

正电超分子手性介质的点击构筑及氨基酸高效拆分 ——化学实验课程思政探索与实践

杜延麒¹, 李汝婧¹, 杨纪同¹, 李媛¹, 靳晓宁^{1,2,*}, 王勇^{1,2,*}

¹天津大学理学院, 天津 300354

²化学化工国家级实验教学示范中心(天津大学), 天津 300354

摘要: 手性是生命的本质属性, 分子手性与生命现象的精细调控息息相关。不同对映体药物的药理、毒理高度差异化。面对快速增长的手性药物市场, 发展高效精准手性拆分策略, 已成为当前医药领域的迫切需求。本实验面向新工科2.0, 首次提出构建“手性拆分工坊”综合实验构想。利用点击化学绿色合成策略实现单正电环糊精的高效接枝, 构筑正电超分子手性介质, 探讨基于分子间弱相互作用的手性识别机制, 藉此发展外消旋氨基酸衍生物的高效色谱手性拆分方法, 优化手性色谱分离条件, 获得丹磺酰氨基酸的精准拆分规律。实验立足新工科化学专业建设, 涵盖绿色合成、仪器分析、物化机制和无机材料等基础化学知识, 并融合前沿技术理论及产业应用, 打造课程思政引导的化学专业人才培养新范式。

关键词: 正电环糊精; 绿色点击化学; 课程思政; 化学实验

中图分类号: G64; O6

Click Construction of Cationic Chiral Supramolecular Medium for Efficient Enantioseparation of Amino Acids: Exploring and Practicing Ideological and Political Education in Chemical Experiment Curriculum

Yanqi Du¹, Rujing Li¹, Jitong Yang¹, Yuan Li¹, Xiaoning Jin^{1,2,*}, Yong Wang^{1,2,*}

¹ School of Science, Tianjin University, Tianjin 300354, China.

² National Demonstration Center for Experimental Chemistry & Chemical Engineering Education, Tianjin University, Tianjin 300354, China.

Abstract: Chirality is the essential attribute of life. Molecular chirality is closely related to the fine regulation of life phenomena. The pharmacology and toxicology of drugs with different enantiomers vary significantly different. Owing to the recent advancements in the chiral drug market, the development of efficient and accurate chiral separation strategy has become critical. Aiming at the construction of new engineering subjects 2.0, the idea of “chiral separation workshop” comprehensive experiment was proposed for the first time. The chiral recognition mechanism based on intermolecular weak interaction was investigated using the click-chemical green synthesis strategy to realize the highly efficient grafting of single-positively charged cyclodextrins and the construction of positively charged supramolecular chiral media; the chiral separation conditions of racemic amino acid derivatives were optimized, and the resolution of racemic dansyl amino acids were obtained as well. The experiment is based on the construction of new engineering chemistry specialty, covering the basic chemical knowledge of green synthesis, accurate instrument analysis, physical and chemical separation mechanism, and inorganic material chemistry, as well as integrating the advanced technical theories and industrial applications, thereby creating a new

收稿: 2022-10-20; 录用: 2022-12-20; 网络发表: 2023-01-31

*通讯作者, Emails: xiaoning_jin@tju.edu.cn (靳晓宁); wangyongtju@tju.edu.cn (王勇)

基金资助: 天津大学第四批课程思政教改项目(序号 97)

paradigm for the cultivation of chemistry talents under the guidance of ideological and political education.

Key Words: Cationic cyclodextrin; Green click chemistry; Course ideology and politics; Chemistry experiment

1 引言

1.1 聚焦国家战略, 开启高质量综合实验新征程

“生命为什么需要手性?” 是2021年*Science*发布的125个重大未解科学问题之一。手性广泛存在于自然界, 是生命体的本质属性^[1], 与人类的生存休戚相关。*R*-型的沙利度胺是一种镇静剂, 而*S*-型的沙利度胺则具有严重致畸性。面对急速增长的手性药物种类和市场, 发展高效精准手性拆分手段^[2], 获取高纯单一对映体手性药物, 既是当前医药领域的前沿热点, 也是我国目前面临的卡脖子技术之一。

深化新工科化学专业教育改革, 推进化学专业教育的高质量发展, 对建设高等教育强国具有重大意义。“手性拆分工坊”综合实验是聚焦天然氨基酸手性拆分这一科学难题, 依托化学前沿理论、化学合成策略、化学测量方法等相关理论技术, 将手性拆分相关基础、方法、应用高度融合而提出的新实验理念^[3] (图1)。以高质量人才培养为基础, 激发学生对生命本质的探索欲, 锻炼学生的实验技术综合技能, 提升学生的国家和社会责任感。同时本实验也是科教融合, 多个二级学科相交叉的基础应用创新化学实验, 能切实提升化学专业本科生培养的“两性一度”(高阶性、创新性、挑战度)。

