）所需的旋光拆分剂廉价且易于回收。化学拆分法整个分离过程冗长且部分对映体产率通常不高，因而难以满足现代手性拆分研究的需要。

1.2.3 微生物酶拆分法

酶具有不对称活性中心以及高度立体专一性，利用此性质可以选择性的与一个对映体发生作用，而与另一对映体不作用或是作用缓慢，从而达到分离手性对映体的目的，这就是微生物酶拆分法。利用氨肽酶成功地分离出制备抗菌素类药物的重要中间体 D-苯基甘氨酸^[12]。用氨肽酶水解醋酐乙酰化的外消旋苯

基甘氨酸，D-构型的酰胺不变，只有 L-N-乙酰化苯基甘氨酸被水解为 L-苯基甘氨酸，至今，用酶法可以拆分绝大多数氨基酸得到旋光纯的对映体。现今广泛应用于手性对映体拆分的酶有：转氨酶、蛋白酶、酯酶、脂肪酶等。

生物酶拆分法反应条件温和，反应温度通常在 0-50℃，并且反应操作简便。最主要的是反应过程无毒无害对环境不会造成污染，可以 100%回收所得单一对映体，因而该方法适合于规模化生产。由于酶筛选困难和生物催化法拆分向有机介质发展等原由，因此微生物酶拆分法也有一定的局限性。

1.2.4 膜技术拆分法

膜拆分技术因其易于连续化控制、耗能低，因而具有大规模工业化生产的潜力。膜分离技术渐渐成为科研工作者研究的热点。膜拆分法可分为液膜拆分法和固膜拆分法两部分^[13-14]，固膜拆分法：待分离的对映体与具有手性识别能力的选择剂通过分子间的空间结构、引力或是斥力相互作用，由于对映体有不同的空间结构，因而不同的对映体与选择剂有不同的作用力，作用力弱的在固相膜上保留的时间短，相对的则较长，从而达到分离的目的。常用的手性选择剂有环糊精、冠醚等^[15]。液模：在手性对应体中液模对其中一种异构体相对于另外一种对映体具有更强的亲和力，通过选择性萃取原理达到拆分的目的。相对于固相模，液模的稳定性差、使用寿命短等缺点，在工业应用中有一定的限制。手性膜拆分虽然方法简便经济且传输速度快但稳定性较差，无法同时实现高通量和高分离因子，因而不能满足工业化生产的需求^[16]。

1.2.5 色谱拆分法

色谱拆分法相对于结晶拆分法、化学拆分法和微生物拆分法等，由于其良好的在现性和选择性并且易于自动化操作成为最有效的分离对映体的手段。到目前为止常用的色谱分离有：液相色谱法(HPIC)^[17]；气相色谱法(GC)^[18]；毛细管电色谱法(CEC)^[19]；超临界流体色谱(SFC)^[20]；薄层色谱法(TLC)^[21]；电色谱法(CE)^[22]。其中液相色谱法由于其独特的优点，在色谱法中应用范围最广。对映体拆分就是利用对映体之间的不同活性转化为非对映体而实现拆分或是在手性选择剂上与对映体建立手性识别关系而实现拆分。根据这一线索，到目前为止，高效液相色谱法的手性拆分方法可分为：①间接性法，即手性对映体的衍生化，选择一种合适的手性衍生化试剂与对映体柱前衍生化，而后用液相色谱进行分

离。由于衍生化试剂纯度的严格要求以及这个流程的复杂性，利用柱前衍生化法通过高效液相色谱分离手性物质越来越缺乏吸引力。②手性流动相添加剂，流动相中加入手性添加剂有利于在整个体系中形成短暂的非对映体，有利于提高手性固定相的识别能力，提高了拆分的可能性。但是手性添加剂法同时也存在选择剂的大量消耗和在检测上的干扰等缺陷，在大量生产时成本较高。③直接拆分法，利用合成的手性固定相直接对手性物质进行拆分，所用流动相有正向流动相和反向流动相两种方式。由于操作简便和成本低廉，此方法应用最广。直接拆分法依赖于通过共价键键合或物理吸附于载体上的手性分离剂对对映体产生的相互作用而实现的分离。

发展到今天，高效液相色谱手性固定相已经相当成熟，很多手性柱已经实现了商品化，概括来说可分为：氨基酸类手性固定相^[23]、蛋白质类手性固定相^[24]、环糊精类手性固定相^[25]、糖类手性固定相^[26]、大环类手性固定相^[27]和冠状醚类手性固定相^[28]等。其中糖类的手性固定相可以拆分多达90%的外消旋体。高效液相色谱法因其易于操作、高灵敏度和使用范围广等优点而得到广泛的应用，在药物研究、生物工程、生命科学，遗传工程以及食品检测等领域是不可或缺的工具。

1.3 氨基酸类手性固定相

氨基酸在自然界中广泛存在，值得一提的是在自然界中大部分的氨基酸是以左旋的形式存在（甘氨酸除外），造就了氨基酸的来源广泛并且价格低廉，正因为如此氨基酸成为合成手性固定相的天然手性源。以氨基酸为手性源的手性固定相有相当一部分实现了商品化，利用正向色谱法或是反向色谱法拆分了大量的对映体，是仅次于糖类手性固定相的另一种应用广泛的手性固定相。氨基酸手性固定相的拆分原理与其它手性固定相的基本相同，即三点作用原理^[29]（图1.2），简单来讲就是空间作用力、分子斥力和分子引力。目前国内外氨基酸类手性固定相大致可分为以下几种类型：

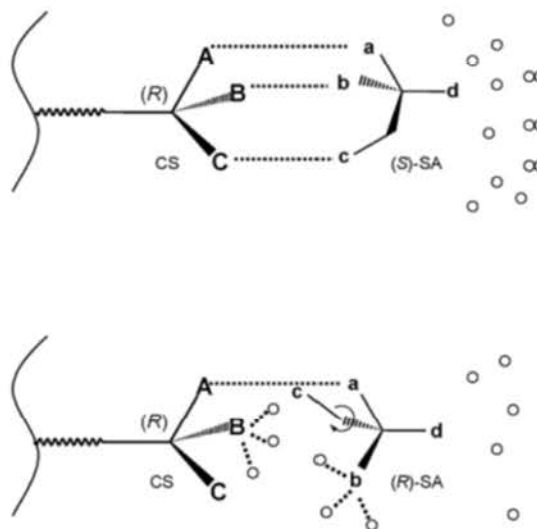
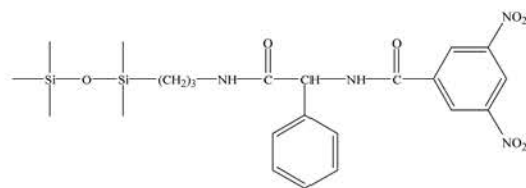


图 1.2 三点作用原理简图

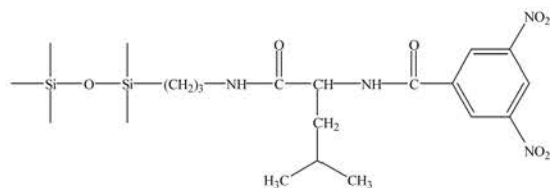
1.3.1 刷型手性固定相

刷型手性固定相因其结构而得名，是发展较早和较为成熟的一种手性固定相。刷型手性固定相具有特定的化学结构，如需含有 π -酸或 π -碱的芳香性基团、氢键给体-受体基团、极性基团或大体积的非极性基团^[30-33]，这些结构构成了手性拆分所需的结构，引力和斥力作用等。

对此类固定相研究较早的是 Pirkle 课题组，因其对此类固定相的突出贡献，刷型手性固定相亦称 Pirkle 手性固定相。Pirkle 等通过大量的实验对刷型手性固定相进行了深入的研究，其代表性的手性固定相是以氨基酸为手性源合成的： (R) -苯甘氨酸的 3,5-二硝基苯甲酰氯(DNB)衍生物 CSP(DNB-PG CSP)和 (R) -亮氨酸的 3,5-二硝基苯甲酰氯(DNB)衍生物 CSP(DNB-Leucine CSP)键合到载体上制成氨基酸手性固定相，其结构见图 1.3。经过大量的实验验证，Pirkle 等发现它们在拆分醚基、烷基或是氨基酸取代的给电子芳香环的对映体时有很好的拆分效果^[34-38]。同时发现末端基团在手性拆分中扮演着重要的角色，通过对不同末端基团的手性固定相的探索，Pirkle 总结出在其合成的手性固定相上 3,5-二硝基苯甲酰氯作为封端基团，在所拆分的手性药物中效果最好。



(a) DNB-PG 固定相结构图



(b) DNB-Leucine 固定相结构图

图 1.3 两种氨基酸固定相结构图

C. Daban Haurou 等^[39]以具有一定刚性的 L-脯氨酸为手性源，以较强刚性和耐酸性的硅胶为载体，以 3-氨丙基三乙氧基硅烷(KH-550)试剂为连接臂，通过键合法合成了四种不同烷基链长和不同分子结构的 L-脯氨酸手性固定相，其结构式见图 1.4。经过多次实验选出适宜的流动相，利用核磁共振对所合成的固定相进行了表征，并说明了固定相与对映体之间产生的斥力和引力作用对手性拆分的重要性。通过实验分析比较得出：合成的手性固定相良好的空间结构，较长的烷基链和较合适的封端基团有利于提高手性固定相的手性识别能力。

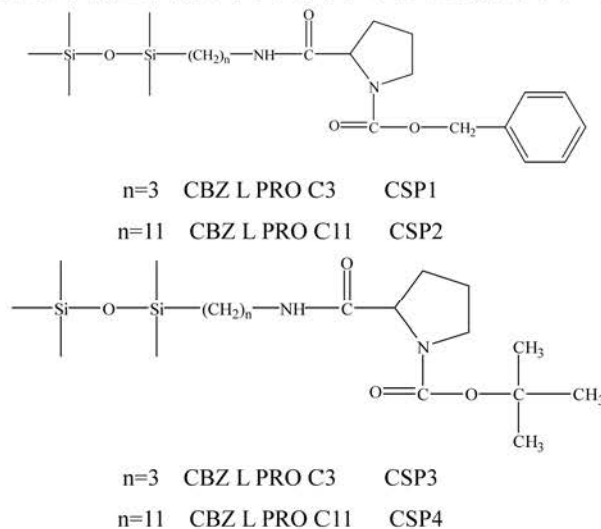


图 1.4 四种脯氨酸固定相结构

Zilin Chen 等^[40]同样以硅胶为载体，以甘氨酸为手性源合成了 3,5-二甲基苯

基甘氨酸手性固定相，如图 1.5。利用其合成的 7 种不同链长和不同链结构的手性固定相成功地拆分了八种对映体，并发现固定相链的长度和含有仲胺的多少对柱子的手性识别能力有很大影响，但是本文作者发现随着链长度的增加仲胺对固定相手性识别能力的影响越来越弱。同时还探索了有机添加剂对拆分效果的影响，发现合适的有机添加剂能够明显的提高手性固定相的识别能力，从而增加了对映体的拆分几率。

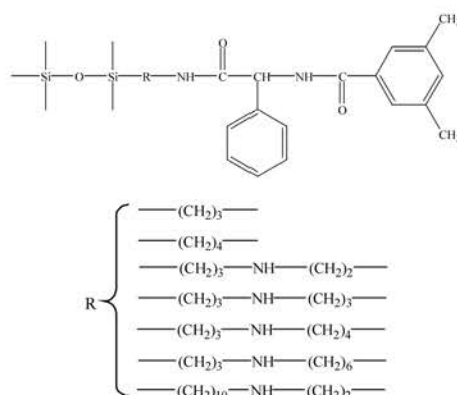


图 1.5 7 种不同结构的 3,5-二甲基苯基甘氨酸手性固定相

Kenichiro Todoroki 等^[41]以脯氨酸为手性源合成了 Dress-up 手性柱，利用此手性柱拆分了 7 种外消旋氨基酸，并且经过大量的实验得出此柱的稳定性、在现性和洗脱性都很好，不仅能用于微量分析，也可用于大量的手性拆分。徐修容等^[42]制备了不同取代基团的手性 L-缬氨酸-酰胺型化学键合固定相，发现简单的酰胺固定相完全没有拆分作用。此外还有许多工作者在刷型手性固定相做出了杰出的成果，如唐琴梅^[43]、刘晋钊^[44-45]和吴邦桂^[46]等等。

刷型手性固定相发展到今天，不再是合成固定相去拆分已有的外消旋体，而是根据要拆分的某种外消旋体结构和特性以及分离原理而设计一个新的手性固定相，从而实现对这种外消旋体的拆分。同时以氨基酸为手性源合成的刷型手性固定相以结构简单、合成方便并且有较强的手性识别能力等优点而得到广泛的应用。

1.3.2 手性配体交换型手性固定相

1961 年，Helferich 创立了配体交换色谱(LEC)技术，此后经过不断发展，手性配体交换色谱成为拆分未衍生化氨基酸对映体最有效的方法之一^[47]。配体

交换色谱法的分离机制是配位交换，是基于手型配体、中心金属离子和被拆分对映体三者之间形成的三元络合物^[48-50]，由于对映体之间有不同的空间结构，因而对映体之间所形成三元络合物会有不同的稳定性，从而产生不同的滞留时间，正是根据对映体之间不同的滞留时间而实现对映体的分离。同时对映体的滞留时间与三元络合物的稳定性有关^[51-52]，三元络合物过于稳定，即对映体与固定相作用力强，导致对映体出峰时间长或是不出峰。如果不能形成较稳定的三元络合物，对映体很容易随着流动相流出，也就没有识别作用，从而不能达到对映体拆分的要求。在配体交换手性固定相中常用于配位的中心金属离子有 Cu^{2+} , Cu^+ , Ni^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} 等，不同的金属离子有不同的适用性，但是在大多数的资料中， Cu^{2+} 是较常用的中心金属离子。

祝馨怡等^[53-55]合成了键合型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相和 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相，见图 1.6。两种固定相都是以 Cu^{2+} 为中心配位金属离子，利用反相色谱法对对映体进行拆分，有效分离了多种 DL-氨基酸。并用元素分析和红外光谱对固定相进行了定性和定量表征。为找到较佳的拆分条件，详细考察了流动相 pH、金属离子浓度、流动相流速、进样量和柱温等因素对拆分效果的影响，进一步优化了色谱条件。在 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相中祝馨怡等合成了不同键合量的 L-脯氨酸固定相，通过对 α -氨基酸的拆分，结果表明不同键合量的固定相在手性拆分中有很大的差异。

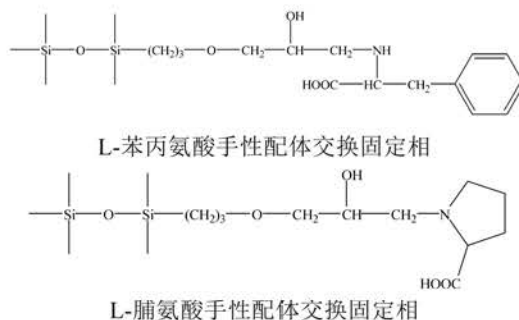


图 1.6 键合型 L-苯丙氨酸和 L-脯氨酸手性配体交换固定相

陈磊、万谦宏^[56]以涂敷的方法合成 3 种氨基酸衍生物手性配体交换色谱固定相，成功的拆分了 5 种 β -氨基酸，分别是： β -苯丙氨酸、 β -3-羟基苯丙氨酸、 β -3-氟苯丙氨酸、 β -3-羟基-4-甲氧基苯丙氨酸和 β -3,4-二甲氧基苯丙氨酸。此外，分别对涂敷量、流动相 pH 和中心金属离子浓度等因素进行了探讨，进一步优化了色谱条件。发现随着硅胶表面手性配体的负载量增大，5 种 β -氨基酸对映

体的保留因子(k)和分离因子(α)都随之降低。结果表明流动相 pH 对三元络合物稳定性有很大的影响, 同时发现中心金属离子在所合成固定相中有一个最佳的浓度, 偏离这个较佳浓度三种固定相的识别能力都下降。

