

第二章 手性化合物的分析方法

一. 对映体组成的确定

对映体过量 (Enantiomeric Excess) 即: “e.e.”

$$\% \text{ e.e.} = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100\%$$

e.r. = [R] : [S] or [S] : [R]

d.r. = anti : syn or syn : anti

1.1. 比旋光的测定

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{L \times c} = \frac{\alpha}{L \times g} \times 100$$

α : 测定的旋光值; L : 样品池的光路长度(dm); c : 浓度(g/100 mL);
D: 用于测量的光波长(D线), 586 nm; t : 测量时的环境温度

• 如何从 α 计算 [α]:

将某不对称反应的产物 1.5 g 溶于乙醇, 制得 50 mL 溶液, 置该溶液在 10 cm 的旋光管中, 在钠光 (D线) 源下于 20°C 测得其旋光度 (α) 为 +2.79°, 求该产物的比旋光度 (数值标注要求规范)。

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{2.79}{1 \times (1.5 \times 2)} \times 100 = 93 \quad [\alpha]_D^{20}: +93 (c 3.0, C_2H_5OH)$$

• 如何由 [α] 求出 e.e. 值

若已知该化合物纯(S)-对映体的 $[\alpha]_D^{20} = -101^\circ$, 求该不对称反应的 e.e. 值。

$$\text{e.e.} = 93/101 \times 100\% = 92.6\%$$

• 如何求出 两个对映异构体的比例 (e.r.) 值

从产物旋光的符号可看出产物中以 R 构型为绝大部分。产物中 R 和 S 构型异构体的组成比为 (e,r)。

$$[R]/[S] \text{ (e.r.)} = 96.3 : 3.7$$

用途: ♣ 光活性化合物的一个基本物理数据;

♣ 计算光学纯度;

$$\text{optical purity (\%)} = [\alpha]_{\text{obs}} / [\alpha]_{\text{max}} \times 100\%$$

♣ 推断手性中心的绝对构型。

局限: 1) 旋光度测量的精确度不够高;

2) 影响旋光值的因素很多, 如: 温度、溶剂、浓度、波长、杂质等;

3) 需要相对多量的样品;

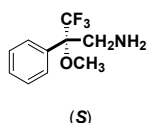
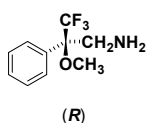
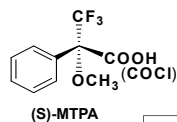
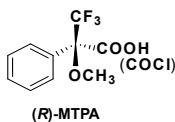
4) 为了比较, 必须得到纯化合物的比旋光值。

1.2. NMR法

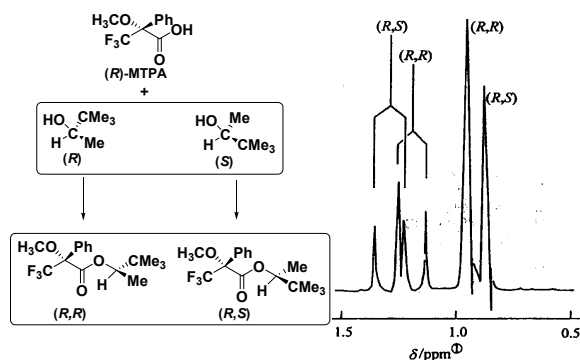
基本的原理和方法: 将分析对象由对映体 → 非对映体 !!!