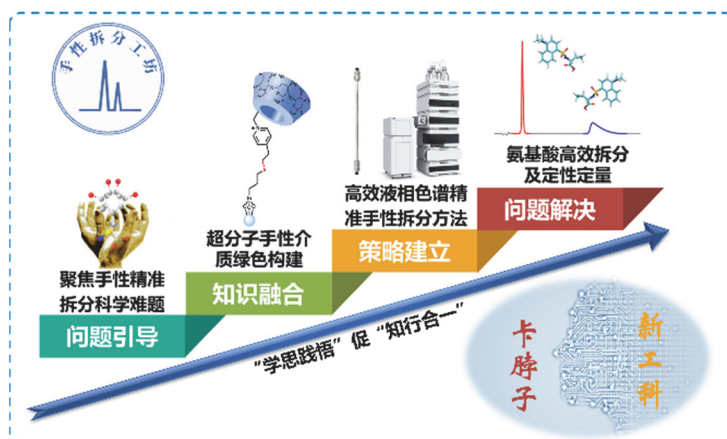


图1 “手性拆分工坊”设计理念

1.2 拟选用拆分对象及背景介绍

氨基酸是生命起源物质, 通过肽键连接成多肽, 调控体内物质代谢和信息传递^[4], 由于氨基酸分子手性碳相连的特殊官能团较少, 其高效手性拆分是分离领域的前沿难点。作为第二代超分子主体化合物, 环糊精(CD)是由6-8个D-吡喃葡萄糖手性单元组成的环状大分子^[5], 其独特的疏水手性空腔结构与表面极性羟基赋予其优秀的分子识别特性(图2a)^[6], 对羟基进行功能化可引入更多协同作用位点并调节其分子构象进而赋予其更强大的识别能力^[7]。

基于上述背景, 本实验将依托 β -CD优秀的手性识别空腔, 并对其6位羟基进行定点精修, 引入吡啶鎓强阳离子作用位点, 通过CD空腔包合作用、强静电作用以及氢键作用构建系列丹磺酰氨基酸(图2b)精准手性拆分体系^[8], 打造“手性拆分工坊”。

1.3 设计实验的方法思路

在前期研究基础上, 本实验采用全绿色化学接枝方法, 以乙醇和水为溶剂, 通过高效点击化学手段将单乙烯基吡啶鎓CD超分子接枝于巯基硅胶表面, 获得一种全新的硫醚桥联正电CD手性介质(合成

设计见图3),以核磁共振氢谱、红外光谱、元素分析等手段对中间产物和目标产物进行结构鉴定,研究装柱方法并制备成手性柱成品。依托高效液相色谱技术,探索氨基酸手性拆分色谱条件,研究不同对映体保留机制,建立依托上述手性柱的氨基酸精准拆分方法,完成“工坊”构建。