在手性固定相中载体作为骨架应具有优良的性质, 较常用的载体是硅胶, 它具有较强的刚性和耐酸性, 但是不足之处是在碱性条件下硅胶颗粒会分解, 严重影响了柱子的使用寿命。马桂娟等^[57-58]以 PGMA/EDMA 为载体, 分别以 L-脯氨酸和 L-异亮氨酸为手性源合成两种手性配体交换色谱固定相, 拆分了十几种 DL-氨基酸, 可在较高的 pH 下对两种氨基醇类药物进行拆分, 是硅胶基质配体交换色谱固定相无法满足的。近年发展起来的点击化学被付春梅等^[59]应用于手性配体交换色谱固定相的合成, 对其稳定性和分离能力进行研究, 表明点击化学具有很大的潜力。此外黄晓佳^[60]和 JIANBIAO MA 等^[61]分别以 L-异亮氨酸和 L-脯氨酸制备了手性配体交换色谱固定相, 拆分了十几种 DL-氨基酸, 并且后者对分离机理进行了探讨。

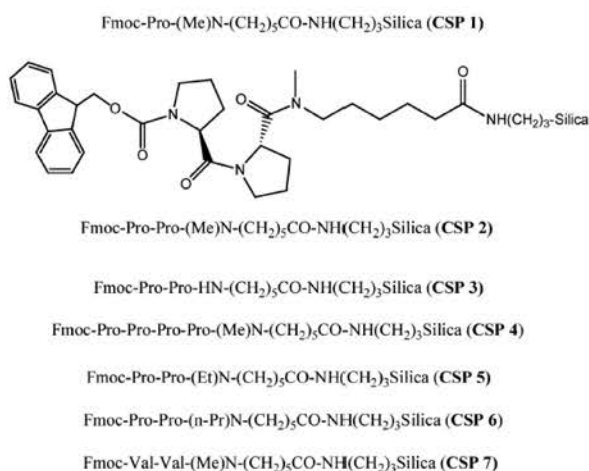
配体交换色谱技术从建立之初, 很快就发展成为手性色谱固定相的重要组成部分, 其主要原因是: 以氨基酸为手性源的手性配体交换色谱固定相合成简单, 并且所用流动相的组分以水为主, 再加入中心配位金属离子和缓冲溶液, 如有必要可以加入有机添加剂(增加手性固定相的识别能力)。配体交换色谱固定相结构简单和所用流动相单一, 使配体交换色谱固定相具有较强的环保性和较好的经济性。发展到现在, 手性配体交换色谱固定相以成为拆分未衍生化的氨基酸最主要的手段。

1.3.3 多肽手性固定相

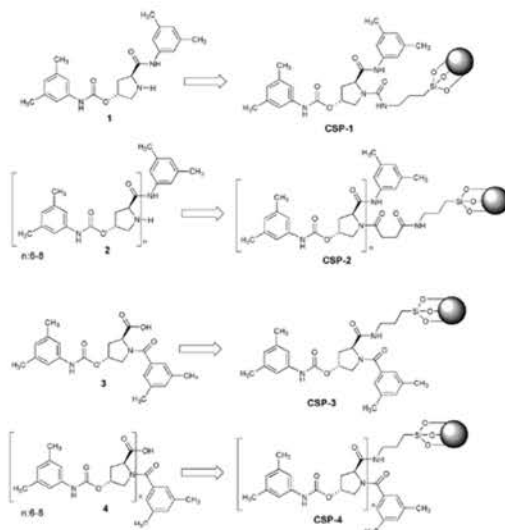
多肽合成无论是在化学还是医学上都有广泛的应用, 特别是在医学上单个的氨基酸或是肽链可作为合成药物的中间体。在手性固定相中多肽同样有重要的作用, 对于一些特殊结构的对映体, 单个的氨基酸手性固定相已无法满足拆分要求, 这就需要多个手性中心和手性识别能力更强的多肽手性固定相。在多肽合成中由于脯氨酸化学结构的特殊性赋予其较强的刚性使其对外消旋体有较高的选择性^[62-64]。因而在多肽手性固定相的合成中手性中心大多是 L-脯氨酸。

在多肽的合成中 Junmin Huang^[65]和 Raquel Sancho^[66]等以 Fmoc-L-脯氨酸为手性源, 以硅胶为载体, 并分别以苄氧羰基和 3, 5-二甲基苯基为封端基团, 利用逐步键合法合成多种不同长度的肽链型手性固定相(图 1.7 所示)。其中

Junmin Huang 合成的手性固定相在拆分的 53 种对映体中有 31 种对映体实现了分离，并与 Whelk O2 柱进行了对比，发现在拆分的 53 种对映体时其性能是优于 Daicel AD-H 和 OD-H 柱。通过不同肽链长度的对比发现肽链中脯氨酸单元在手性识别中起着重要作用，因为单个脯氨酸单元的固定相拆分效果次于多个脯氨酸单元的固定相。Raquel Sancho 合成的手性固定相通过 NMR 研究了固定相的结构，并与其他固定相进行了对比探讨其优缺点。



Junmin Huang 手性固定相



Raquel Sancho 手性固定相

图 1.7 L-脯氨酸肽链手性固定相

Junmin Huang 等^[67]和 Kaname Ohyama 等^[68]分别以 L-脯氨酸和 L-苯基丙氨

酸为手性源，以键合法合成了多种不同肽链长度的手性固定相(见图 1.8)。Junmin Huang 以不同的连接臂合成了 7 种不同肽链长度的 L-脯氨酸手性固定相。通过对 53 种手性药物的拆分，发现多肽直接键合到 3-甲基氨丙基硅胶合成的固定相的拆分效果优于以 N-甲基己内酰胺为中间桥梁在键合到 3-甲基氨丙基硅胶。同时在 8 号固定相中流动相为二氯甲烷/正己烷/2-丙醇时的拆分效果优于流动相为正己烷/2-丙醇时。Kaname Ohyama 合成了三种不同肽链长度的 L-苯基丙氨酸手性固定相，系统讨论了肽链长度对手性固定相分离的影响，得出对华法令阻凝剂对映体拆分效果最好的是中等肽链长度的固定相。同时得出固定相中的肽链是以螺旋结构的形式存在。

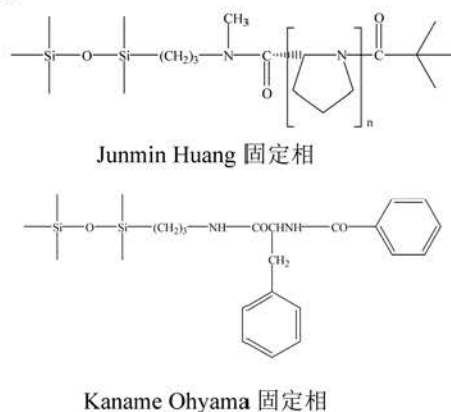
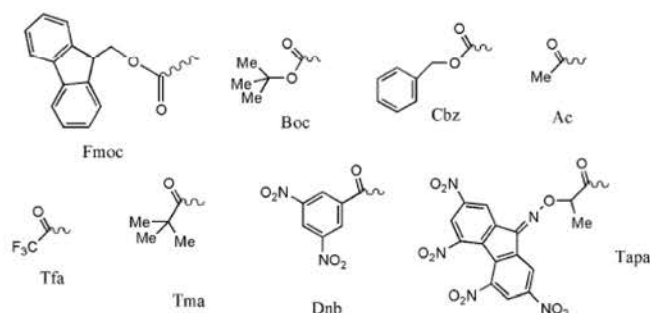
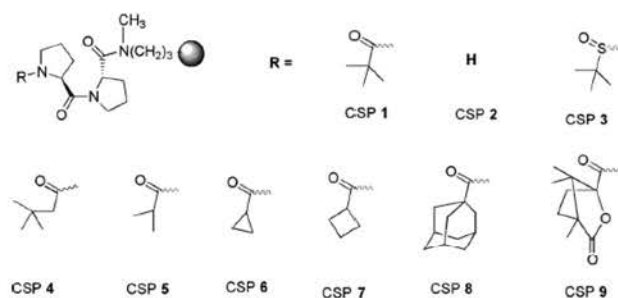


图 1.8 L-脯氨酸和 L-苯基丙氨酸固定相

手性固定相的拆分能力同样受封端基团的影响，Pirkle 课题组在这方面也做过相关的研究，得出在其合成的手性固定相上 3,5-二硝基苯甲酰氯作为封端基团，在所拆分的手性药物中效果最好。Junmin Huang 等^[69]和 Zhi Dai 等^[70]以 L-脯氨酸为手性源利用逐步键合法成功合成不同封端基团的手性固定相(封端基团的结构见图 1.9)。对外消旋体进行拆分时，发现不同的封端基团在拆分所收集的对映体时有不同的拆分能力，鉴于这种发现，选出了对所分离的外消旋体有最强识别能力的封端基团。得出具有空间结构的封端基团拆分能力相对较强。



Junmin Huang 固定相封端基团



Zhi Dai 固定相封端基团

图 1.9 固定相封端基团结构图

大多数的手性固定相均以单键合壁的形式合成，而 Wenjian Lao 等^[71]合成两种类型的固定相，一种是双键合臂的手性固定相，另外一种单键合臂的固定相。通过对外消旋体的拆分，发现双键合臂的手性固定相拆分能力强于单键合臂固定相，并且双键合臂的手性固定相具有很强的稳定性。二维液相对分离复杂手性样品是一种非常重要的技术，Meiyun Xue 等^[72]以苯基甘氨酸为手性中心，通过引入叠氮基合成二肽手性固定相，并与 C18 柱连用形成二维的反向色谱手性固定相。研究证明这种二维的固定相有很强的拆分能力，并且强于单个的二肽手性固定相。此外还有许多工作者作出了突出成果，如：Junmin Huang 等^[73-74]在以氨基酸为手性源合成十多种手性固定相，对萘酚实现了有效的拆分，Raquel Sancho^[75]、Ye Bao^[76]和 Junmin Huang^[77]等多肽手性固定相的合成中取得了不少研究成果。

由于生物工程、生命科学等的发展，多肽合成技术已经非常成熟，多是以王树脂为载体通过逐步键合的方法进行多肽合成，而后分离提纯。多肽手性固定相的合成亦可以借助上诉的方法，使此种固定相的合成简便易行。多肽手性

固定相相对于单个的氨基酸手性固定相具有较强手性识别能力，解决了一些简单手性固定相不能实现的难题。多肽手性固定相本身也存在一定的限制：并不是所有的多肽都具有较强手性识别能力，在现有的资料中应用最多的就是 L-脯氨酸。尽管如此多肽手性固定相仍在手性固定相中占有重要地位。

1.3.4 其它含氨基酸的手性固定相

氨基酸由于含有天然的手性中心和广泛的来源，不仅用于合成简单的刷型手性固定相或是多肽手性固定相等，还可以通过键合法反映到聚合物、环糊精或是纤维素等物质上。由于环糊精和纤维素等本身就有手性识别的能力，因而键合上氨基酸之后合成的手性固定相对外消旋体的拆分能力更强。

聚合物手性固定相是一种聚合的大分子手性物键合或是涂敷到载体上而制成的手性固定相，聚合物手性固定相具有结构复杂、空间作用力强等特点。M. Mizanur Rahman 等^[78-79]以 L-苯丙氨酸衍生物为手性源合成一种聚合物手性固定相。此固定相与 ODS-p 柱相比虽表面覆盖率低且烷基链不规则，但由于 π - π 键的相互作用对多环芳烃(PAHs)有较强的拆分能力。同时 Atsuomi Shundo 等^[80]以 L-丙氨酸为手性源合成的聚合物手性固定相对 PAHs 也有较强的拆分能力。环糊精手性固定相是研究比较早和比较成熟的一种手性固定相，冯钰琦等^[81]以甘氨酸衍生化环糊精键合硅胶制成环糊精手性固定相。考察了丹磺酰化氨基酸异构体、苯丙酸类药物等的分离性能，研究了流动相中甲醇浓度、pH 以及柱温对色谱保留行为的影响。杜祖银^[82]以(L)-DNP-氨基酸修饰 β -环糊精合成环糊精手性固定相，并对其性能进行评价。孙立权^[83]合成苄氧羰基苯丙氨酸环糊精衍生物键合硅胶固定相，并对此固定相进行表征，实现了硝基苯酚和氨基苯酚对应异构体的分离。

发展到现在手性固定相种类更多，结构更为复杂，相对应的手性识别能力也持续增加。尤其是糖类手性固定相在整个手性固定相中占有重要位置，现知对应体中有 90%可用多糖手性固定相拆分。相信以氨基酸为手性源键合到多糖类物质上合成手性固定相拆分能力将有明显提升。

1.4 本文研究内容及意义

1. 研究意义

不同空间结构的对映体，在人体内的机理作用中表现出不同的药动学和药效学作用，而外在则会有不同的生理反应，甚至毒副作用。手性分离的目的是制备低毒、低副作用的药物，而目前手性色谱法是拆分对映体较为有效的方法。本文以苯丙氨酸和脯氨酸为手性源合成手性配体交换色谱固定相，并对对映体进行分离。

2. 主要研究内容

本课题的研究目标是：合成以氨基酸为手性源的手性配体交换固定相，并对外消旋体有效的拆分。具体来说就是以硅胶为载体，以 3-氨丙基三乙氧基硅烷和三聚氯氰为连接臂，合成一种新型的键合型双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相和 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相。为确定固定相成功合成，通过元素分析法、红外分析法和热重分析法对每一步产物进行了定性和定量表征。手性固定相以匀浆法进行装填。为验证所合成固定相的性能，以反相色谱法对外消旋体进行拆分。为得到较佳的拆分条件，本文探讨了缓冲溶液的种类和浓度，金属离子的种类和浓度，流动相的流速和 pH 对拆分效果的影响。

3. 实验创新性

本实验以手性识别能力较强的 L-苯丙氨酸和 L-脯氨酸为手性源，通过具有特殊三角结构的三聚氯氰为中间连接臂，成功合成了一种双齿型手性固定相。创新性：①三聚氯氰特殊的三角结构有利于增加氨基酸的键合量，从而增加了固定相的手性识别能力。②三聚氯氰特殊三角结构造就了氨基酸排布的齿形结构，这种双齿型结构更有利于形成络合物，增加了固定相的拆分能力。③本文以键合法合成出两种新型的氨基酸配体交换手性固定相，并对多种氨基酸及手性药物氯苯那敏进行了成功拆分。

2 CSP-1 的合成及其拆分性能

手性配体交换色谱固定相是手性色谱固定相的重要组成部分，由于其较强的手性识别能力、较好的环保性以及良好的经济性，在拆分各种对应体中得到广泛的应用，尤其值得一提的是它是拆分未衍生化氨基酸最有效的手段。手性配体交换色谱固定相可分为涂敷型^[84]和键合型^[85]两种，相比较之下键合型有较多优点：合成的硅胶颗粒均匀和固定相稳定等。本实验合成了一种新型键合型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相(CSP-1)。

本实验以硅胶为载体，以 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂(KH-550)和三聚氯氰作为连接臂合成了一种新型的键合型双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相。硅胶有较强的刚性和耐酸性，是应用范围较广的一种载体，其中 KH-550 末端带有活泼性基团氨基，易于与其他基团反应，在键合型手性固定相中广泛应用，三聚氯氰由于特殊的分子结构可以提高手性选择剂 L-苯丙氨酸的键合率。L-苯丙氨酸作为手性选择剂具有较强的手性识别能力，这在很多方面已经得到证明^[86-87]。此外对合成的双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相采用红外分析法、热重分析法和元素分析法进行定性和定量表征。合成的固定相以匀浆法装柱，并成功地拆分了五种对应体，分别是：DL-氯苯那敏、DL-色氨酸、DL-苹果酸、DL-缬氨酸和 DL-异亮氨酸。此外为得到较佳的拆分条件，还探讨了缓冲溶液的种类和浓度，金属离子的种类和浓度，流动相的流速和 pH 对拆分效果的影响。其实验过程如图 2.1

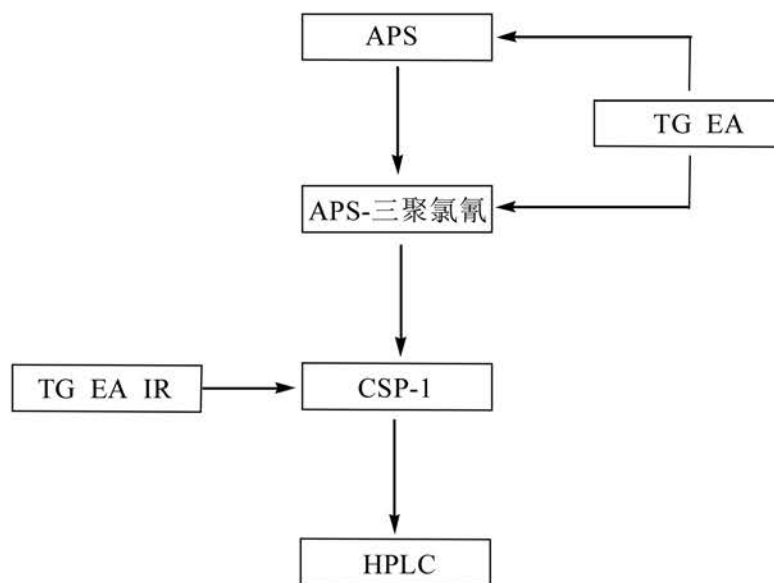


图 2.1 实验过程图

(其中 TG、EA 和 IR 分别代表热重分析、元素分析和红外分析)