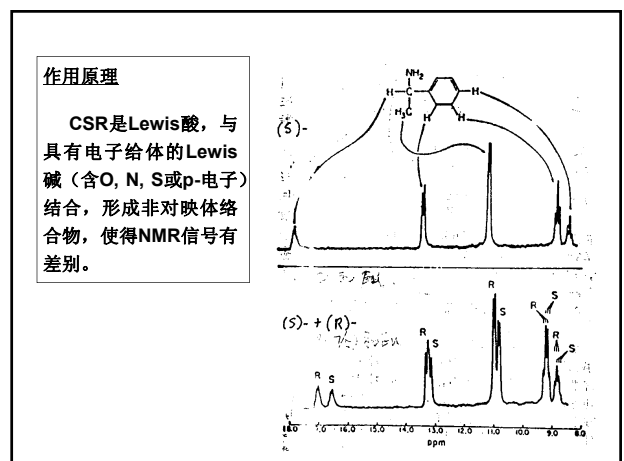
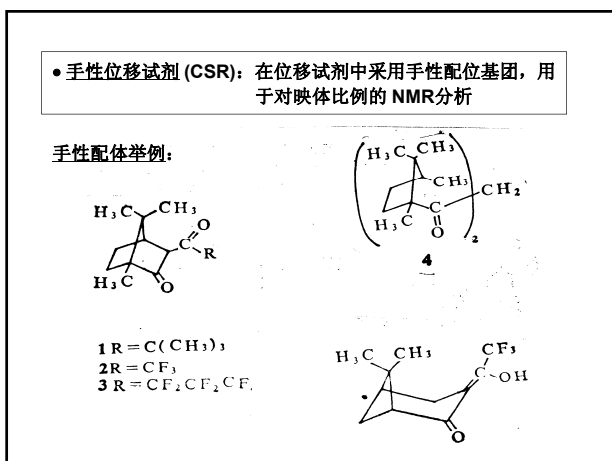
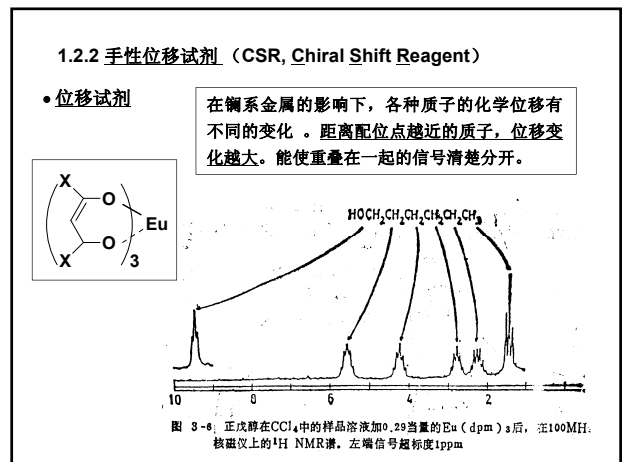
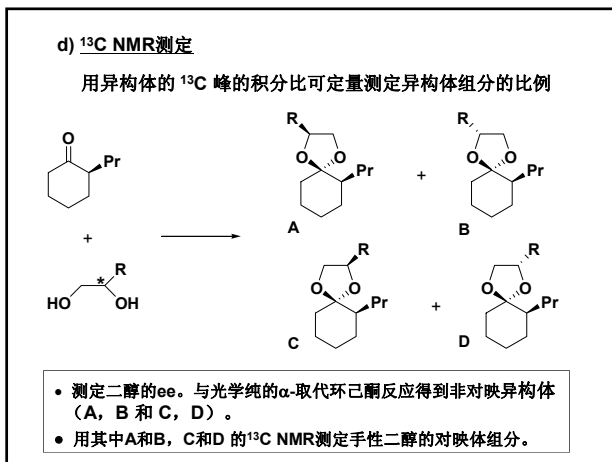
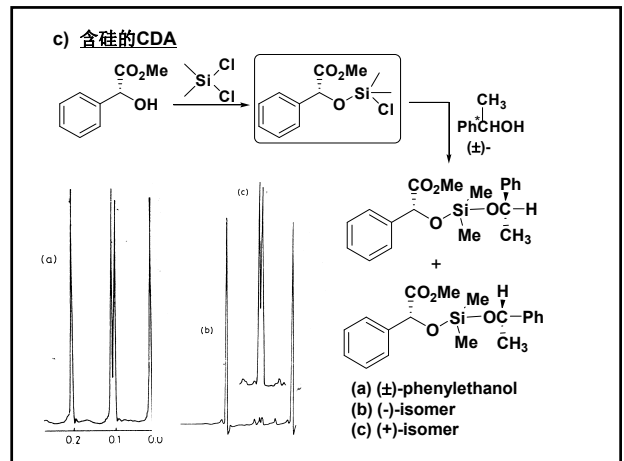
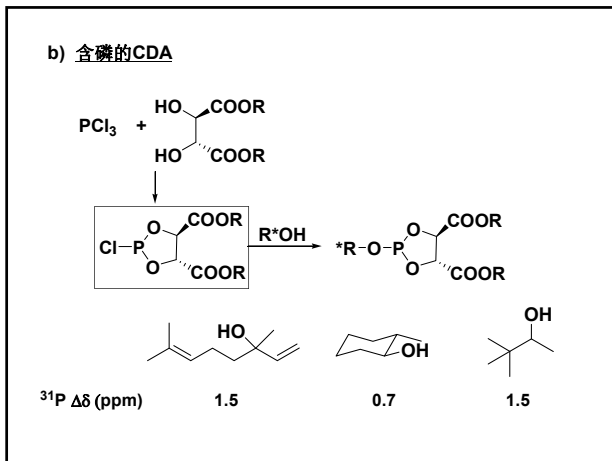
1.2.1 手性衍生试剂 (CDA, Chiral Derivating Agent)