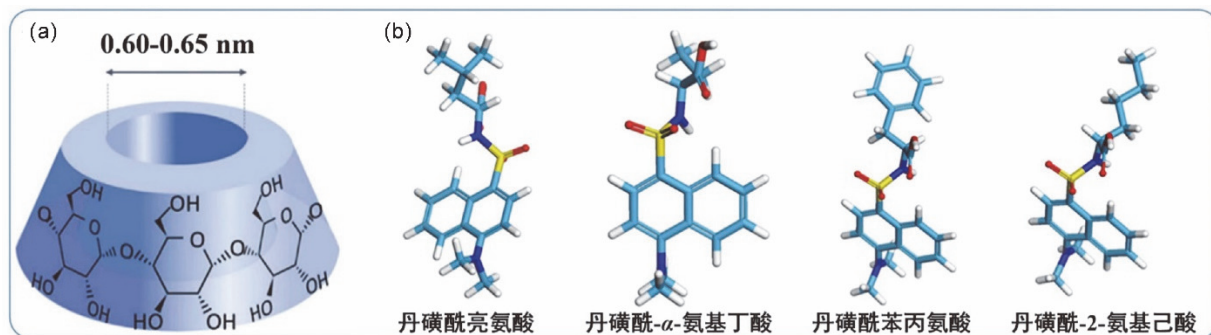


图2 (a) β -环糊精结构; (b) 四种丹磺酰氨基酸立体结构图

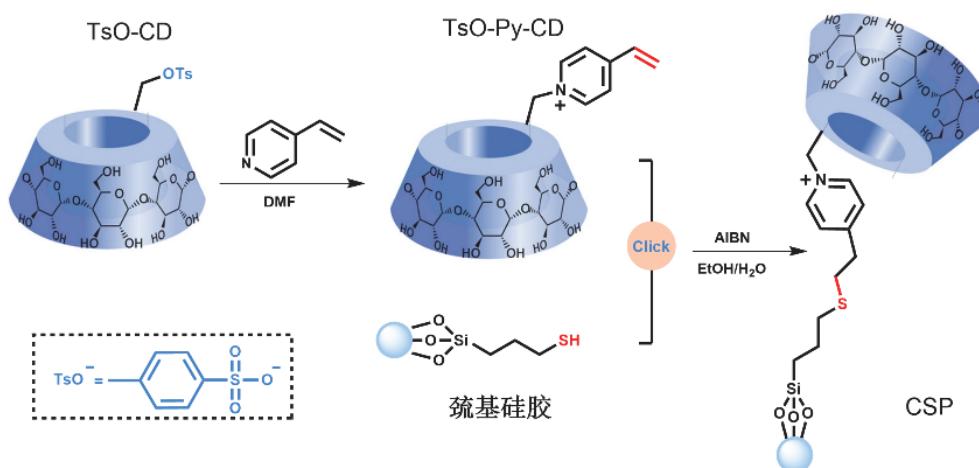


图3 手性固定相(CSP)的设计制备路线

2 实验部分

2.1 实验原理

本实验主要涉及合成和识别两部分原理,一是点击化学接枝原理;二是正电环糊精超分子手性识别原理。

2.1.1 单正电超分子环糊精手性介质的点击构筑

点击化学反应机理如图4所示,偶氮二异丁腈(AIBN)在加热条件下生成氰基异丙基自由基,夺取巯基硅胶中的氢原子,生成硫自由基,再与4-乙烯基吡啶鎓CD发生自由基加成,生成苄基自由基,夺取巯基中的氢原子,生成目标产物CSP的同时产生硫自由基完成反应循环。

2.1.2 手性氨基酸衍生物的拆分原理

手性拆分本质是利用两种对映异构体分子与手性选择剂之间的差异化作用实现分离。根据经典的“三点作用”模型,氨基酸羧基疏水部可进入环糊精空腔形成匹配包合,其结构与手性碳相邻的脂肪侧链引起的空间效应有助于提升环糊精手性选择性,氨基酸羧基阴离子可与环糊精吡啶鎓形成强静电相互作用,羰基与环糊精羟基可形成氢键协同作用,籍此可形成不同的对映体包合构象,从而呈现丹磺酰氨基酸的精准拆分(图5)^[9]。