2.1 实验试剂和仪器

根据以上的实验流程，本论文所涉及的主要试剂列于表 2.1 中。

表 2.1 实验试剂

名称	级别	生产厂家
硅胶(5 μm , 110 $\text{\AA}$, 300 m^2/g)	色谱级	郑州英诺生物有限公司
3-氨丙基三乙氧基硅烷	纯度 99%	阿拉丁试剂
三聚氯氰(Cyanuric chloride)	纯度 99%	阿拉丁试剂
L-苯丙氨酸	分析纯	阿拉丁试剂
L-脯氨酸	分析纯	阿拉丁试剂
吡啶	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
三乙胺	分析纯	广东光华科技有限公司
氢氧化钠	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
无水硫酸镁	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
氯化钙	分析纯	阿拉丁试剂
甲苯	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
甲醇	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
丙酮	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
N,N-二甲基甲酰胺	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
二氯甲烷	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司

续表

磷酸氢二钠	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
磷酸二氢钠	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
醋酸	分析纯	天津风船化学试剂科技有限公司
醋酸铵	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
醋酸钠	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
硫酸铜	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
硫酸锌	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
硝酸镍	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
硝酸铅	分析纯	天津科密欧化学试剂有限公司
DL-氯苯那敏	分析纯	湖北楚胜威试剂
DL-异亮氨酸	分析纯	阿拉丁试剂
DL-缬氨酸	分析纯	阿拉丁试剂
DL-色氨酸	分析纯	阿拉丁试剂
DL-苹果酸	分析纯	阿拉丁试剂

实验中所使用的仪器设备列于表 2.2 中, 另外还有一些常用的实验仪器, 如单口烧瓶、三口烧瓶、冷凝管、搅拌棒、玻璃棒、空心塞、砂芯漏斗、抽滤瓶和烧杯等。

表 2.2 实验仪器

设备	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	Agilent1100	Agilent 科技有限公司(美国)
元素分析仪	JSB-2A	南京第四分析仪器有限公司
热重分析仪	DSC-60	Shimadzu Corporation
傅立叶变换红外光谱仪	FY-IR200	Thermo USA
循环水式真空泵	SHZ-D	巩义市英峪予华仪器厂
PH 计	PHS-3C	上海宏盖仪器公司
真空干燥箱	DEF-6020	上海精宏实验设备有限公司
电子天平	TE6101-L	赛多利克斯仪器(北京)有限公司
电动搅拌器	D8401-ZH	天津市华兴科学仪器厂

2.2 CSP-1 的合成

本实验以化学键合法合成双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相, 具体的合成路线如下图 2.2 所示

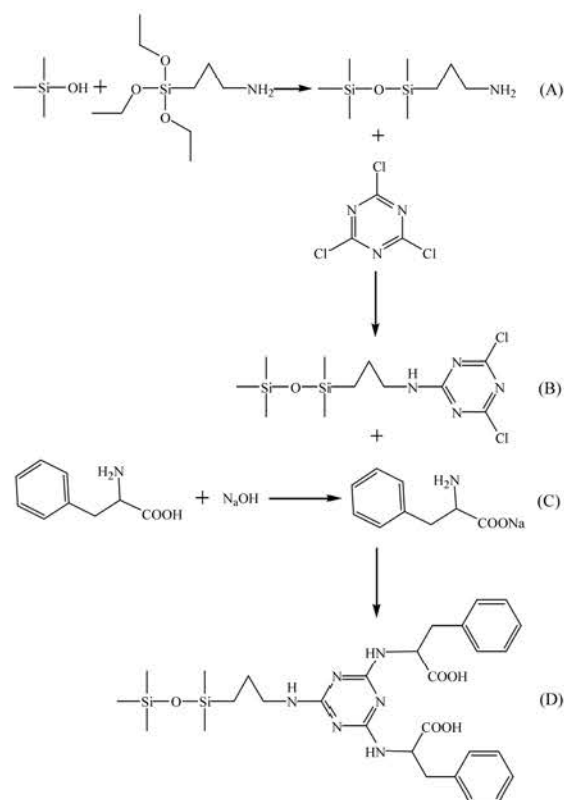


图 2.2 CSP-1 合成路线

2.2.1 硅胶的表面处理、活化和除水

(1) 硅胶表面处理和活化

硅胶巨大的比表面积赋予了硅胶很强的吸附能力，未经处理的硅胶表面有吸附的金属离子(铁、铜等)，所以硅胶处理的目的就是除尽硅胶表面吸附的金属离子，使硅胶表面的羟基尽可能的裸露出来，从而提高单位比表面积硅烷偶联剂的键合量。具体步骤：将 5.0 g 硅胶和 1 mol/L 的盐酸加入到三口烧瓶中，60 °C 下电动搅拌 12 h，抽滤用纯水洗涤，在洗涤的过程中纯水与硅胶的分离我们用自动沉降法，当硅胶绝大多数沉降至烧杯底部时，倒掉上层液体，重复上述操作直至硅胶洗到中性，最后一次洗涤用减压抽滤，最后 120 °C 真空干燥。这种做法的目的是除去粒径较小的硅胶，尽可能的使硅胶颗粒均匀，装柱之后的固定相才不易产生沟流的现象，以提高柱效。

(2) 硅胶的除水

硅胶因为有较大比表面积的特性，赋予其较强的吸附能力，简单的真空干

干燥很难除尽硅胶含有的水分，同时硅烷试剂非常容易与水反应，因而必须想办法尽可能减少硅胶内部含有的水分。本实验选用共沸除水法，实验装置如图 2.3。需要注意的是：整个装置不能完全密封，以防止内部压力过高导致爆炸。为解决这个问题，在双口烧瓶上安装了一个气球，避免内部压力过高也防止甲苯挥发。

具体的操作步骤是：将 120 ml 的甲苯和氢化钙加入到带有冷凝管的三口烧瓶中，100 °C 下回流 10 h，目的是使甲苯中含有的水全部与氢化钙反应。之后常压蒸馏出无水甲苯。将蒸馏出的 100 mL 甲苯和 5.0 g 硅胶加入三口烧瓶中(图 2.3 所示)，在 120 °C 的条件下共沸，当有 20 mL 的共沸物蒸馏到双口烧瓶时停止加热，冷却到室温以便进行下一步反应。

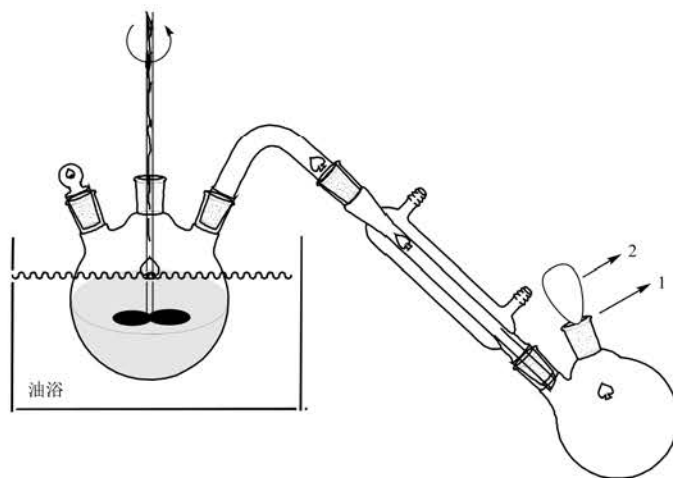


图 2.3 硅胶共沸除水装置(1 瓶口；2 气球)

2.2.2 氨丙基硅胶(APS)的合成

本实验所涉及的反应大部分要求在无水的条件下进行，因而试验装置应该是密闭的，防止外界水分进入实验装置内部而影响反应结果。鉴于此设计了如下图 2.4 所示的反应装置。本实验装置所有的接口处都是密封的。具体的操作是：当溶剂和反应物全部加入到三口烧瓶后，打开氮气瓶并调节流量，使右边的烧杯中有气泡缓慢的出现，即防止了外部水分进入实验装置，同时也避免氮气流量过大使溶剂随着氮气挥发。

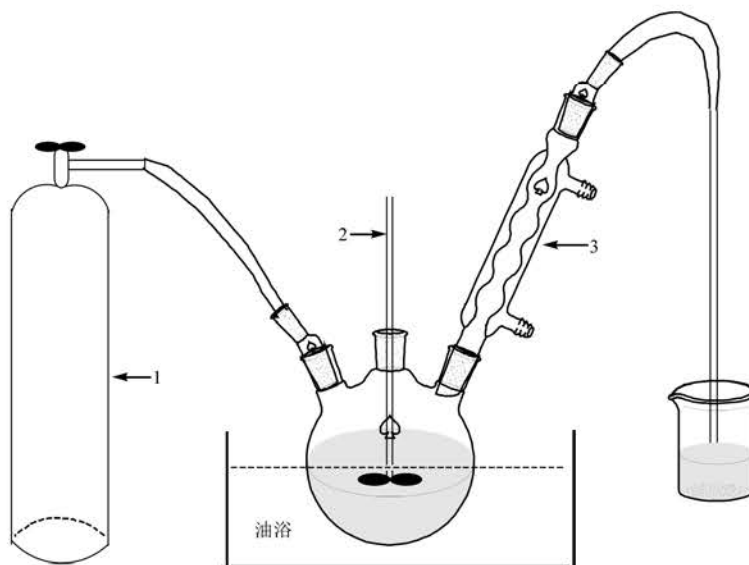


图 2.4 实验反应装置(1. 氮气瓶; 2. 搅拌桨; 3. 球形冷凝管)

向含有干燥硅胶和甲苯的三口烧瓶(本章节 2.2.1 所得)中加入 4 ml 的 KH-550 和 0.1 ml 的吡啶, 其中吡啶作为催化剂使用。在 110 °C 的条件下, 搅拌反应 14 h, 整个过程在氮气保护下进行。反应结束后, 产物冷却抽滤, 依次用甲苯、甲醇和丙酮洗涤, 过夜真空干燥得 APS(如图 2.2 中 A)。

2.2.3 APS-三聚氯氰的合成

将 100 ml 的甲醇和过量的无水硫酸镁加入到带有冷凝管的三口烧瓶中, 70 °C 下回流 10 h, 目的是使甲醇中含有的水全部转变为硫酸镁的结晶水。之后常压蒸馏出无水甲醇。其中七水硫酸镁失去结晶水的温度是 150 °C, 一水硫酸镁失去结晶水的温度是 200 °C, 因而在蒸馏的过程中不用担心硫酸镁结晶水失去, 而使甲醇再次含有水分。

将 2.2.2 小结得到的 APS 和 80 ml 干燥的甲醇加入到带有冷凝管的三口烧瓶中(实验装置如图 2.4), 而后加入 0.6 g 三聚氯氰, 在 70 °C 搅拌反应 6 h, 整个过程是在氮气保护下完成。反应结束, 产物直接热抽滤, 用无水甲醇洗涤三次, 得所需产物 APS-三聚氯氰(如图 2.2 中 B)。

2.2.4 苯丙氨酸钠盐的合成

将一定量的氢氧化钠溶解到 50 mL 的甲醇中, 缓慢滴加到装有甲醇和等物

质的量的苯丙氨酸的三口烧瓶中(此过程一定要缓慢进行,以防止碱性过高使苯丙氨酸消旋)^[88],磁力搅拌,反应 0.5 h。蒸馏出甲醇,70 °C 真空干燥,得到产物苯丙氨酸钠盐。

2.2.5 CSP-1 的合成

0.6 g 苯丙氨酸钠盐、产物 B 和 80 ml 干燥的甲醇加入到 250 ml 干燥的三口烧瓶中(实验装置如图 2.4),反应条件与小结 2.2.3 同,真空抽滤,依次用 DMF 和纯水洗涤,70 °C 真空过夜干燥,得所需产物 CSP-1(如图 2.2 中 D)。

2.3 CSP-1 的表征

2.3.1 APS 的表征

热重分析:空白硅胶和 APS 在同等条件干燥,测得热失重结果如图 2.5,可知空白硅胶的热失重是 1.182%而 APS 的热失重是 7.418%,因为实验产物 APS 经过大量有机溶剂洗涤,所以未反应的 KH-550 已经洗掉,可以确定键合上的 KH-550 的热失重约是 6.236%,说明 KH-550 已经成功地键合到硅胶上。

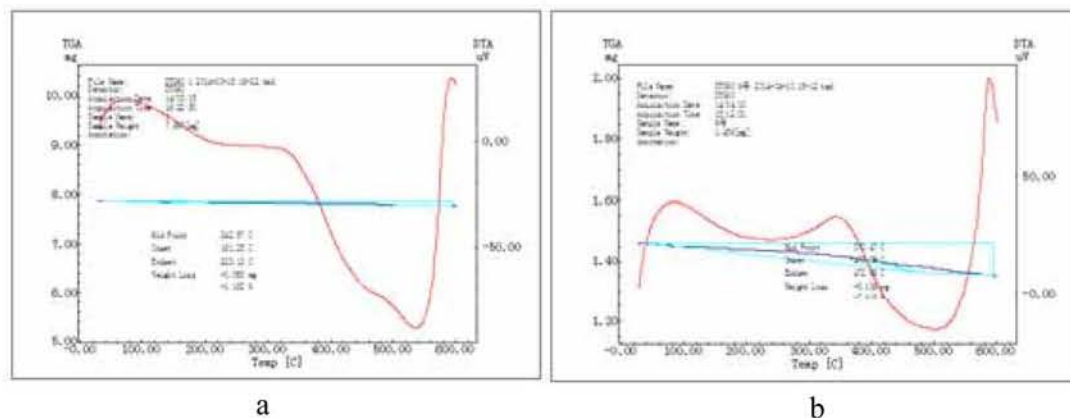


图 2.5 热重分析图(a: 空白硅胶热重图; b: APS 热重图)

元素分析:为对产物进一步的表征,我们对合成的 APS 做了元素分析表征,结果: C, 2.57%; N, 0.96%; H, 0.69%。从理论上来说,硅胶表面的羟基浓度约为 8.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$,但是由于空间位阻的原因,最多只有 50%的羟基能参加反应即 4.15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。本实验反应按照单分子层计算,所以硅胶表面的覆盖率 V 可用下面的公式计算:

$$V = \left[\left(\frac{W}{M} \right) \div (4.15 \times 300 \times 10^{-6}) \right] \times 100\% = 54.68\%$$

W 为元素分析氮含量即 0.96%

M 为氮元素分子量

所以硅胶表面的覆盖率是 54.68%，由硅胶的覆盖率可以计算得到羟基的反应浓度为 2.269 umol/m^2 ，有文献报道单分子层羟基的键合浓度一般为 $2-4 \text{ umol/m}^2$ ^[89]，计算得到的数据在理论范围内，说明该键合反应是按照单分子层进行的。

2.3.2 APS-三聚氯氰的表征

热重分析：产物 APS-三聚氯氰和 APS 在同等条件下真空干燥，测得两种产物的热失重结果如图 2.6，从图中可以看出产物 APS-三聚氯氰的总热失重量是 12.625%，减去 APS 的热失重，即为键合上三聚氯氰的热失重即 5.207%。因为产物在处理过程中经溶剂多次洗涤，一些非键合上的三聚氯氰和其他杂质基本上清洗掉了。所以可以认为合成的产物 APS-三聚氯氰中三聚氯氰的热失重约 5.207%。

