

壳聚糖苯甲酰化衍生物固定相的制备及其手性识别^{*}

罗迎彬¹ 王晓晨¹ 陈 伟¹ 黄少华^{2**} 柏正武^{1**}

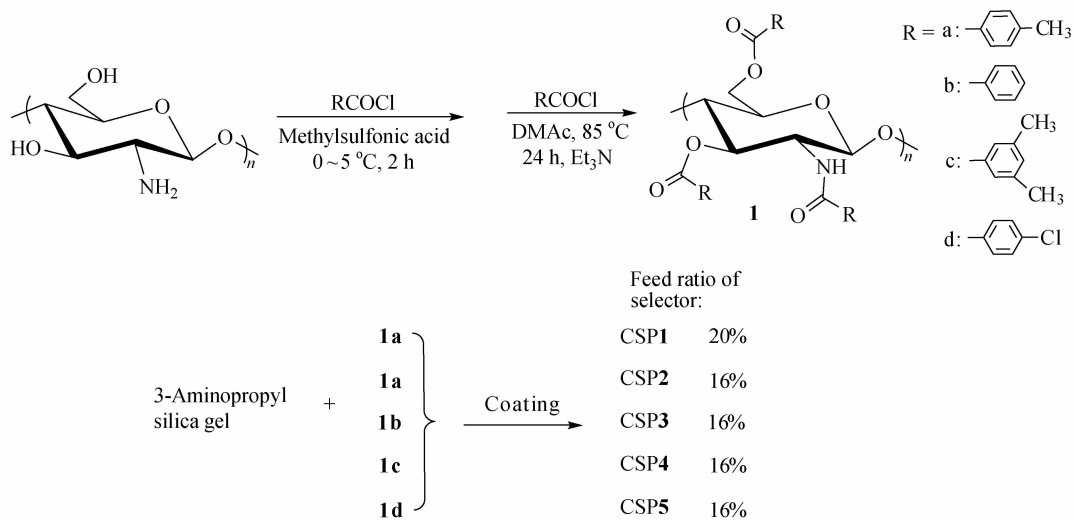
(¹ 武汉工程大学化学与环境工程学院 武汉 430073) (² 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 青岛 266101)

摘 要 为制备新型手性分离材料,用含不同取代基的苯甲酰氯修饰壳聚糖,合成了壳聚糖-二(4-甲基苯甲酸酯)-(4-甲基苯甲酰胺)、壳聚糖-二(苯甲酸酯)-(苯甲酰胺)、壳聚糖-二(3,5-二甲基苯甲酸酯)-(3,5-二甲基苯甲酰胺)和壳聚糖-二(4-氯苯甲酸酯)-(4-氯苯甲酰胺)4 种新的衍生物,以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂,将壳聚糖衍生物涂敷于大孔的 3-氨基硅胶上,制得相应的手性固定相.测试了固定相的手性识别性能,结果表明这些固定相均有较好的对映体选择性.涂覆量为 16% 的固定相比涂覆量为 20% 的固定相有更好的手性分离性能,以壳聚糖-二(3,5-二甲基苯基甲酸酯)-(3,5-二甲基苯基甲酰胺)制备的固定相有最强的手性识别性能,以壳聚糖-二(4-甲基苯甲酸酯)-(4-甲基苯甲酰胺)制备的固定相对手性化合物有最大的分离度.

关键词 壳聚糖, 苯甲酰化, 涂覆, 手性固定相, 手性识别

对映异构体的手性拆分是分离及分析领域中的研究热点^[1,2]. 目前,基于使用手性固定相(chiral stationary phase, CSP)的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法因其高效、快速等优点,已成为对映体分离和检测的最佳方法^[3],因而研制新的手性分离材料一直受到极大的关注.多糖类手性固定相因其手性识别范围广,手性分离性能好,且制备简单,成本低,柱容量高,成为使用最广泛的一类手性固定

相^[4,5]. 在已商业化的 100 多种手性固定相中,应用最多的是纤维素和直链淀粉衍生物手性固定相^[6~8]. 一般认为,有机小分子能与纤维素或直链淀粉的螺旋沟槽“络合”,从而产生手性识别^[9], Okamoto 等认为多糖衍生物高级结构的规整性对相应固定相的分离性能有至关重要的作用^[10,11]. 甲壳素与纤维素的结构相似,也有螺旋结构^[12],脱乙酰后的甲壳素即为壳聚糖,在已有的文献报道中,用以制备固定相的壳聚糖的脱乙酰度大



Scheme 1 Preparation of the chitosan derivatives and the CSPs

^{*} 2013-12-18 收稿,2014-01-28 修稿;国家自然科学基金(基金号 51373127)资助项目.