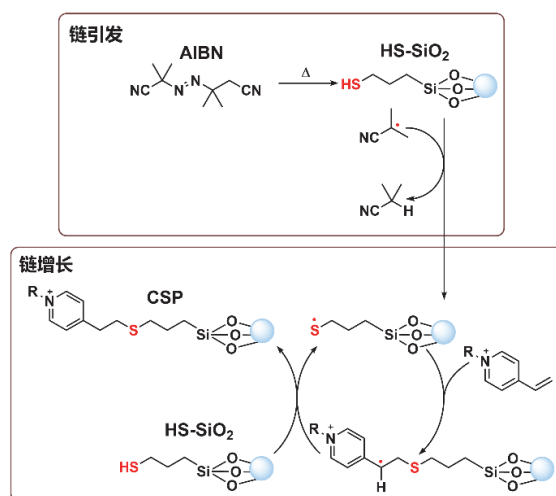


图4 “巯基-烯”点击反应机理

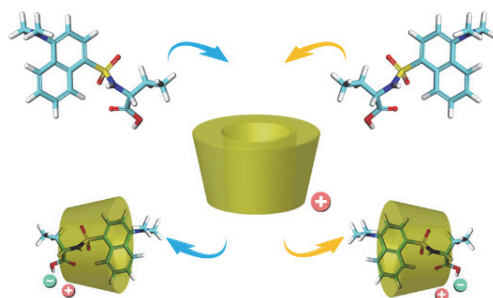


图5 正电环糊精手性识别原理

2.2 试剂或材料

TsO-CD与巯基硅胶可由实验室自制准备或购买，其他试剂见表1。

表1 实验所用主要试剂

试剂名称	纯度/规格	制造商	试剂名称	纯度/规格	制造商
无水乙醇	分析纯	天津市科密欧化学试剂有限公司	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺 (DMF)	> 99.8%	上海麦克林生化科技有限公司
乙腈	色谱纯	天津市康科德科技有限公司	氘代二甲亚砜 (DMSO- d_6)	> 99.9%	安诺伦(北京)生物科技有限公司
甲醇	色谱纯	天津市康科德科技有限公司	偶氮二异丁腈 (AIBN)	分析纯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
三乙胺	色谱纯	天津市康科德科技有限公司	丹磺酰- α -氨基丁酸 (Dns-Aba)	> 99.0%	德国默克化学试剂
乙酸	色谱纯	天津市康科德科技有限公司	丹磺酰亮氨酸 (Dns-Leu)	> 99.0%	德国默克化学试剂
丙酮	分析纯	天津渤化化学试剂有限公司	丹磺酰-2-氨基己酸 (Dns-Nle)	> 99.0%	德国默克化学试剂
4-乙烯基吡啶	> 96.0%	上海迈瑞尔	丹磺酰苯丙氨酸 (Dns-Phe)	> 99.0%	德国默克化学试剂

2.3 仪器和表征方法

本实验所用主要仪器见表2。

表2 实验所用主要仪器

仪器名称	型号	制造商
分析天平	BSA124S	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
核磁共振谱仪	AVANCE III HD 400 MHz	德国Bruker公司
傅里叶变换红外光谱仪	ALPHA	德国Bruker公司
压力填充泵	P10SNXP1	美国LabAlliance
高效液相色谱仪	1260	美国Agilent Technologies
pH计	Five Easy Plus	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
循环水式多用真空泵	SHB-III	郑州长城科工贸有限公司

2.4 实验方法

2.4.1 单-6-(4-乙烯基吡啶)- β -CD的制备

将干燥的TsO-CD 1.94 g (1.5 mmol)溶解到10 mL无水DMF中, 加入1.1 mL (10.2 mmol) 4-乙烯基吡啶。95 °C下磁力搅拌, 回流反应2 h。反应后将溶液缓慢滴加到30 mL丙酮中, 有大量固体析出。减压过滤, 用丙酮充分洗涤, 干燥得到目标产物TsO-Py-CD, 产物为淡黄色粉末。

2.4.2 CSP的“巯基-烯”点击制备

将2.0 g TsO-Py-CD分散到乙醇和去离子水(体积比 1 : 1)的混合溶液(30 mL)中, 搅拌溶解, 加入巯基硅胶2.0 g和催化剂AIBN 0.05 g, 60 °C磁力搅拌回流反应2 h。减压过滤, 依次用水、乙醇、丙酮洗涤, 干燥得到目标产物CSP。

2.4.3 色谱柱的装填

采用高压匀浆填充法将所制备的CSP装入不锈钢柱(100 mm $\times$ 4.6 mm I.D.), 以甲醇作为分散剂。装填过程持续30 min, 装柱压力 4.137×10^7 Pa (6000 psi), 流速为10 mL $\cdot$ min⁻¹。装完柱后, 标记好流向, 将色谱柱以正确方向安装于HPLC。

2.4.4 高效液相色谱的实验方法

采用高效液相色谱反相模式进行拆分研究。本实验选用MeOH/TEAA (三乙胺-乙酸水体系缓冲液)作为流动相。TEAA的配制方法是: 将三乙胺(TEA)溶于纯净水中, 用乙酸调节pH得到所需TEAA缓冲溶液。所有的分析物均溶解在MeOH/H₂O (体积比1 : 1)中, 配制成浓度为1 mg $\cdot$ mL⁻¹的溶液, 进样量均为10 μ L。所有缓冲溶液和样品在使用前均经过0.45 μ m的滤膜过滤并超声脱气。根据丹磺酰氨基酸紫外吸收光谱, 设定检测波长范围为220 nm。除特殊说明外, 每个样品均重复进样三次, 所得结果取平均值。保留因子 k , 选择因子 α 和分离度 R_s 均采用USP标准进行计算。

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

$$R_s = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{W_{1/2(1)} + W_{1/2(2)}} \quad (3)$$

其中, t_R 为对映体的保留时间, t_0 为死时间; $W_{1/2}$ 为色谱峰的半峰宽值。 α 为选择性因子, R_s 为分离度; 当 $R_s > 1.5$ 时, 认为两物质能基线分离。

3 结果与讨论

3.1 TsO-Py-CD和CSP的结构表征

采用FTIR和核磁共振氢谱对所合成的单正电CD进行结构表征。在FTIR光谱(图6a)中,与TsO-CD相比,TsO-Py-CD在 $\sim 1658\text{ cm}^{-1}$ 处的C=C双键伸缩振动吸收峰明显增强,初步说明吡啶基团的引入。 ^1H NMR谱图(图6b)显示,TsO-Py-CD中苯环氢(H1', H2')的化学位移明显向高场移动,可归因于苯环质子周围电子云密度增加,屏蔽作用增强,证明对甲苯磺酰基已脱离CD母体成为离子,并且出现了全新的吡啶质子吸收峰(H1, H2)。TsO-Py-CD的 ^{13}C NMR谱图(图6c)中可以明显看到位于130附近的吡啶环碳原子吸收峰,以及位于100附近乙烯基碳原子吸收峰(C5, C6),进一步证明吡啶环的引入。上述分析结果证实了TsO-Py-CD的成功合成。