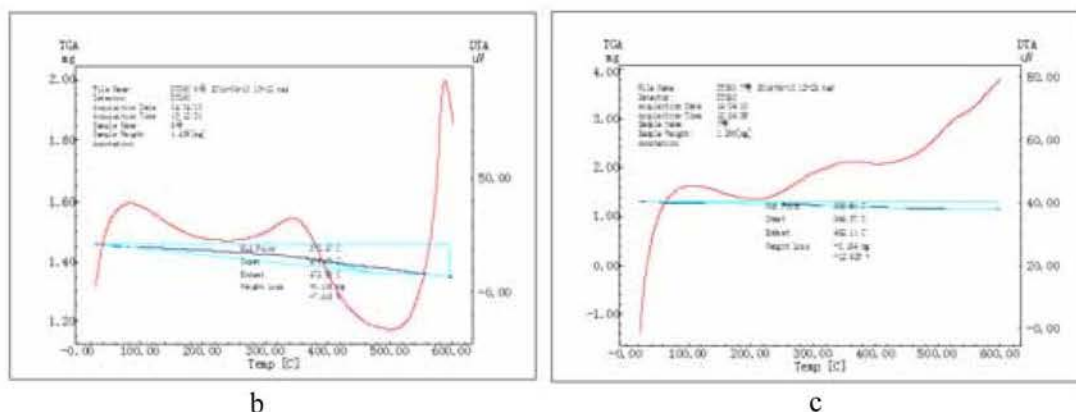


图 2.6 热重分析图(b: APS 热重图; c: APS-Cyanuric chloride 热重图)

元素分析：经元素分析第二步实验产物 APS-三聚氯氰的结果是：C, 4.31%; N, 2.25%; H, 0.81%，结合上一步的元素分析结果我们可以计算出氨基的反应率 V

$$V = \left[\frac{\frac{3}{2}(W_B - W_A)}{3 \times M} \div \left(\frac{W_A}{M} \right) \right] \times 100\% = 67.18\%$$

W_A 为产物 APS 氮元素含量即 0.96%

W_B 为产物 APS-三聚氯氰氮元素含量即 2.25%

M 表示氮元素的分子量。

在产物 APS 中氨基的反应率较低，原因是硅胶本身的空间位阻，阻碍了反应的进行，同时三聚氯氰本身特殊的平面结构也加大了空间阻力，进一步增加了反应进行的难度。

2.3.3 苯丙氨酸钠盐的表征

红外表征：如图 2.7 分别为苯丙氨酸(图中 A 所示)和苯丙氨酸钠盐(图中 B 所示)红外图。在苯丙氨酸中氨基的红外吸收峰为 $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ 的中等双峰，在图 2.7 中 A 可以明显看出。并且氨基酸中羧酸的羰基伸缩震动出双峰： 1600 左右的反对称震动峰和 1400 cm^{-1} 左右的对称震动峰。当氨基酸成盐后 3100 cm^{-1} 左右的吸收峰变宽形成一个大峰如图 2.7 中 B，并且在 1600 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} 附近形成两个酸根峰比羧酸中的羰基峰分为明显。由此可以判定所合成的产物就是苯丙氨酸钠盐。

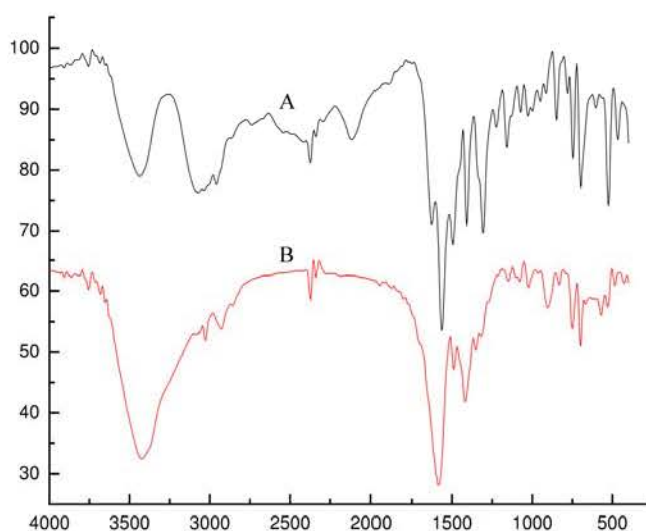


图 2.7 红外图(A: 苯丙氨酸; B: 苯丙氨酸钠)

2.3.4 终产物 CSP-1 的表征

热重表征：产物 APS-三聚氯氰和终产物 CSP-1 在同等条件真空干燥，测得热失重结果如图 2.8，从图中可以看出 CSP-1 的总热失重量是 15.262%，减去产物 APS-三聚氯氰的热失重量，则为键合上苯丙氨酸钠盐的热失重量即 2.637%。因为产物在处理过程中经溶剂多次洗涤，一些非键合上的苯丙氨酸钠盐和其他杂质基本上清洗掉了。所以可以认为合成的 CSP-1 中苯丙氨酸钠盐的热失重量约为 2.637%。

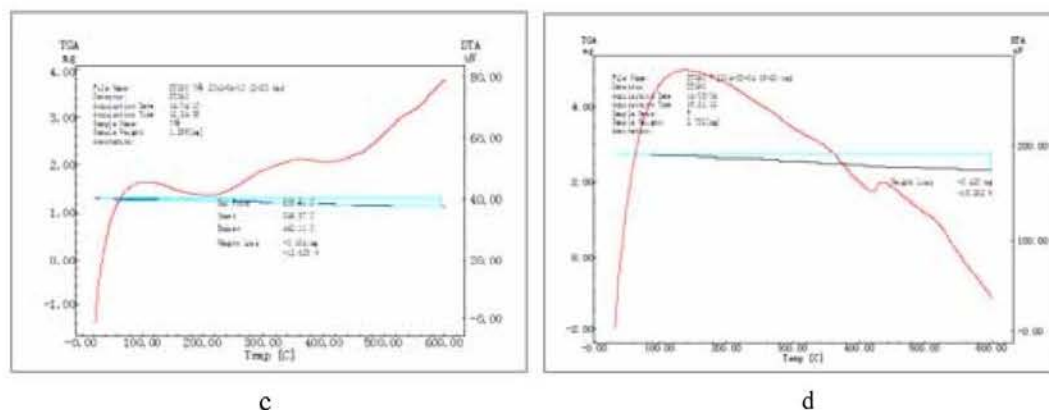


图 2.8 热重分析图(c: APS-Cyanuric chloride 热重图; d: CSP-1 热重图)

元素分析：CSP-1 的元素分析结果：C, 5.83%; N, 2.56%; H, 1.25%。根据上一步的数据可以计算出三聚氯氰中氯原子的反应率 V

$$V = \left[\frac{\frac{2}{3}(W_D - W_B)}{M} + \left(\frac{W_B - W_A}{3 \times M} \right) \right] \times 100\% = 48.06\%$$

W_A 为 APS 中氮元素含量即 0.96%

W_B 为 APS-三聚氯氰中氮元素含量即 2.25%

W_D 为终产物 CSP-1 中氮元素含量即 2.56%

M 为氮元素的分子量

可知三聚氯氰中氯原子的反应率为 48.06%，原因有三点，一是苯丙氨酸为手性物质，具有一定的空间结构，对反应造成一定的阻碍，二是硅胶本身也有一定的空间阻碍，使反应难以进行，三是反应是固液反应使两反应物不能充分

接触，最终导致三聚氯氰中氯原子的反应率不高。

红外表征：如图 2.9 所示，分别为空白硅胶(图中 A)和终产物 CSP-1(图中 B)的红外图。可知无论是在纯硅胶中还是在 CSP-1 中含有最多的键是硅氧键，而含量最多的基团是硅羟基，在红外图中 $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ 为硅羟基， 1110 cm^{-1} 为硅氧键。在 $800\text{--}473\text{ cm}^{-1}$ 为硅胶介孔结构中硅氧键亦可理解为硅胶的特有红外吸收峰。正是硅胶的特有红外吸收峰掩盖了碳碳键的伸缩震动峰($1250\sim 1140\text{ cm}^{-1}$)和氮氢键的伸缩震动峰($3500\sim 3300\text{ cm}^{-1}$)，只能在红外图中看到碳氢键的伸缩震动峰即 2926 cm^{-1} ，由此可以认为反应是成功地。

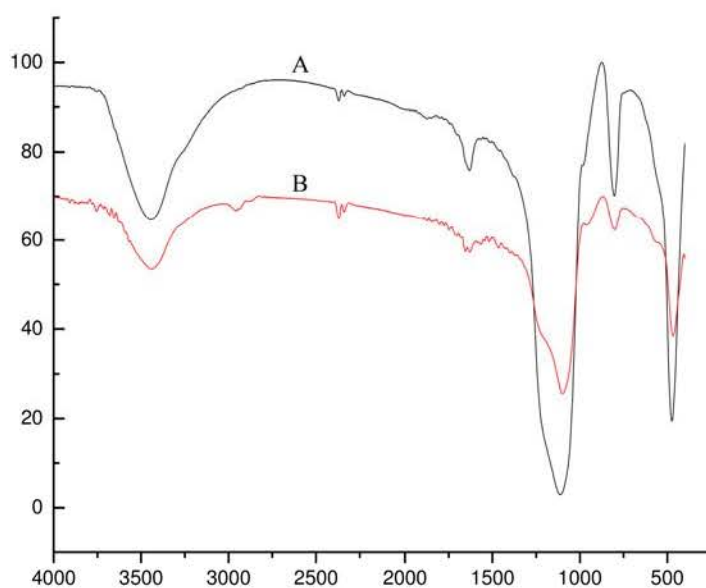


图 2.9 红外图(A: 空白硅胶; B: CSP-1)

2.4 CSP-1 拆分性能研究

2.4.1 HPLC 色谱条件和分离参数

本文所合成的固定相为手性配体交换色谱固定相，所使用的流动相为反向流动相。流动相：以磷酸钠缓冲溶液、醋酸铵缓冲溶液和醋酸钠缓冲溶液为缓冲溶液，以硫酸铜、硫酸锌、硝酸镍和硝酸铅为中心金属离子。检测器为 UV 检测器，设定检测波长为 214 nm ，流动相流速 1 mL/min 。柱温设定为 35°C 。色谱柱死时间 t_0 用 1,3,5-三叔丁基苯测定。

保留因子 k_1 和 k_2 分别用如下公式：

$$k_1 = (t_1 - t_0)/t_0$$

$$k_2 = (t_2 - t_0)/t_0$$

t_0 为柱子的死时间

t_1 为第一个峰的出峰时间

t_2 为第二个峰的出峰时间

选择性因子 α 可由如下公式计算：

$$\alpha = k_2/k_1$$

分离度 R 可由如下公式求得：

$$R = 2(t_2 - t_1)/(w_2 + w_1)$$

w_1 为第一个峰基线宽度

w_2 为第二个峰基线宽度

2.4.2 装柱和柱子的预处理

本实验采用传统的匀浆填充法装填色谱柱，具体来讲，就是以一种溶剂或是混合溶剂作为匀浆液，通过超声波使固定相均匀的以悬浮状态分散在匀浆液中，然后通过顶替液将匀浆液压入柱管中，制备成紧密的、均匀的色谱柱。在液相色谱中匀浆法看似简单，但是却涉及了胶体化学和流变学的应用。其关键是在装柱过程中匀浆液中的填料不发生沉降、絮凝和附聚的现象。在整个操作的过程中匀浆液的制备是一个重要的因素，匀浆液浓度太浓，匀浆剂不能充分润湿固定相使固定相充分均匀的分散在匀浆液中，结果可能导致柱子中填料分布不均匀。匀浆浓度太稀，这样所需的匀浆槽体积增大，可能导致填料发生分层的现象，使装填的色谱柱不均匀，易发生沟流的现象。

(1)空柱管的清洗，理想的空柱管内壁应该是光滑无摩擦，因此清洗柱管时应小心谨慎，避免内壁留下划痕，否则会使流动相出现沟流的现象，而使色谱柱出现拖峰的现象甚至单种纯物质出现两个色谱峰。可用去离子水冲洗柱管，再用丙酮淋洗，而后烘干。

(2)匀浆液的制备，上面我们已经说过匀浆液的浓度一定要适宜，有研究表明，在湿法装柱中所配置的匀浆液浓度有一个较佳值，在 5%-15% 范围内较好

[90-91]。本实验选择匀浆液浓度为 10%，以甲醇为匀浆液，通过超声波使填料均匀的分散在匀浆液中，并且无凝聚和分层的现象。

(3)装柱操作，将清洗好的色谱柱通过螺纹连接到匀浆槽的下端，之后将匀浆液倒入匀浆槽中，快速将匀浆槽连接到色谱装柱机(如图 2.10)。以甲醇为顶替液，在 37MPa 下压力以脉冲的形式装填色谱柱。装填完成取下色谱柱，用小刀刮去色谱柱上端多出的填料，之后接上色谱柱头，并标记流动相流动方向，色谱柱装填完成。

柱子的预处理：新合成的固定相在装柱之后并不能直接进行下一步的拆分实验，必须对柱子进一步处理。将含有 1.0 mmol/L 的某金属离子的水溶液作为对柱子的预处理流动相，以 1.0 mL/min 的流速流经手性柱子，持续 2.0 h，之后关掉泵让柱子中的流动相静止 4 h，而后在重复一次以上的操作。这种做法的目的是使固定相中含有一定量的金属离子，在进行固定相的拆分实验中易于形成三元配合物，从而易实现对映体的分离，也达到了冲洗柱子的目的，使后续操作中色谱基线快速达到平稳。在本实验中讨论了多种金属离子对拆分效果的影响，因而在流动相中的金属离子要更换时一定要再次重复上面的操作，确保固定相中金属离子彻底的转变成目的金属离子，以免影响拆分实验结果。

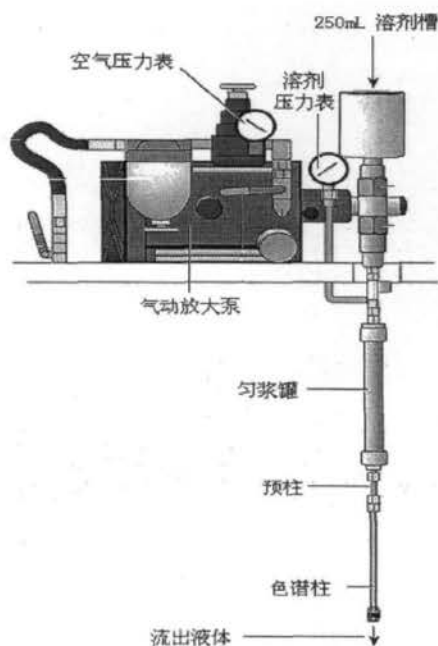


图 2.10 高效液相色谱匀浆装柱机

2.4.3 CSP-1 拆分影响因素

利用本文合成的双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相对五种外消旋体(如图 2.11 所示)(1)DL-氯苯那敏(Chlorpheniramine), (2)DL-色氨酸(Tryptophan), (3)DL-苹果酸(malic acid), (4)DL-缬氨酸(1-2-Amino-3-methylbutyric acid), (5)DL-异亮氨酸(Isoleucine))进行拆分, 为了得到较佳的拆分条件, 探讨了金属离子的种类和浓度, 缓冲溶液的种类和浓度, 流动相的流速和 pH 对拆分效果的影响。

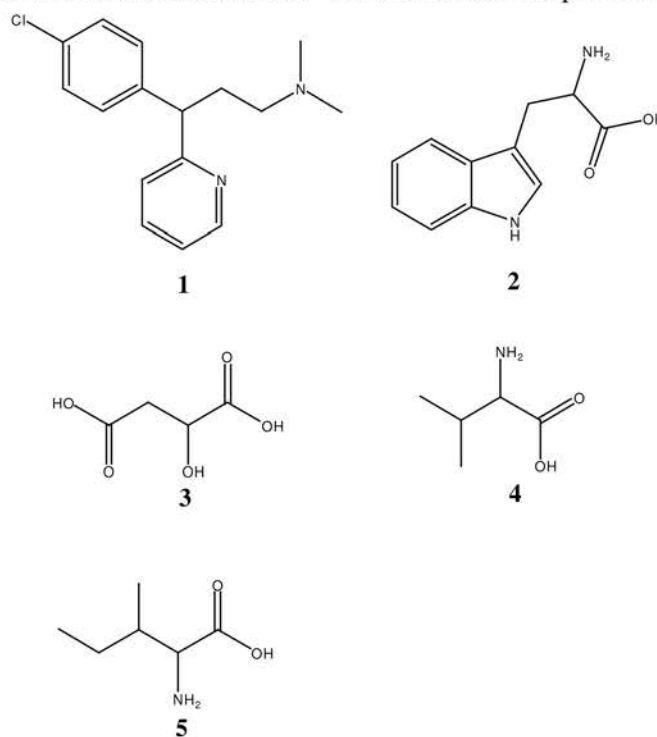


图 2.11 拆分对映体的结构

2.4.3.1 金属离子种类对拆分效果的影响

在配体交换色谱手性固定相中常用于配位的金属离子有 Cu^{2+} , Cu^+ , Ni^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} 等。本实验选出相对较为常用的四种金属离子 Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 作为研究对象, 探讨它们在所合成的 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相对消旋体拆分的影响并选出较佳的配位金属离子。由表 2.3, 可以看到 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 作为配位金属离子加入到流动相中后 2 号、4 号和 5 号对映体没有出峰, 而是滞留在柱子内部, 并且 1 号和 3 号对映体的出峰时间相比于配位金属离子为 Cu^{2+} 时较长。当加入的配位金属离子为 Zn^{2+} 时, 2 号和 4 号对映体没有出峰, 且其它三种对映体的出峰时间相比于配体金属离子为 Cu^{2+} 时较长。但是当