^{**} 通讯联系人,E-mail:huangsh@gibebt.ac.cn; zhengwu_bai@yahoo.com

多为 75% ~ 90%, 即壳聚糖的结构不均一, 势必影响所制备的壳聚糖衍生物的规整性, 进而影响所制备固定相的对映体选择性和分离性能. 本文以超高脱乙酰度壳聚糖(脱乙酰度为 95% 以上的壳聚糖^[13])为手性原料, 用一系列含不同取代基的苯甲酰氯修饰壳聚糖, 制备出新的衍生物, 以这些衍生物为手性选择体, 将其涂覆在氨基硅胶上, 得到新的手性固定相(方案一), 以期提高手性固定相的对映体选择性及分离性能.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Nicolet 5DX 型红外光谱仪(美国尼高力公司); Vario EL III CHNOS 型元素分析仪(德国 Elementar 公司); Agilent DD2 400 MHz 核磁共振仪(美国安捷伦科技有限公司); Alltech 1666 型色谱柱填充泵(美国 Alltech 公司); 250 mm × 4.6 mm 不锈钢空色谱柱(美国热电集团); 乌氏黏度计(毛细管内径 0.57 mm); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司).

甲壳素, 购于青岛潍坊海之源生物制品有限公司; 硅胶(平均粒径 7 μm, 日本 Daiso 公司); 3-氨基丙基三乙氧基硅(γ-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 购于百灵威科技有限公司; 甲基磺酸, 购自武汉格奥化学技术有限公司; 4-甲基苯甲酰氯、苯甲酰氯、3,5-二甲基苯甲酰氯和 4-氯苯甲酰氯购于天津市福晨化学试剂厂; *N*, *N*-二甲基乙酰胺(*N*, *N*-dimethylacetamide, DMAc)、*N*, *N*-二甲基甲酰胺(*N*, *N*-dimethylformamide, DMF)、甲苯和色谱流动相购于国药集团化学试剂有限公司. DMAc 使用前加入分子筛干燥; 甲苯用金属钠回流干燥、重蒸. 手性样品 1~8 购自天津希恩思生化科技有限公司, 9~19, 31 及 32 由江苏恩华药业股份有限公司、江苏南通制药总厂等国内多家制药公司提供, 20 购自江苏海安常春藤手性制品开发有限公司, 21~30 按照文献报道的方法合成^[14].

1.2 壳聚糖衍生物手性固定相的制备

1.2.1 壳聚糖衍生物的制备

参考文献[15], 将甲壳素和 NaOH 置于正戊醇中, 加热至回流, 搅拌 3 h. 水洗至中性, 真空干燥得到白色粉末. 参考文献[16]方法, 测得壳聚糖分子量 M_n 为 4.2×10^5 .

称取干燥至恒重的壳聚糖 1.60 g 于 50 mL

三口烧瓶中, 加入 10 mL 甲基磺酸, 冰浴冷却, 搅拌至均相, 再加入 8 mL 对甲基苯甲酰氯, 剧烈搅拌 2 h. 密封, 置于冰箱中冷冻过夜. 室温解冻, 将粗产物分散在冰水中, 搅拌, 过滤. 将滤饼分散在蒸馏水中, 滴加氨水调节其 pH 至 8, 搅拌, 过滤. 将滤饼分散在乙醇中, 反复洗涤数次, 至将滤液作薄层色谱分析时检测不到有机物为止(紫外分析仪下观察), 真空干燥至恒重, 得 2.01 g 第一次修饰的产物.

为使壳聚糖上的羟基修饰完全, 再进行第二次修饰. 将上述产物置于 100 mL 三口烧瓶中, 加入 30 mL DMAc 和 6 mL 三乙胺, 搅拌、升温, 得到透明溶液, 于 85 °C 下加入 11 mL 对甲基苯甲酰氯, 反应 24 h 后, 冷却, 过滤, 除去三乙胺盐酸盐. 将滤液逐滴滴入 400 mL 甲醇中, 并剧烈搅拌, 过滤, 滤饼用 10 mL DMAc 溶解, 再将该溶液逐滴滴入水中, 剧烈搅拌, 过滤, 用乙醇洗涤固体数次, 真空干燥至恒重, 得到 3.05 g 黄色固体, 即壳聚糖-二(4-甲基苯甲酸酯)-(4-甲基苯甲酰胺)(**1a**), 产率 59%. ¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃, TMS, δ): 1.92 ~ 2.43 (m, 9H, —CH₃), 3.10 (s, 1H, 2-H), 3.23 ~ 4.85 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.32 (s, 1H, 1-H), 6.40 ~ 7.90 (m, 12H, Ar-H); IR (KBr, cm⁻¹): 3414 (—CONH—), 3061 (Ar-H), 1724 (—CO—), 1264 (C—O); 元素分析值(%), 计算值(C₃₀H₂₉NO₇): C 69.89, H 5.67, N 2.72, 实测值: C 69.47, H 5.68, N 2.50.