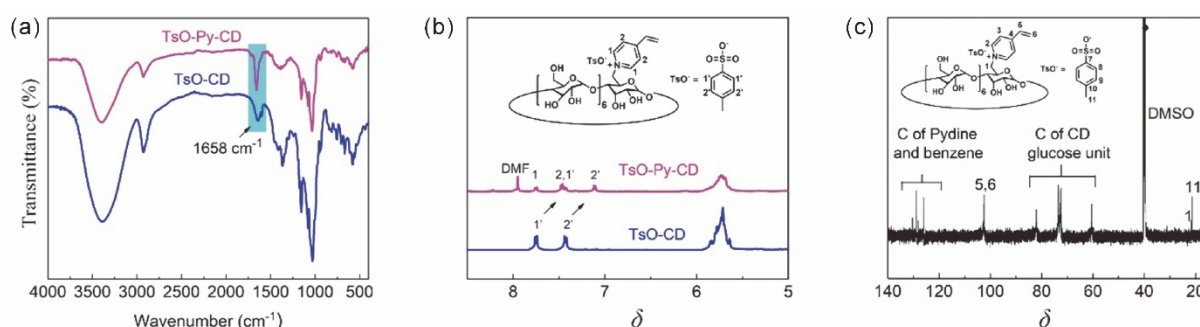


图6 TsO-Py-CD和TsO-CD的FTIR图(a)、 ^1H NMR图谱对比图(b)及TsO-Py-CD的 ^{13}C NMR图谱(c)

利用FTIR、热失重分析、固体核磁和元素分析对点击反应制备的CSP进行表征。在FTIR光谱图中(图7a),相比HS-SiO₂,CSP在 2940 cm^{-1} 附近的一CH₂—伸缩振动峰明显增强,说明乙烯基吡啶CD成功键合到巯基硅胶表面。在热失重分析中(图7b),相比巯基硅胶,CSP的失重差明显增大,说明巯基硅胶表面已被成功修饰。从固体核磁谱图中(图7c)可以明显看到吡啶环和CD骨架的吸收峰,进一步证明了乙烯基吡啶CD的成功键合。结合元素分析结果(表3),CSP的C、H、N的百分含量与HS-SiO₂相比均有较大程度提升且S的含量显著下降,根据式(4)^[10]计算得出CSP的CD固载量达到 $0.48\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$,证明点击化学可成功制备超分子CSP。

$$N(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}) = \frac{(C\%)(10^6)}{(S.A.)(n_C)(12.001)(100 - \frac{(C\%)}{(n_C)(12.001)}(M_r))} \quad (4)$$

其中, C%: CSP中碳元素的总含量; S.A.: 球形硅胶的比表面积; n_C : 每个 β -CD分子中碳原子数; M_r : CSP中相比于硅胶增加结构部分的分子量。

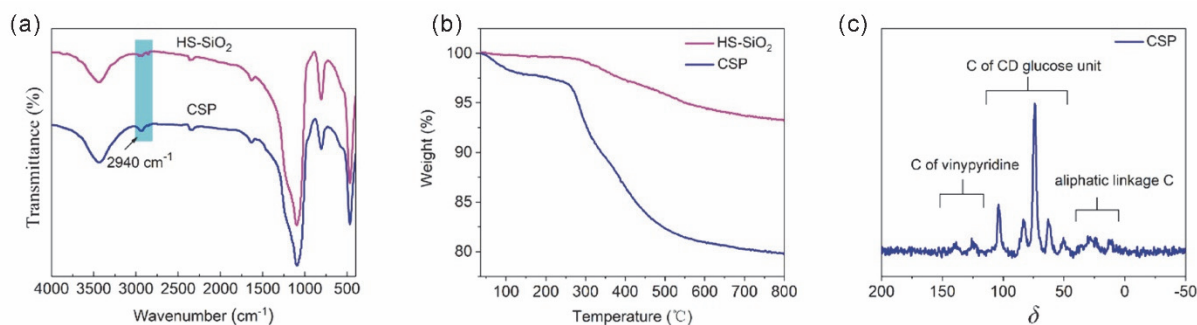


图7 巯基硅胶和CSP的FTIR图(a)、TGA曲线(b)、CSP固态核磁共振光谱(c)