以 Cu^{2+} 为配位金属离子时，所拆分的物质全部出峰，出峰时间短而且有很好的分离度。配体交换色谱手性固定相的拆分原理是：金属离子与固定相和拆分对象形成三元配合物，所形成的三元配合物在流动相中有一定的滞留作用，正是因为对映体之间所形成的三元配合物稳定性不同，从而形成不同的滞留，而实现对映体的分离，如图 2.12 所示。

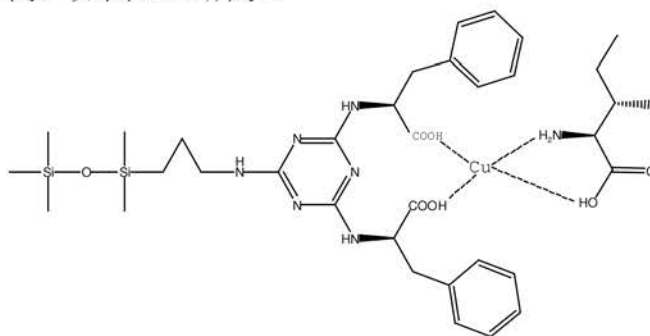


图 2.12 手性配体固定相分离机理图

由于不同金属离子有不同的半径和轨道排布，因而所形成的配合物稳定性不同，导致具有不同的滞留时间。正是因为 Ni^{2+} ， Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 与固定相和拆分物质形成三元配合物过于稳定，使部分消旋体不能随着流动相流出柱子，却滞留在柱子内。而以 Cu^{2+} 为配位金属离子所形成配合物的稳定性适中，所以相对其他三种金属离子 Cu^{2+} 作为配位金属离子在本实验所合成的固定相中无论是在分离度还是在分离时间都是较优的。

表 2.3 不同的金属离子对对映体拆分的影响

	Cu^{2+}				Zn^{2+}				Ni^{2+}				Pb^{2+}			
	k1	k2	α	R	k1	k2	α	R	k1	k2	α	R	k1	k2	α	R
1	2.04	4.43	2.19	1.52	4.40	6.48	1.47	1.07	3.78	6.12	1.61	0.98	2.83	3.51	1.24	1.14
2	4.88	5.92	1.21	0.77	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3	1.64	2.40	1.45	0.98	2.82	4.11	1.46	0.77	3.55	5.03	1.42	0.81	5.73	5.73	1.00	--
4	0.16	0.40	2.50	0.47	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5	0.26	1.24	4.70	1.30	1.18	1.68	1.43	0.48	--	--	--	--	--	--	--	--

色谱条件: 0.3 mmol/L 的金属离子在 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中; pH=4.5; 流速 1.0 ml/min;
检测波长 214 nm; 柱温 35℃

2.4.3.2 Cu^{2+} 浓度对拆分效果的影响

由上面的结果可知：在本实验所合成的柱子中用 Cu^{2+} 作为配位金属离子所

得到的拆分效果最好。为找到较佳的拆分条件, 本文就 Cu^{2+} 的浓度对拆分效果的影响进行了验证。由图 2.13 可以看出铜离子的浓度对拆分效果有很大影响, 在所拆分的五种消旋体中 1 号, 3 号和 5 号对映体的分离度随着铜离子浓度的增加而增加, 但是由于所选流动相体系的限制, 同时考虑到铜离子过高会产生拖峰现象和检测器响应值的变化。在所选定的流动相体系中对这三种物质的拆分最适铜离子的浓度是 0.7 mmol/L。但是对 2 和 4 号消旋体的拆分随着铜离子浓度的增加, 前者拆分效果增加不是很明显而后者分离度明显降低甚至最后都没拆分开。这是因为随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 三元配合物的量也会增加, 使得所分离物质的保留增强促进了拆分, 但当 Cu^{2+} 达到饱和之后三元络合物存在如下的平衡:



AA 表示所拆分的对映体

Ls 表示手性配体

由上述平衡式可知, 如果继续增加 Cu^{2+} 浓度, 平衡向右移动, 不利于形成三元络合物, 从而降低了所拆分对映体的分离度。因而在选择 Cu^{2+} 浓度时应根据实际情况而定, 如果 Cu^{2+} 浓度没有达到饱和值时, 所拆分对映体的分离度已经标准分离度 $R \geq 1.5$, 则没有必要在增加铜离子浓度。

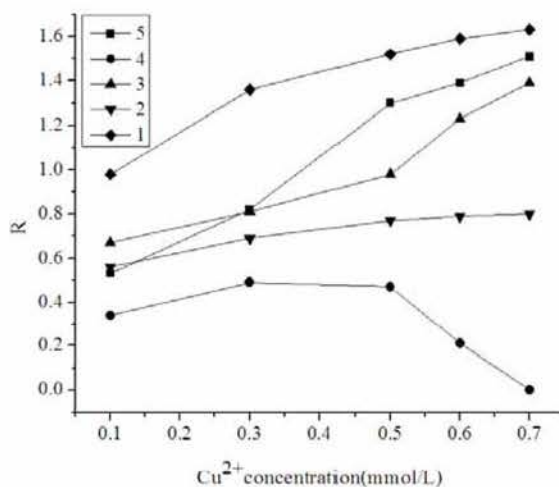
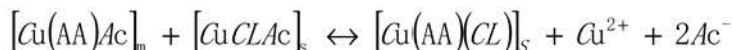
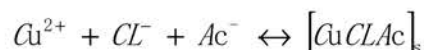
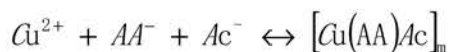


图 2.13 铜离子的浓度对拆分效果的影响

(色谱条件: pH=4.5 的 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液+ Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 35°C)

2.4.3.3 不同种类缓冲溶液对拆分效果的影响

在前面的实验中得出流动相中金属离子的种类和浓度对拆分效果有很大影响，鉴于此，本小节探讨了不同的缓冲溶液体系对手性物质拆分的影响。本实验选择磷酸盐缓冲溶液体系，醋酸钠缓冲溶液体系和醋酸铵缓冲溶液体系作为研究对象，并调节流动相 pH=4.5，以铜离子为配体金属离子，探讨缓冲溶液体系对拆分效果的影响，并选出较佳的缓冲溶液体系。经过实验验证得到如下表 2.4 所示结果，由表可知三种缓冲溶液体系所拆分的五种对映体出峰时间相差不大，说明在这三种缓冲溶液体系中所形成的三元络合物稳定性相差不大。但是流动相以醋酸铵和醋酸钠缓冲溶液体系为缓冲溶液时，拆分五种消旋体有两种消旋体没有拆分开，并且对其他三种对映体的分离度也不是很高，而磷酸盐缓冲溶液体系无论是在拆分的数量，还是在对映体的分离度都明显的优于醋酸钠和醋酸铵缓冲溶液体系。可能的原因是：醋酸根是弱电解质，本身参与了与铜离子的络合竞争，形成了如下所示的平衡：



AA⁻表示所拆分的对映体

CL⁻表示固定相

m 表示流动相

s 表示固定相

醋酸钠缓冲溶液或是醋酸铵缓冲溶液浓度增加，伴随着醋酸根的浓度也在增加，由第三个平衡式可知平衡会向左移动，则相应形成的三元络合物的量就会减少，因为在配体交换色谱中三元络合物的形成是拆分的必备条件，因而其结果是对对映体的拆分效果降低。在所选定的三种缓冲溶液体系中磷酸盐缓冲溶液体系最适合应用于 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相的流动相中。

表 2.4 不同的缓冲溶液体系对拆分效果的影响

	磷酸盐				醋酸铵				醋酸钠			
	k1	k2	α	R	k1	k2	α	R	k1	k2	α	R
1	2.04	4.43	2.19	1.52	2.41	3.23	1.34	0.54	2.48	3.12	1.26	0.78
2	4.88	5.92	1.21	0.77	4.52	5.46	1.21	0.69	4.60	5.80	1.26	0.71
3	1.64	2.40	1.45	0.98	1.57	2.25	1.43	0.85	0.35	0.49	1.40	0.86
4	0.16	0.40	2.50	0.47	0.17	0.17	1	--	0.16	0.16	1	--
5	0.26	1.24	4.70	1.30	0.24	0.24	1	--	0.21	0.21	1	--

色谱条件: pH=4.5 的 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液体系/醋酸铵缓冲溶液体系/醋酸钠缓冲溶液体系+ 0.3 mmol/L Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$

2.4.3.4 缓冲溶液浓度对拆分效果的影响

本小节选择手性药物氯苯那敏为研究对象探讨了磷酸盐缓冲溶液的浓度对分离效果的影响。选定了三个磷酸盐缓冲溶液浓度点, 分别是: 0.01 mol/L、0.02 mol/L 和 0.05 mol/L, 得到实验结果如图 2.14。由图可知磷酸盐缓冲溶液浓度在 0.02 mol/L 时分离度 $R=1.52$ 优于其它两个浓度点, 因而可以得到磷酸盐缓冲溶液对形成的三元络合物也有一定的影响, 也像 2.4.2.3 小节探讨的一样, 但是磷酸盐缓冲溶液相对于醋酸类缓冲溶液对三元络合物的影响要小, 这也是为什么同等浓度的磷酸盐缓冲溶液拆分效果要优于醋酸类缓冲溶液, 从这一点也说明了为什么许多实验中选用磷酸盐缓冲溶液作为流动相添加剂。

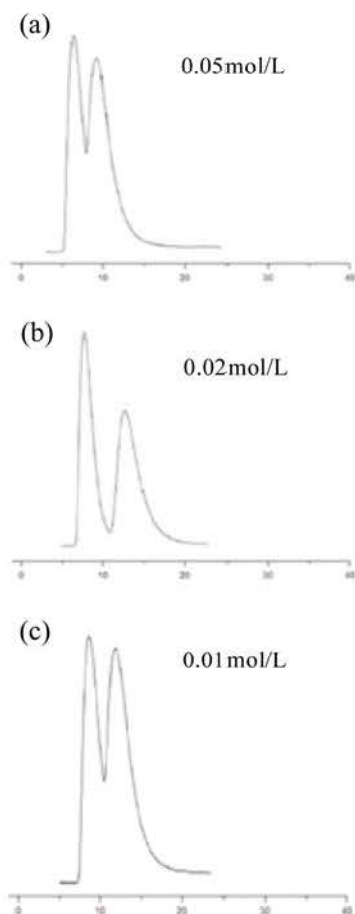
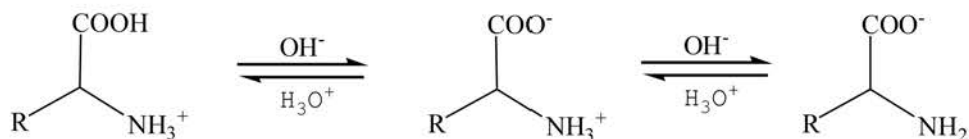


图 2.14 缓冲溶液的浓度对拆分结果的影响

(色谱条件: pH=4.5 的磷酸盐缓冲溶液+ 0.3 mmol/L Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 35°C)

2.4.3.5 流动相 pH 值对拆分效果的影响

流动相 pH 值对拆分效果有明显的影响, 在许多配体交换手性固定相的文章中都有一定的探讨^[92-93], 这是因为流动相 pH 对固定相表面由金属离子、固定相和拆分对映体形成的三元配合物有显著的影响。本实验选定 5 号对映体为研究对象, 选择三个 pH 点, 分别是 pH=4.5、pH=5.0 和 pH=6.0, 所得结果如图 2.15 所示。从图中可以大致看出一个趋势, 那就是随着流动相 pH 的增加 5 号对映体的分离度也随着增加, 但当达到一定值时随着 pH 的增加 5 号对映体的分离度就会降低。这是因为在流动相中, 氨基酸的阴阳离子与两性离子在水溶液中存在一定的平衡, 如下所示:



由上述平衡可以看出 5 号对映体的存在形式一定层度上取决于流动相的 pH，可知所形成的三元络合物通常是由中心金属离子与未被质子化的羧基和氨基构成，在上述所示的平衡中可以看出增大流动相 pH，伴随着 R-NH₂ 的浓度也会增加，更有利于形成三元络合物，提高了对映体拆分的机率。有研究结果表明，流动相中 pH 越接近中性越容易形成三元络合物^[94]。但是流动相中 pH 较高，形成的三元络合物过于稳定也不利于拆分，因为过于稳定的三元络合物延长了对映体出峰时间甚至不出峰而保留在手性固定相中，降低了手性固定相的识别能力，从而影响了手性固定相的拆分性能。可以得出在配体交换手性固定相中对所拆分的对映体有一个较合适流动相 pH，在这个 pH 下对映体拆分效果最好。

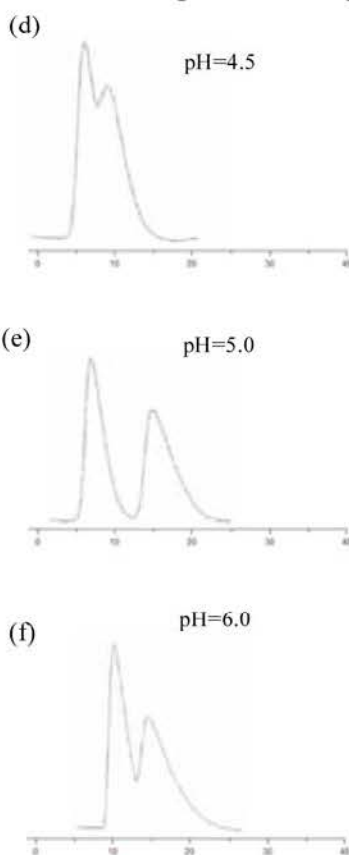


图 2.15 pH 值对拆分结果的影响

(色谱条件：0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液+ 0.5 mmol/L Cu²⁺；流速：1.0 mL/min；检测波长：214 nm；柱温：35 °C)

2.4.3.6 流动相流速对拆分效果的影响

流动相流速的改变，对拆分物质的分离度也有一定的影响，由表 2.5 得出随着流动相流速的改变所拆分的对映体出峰时间和分离度也随之变化。由 1 号对映体可以出，在流动相流速为 0.5 mL/min 时其影响因子大于流动相流速在 1.0 mL/min 和 0.7 mL/min 时，但是其分离度却是小于两者。主要原因是当流动相流速较小时所拆分的对映体产生了拖峰现象，减小了分离度。4 号对映体在流动相流速较小时没有实现分离，可能的原因是：在此固定相中 4 号对映体的分离度本来就不高，流动相流速较小时产生了较为严重的拖峰现象，使得对映体没有拆分开。但是流动相流速的改变对 5 号对映体的影响确恰恰相反，在流动相流速较小时其分离度却是大于流动相流速较高时。可能原因是 5 号对映体形成的三元络合物与其他三种对映体所形成的三元络合物相比较稳定相较差，很容易随着流动相流出，而不易产生拖峰的现象，提高了分离度。

表 2.5 流动相流速对拆分效果的影响

	0.5mL/min				0.7mL/min				1.0mL/min			
	k ₁	k ₂	α	R	k ₁	k ₂	α	R	k ₁	k ₂	α	R
1	2.16	4.78	2.21	1.37	2.11	4.23	2.00	1.44	2.04	4.43	2.19	1.52
2	5.12	5.98	1.16	0.54	4.52	5.46	1.21	0.61	4.88	5.92	1.21	0.77
3	1.98	2.51	1.26	0.56	1.57	2.25	1.43	0.85	1.64	2.40	1.45	0.98
4	0.23	0.23	1	--	0.17	0.37	2.17	0.38	0.16	0.40	2.50	0.47
5	0.31	1.40	4.51	1.47	0.29	1.34	4.62	1.39	0.26	1.24	4.70	1.30

色谱条件：pH=4.5 的 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液+ 0.3 mmol/L Cu²⁺；检测波长：214 nm；柱温：35 °C