依照此方法制备壳聚糖-二(苯基甲酸酯)-(苯基甲酰胺)(**1b**), 产率 68%. ¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃, TMS, δ): 3.22 (s, 1H, 2-H), 3.32 ~ 4.95 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.43 (s, 1H, 1-H), 6.50 ~ 8.00 (15H, Ar-H); IR (KBr, cm⁻¹): 3422 (—CONH—), 3032 (Ar-H), 1720 (—CO—), 1264 (C—O); 元素分析值(%), 计算值(C₂₇H₂₃NO₇ · 0.5H₂O): C 67.21, H 5.01, N 2.90, 实测值: C 67.84, H 5.16, N 2.33. 壳聚糖-二(3,5-二甲基苯基甲酸酯)-3,5-二甲基苯基甲酰胺(**1c**), 产率 65%. ¹H-NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃, TMS, δ): 1.92 ~ 2.45 (m, 18H, —CH₃), 3.03 (s, 1H, 2-H), 3.40 ~ 4.95 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.40 (s, 1H, 1-H), 6.50 ~ 7.90 (m, 9H, Ar-H); IR (KBr, cm⁻¹): 3422 (—CONH—), 3125 (Ar-H), 1720 (—CO—), 1307 (C—O); 元素分析值(%), 计算值(C₃₃H₃₅NO₇ · 0.5H₂O): C 69.95,

H 6.40, N 2.47, 实测值: C 69.82, H 6.40, N 2.38. 壳聚糖-二(4-氯苯基甲酸酯)-4-氯苯基甲酰胺 (**1d**), 产率 60%. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25 °C, CDCl_3 , TMS, δ): 3.20 (s, 1H, 2-H), 3.32 ~ 4.95 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 5.30 (s, 1H, 1-H), 6.53 ~ 8.12 (m, 12H, Ar-H); IR (KBr, cm^{-1}): 3457 (—CONH—), 3064 (Ar-H), 1724 (—CO—), 1268 (C—O); 元素分析值(%), 计算值 ($\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{NO}_7\text{Cl}_3$): C 56.22, H 3.49, N 2.43, 实测值: C 55.81, H 3.97, N 2.25.

1.2.2 固定相的制备

氨丙基硅胶由 3-氨基丙基三乙氧基硅烷与硅胶于 95 °C 下在甲苯中反应 24 h 制得^[17].

将 0.70 g **1a** 溶于 30 mL DMF 中, 取 10 mL 上述溶液与 2.8 g 氨丙基硅胶相混合, 减压蒸干, 此过程重复 2 次, 干燥后制得手性固定相 CSP1, 涂覆量为 20%.

按上述方法, 依次称取 0.56 g **1a**、**1b**、**1c** 和 **1d** 涂敷在 2.94 g 氨丙基硅胶上, 制得涂覆量均为 16% 的 CSP2、CSP3、CSP4 和 CSP5.

1.2.3 手性柱的填充及色谱条件及参数

以 30 mL 正己烷-异丙醇 (2/1, V/V) 为匀浆液, 用填充泵将固定相以 38 MPa 的压力填充至不锈钢色谱柱中. 以联苯为检测物, 以正己烷-异丙醇 (90/10, V/V) 为流动相测定柱效. 以 1,3,5-三叔丁基苯为样品, 其它参数与柱效测定中的相同, 测得死时间. 手性样品溶液用乙醇配制 (1 mg/mL), 并经 0.2 μm 滤膜过滤. 在所有检测中流动相的流速均为 1 mL/min, 柱温为 25 °C.

手性识别中的相关色谱参数包括容量因子 (k)、分离因子 (α) 及分离度 (R_s), 其中 $k = (t_R - t_m)/t_m$, t_R 为手性样品某一个对映体的保留时间, t_m 为死时间; $\alpha = k_2/k_1$, k_1 和 k_2 分别为 2 个对映体的容量因子; $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2)$, 其中 t_{R1} 和 t_{R2} 分别为第一个及第二个被洗脱出来的对映体的保留时间, w_1 和 w_2 分别表示色谱图中 2 个对映体的峰底宽.

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖衍生物的特征

以超高脱乙酰壳聚糖为原料制备固定相. 一些文献报道了制备超高脱乙酰壳聚糖的方法, 其溶剂可归纳为水体系和醇体系两大类^[18,19]. 本文采用戊醇作溶剂, 将固体氢氧化钠和甲壳素在戊

醇中相混合, 加热回流, 所制备的壳聚糖为白色粉末. 图 1 为所制备壳聚糖的核磁共振谱图. 脱乙酰度及分子量都会影响壳聚糖核磁共振谱图上的化学位移, 所使用的氘代试剂尤其影响化学位移, 本文用氘代三氟乙酸为溶剂进行核磁共振谱的检测. 在图 1 中, 化学位移为 2.30 的峰对应未完全脱乙酰的乙酰基上的甲基 H, 化学位移在 4.5 附近的峰对应壳聚糖重复单元 2 位上的 H^[20], 在壳聚糖骨架 H 中, 1 位上 H 的化学位移最大, 但与相邻的峰有部分重叠, 而 2 位 H 的峰与相邻的峰达到基线分离. 根据 2 位 H 和乙酰基 H 的积分面积比, 或者其余骨架 H 积分面积之和与乙酰基积分面积之比, 均能计算出壳聚糖的脱乙酰度为 99.6%.