表3 巯基硅胶和CSP的元素分析结果

样品名称	氮含量/%	碳含量/%	氢含量/%	硫含量/%
HS-SiO ₂	0.04	3.56	1.39	1.45
CSP	0.45	10.78	2.27	0.95

3.2 流动相条件结果讨论

鉴于流动相中有机相组成、pH、离子强度和有机相比比等色谱条件均可对丹磺酰氨基酸的分离结果有重要影响,因此,本实验对各因素进行详细考察,以期获得最佳分离条件。

3.2.1 流动相中有机溶剂种类的影响

本实验首先考察两种常用有机溶剂乙腈(ACN)和MeOH对丹磺酰氨基酸的影响。由图8可看出,以Dns-Aba为例,有机溶剂为MeOH时,CSP分离效果明显优于ACN。这主要归因于ACN极性明显弱于甲醇,与CD空腔有更强的疏水包合作用。另外由于MeOH是质子型溶剂,会参与主客体包合形成三元配合物,增强主客体包合稳定性。因此选用MeOH为丹磺酰氨基酸手性拆分的优选有机溶剂。

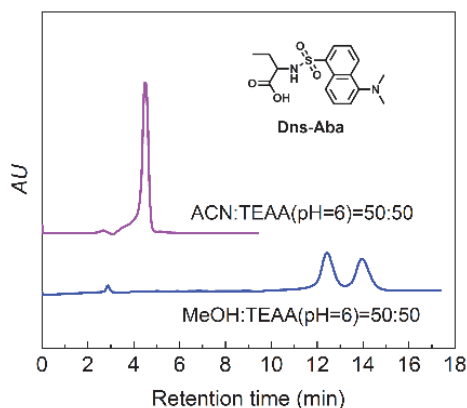


图8 流动相中有机溶剂种类对Dns-Aba拆分影响

3.2.2 流动相pH的影响

对于丹磺酰氨基酸,流动相pH直接影响其带电行为,从而影响静电相互作用。本实验先选用MeOH/TEAA缓冲液(体积比50:50),考察流动相中缓冲液pH对分离效果的影响。考虑氨基酸衍生物的弱酸性,实验采用pH = 4、5、6、7、8五种缓冲溶液分析对CSP拆分行行为的影响。结果如图9所示,以Dns-Aba为例,随着pH从4变化到8,分析物的保留因子、选择性和分离度呈现先增大后减小的趋势。这是由于在保留因子和选择性达到峰值之前,分析物中羧基的电离随着溶液碱性的增强而增强,更多的一COO⁻使得分析物与正电CSP的作用增强,从而导致保留因子和选择性增大。综合考虑分离时间和拆分效果,本实验选择pH为6进行后续实验。

3.2.3 离子强度的影响

离子强度对酸碱化合物电离、环糊精包合以及硅胶表面电荷抑制都有影响。因此,本实验固定最优pH = 6,调整TEA体积浓度比,分别考察0.4%、0.6%、0.8%、1.0%和1.2%五种离子强度对Dns-Aba保留值的影响,同时分析CSP对Dns-Aba的色谱拆分行行为。由图10看出,当流动相中离子强度从0.4%增加到1.2%,分析物的保留因子呈现减小趋势、选择性基本维持不变化但分离度呈现先增大后减小趋势。这是由于流动相中TEA阳离子浓度的增加,对硅胶表面的一SiO⁻基团有屏蔽效应,有助于提高柱效。同时流动相中的TEA也会竞争CD空腔,离子强度越大,CD和分析物的相互作用就越弱。综合考虑拆分效果和分离时间,本实验选择最佳离子强度为1.0%。