2.5 本章小结

本章以手性识别能力较强的 L-苯丙氨酸为手性源，选择较强硬度和耐酸性的硅胶为固定相载体，选择 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂和特殊三角结构的三聚氯氰为连接臂，利用化学键合法合成了一种新型的键合型双齿型 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相，具体合成步骤：(1)氨丙基硅胶(APS)的合成，以硅胶为载体，以 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂为连接臂，甲苯为溶剂，在 110 °C 下搅拌反应 14 h，既得产物。(2)APS-三聚氯氰的合成，三聚氯氰和 APS 加入甲醇溶剂中，在 70 °C 搅拌反应 6 h，既得产物。(3)L-苯丙氨酸钠盐的合成，在 L-苯丙氨

酸的甲醇溶液中，缓慢滴加低浓度的氢氧化钠甲醇溶液而生成。(4)。CSP-1 的合成，APS-三聚氯氰和氨基酸钠盐以甲醇为溶剂，在 70 °C 搅拌反应 6 h，既得产物。

通过元素分析、热重分析以及红外分析对手性固定相进行了定性和定量表征。利用热重进行了定量分析，得出合成的固定相中 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂、三聚氯氰、L-苯丙氨酸的热失重量分别是 6.236%、5.207%和 2.637%，说明反应成功进行。利用元素分析计算得出每步反应物的反应率，计算得到硅胶表面覆盖率和氨丙基硅胶中的氨基反应率分别是 54.68%和 67.08%，键合 L-苯丙氨酸时，氨丙基硅胶-三聚氯氰中氯原子的反应率是 48.06%。利用红外分析法对 L-苯丙氨酸钠盐定性表征，在 1600 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} 附近出现两个中等双峰，说明反应成功，并对 L-苯丙氨酸固定相进行红外表征，在 2926 cm^{-1} 出现碳氢键的伸缩震动峰。

本文所合成的 L-苯丙氨酸固定相成功的拆分了五种对映体，分别是：DL-氯苯那敏，DL-色氨酸，DL-苹果酸，DL-缬氨酸，DL-异亮氨酸。为探索较佳的拆分条件，深入探讨了金属离子的种类和浓度，缓冲溶液的种类和浓度，流动相的流速和 pH 对拆分效果的影响。首先对金属离子的种类进行了探讨，选出较为常用的四种金属离子 Cu^{2+} ， Ni^{2+} ， Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 作为研究对象，在确定其他条件不变的情况下，得出在此固定相中金属离子 Cu^{2+} 作为配位金属离子拆分效果最好。金属离子 Cu^{2+} 的浓度对拆分效果也有很大的影响，通过建立金属离子与三元络合物的平衡关系式，得出流动相中铜离子的浓度有一个最适点，当超过这个最适点时，手性固定相对手性物质的拆分能力下降。本文选择了三种常用的缓冲溶液体系做了初步的探讨，实验结果表明磷酸盐缓冲溶液对拆分效果最好，同时以氯苯那敏为研究对象验证了磷酸盐缓冲溶液的浓度的拆分效果的影响，在所选定的三个浓度点中磷酸盐缓冲溶液浓度为 0.02 mol/L 时，对映体的拆分效果最好。在流动相 pH 对拆分效果的讨论中，发现流动相 pH 越高越容易形成三元络合物，但并不是流动相 pH 越高拆分效果越好，在流动相 pH=5.0 时，5 号对映体的拆分效果最好。流动相流速太小易产生拖峰显现，在保持峰形美观和分离度达到要求值的条件下，适当调节流动相流速的大小。

本手性固定相在经过多次的进样之后其分离效果基本不变，说明本文所合成出的手性固定相具有较强的稳定性。

3 CSP-2 的合成及对氯苯那敏的拆分

在 CSP-1 合成的基础上, 本章以较强手性识别能力的 L-脯氨酸为手性源, 并以硅胶为载体, 以 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂(KH-550)和三聚氯氰作为连接臂合成了一种新型的键合型双齿型 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相(CSP-2), 并对烃烷基胺类抗组胺药氯苯那敏进行了手性拆分。脯氨酸由于本身结构的特殊性使其带有一定的刚性和较强选择性, 在许多以氨基酸为手性源的文献中大多选用脯氨酸作为手性中心^[95-96]。所合成的固定相通过热重分析, 红外分析和元素分析进行了定性和定量表征。L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相以匀浆法装柱, 并成功地拆分了手性药物 DL-氯苯那敏(Chlorpheniramine)。为找到较佳的拆分条件, 本文详细考察了流动相 pH、中心金属离子浓度和缓冲溶液浓度以及柱温对拆分效果的影响。本实验的具体流程如下 3.1 图所示。

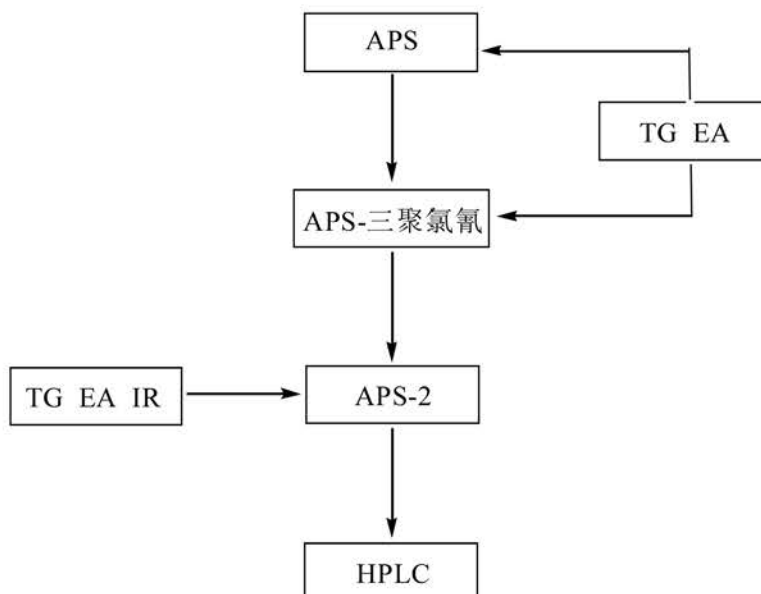


图3.1 实验流程图

3.1 CSP-2的合成

本实验是通过化学键合的方法合成了双齿型L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相(CSP-2), 具体的合成工艺路线如图3.2。

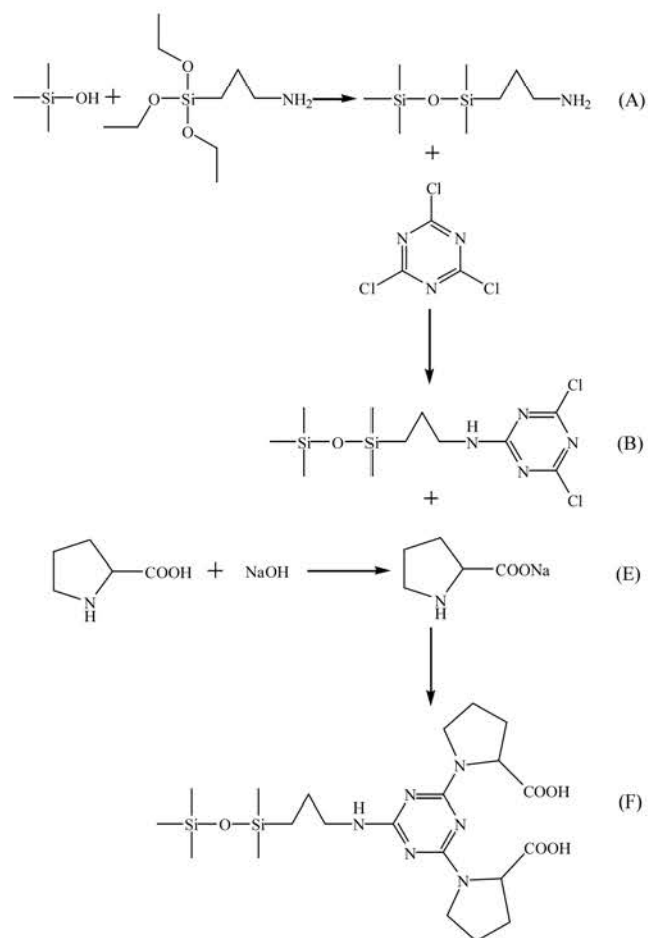


图3.2 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相合成路线

本实验的合成方法和原料的处理与第二章节CSP-1固定相的合成相同。

3.2 CSP-2的表征

3.2.1 APS的表征

同2.3.1

3.2.2 APS-三聚氯氰的表征

同2.3.2

3.2.3 脯氨酸钠盐的表征

如图3.3所示，分别为脯氨酸(A)和脯氨酸钠盐(B)的红外图谱。与苯丙氨酸中的氨基相同，脯氨酸中氨基的红外吸收峰在 $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ 处有两个峰，在图A中可以明显的看出。并且氨基酸中羧酸的羰基伸缩震动出双峰： 1600 cm^{-1} 左右的反对称震动峰和 1400 cm^{-1} 左右的对称震动峰。当氨基酸成盐后，氨基的红外吸收双峰会疏导影响，在 3100 cm^{-1} 左右会形成一个较大的红外吸收峰，并且羧基成盐后羧根的震动峰比羧基的吸收峰较为明显，在 1600 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} 附近形成两个中等双峰。以上描述的特点在图B中都有体现，说明成功合成了脯氨酸钠盐。

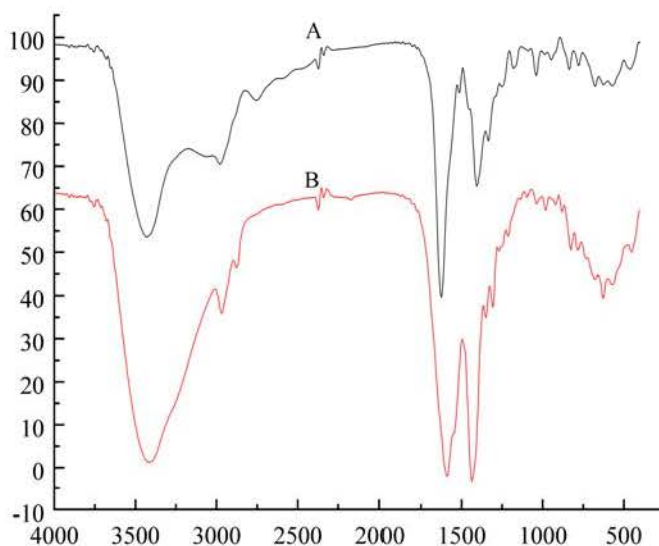


图3.3 红外图(A: 脯氨酸; B: 脯氨酸钠盐)

3.2.4 终产物CSP-2的表征

热重分析：在同等条件干燥的APS-三聚氯氰和CSP-2测得如图3.4所示的热重图。由图中可以看到APS-三聚氯氰和CSP-2的热失重量分别是12.625%和15.482%，由此可以计算得到L-脯氨酸的热失重量约是2.857%。

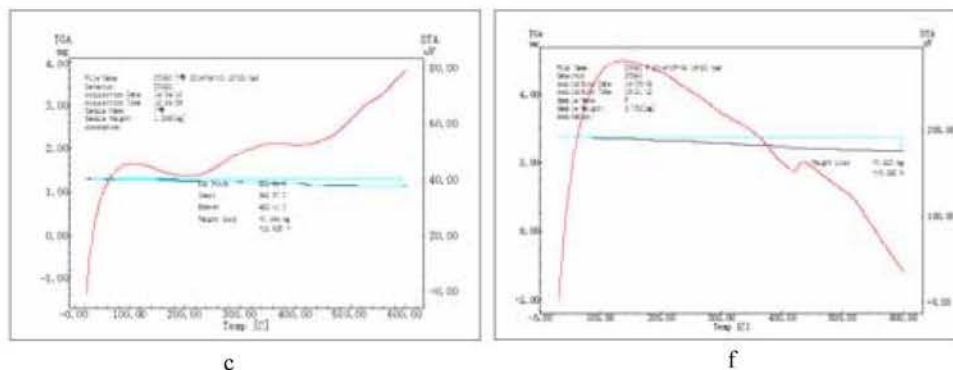


图3.4 热重分析图(c: APS-三聚氯氰热重图; f: CSP-2热重图)

元素分析: CSP-2的元素分析结果: C, 5.71%; N, 2.62%; H, 1.20%。联合上一步的数据可以计算出三聚氯氰中氯原子的反应率 V :

$$V = \left[\frac{\frac{2}{3}(W_F - W_B)}{M} \div \left(\frac{W_B - W_A}{3 \times M} \right) \right] \times 100\% = 57.36\%$$

W_A 是产物APS中氮元素含量即0.96%

W_B 是产物APS-三聚氯氰中氮元素含量即2.25%

W_F 是产物CSP-2中氮元素含量即2.62%

M 为氮元素的分子量

由三聚氯氰中氯原子的反应率可知脯氨酸钠盐的反应量不高, 主要原因是脯氨酸为手性物质, 具有一定的空间结构, 对反应造成一定的阻碍, 并且硅胶本身也有一定的空间阻碍, 导致脯氨酸钠盐反应量不是很高。

红外分析: 在前面的CSP-1红外分析的已经说明, 键合物质的特征峰大多被硅胶的一些特征吸收峰所掩盖, 只能看到碳氢键的伸缩震动峰, 在 2926 cm^{-1} 出现, 由图3.5可以看到。因而可以判定合成反应是成功的。

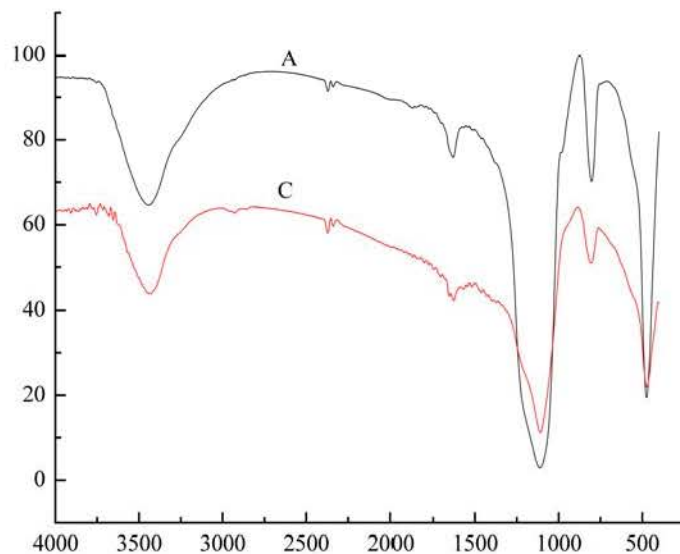


图3.5 CSP-2的红外表征图(A: 空白硅胶; B: CSP-2)

3.3 CSP-2拆分性能研究

应用本文合成的CSP-2成功的拆分了手性药物DL-氯苯那敏(图3.6), 为得到较佳的拆分条件, 本文探讨了金属离子的浓度, 缓冲溶液的浓度, 流动相的pH以及柱子的温度对拆分效果的影响。结合固定相CSP-1的拆分结论, 本实验选择的色谱条件是: 流动相组成为磷酸盐缓冲溶液和 Cu^{2+} , 流速1.0mL/min, 检测波长为214nm, 柱温设定为35℃。色谱柱死时间 t_0 用1,3,5-三叔丁基苯测定。

本实验所涉及的分离参数、装柱和柱子的预处理与2.4.1和2.4.2相同。

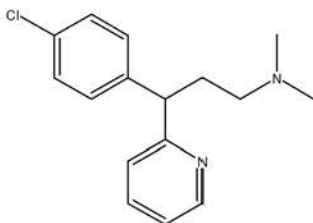


图3.6 DL-氯苯那敏结构式

3.3.1 不同的 Cu^{2+} 浓度对拆分效果的影响

配体交换色谱手性固定相中常用于配位的金属离子有 Cu^{2+} , Cu^+ , Ni^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} 等, 根据第二章的实验结果, 本实验选用 Cu^{2+} 为中心配位金属。

试验结果如图3.7，可以看出随着 Cu^{2+} 浓度的增加，手性药物氯苯那敏的分离度也在增加，但是铜离子的浓度增加到一定值时分离度不在增加，甚至有下降的趋势。根据配体交换色谱手性固定相的拆分原理：金属离子与固定相和拆分物质形成三元配合物，所形成的配合物对所拆分的对映体形成不同的滞留作用而实现分离。并且 Cu^{2+} 与三元络合物存在如下平衡：