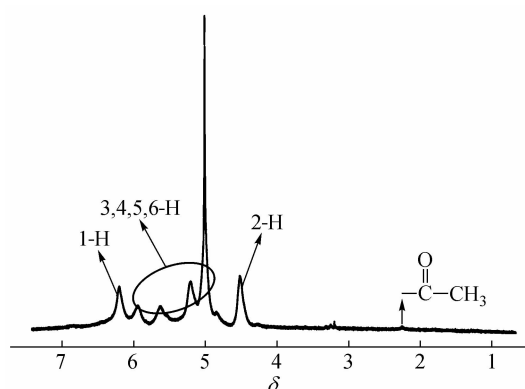


Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of chitosan (CF_3COOD)

因壳聚糖不溶于一般的溶剂中, 所以, 其初始的酰基化反应在甲烷磺酸中进行^[19-21]. 甲烷磺酸能与壳聚糖上的氨基反应生成盐, 在酰基化反应中, 羟基会被酰基化, 但氨基可能还是以盐的形式存在. 初始酰基化的产物不溶于甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂, 在 DMF 中有一定的溶解度, 能较好地溶于 DMAc 中. 为使壳聚糖的羟基及氨基完全酰基化, 在 DMAc 中, 将壳聚糖初始酰基化的产物再进一步酰基化, 制备出完全酰基化的壳聚糖. 元素分析及核磁共振谱的结果与预期相一致, 表明壳聚糖被完全酰基化.

2.2 固定相的手性识别性能与构效关系

分别以异丙醇-正己烷、乙醇-正己烷和 (甲醇 + 乙醇)-正己烷为流动相, 用 33 个手性样品 (图 2) 对所制备的固定相的手性识别能力进行了初步评价, 表 1 为对应最大分离度的手性识别结果. 在相同流动相条件下, CSP1、CSP2、CSP3、CSP4 及 CSP5 分别识别了 22、23、24、27 和 20 种手性化合

物,达到基线分离的样品分别为 4、7、1、4 和 2 个。从所识别的对映体数目来看,这 5 种固定相均有较好的手性识别性能。在 CSP2 上的分离度比在其它 CSP 上的分离度普遍要大,而 CSP4 所识别的手性样品最多。苯甲酰化和 4-甲基苯甲酰化的纤维素均有较好的手性识别性能,相应的固定相均已商业化,4-氯苯甲酰化、3,5-二甲基苯甲酰化纤维素及芳香基酰化直链淀粉均未商业化,说明这些衍生物的手性识别性能较差,或者用这些衍生物难以制备固定相。本文中的酰基化壳聚糖均有较好的手性识别性能,有实际应用的前景。

从结构与性能的关系上看,4-甲基苯基和 3,5-二甲基苯基异氰酸酯修饰的纤维素以及 3,5-二甲基苯基异氰酸酯修饰的直链淀粉有较好的手性识别性能^[21, 22]。本文中的 4-甲基苯甲酰壳聚糖和 3,5-二甲基苯甲酰壳聚糖也都有较好的手性识别性能,说明在壳聚糖衍生物中引入 4-甲基苯基和 3,5-二

甲基苯基有利于手性识别。而且,与 4-氯苯基相比,4-甲基苯基和 3,5-二甲基苯基更有利于手性识别^[22],其原因可能是:甲基为推电子基团,使得苯环上的电子云密度增大,从而使 4-甲基苯基或 3,5-二甲基苯基易与其它苯环发生 $\pi-\pi$ 作用。苯环上的氯通过诱导效应吸电子,同时通过共轭作用向苯环供电子,总的结果是吸电子,但又不能使苯环上的电子云密度降低很多,所以,4-氯苯基与样品化合物中的苯基发生 $\pi-\pi$ 作用要弱一些,导致相应的固定相(CSP5)所识别手性样品的数量要少一些。至今为止,鲜见文献报道直链淀粉-三(4-甲基苯甲酸酯)有较好的手性识别性能,这与纤维素-三(4-甲基苯甲酸酯)和壳聚糖-二(4-甲基苯甲酸酯)-(4-甲基苯甲酰胺)不同。其原因可能在于壳聚糖和纤维素的糖单元都是通过 β -1,4 糖苷键连接的,而直链淀粉的糖单元是通过 α -1,4 糖苷键连接的,糖苷键不同的连接方式导致纤维素和淀粉衍生