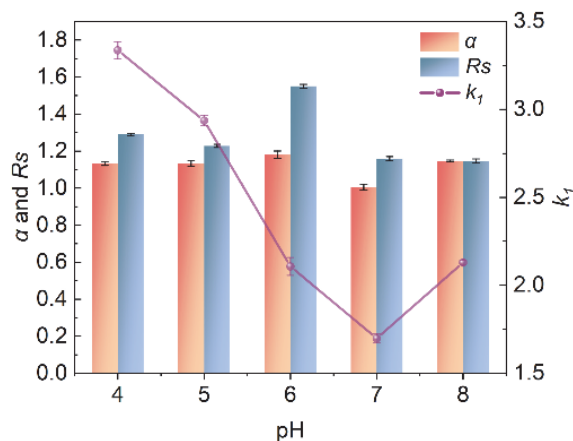


图9 流动相pH对Dns-Aba拆分的影响

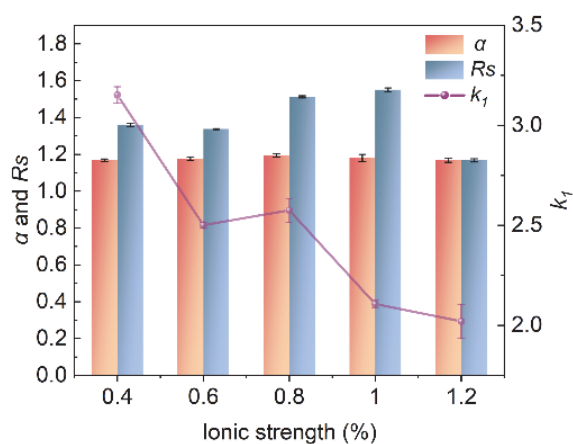


图10 离子强度对Dns-Aba拆分的影响

3.2.4 流动相比例的影响

本实验固定上述最优pH和离子强度, 调整MeOH/TEAA比例, 分析CSP对Dns-Aba的色谱拆分行为。由图11看出, 当MeOH的比例从60%降低到35%, 分析物的保留因子、选择性和分离度均呈现上升趋势, 当甲醇比例降至45%时, 已能够实现基线分离。这是由于MeOH和分析物都会竞争CD空腔, 甲醇比例越大, CD和分析物的相互作用就越弱。综合考虑拆分效果和分离时间, 本实验选择最佳流动相MeOH/TEAA比例为45 : 55 (体积比)。

3.2.5 对映体保留顺序分析

为进一步探究正电CD与不同构型的氨基酸对映体作用强弱, 本实验分别考察所制备的CSP对对映体样品的洗脱顺序。以Dns-Aba为例, 通过相同条件下保留值定性, 发现Dns-Aba的L构型要先于D构型出峰, 说明CSP和Dns-Aba的D-构型作用力更强, 能形成更稳定的主客体包合物(图12)。

3.2.6 外消旋体定量分析

根据式(5)使用面积归一化法进行定量分析, 由于对映体的紫外吸收完全相同, 因此相对校正因子 $f_D = f_L$, 由软件积分获得各自积分面积(A_D , A_L), 经计算可知样品Dns-Leu中L构型含量为57.0%, D构型含量为43.0%。

$$w_D = \frac{f_D A_D}{f_D A_L + f_D A_L} \times 100\% \quad (5)$$

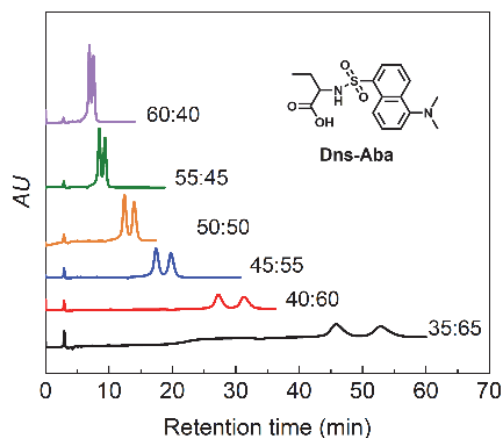


图11 流动相比对Dns-Aba拆分的影响

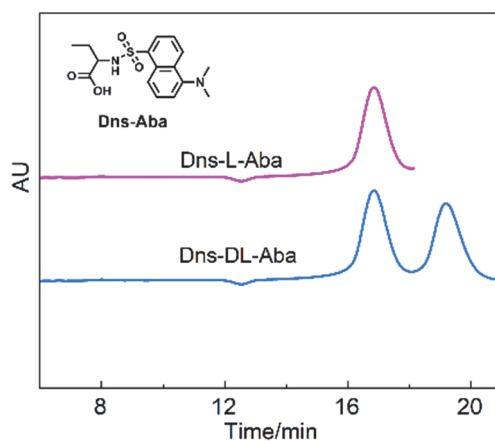


图12 不同构型氨基酸保留顺序

3.2.7 CSP色谱柱评价

为了考察CSP的稳定性能, 实验在最佳流动相条件(MeOH/TEAA (1.0%, pH = 6) 体积比45 : 55)下进行了日间重复实验。以Dns-Aba为例, 对比结果如图13所示, 色谱峰未发现明显变化, 且保留因子、选择性和分离度的标准偏差均小于0.1%, 充分说明CSP的稳定性能, 证明了点击化学接枝手段的有效性。