AA表示所拆分的对映体

Ls表示手性配体

由以上的平衡式可以得到铜离子的浓度存在一个饱和点，在这个饱和点时手性固定相的识别能力最高，亦即对映体的分离度最高。所以在没有达到这个饱和点时，随着 Cu^{2+} 浓度增加有足够多的 Cu^{2+} 与对映体和固定相形成三元络合物，有利于对映体的拆分，但是当 Cu^{2+} 浓度超过这个饱和点时，由平衡关系式可知平衡向右移动，三元络合物的量减少，不利手性拆分。

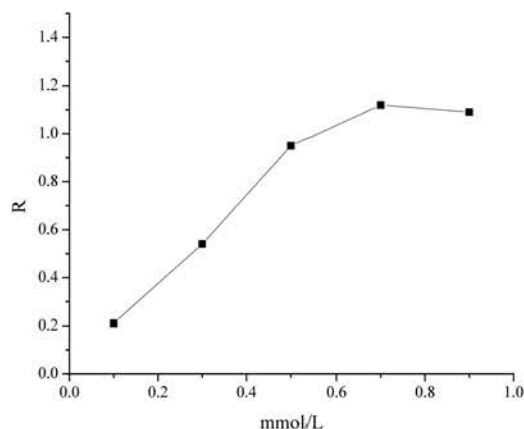


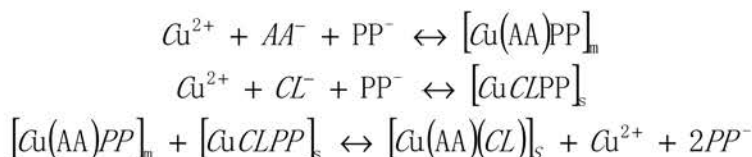
图3.7 Cu^{2+} 离子的浓度对分离度的影响

(色谱条件：pH=4.5的0.02 mol/L的磷酸钠缓冲溶液+ Cu^{2+} ；流速：1.0 mL/min；检测波长：214 nm；柱温：30 °C)

3.3.2 缓冲溶液的浓度对拆分效果的影响

缓冲溶液的浓度对拆分效果有很大影响，在前面的实验中已经得到过验证，但是不同的固定相对外消旋体拆分时，达到较好拆分效果时缓冲溶液的浓度也不同。本实验探讨了缓冲溶液的浓度对拆分效果的影响，目的是找到较佳的缓冲溶液浓度，实验结果如表1所示。可以看出随着缓冲溶液浓度的降低，手性药

物氯苯那敏的分离度却是在增加(表1)。可知磷酸盐虽然是强电解质,但是在较高的浓度时也可以与铜离子在溶液中形成沉淀,所以可能的原因是较高浓度的缓冲溶液中酸根离子参与了金属离子、对映体和固定相之间的配位络合,形成了如下所示的平衡。



AA⁻表示所拆分的对映体

PP⁻表示磷酸根离子

CL⁻表示固定相

m表示流动相

s表示固定相

当缓冲溶液的溶度过高时,由第三个平衡式可知平衡会向左移动,降低了三元络合物在固定相中的含量,从而降低了手性固定相的手性识别能力。因而由上面的平衡方程式可以得到磷酸盐缓冲溶液有一个较佳浓度,在这个浓度时手性药物氯苯那敏的分离度最高,偏离这个浓度时,对氯苯那敏的拆分效果都会有所降低。

表3.1 缓冲溶液的浓度对拆分效果的影响

	k_1	k_2	α	R
0.005 mol/L	3.98	7.46	1.87	1.81
0.01 mol/L	4.18	8.19	1.96	2.37
0.02 mol/L	3.72	7.00	1.88	1.89
0.05 mol/L	5.90	6.72	1.14	0.85

(色谱条件: pH=4.5的磷酸钠缓冲溶液+0.5 mmol/L Cu²⁺; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 30 °C)

3.3.3 流动相pH值对拆分效果的影响

在一定拆分条件下流动相分别为不同pH值时,得到对手性药物氯苯那敏的拆分离相图谱如图3.8和图3.9所示。可以看到流动相pH=7.0时氯苯那敏的分离度R=2.05,当流动相pH=4.5时氯苯那敏的分离度R=1.78。由此可以看出在此固定相中配位主要在氯苯那敏的非质子基团、铜离子与羧基阴离子之间,而形成对应体配位络合物。较高的酸度对三元络合物的稳定有害,而不利于对映体的拆分。

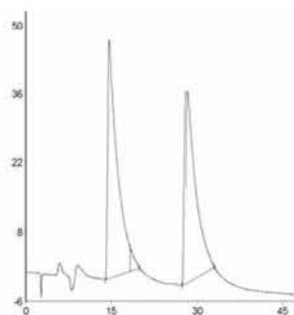


图3.8 氯苯那敏液相色谱图

(色谱条件: pH=7.0的0.02 mol/L磷酸钠缓冲溶液+0.2 mmol/L Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$)

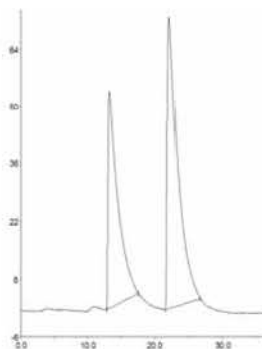


图3.9 氯苯那敏液相色谱图

(色谱条件: pH=4.5的0.02 mol/L磷酸钠缓冲溶液+0.2 mmol/L Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$)

3.3.4 柱温对拆分效果的影响

柱温对拆分效果的影响如表3.2所示, 可知随着温度的增加对映体在柱内的保留时间减小, 可知温度增加三元络合物的稳定性降低。温度在25 $^{\circ}\text{C}$ 时分离度已经很高, 但是由于出峰时间太长在实际应用中有限, 在35 $^{\circ}\text{C}$ 时分离度较高于25 $^{\circ}\text{C}$ 时, 并且出峰时间相对较短。温度较高时不但分离度低而且对柱子有害。因而对映体的分离应选择适当的温度, 35 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

表3.2 温度对拆分的影响

	k_1	k_2	α	R
25 °C	4.36	6.86	1.57	1.87
35 °C	3.69	7.05	1.91	1.92
45 °C	3.51	5.89	1.67	1.39

(色谱条件: pH=4.5的0.02 mol/L的磷酸钠缓冲溶液+ 0.5 mmol/L Cu^{2+} ; 流速: 1.0 mL/min;
检测波长: 214 nm)

3.4 本章小结

本章以L-脯氨酸为手性中心,以硅胶为载体通过化学键合法成功的合成了一种新型的键合型双齿型L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相。为进一步确定反应是否成功,选用元素分析、红外分析和热重分析作为检测手段,对所合成的固定相进行了定性和定量表征。从实验表征结果可以确定L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相合成是成功地。

CSP-2成功地拆分了手性药物氯苯那敏,根据CSP-2的拆分经验,为得到较佳的拆分条件,本文详细考察了流动相pH、中心金属离子浓度和缓冲溶液浓度以及柱温对拆分效果的影响,得出较佳拆分条件是:铜离子浓度0.7 mmol/L、缓冲溶液浓度0.01 mol/L、流动相pH=7.0和柱温35 °C,在较佳拆分条件下CSP-2对氯苯那敏的分离度 $R=2.85$ 。

本手性固定相在经过多次的进样之后分离效果依然没有较大的变化,说明本手性固定相具有较强的稳定性。

4 结论

1 本文以硅胶为载体, 3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂和特殊三角结构的三聚氯氰为连接臂, 采用键合法成功地合成出两种新型氨基酸手性配体交换色谱固定相CSP-1和CSP-2。并得到了两种固定相的具体合成条件: ①硅胶和3-氨丙基三乙氧基硅烷试剂以甲苯为溶剂, 在110℃下搅拌反应14h, 既得APS。②三聚氯氰和APS加入甲醇溶剂中, 在70℃下搅拌反应6h, 既得APS-三聚氯氰。③在氨基酸的甲醇溶液中, 缓慢滴加低浓度的氢氧化钠甲醇溶液而生成氨基酸钠盐。④APS-三聚氯氰和氨基酸钠盐以甲醇为溶剂, 在70℃搅拌反应6h, 既得CSP-1和CSP-2。

2 通过元素、热重和红外分析, 对所合成的两种固定相进行了表征, 结果表明实验所测相关数据与其理论计算值基本相符, 表明合成物与设计的目标产物是一致的, 两种固定相的合成是成功的。

3 CSP-1成功的拆分了DL-氯苯那敏, DL-色氨酸, DL-苹果酸, DL-缬氨酸和DL-异亮氨酸五种对映体, 并且得出: 铜离子作为中心金属离子和磷酸盐作为缓冲溶液, 且铜离子浓度为0.7 mmol/L和磷酸盐缓冲溶液浓度为0.02 mol/L时拆分效果较好, 但不同对映体拆分时其流动相的流速是不同的, 以异亮氨酸为研究对象, 得到流动相pH对拆分效果也有影响。CSP-2在优化出的较佳拆分条件(铜离子浓度0.7 mmol/L、缓冲溶液浓度0.01 mol/L、pH=7.0和柱温35℃)下, 对手性药物氯苯那敏的分离度可达2.85, 高于标准分离度。

4 CSP-2对手性药物氯苯那敏的拆分分离度明显高于CSP-1, 且色谱峰形状尖锐规则; CSP-1对其他氨基酸对映体的拆分能力强于CSP-2。

本文为DL-氯苯那敏, DL-色氨酸, DL-苹果酸, DL-缬氨酸和DL-异亮氨酸的拆分提供了两种新型的氨基酸配体交换手性固定相及其较佳的拆分条件。使用本文研制的固定相和探索的拆分条件, 可使氯苯那敏和异亮氨酸的分离度超过标准分离度。

对今后研究的建议

- 1、本文所合成的两种氨基酸固定相存在的问题是固定相键合量不高，在今后的工作中希望能有所改善。
- 2、可进一步研究本文所合成的固定相对其他种类氨基酸的拆分性能。

参考文献

- [1]. 陈亿新, 刘天穗, 刘汝锋, 等. 手性药物技术与展望[J]. 广州大学学报, 2002, 1(1): 39-43.
- [2]. Schmid MG, Gübitz G. Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400, 2305-2316.
- [3]. Ravikumar M, Varma MS, Raju TS, et al. Enantiomeric separation of moxifloxacin and its (R, R)-isomer by ligand-exchange chiral chromatography[J]. Chromatographia, 2009, 69(1/2): 85.
- [4]. 杜灿屏, 林国强, 施敏, 等. 手性与手性药物研究中的若干科学问题[J]. 中国科学基金, 2003, (2): 72-75.
- [5]. 尤启冬, 林国强, 手性药物: 研究与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 3-5.
- [6]. Blaschke G, Kraft HP, Fickentscher K, et al. Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers[J]. Arzneimittelforschung, 1979, 29: 1640-1642.
- [7]. 黄德友, 李杨, 李连杰, 蒋登高. 以氨基酸为手性源的手性固定相研究进展[J]. 科学时代. 2014, (03): 37-40.
- [8]. 王普善, 王宇梅, 手性药物开发战略的再认识[J]. 精细与专用化学品, 2004, 12(10): 4-8.
- [9]. Wang D X, Zhang X X, Zhang J L, et al. Separation and recognition of the enantiomers of trans arylcyclopropanecarboxylic acids and their amide and nitrile derivatives on polysaccharide stationary phases [J]. Chromatographia, 2007, 65(5-6), 343-348.
- [10]. 李根容, 李志良, 手性药物拆分技术研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(8): 969-974.
- [11]. 任国宾, 詹予忠, 郭士岭. 手性拆分技术进展[J]. 河南化工, 2002, 1: 1-3.
- [12]. 王普善. 手性化学工业的进展(一)[J]. 精细与专用化学品, 2006, 14(14): 1-5.
- [13]. 谢锐, 褚良银, 曲剑波. 手性拆分膜的研究与应用新进展[J]. 现代化工, 2004, 24 (4): 15-18.
- [14]. Gabelman A, Hwang S-T. Hollow fiber membrane contactors[J]. Journal of Membrane Science, 1999, 159(1-2): 61-106.
- [15]. 周华, 龙远德, 黄天宝. 一种新型 L-脯氨酸衍生的高效液相色谱手性固定相[J]. 色谱, 1997, 15(1): 26.
- [16]. 戴荣继, 苏彩莲, 佟斌, 等. 膜拆分法分离制备手性药物[J]. 膜科学与技术, 2006, 26(3): 84-88.
- [17]. Shishovska M, Trajkovska V. HPLC-method for determination of permethrin enantiomers using chiral beta-cyclodextrin-based stationary phase[J]. CHIRALITY, 2010, 22(5): 527.
- [18]. C. Freissinet, A. Buch, C. Szopa, et al. Enantiomeric separation of volatile organics by gas

- chromatography for the in situ analysis of extraterrestrial materials: Kinetics and thermodynamics investigation of various chiral stationary phases[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1306: 59-71.
- [19].Sulan Liao, Xiaochun Wang, Xucong Lin, Xiaoping Wu, et al. A molecularly imprinted monolith for the fast chiral separation of antiparasitic drugs by pressurized CEC[J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(14): 2123-2130.
- [20].Welch CJ, Biba M, Gouker JR, et al. Solving multicomponent chiral separation challenges using a new SFC tandem column screening tool[J]. *CHIRALITY*, 2007, 19(3): 184-189.
- [21].M. Starek, J. Krzek. Chemical Study of (+)-(S)-Ibuprofen Enantiomer Chiral Inversion by Means of Chiral TLC Separation[J]. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2012, 25(1).
- [22].Hadjistasi CA, Stavrou IJ, Stefan-Van Staden RI, et al. Chiral Separation of the Clinically Important Compounds Fucose and Pipecolic Acid Using CE: Determination of the Most Effective Chiral Selector[J]. *Chirality*, 2013, 25(9): 556-560.
- [23].W.H Pirkle, J.A Burke. Chiral stationary phase designed for β -blockers[J]. *Journal of Chromatography A*, 1991, 557: 173-185.
- [24].Hermansson, J. DIRECT LIQUID-CHROMATOGRAPHIC RESOLUTION OF RACEMIC DRUGS USING ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN AS THE CHIRAL STATIONARY PHASE[J]. *Chromatogr*, 1983, 269: 71-80.
- [25].Xia Li, Zhiming Zhou. Enantioseparation performance of novel benzimido- β -cyclodextrins derivatized by ionic liquids as chiral stationary phases[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 819: 122-129.
- [26].Bruno Gallinella, Lucia Bucciarelli, Leo Zanitti, et al. Direct separation of the enantiomers of oxaliplatin on a cellulose-based chiral stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography mode[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1339: 210-213.
- [27].Fernandes Carla, Tiritan Maria Elizabeth, Cass Quezia, Kairys, et al. Enantioseparation and chiral recognition mechanism of new chiral derivatives of xanthenes on macrocyclic antibiotic stationary phases[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1241: 60-68.
- [28].Jin KB, Kim HE, Hyun MH. Liquid Chromatographic Resolution of Mexiletine and Its Analogs on Crown Ether-Based Chiral Stationary Phases[J]. *Chirality*, 2014, 26, 272-278.
- [29].Michael Lammerhofer. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(6): 814 - 856.
- [30].W. H. Pirkle, D. W. House. Chiral high-performance liquid chromatographic stationary phases. 1. Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1979, 44(12): 1957-1960.
- [31].Pirkle W H, Finn J M, Schreiner J L. A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers[J]. *Journal of the*

- American Chemical Society, 1981, 103(13): 3964-3966.
- [32]. William H. Pirkle, David W. House, John M. Finn. Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases[J]. Journal of Chromatography. A, 1980, 192(1): 143-158.
- [33]. William H. Pirkle, Myung Ho Hyun. A chiral stationary phase for the facile resolution of amino acids, amino alcohols and amines as the N-3,5-dinitrobenzoyl derivatives[J]. Journal of Organic Chemistry, 1984, 49(17): 3042-3046.
- [34]. William H. Pirkle, Christopher J. Welch, Myung Ho Hyun. A chiral recognition model for the chromatographic resolution of N-acylated L-aryl-L-aminoalkanes[J]. Journal of Organic Chemistry, 1983, 48(25): 5022-5026.
- [35]. PIRKLE, WH, FINN, JM, HAMPER, BC. A USEFUL AND CONVENIENTLY ACCESSIBLE CHIRAL STATIONARY PHASE FOR THE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ENANTIOMERS[J]. ACS SYMPOSIUM SERIES, 1982, 185, 245-260.
- [36]. Yang S K, Li C J. Direct enantiomeric resolution of cyclic alcohol derivatives of Polycyclic aromatic hydrocarbons by chiral stationary phase high-performance liquid chromatography[J]. J. Chromatogr, 1984, 291: 265-273.
- [37]. Weems Henri B, Mushtaq, Mohammad Yang, Shen K. Absolute Configurations of K-Region Epoxide Enantiomers of 3-Methylcholanthrene, Benz(a)anthracene, and Benzo(a)Pyrene[J]. ANALCHEM, 1987, 59(22): 2679-2688.
- [38]. Pirkle W H, Schreiner J L. Chiral HPLC(high-performance liquid chromatographic) Stationary Phases for Separation of the enantiomers of bi-beta naphthols and analogs[J]. J. Org Chem, 1981, 46: 4988-4991.
- [39]. C. DABAN HAUROU, G. DECLERCQ, P. RAMIANDRASOA. Enantiomeric resolution of amino acid derivatives by high performance liquid chromatography on chiral stationary phases derived from L-proline [J]. Journal of Chromatography, 1991, 547: 31-44.
- [40]. Zilin Chen, Takashi Fuyumuro, Katsunori Watabe, et al. Influence of spacers and organic modifiers on chromatographic behaviors on chiral diamide stationary phase with N-(3,5-dimethylbenzoyl)-D-phenylglycine [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 518: 181-189.
- [41]. Kenichiro Todoroki, Yasuhiro Ishii, Koji Toyoda, et al. Dress-up chiral columns for the enantioseparation of amino acids based on fluorinated separation[J]. Anal Bioanal Chem. 2013, 405: 8121-8129.
- [42]. 徐修容, 唐琴梅, 施铭英, 等. 高效液相色谱手性固定相的研究 II. 数种 L-缬氨酸-酰胺型固定相的制备及拆分对映体的比较[J]. 色谱, 1984, 1: 22-27.
- [43]. 唐琴梅, 徐修容, 施铭英, 等. 高效液相色谱手性固定相的研究 III. L-氨基酸-叔丁酰胺型固定相的制备及 α -氨基酸衍生物和 α -氨基-烃基[J]. 色谱, 1989, 3: 157-160.
- [44]. 刘晋钊, 徐修容, 黄嘉鑫, 等. 高效液相色谱手性固定相的研究. VI. 间隔基结构对 L-缬氨酸叔丁酰胺型手性固定相拆分效果的影响[J]. 化学学报, 1991, 2: 170-176.