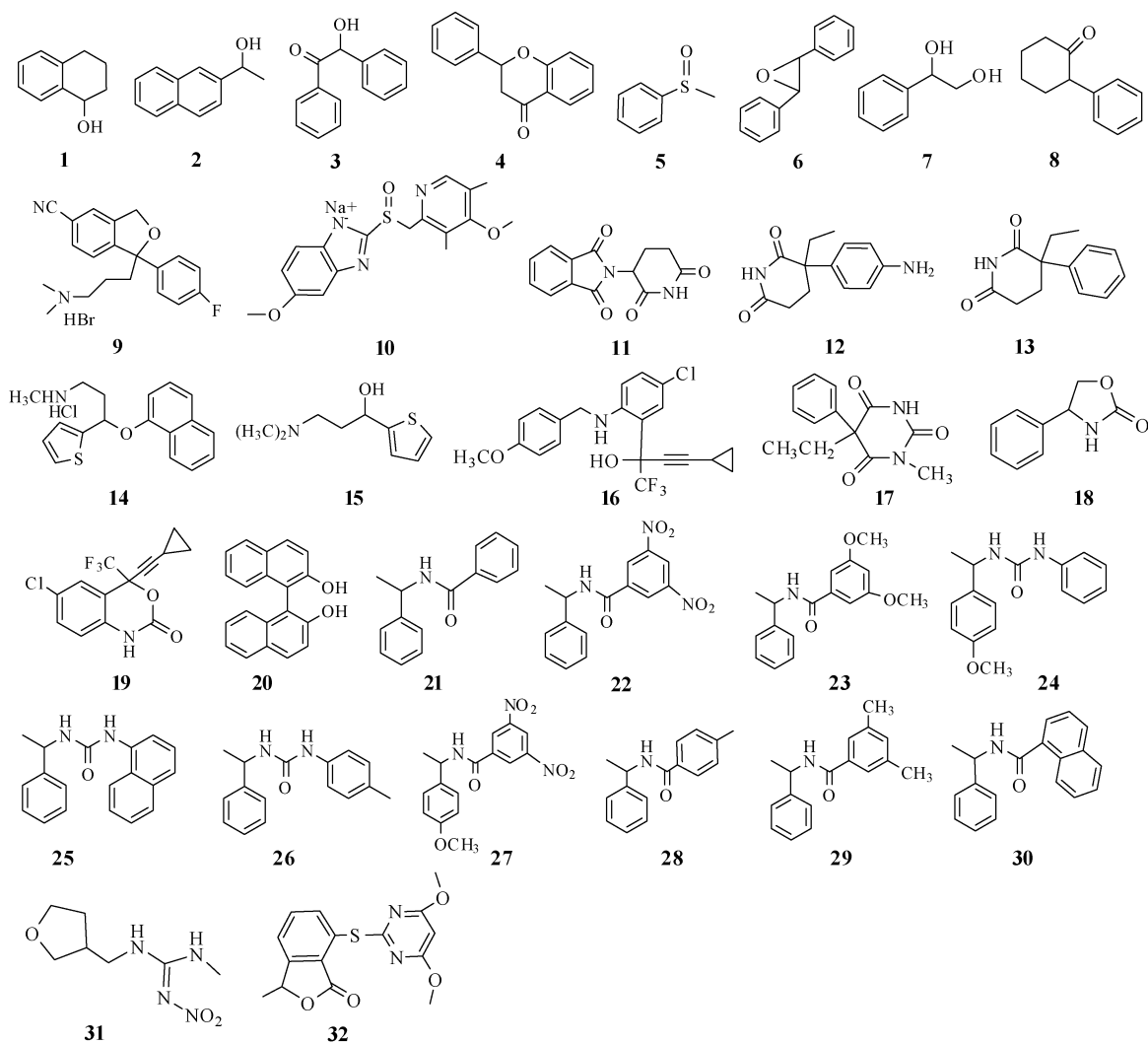


Fig. 2 Structures of chiral compounds resolved by CSPs 1 ~ 5

物空间结构的不同,需要不同的取代基与之匹配才能发挥较好的手性识别性能.

2.3 涂覆量对固定相手性识别的影响

涂覆量对固定相的手性识别性能有较大的影响,Okamoto 等研究过纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)在氨基化硅胶上的涂覆量与相应固定相手性识别性能的关系^[23],结果表明当涂覆量在 12% 至 20% 时,固定相对多数样品都有较好的手性识别性能.当涂覆量大于 20% 时,样品的保留时间较长,柱效会有不同程度的降低,柱压则会升高.所以,为兼顾适当的分离时间和较好的分离度(R_s),多糖衍生物固定相的涂覆量通常为 20%.为比较不同涂覆量固定相的手性识别性能,