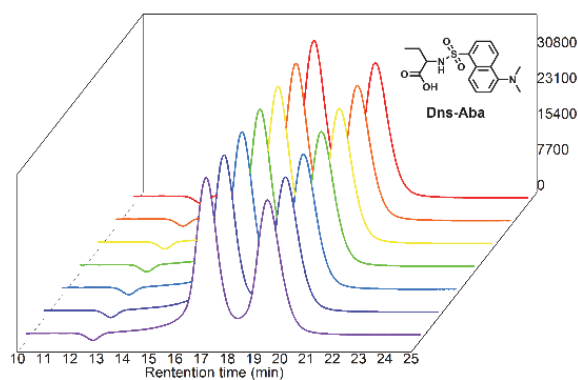


图13 Dns-Aba在最佳流动相条件下日间重复性实验

3.2.8 CSP的普适性考察

以MeOH/TEAA (1.0%, pH = 6) 体积比45 : 55为流动相, 进一步考察了该CSP手性拆分的普适性。对丹磺酰氨基酸类对映体进行拆分, 发现大部分样品都具备拆分效果。如图14, 除了Dns-Aba, CSP也对Dns-Leu、Dns-Nle和Dns-Phe色谱拆分结果较好。

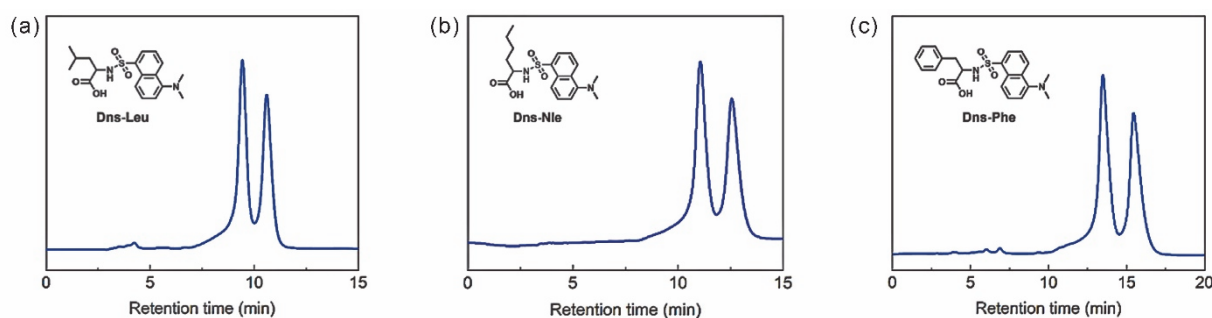


图14 CSP对丹磺酰氨基酸类对映体的拆分结果

(a) Dns-Leu; (b) Dns-Nle; (c) Dns-Phe

4 结语

“手性拆分工坊”是以建立手性对映体药物精准拆分方法为目标创新综合实验, 以卡脖子技术和国家重大需求为导向, 融合思政, 首次引入工坊式创新实验理念, 把工厂搬进实验室, 注重教学中化学基础研究创新和自主知识产权建立, 聚“产教学研用”五位一体, 既顶天又立地。实验汇集化学多领域理论及实验知识, 时长可控制在16学时, 非常适合本科生综合化学实验。实验亦可模块化分解。如: 有机合成CSP可作为8学时有机化学实验; 液相色谱精准拆分手性氨基酸可作为4学时的仪器分析实验。本实验还高度外延, 引入氨基酸衍生化实验、分子对接计算化学实验, 直至海量数据支撑下的人工智能实验, 构建化学为基础学科的交叉性大综合实验, 打造“科教融合应用型人才培养”新范式, 让学生成为我国高等教育改革的受益者, 勇挑国家战略建设的重担。

参 考 文 献

- [1] Dou, X.; Mehwish, N.; Zhao, C. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 852.
- [2] Sun, Z.; Hou, J.; Li, L.; Tang, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *425*, 213481.
- [3] Gogoi, A.; Nongrum, S.; Bez, G. *Curr. Org. Chem.* **2021**, *25*, 1566.
- [4] Li, L.; Zhang, J.; Dai, H. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 14425.
- [5] Liu, Z.; Ye, L.; Xi, J.; Wang, J.; Feng, Z.-G. *Prog. Polym. Sci.* **2021**, *118*, 101408.
- [6] Lu, X. L.; Chen, M.; Yang, J. T. *J. Chromatogr. A* **2022**, *1664*, 462786.
- [7] Shaw, S.; White, J. D. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 9381.
- [8] Topuz, F.; Holtzl, T.; Szekeely, G. *Chem. Eng. J.* **2021**, *419*, 129443.
- [9] Dalglish, C. *J. Chem. Soc.* **1952**, 3940.
- [10] Siles, B. A.; Halsall, H. B.; Dorsey, J. G. *J. Chromatogr. A* **1995**, *704*, 289.