- [45].刘晋钊, 徐修容, 黄嘉鑫. 高效液相色谱手性固定相的研究 V-二肽叔丁酰胺型手性固定相拆分 α -氨基酸、二茂铁基氨基酸及二肽衍生物[J]. 色谱, 1990, 4: 229-232.
- [46].吴邦桂, 黄天宝, 龙远德, 等. L-脯氨酸手性键合固定相的制备和表征[J]. 色谱, 1993, 3: 164-167.
- [47].王群标, 龙远德, 黄天宝. 新型手性配体交换色谱固定相的制备及应用[J]. 色谱, 2000, 2: 112-114.
- [48].Minglei Tian, Hyung Sang Row, Kyung Ho Row. Chiral separation of ofloxacin enantiomers by ligand exchange chromatography[J]. Monatshefte für Chemie. Chemical Monthly, 2010, 141(3): 285-290.
- [49].Davankov VA, Sychov CS, Ilyin MM, et al. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material. Mechanisms of retention[J]. Journal of Chromatography. A, 2003, 897(1-2): 67-75.
- [50].Martin G. Schmid, Karin Schreiner, Daniela Reisinger, et al. Fast chiral separation by ligand-exchange HPLC using a dynamically coated monolithic column[J]. J. Sep. Sci. 2006, 29: 1470-1475.
- [51].Zheng ZX, Lin JM, Qu F. Chiral separation of underivatized and dansyl amino acids by ligand-exchange micellar electrokinetic capillary chromatography using a copper(II)-L-valine complex as selector[J]. Journal of Chromatography. A, 2003, 1007(1-2): 189-196.
- [52].Chen Z, Lin J.-M, Uchiyama K. et al. Determination of critical micelle concentrations of anionic surfactants based on ligand exchange micellar electrokinetic chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 2000, 403(1): 173-178.
- [53].祝馨怡, 蔡迎春, 陈立仁, 等. α -氨基酸在 L-苯丙氨酸手性配体交换色谱固定相上的分离研究[J]. 化学试剂, 2003, 25(2): 65-68.
- [54].祝馨怡, 刘淑娟, 肖小华, 等. L-苯丙氨酸键合手性配体交换色谱固定相的制备及手性拆分[J]. 分析测试学报, 2002, 21(6): 62-64.
- [55].祝馨怡, 韩小茜, 齐邦峰, 等. 硅胶键合手性配体交换色谱固定相键合量对 α -氨基酸拆分的影响[J]. 2002, 20(3): 223-226.
- [56].陈磊, 万谦宏. β -氨基酸对映体在涂敷型手性配体交换色谱固定相上的分离[J]. 分析化学, 2006, 4: 474-478.
- [57].马桂娟. L-脯氨酸聚合物键合手性配体交换色谱固定相 I 的制备及应用[J]. 吉林农业, 2011, 12: 68-70.
- [58].马桂娟, 龚波林, 阎超. L-异亮氨酸聚合物手性配体交换固定相的制备及对 DL-氨基酸的拆[J]. 应用化学, 2009, 2: 125-129.
- [59].付春梅, 石宏宇, 李章万, 等. 点击化学制备新型手性配体交换色谱固定相[J]. 分析化学研究简报, 2010, 7: 1011-1014.
- [60].黄晓佳, 丁国生, 王俊德, 等. 新型手性配体交换色谱固定相的合成及其对 DL-氨基酸的拆分[J]. 色谱, 2003, 3: 230-232.
- [61].Jianbiao Ma, Li Chen, Binglin He. Synthesis of crosslinked poly(vinyl alcohol) with

- L-Proline pendant as the chiral stationary phase for resolution of amino acid enantiomers[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1996, 11(61): 2029-2034.
- [62].PIRKLE WH, MURRAY PG. CHIRAL STATIONARY-PHASE DESIGN - USE OF INTERCALATIVE EFFECTS TO ENHANCE ENANTIOSELECTIVITY[J]. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, 1993, 641(1): 11-19.
- [63].Murer P, Lewandowski K, Svec F, et al. On-bead combinatorial approach to the design of chiral stationary phases for HPLC[J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(7): 1278 - 1284.
- [64].Yashima E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation[J]. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, 2001, 906(1-2): 105 - 125.
- [65].Huang J, Zhang P, Chen H, et al. Preparation and evaluation of proline-based chiral columns[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10): 3301-3308.
- [66].Raquel Sancho, Cristina Minguillon. Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: Chromatographic and conformational studies[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 875(1): 93 - 101.
- [67].Junmin Huang, Hui Chen, Tingyu Li. Improvement of proline chiral stationary phases by varying peptide length and linker[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1113(1-2): 109-115.
- [68].Kaname Ohyama, Kana Oyamada, Naoya Kishikawa, et al. Preparation and characterization of poly(L-phenylalanine) chiral stationary phases with varying peptide length[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1208(1-2): 242 - 245.
- [69].Junmin Huang, Hui Chen, Peng Zhang, et al. Improvement of proline enantioselective stationary phases by replacing the 9-fluorenylmethoxycarbonyl group[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1109(2): 307-311.
- [70].Zhi Dai, Guozhong Ye, Charles U, et al. Steric effects on the enantiodiscrimination of diproline chiral stationary phases in the resolution of racemic compounds[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(32): 5498 - 5503.
- [71].Wenjian Lao, Jay Gan. Doubly tethered tertiary amide linked and ionically bonded diproline chiral stationary phases[J]. *J. Sep. Sci.* 2009, 32(14): 2359 - 2368.
- [72].Meiyun Xue, Hongxue Huang, Yanxiong Ke, et al. "Click dipeptide": A novel stationary phase applied in two-dimensional liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(49): 8623 - 8629.
- [73].Junmin Huang, Tingyu Li. Efficient resolution of racemic 1,1-bi-2-naphthol with chiral selectors identified from a small library[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1062(1): 87-93.
- [74].Junmin Huang, Hui Chen, Tingyu Li. Studies of the resolution of racemic 1,1 prime -bi-2-naphthol with a dipeptide chiral selector identified from a small library [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1102(1-2): 176-183.
- [75].Raquel Sancho, Anna M. Perez, Cristina Minguillon. A (4R)-Hydroxy-L-proline-derived

- chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation[J]. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(6): 905 - 914.
- [76]. Ye Bao, Junmin Huang, Tingyu Li, et al. Evaluation of Pentaproline-Based Chiral Stationary Phase by LC[J]. *Chromatographia*, 2007, 67(Suppl 1).
- [77]. Junmin Huang, Peng Zhang, Hui Chen, et al. Preparation and Evaluation of Proline-Based Chiral Columns[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10): 3301-3308.
- [78]. Rahman M. Mizanur, Takafuji Makoto, Ihara Hirotaka. Preparation, telomerization, immobilization and application of N-alkyl L-phenylalanine-derived polymerizable organogelator for reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography. A*, 2008, 1203(1): 59 - 66.
- [79]. Miklos Czaun M, Mizanur Rahman, Makoto Takafuji, et al. Molecular shape recognition-structure correlation in a phenylalanine-based polymer - silica composite by surface-initiated atom transfer radical polymerization[J]. *Polymer*, 2008, 49(25): 5410 - 5416.
- [80]. Atsuomi Shundo, Toshihiko Sakurai, Makoto Takafuji, et al. Molecular-length and chiral discriminations by structural poly(L-alanine) on silica[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1073(1): 169-174.
- [81]. 冯钰琦, 达世禄. 甘氨酸衍生化 β -环糊精键合硅胶液相色谱固定相的合成与评价[J]. *色谱*, 2000, (3): 224-229.
- [82]. 杜祖银. 键合型高效液相色谱手性固定相的制备及其拆分性能研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2006.
- [83]. 孙立权, 丁广辉, 马宁, 等. 新型苄氧羰基苯丙氨酸环糊精衍生物键合硅胶手性固定相的合成与评价[J]. *北京理工大学学报*, 2008, 28(8): 749-752.
- [84]. Xiaoqian Han, Lili An, Hong Cui, et al. Enantioseparation Using Chitosan Tris(3-chlorophenylcarbamate) as a Chiral Stationary Phase for HPLC[J]. *Chromatographia*, 2011, 73(11-12): 1043-1047.
- [85]. Yueqi Liu, Hanfa Zou, Jun Haginaka. Preparation and evaluation of a novel chiral stationary phase based on covalently bonded chitosan for ligand-exchange chromatography[J]. *J. Sep. Sci.* 2006, 29(10): 1440-1446.
- [86]. Chunhong Zhang, Hailun Wang, Qianqian Geng. Synthesis of Helical Poly(phenylacetylene)s with Amide Linkage Bearing L-Phenylalanine and L-Phenylglycine Ethyl Ester Pendants and Their Applications as Chiral Stationary Phases for HPLC[J]. *Macromolecules*, 2013, 46(21): 8406-8415.
- [87]. Kaichen He, Fengxian Qiu, Jiao Qin, et al. Preparation and characterization of L-phenylalanine-derivatized β -cyclodextrin-bonded silica and its application on chiral separation of alanine acid racemates[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2013, 30(11): 2078-2087.
- [88]. Meng Qinghua, Wang Shengqing, Guo Ying, et al. Preparation and Application of Isoquinolinecarboxylic Acid Derivative as Chiral Stationary Phase for Ligand Exchange

- Chromatography[J]. 2006, 34(3), 311–315.
- [89].王冲. 分离生物大分子液相色谱填料的合成和评价[D]. 北京: 北京化工大学, 2008.
- [90].Bristow P A. Packing . Performance and Penneality of larger and wider liquid chromatography column and their use in preparing samples for in dentification[J]. J.Chromatogr. 1978, 149: 13-28.
- [91].Ravindranath B. Principles and Practice of chromatography[M]. Ellis Horwood Limited, 1989.
- [92].MAURIZIO REMELLI , STEFANIA FACCINI , CHIARA CONATO . Chiral Ligand-Exchange Resolution of Underivatized Amino Acids on a Dynamically Modified Stationary Phase for RP-HPTLC[J]. CHIRALITY, 2014, 26: 313–318.
- [93].Ma Gui-Juan, Gong Bo-Lin, Yan Chao. Preparation of Polymer-bonded Chiral Ligand Exchange Chromatographic Stationary Phase and Resolution of Racemates[J]. Chin J Anal Chem. 2008, 36(3), 275–279.
- [94].Marchelli R, Corradini R, Bertuzzi T, et al. Chiral discrimination by ligand-exchange chromatography: A comparison between phenylalaninamide-based stationary and mobile phases[J]. Chirality, 1996, 8: 452-461.
- [95].Hong Yu Shi, Rui Juan Song, Yu Fu. A chiral stationary phase with special hydrophobic framework for ligand-exchange chromatography[J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18: 1392-1394.
- [96].M. Ashtari, N.M. Cann. Poly-proline-based chiral stationary phases: A molecular dynamics study of triproline, tetraproline, pentaproline and hexaproline interfaces[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1265: 70-87.

个人简历、在校期间发表的学术论文

个人简历

姓名：黄德友 籍贯：河南濮阳台前县 性别：男 出生年月日：1988.6.13

2008.9-2012.7 平顶山学院化学化工学院 化学工程与工艺 工学学士

2012.9-2015.7 郑州大学化工与能源学院 化学工程 工学硕士

发表论文：

1. 黄德友, 朱进科. 一种反应釜旋塞阀门: 中国, ZL2014 2 0589359.2[P]. 2015-01-21.
2. 黄德友, 李杨, 李连杰, 蒋登高. 双齿型 L-脯氨酸手性配体交换色谱固定相合成及对氯苯那敏的拆分[J]. 化学试剂 (录用)
3. 黄德友, 李杨, 李连杰, 蒋登高. 以氨基酸为手性源的手性固定相研究进展[J]. 科学时代, 2014, (355): 37-39.
4. 李杨, 黄德友, 李连杰. 顶空气相色谱法测定苯妥英钠中有机溶剂残留量[J]. 中国药师, 2014, 17(6): 1062-1063.
5. 张利敏, 黄德友. 高效液相色谱法测定多索茶碱颗粒中的有关物质[J]. 科学时代, 2014, (359): 48-49.
6. 李杨, 李连杰, 黄德友, 蒋登高. 新水杨酸溶出度标准片的标定与评价[J]. 中国当代医药, 2014, 21(21).
7. 李亚美, 张利敏, 黄德友. 浅谈十六烷基三甲基溴化铵改性沸石在污水处理中的应用[J]. 科学时代. 2014, (361).
8. 李连杰, 李杨, 黄德友, 刘娟, 蒋登高. 近红外一致性检验模型快速鉴别苯妥英钠片[J]. 海峡药学, 2014, 26(5): 51-52..

致谢

三年时光转眼而过，回首往昔，实验中的苦恼努力和生活中辛苦欢乐仍历历在目，在我人生的纸张中写下重重的一笔。在此毕业之际，我谨向所有一直关心与帮助我的老师、师兄师姐、同学以及家人表示最真挚的感谢！

在这三年的时光里，我最感谢的是导师蒋登高蒋老师，从论文的选题、实验方案的确立、实验操作以及毕业论文的撰写，都是在蒋老师的帮助和悉心指导下顺利完成的。蒋老师严谨的治学态度和丰富的专业知识，在科研实验上给予了我很大的帮助和指导，同时也使我养成了良好的科研态度，丰富了专业知识。蒋老师高尚的品质和独到的处世为人的方式使我受益匪浅。同时，黄明贤老师对我论文的选题、实验方案的确立以及论文的发表给予的很大帮助。在此感谢课题组的其它老师，在整个科研过程中给予的宝贵意见。在此真诚的感谢诸位老师，祝老师们工作顺利，身体健康，全家快乐。

实验的顺利完成还要感谢实验期间帮助我的各位同学：田俊峰师兄、李杨师兄、张艳伟师姐、王影师姐、白银鸽师兄、高晓强师兄、李连杰、刘娟、王彦举以及朱进科师弟。尤其要感谢我的女朋友张利敏，在实验期间给予了我莫大的鼓励。同时也祝各位同学工作顺利，学习进步。

最后，诚挚对我的家人说声谢谢，寒窗苦读 20 载，是他们给予了我精神和物质上支持，使我顺利完成了学业。

再次真诚感谢各位关心我的亲人、老师以及同学。