将 **1a** 分别以 20% 和 16% 的质量比涂敷于 7 μm 大孔氨丙基硅胶上,制得 CSP1 和 CSP2.由表 1 可知,在相同的流动相条件下,在 CSP1 上的容量因子(k)比在 CSP2 上的大,在 CSP1 上的分离度比在 CSP2 上的小,表明涂覆量少的固定相的手性识别性能强,而且手性样品在其上的保留时间短,这是在研制新的固定相时所希望的.大多数手性样品在 CSP2 上的分离度要明显大于在 CSP1 上的分离度.从所识别的样品数量上看,CSP2 识别了 23 个化合物,而 CSP1 识别了 22 个化合物.虽然 CSP1 上壳聚糖衍生物的涂覆量比 CSP2 上的要高,但并没有提高固定相的手性识别能力.因此,本工作在其它固定相的制备中,壳聚糖衍生物

Table 1 The chromatographic data of chiral compounds resolved by CSP1 ~ CSP5

Chiral analytes	CSP1			CSP2			CSP3			CSP4			CSP5		
	k_i	α	R_s	k_i	α	R_s	k_i	α	R_s	k_i	α	R_s	k_i	α	R_s
1	^{B1} 0.77	1.13	0.60	^{B1} 0.66	1.15	0.68	no separation			no separation			no separation		
2	^{B1} 1.74	1.10	0.62	^{A2} 2.45	1.14	1.08	^{A2} 3.10	1.07	0.43	^{A3} 0.67	1.10	0.50	no separation		
3	^{B1} 3.55	1.41	2.32	^{C2} 2.27	1.28	2.72	^{A2} 7.87	1.28	1.16	^{A2} 2.00	1.19	2.07	^{A3} 2.85	1.15	0.62
4	no separation			^{C3} 0.66	1.18	1.08	^{A1} 0.77	1.04	0.34	^{C3} 0.46	1.06	0.62	^{B3} 0.53	1.09	0.55
5	^{B3} 0.75	1.03	0.23	^{B1} 3.23	1.14	0.97	^{C6} 0.25	1.14	0.45	^{B1} 1.69	1.01	0.21	^{A2} 11.98	1.09	0.61
6	^{C3} 0.29	1.37	1.00	^{A2} 0.43	1.71	1.67	^{A1} 0.95	1.17	0.63	^{A3} 0.17	1.89	1.18	no separation		
7	^{B1} 3.49	1.09	0.51	no separation			no separation			no separation			^{A3} 2.15	1.01	0.14
8	^{B1} 1.44	1.29	1.42	^{B1} 1.27	1.29	1.96	^{C4} 0.62	1.11	0.52	^{A2} 0.89	1.31	1.79	^{B1} 1.14	1.25	1.70
9	no separation			^{B2} 0.96	1.02	1.00	no separation			^{B3} 0.41	1.02	0.12	no separation		
10	^{C2} 12.17	1.20	0.96	^{B2} 5.57	1.28	1.24	^{B2} 10.46	1.11	0.38	^{C2} 5.09	1.21	1.95	no separation		
11	no separation			^{C2} 3.47	1.04	0.44	no separation			^{A4} 8.36	1.11	0.59	^{B3} 8.19	1.06	0.36
12	^{C2} 49.37	1.19	1.64	^{C3} 13.92	1.18	1.64	^{B3} 6.53	1.09	0.42	^{B2} 13.34	1.09	0.79	no separation		
13	^{C2} 46.38	1.18	1.54	^{C3} 14.67	1.18	1.73	^{B3} 6.48	1.10	0.48	^{B2} 13.20	1.09	0.76	no separation		
14	no separation			no separation			^{B2} 1.58	1.15	0.32	no separation			no separation		
15	no separation			no separation			^{B3} 0.21	1.12	0.36	^{B2} 0.39	1.03	0.14	no separation		
16	^{B3} 0.84	1.02	~0.1	^{B4} 0.30	1.36	0.69	^{B3} 0.53	1.05	0.13	^{B3} 0.47	1.11	0.65	^{B3} 0.19	1.23	0.40
17	no separation			no separation			no separation			^{B2} 1.89	1.01	0.12	no separation		
18	^{C2} 10.24/S	1.19	1.59	^{C2} 8.43	1.18	2.09	^{C2} 11.69	1.19	1.55	^{C2} 3.79/S	1.17	1.75	^{C3} 5.1/S	1.12	1.28
19	no separation			^{C2} 2.59	1.01	ca.0.1	^{B2} 1.58	1.14	0.36	no separation			^{C2} 3.43/R	1.21	1.70
20	^{C3} 5.33	1.10	0.60	^{C2} 10.01	1.11	0.82	^{B3} 2.05	1.35	0.67	^{B3} 1.04/S	1.17	0.66	^{A3} 7.65/S	1.11	0.45
21	^{C3} 1.63	1.02	0.14	no separation			^{C3} 1.86	1.03	0.21	no separation			^{B3} 1.32	1.02	0.14
22	no separation			^{C2} 19.76/S	1.10	0.75	no separation			^{C3} 4.30/R	1.00	~0.1	no separation		
23	^{B3} 0.80/S	1.02	ca.0.1	no separation			no separation			^{A4} 1.07/S	1.01	~0.1	no separation		
24	^{C2} 12.11/R	1.11	0.60	^{C1} 31.56/R	1.15	1.23	^{C3} 3.93/R	1.11	0.54	^{C2} 4.69/R	1.05	0.54	^{C3} 2.43/R	1.09	0.55
25	^{B3} 0.95/S	1.03	0.11	^{C5} 0.28/S	1.18	0.54	^{C6} 0.21/S	1.46	0.64	no separation			^{A3} 6.55/S	1.21	0.49
26	^{C2} 4.94/S	1.16	0.83	^{C2} 4.09/R	1.15	1.06	^{C2} 4.00/R	1.30	0.82	^{A1} 12.58/R	1.15	1.43	no separation		
27	^{C2} 33.48/S	1.24	1.35	^{C3} 11.32/S	1.24	1.64	^{C4} 2.72/S	1.13	0.42	^{C2} 15.51/R	1.04	0.55	^{B2} 2.18/S	1.12	0.56
28	^{B2} 1.90	1.01	ca.0.1	no separation			no separation			^{B1} 2.14/R	1.10	0.62	^{B3} 0.49	1.04	0.18
29	no separation			^{C4} 0.21	1.24	0.54	no separation			^{B2} 0.96	1.01	~0.1	^{C3} 2.45	1.01	0.16
30	^{C2} 6.26	1.13	0.70	^{C1} 19.05	1.12	1.19	^{B2} 0.04	2.18	0.47	no separation			no separation		
31	no separation			no separation			no separation			^{B3} 1.82	1.01	0.12	no separation		
32	no separation			^{C2} 8.73	1.06	1.19	^{C3} 6.99	1.08	0.50	^{B1} 5.42	1.07	0.62	no separation		

Eluent: n-hexane/isopropanol (98/2^{A1}, 95/5^{A2}, 90/10^{A3}, 70/30^{A4}, V/V); n-hexane/ethanol (95/5^{B1}, 90/10^{B2}, 70/30^{B3}, 50/50^{B4}); n-hexane/[(ethanol/methanol = 1/1) 98/2^{C1}, 95/5^{C2}, 90/10^{C3}, 70/30^{C4}, 50/50^{C5}, 20/80^{C6}]. R/S: the configuration of the first-eluted enantiomer determined in case of the availability of the pure enantiomer.

投料的质量比均为 16%。

2.4 流动相的组成对手性识别的影响

在正相条件下,一般都用异丙醇作为流动相的组分,较少使用乙醇,不用乙醇与甲醇的混合物作为流动相的组分.不用甲醇作为流动相组分的原因可能是甲醇不能与正己烷以任意比例互溶,而乙醇与甲醇的混合物能与正己烷相溶.在本文中,分别以异丙醇-正己烷、乙醇-正己烷和(甲醇+乙醇)-正己烷为流动相,考察流动相中不同的醇对手性识别的影响.从表 1 中可以看出,在 CSP1-CSP5 中,分别有 0、4、2、7 和 5 个手性样品在含异丙醇的流动相中分离度最大;分别有 10、9、6、12 和 5 个手性样品在含乙醇流动相中分离度最大;分别有 11、9、16、6 和 2 个手性样品在含乙醇及甲醇混合醇的流动相中分离度最大.从总体上看,手性样品在含混合醇流动相中的分离度比在含异丙醇或含乙醇流动相中的好.在手性识别中,手性样品与流动相和壳聚糖衍生物之间都有相互作用,手性识别的产生是这些作用的综合结果.用乙醇和甲醇的混合物作为流动相的组分

更有利于手性识别的原因尚不清楚。

3 结论

本文共合成了 4 种新的壳聚糖衍生物,并将其涂敷于大孔氨丙基硅胶上制得相应的固定相,这些固定相有较好的手性识别性能.研究了壳聚糖衍生物在固定相上的涂敷量对手性识别性能的影响,发现当衍生物涂敷量由 16% 增加到 20% 时,固定相的手性识别性能稍有降低.在研究中还发现当使用乙醇和甲醇的混合溶剂作流动相的组分时,有利于提高壳聚糖衍生物对手性样品的分离度.综合比较 4 种固定相的手性识别结果,以壳聚糖-二(3,5-二甲基苯基甲酸酯)-(3,5-二甲基苯甲酰胺)制备的固定相的手性识别性能最强,以壳聚糖-二(4-甲基苯基甲酸酯)-(4-甲基苯甲酰胺)制备的固定相对手性化合物的分离度最大.另一方面,本工作使用的壳聚糖的分子量未必最适合所制备固定相的手性识别及分离,改变壳聚糖的分子量,还有望进一步提高固定相的手性识别性能,尤其是对手性化合物的分离度。

REFERENCES

- 1 Mohr S, Taschwer M, Schmid M G. Chirality, 2012, 24: 486 ~ 492
- 2 Francotte E R. J Chromatogr A, 2001, 906: 379 ~ 397
- 3 Okamoto Y, Ikai T, Shen J. Isr J Chem, 2011, 51: 1096 ~ 1106
- 4 Douša M, Lehnert P. J Pharm Biomed Anal, 2013, 74: 111 ~ 116
- 5 Dossou K S S, Chiap P. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54: 687 ~ 693
- 6 Okamoto Y. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 2009, 47(7): 1731 ~ 1739
- 7 Chen X M, Yamamoto C, Okamoto Y. Pure Appl Chem, 2007, 79: 1561 ~ 1573
- 8 Beesley T E. LC GC Europe, 2011, 24: 270 ~ 276
- 9 Berthod A. Anal Chem, 2006, 78: 2093 ~ 2099
- 10 Ikai T, Okamoto Y. Chem Rev, 2009, 109: 6077 ~ 6101
- 11 Francotte E, Wolf R M, Lohmann D, Mueller R. J Chromatogr, 1985, 347: 25 ~ 37
- 12 Jiang Tingda(蒋挺大). Chitin(甲壳素)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003. 23 ~ 26
- 13 Jiang Tingda(蒋挺大). Chitin(甲壳素)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003. 3
- 14 Huang S, Bai Z, Feng J. Magn Reson Chem, 2009, 47: 423 ~ 427
- 15 Song Qingping(宋庆平), Wang Yong(汪泳), Ding Chunmei(丁纯梅). Chemical World(化学世界), 2005, 7: 422 ~ 423
- 16 Roberts G A F, Domszy J G. Int J Biol Macromol, 1982, 4: 374 ~ 377
- 17 Zhang Juan(张娟), Wei Wenjuan(魏文娟), Chen Wei(陈伟), Wu Yuanxin(吴元欣), Bai Zhengwu(柏正武). Chinese Journal of Chromatography(色谱), 2010, (28): 971 ~ 976
- 18 Hirano S, Ohe Y, Ono H. Carbohydr Res, 1976, 47: 315 ~ 320
- 19 Hirano S, Yamaguchi R. Biopolymers, 1976, 15: 1685 ~ 1691
- 20 Kasaai M R. Carbohydr Polym, 2010, 79: 801 ~ 810
- 21 Ikai T, Yamamoto C, Kamigaito M, Okamoto Y. J Chromatogr A, 2007, 1157: 151 ~ 158
- 22 Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. J Chromatogr, 1986, 363: 173 ~ 186
- 23 Yashima E, Sahavattanapong P, Okamoto Y. Chirality, 1996, 8: 446 ~ 451

Preparation and Chiral Recognition of Chiral Stationary Phases Derived from Benzoylated Chitosan

Ying-bin Luo¹, Xiao-chen Wang¹, Wei Chen¹, Shao-hua Huang^{2*}, Zheng-wu Bai^{1*}

(¹ School of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073)

(² Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101)

Abstract In order to develop novel chiral stationary phases (CSPs), chitosan was modified by benzoyl chlorides with various substituents, successively using methylsulfonic acid and *N,N*-dimethylacetamide as the solvents. In this way, new derivatives of chitosan bis (benzoate)-(benzamide), chitosan bis (4-methylbenzoate)-(4-methylbenzamide), chitosan bis (3,5-dimethylbenzoate)-(3,5-dimethylbenzamide) and chitosan bis (4-chlorobenzoate)-(4-chlorobenzamide) were synthesized. The corresponding CSPs were prepared by coating the chitosan derivatives on porous 3-aminopropyl silica gel employing *N,N*-dimethylformamide as the solvent. The chiral recognition capability of the CSPs was evaluated towards structurally various chiral compounds in normal phase conditions, and the results showed that these CSPs possessed satisfactory enantioselectivity. The CSP prepared from chitosan bis (4-methylbenzoate)-(4-methylbenzamide) with a coating ratio of 16% exhibited better chiral recognition capability than that prepared from the same derivative with a coating ratio of 20%. The CSP based on chitosan bis (3,5-dimethylbenzoate)-(3,5-dimethylbenzamide) showed stronger chiral recognition capability than the CSPs based on the other derivatives. Meanwhile, the CSP derived from chitosan bis (4-methylbenzoate)-(4-methylbenzamide) separated the chiral compounds with highest resolutions. This feature is similar to that of the CSP derived from cellulose tris (4-methylbenzoate), and different from that of the CSP prepared from amylose tris (4-methylbenzoate) that bear poor chiral recognition capability. The reason may be related to the similarity of chitosan and cellulose in which the repeating units are all connected by β -1,4-glycosidic bond, other than α -1,4-glycosidic bond in amylose. In addition, the CSPs generally demonstrated better resolutions in the mobile phases simultaneously containing ethanol and methanol.

Keywords Chitosan, Benzoylation, Coating, Chiral stationary phase, Chiral recognition

* Corresponding authors; Shao-hua Huang, E-mail: huangsh. cas@ gmail. com

Zheng-wu Bai, E-mail: zhengwu_bai@ yahoo. com