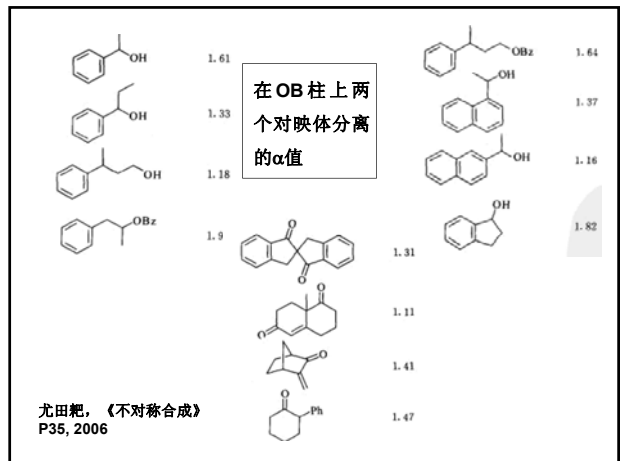
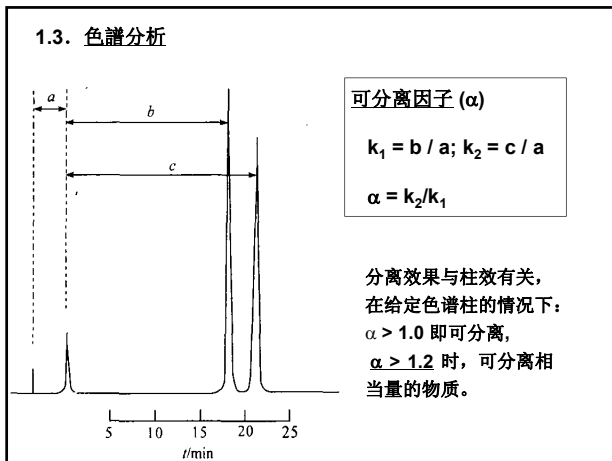
a) Mosher酸 (MTPA) 和 Mosher胺



含F和OCH3都使
NMR谱线单一,
易分析。







1.3.1 液相色谱 (HPLC)

使用手性固定相作柱填料，样品的HPLC谱与外消旋样品的谱比较，可以测定对映体的组成比例。是目前最有效、最权威的方法。

- 手性固定相 (CSP, Chiral State Phase) 可分为：
 - a) 天然手性化合物
 - b) 合成的手性固定相

(a) 天然手性化合物

环糊精、淀粉、纤维素等涂布、吸附或键合在硅胶或氧化铝上。价廉易得，应用广泛，但分子结构较复杂，手性识别的机理有待深入研究。

1) 环糊精 (CD, CycloDextrin)

6~12 个 D-(+)-吡喃葡萄糖单元

α -CD 六糖环

β -CD 七糖环

γ -CD 八糖环

用作固定相

环糊精用隔离臂和硅胶相连成为手性固定相。
 隔离臂太短：立体位阻使连接反应较难进行
 太长：硅胶表面裸露，会直接吸附，降低识别效果

2) 多糖化合物 (纤维素、淀粉等的衍生物)

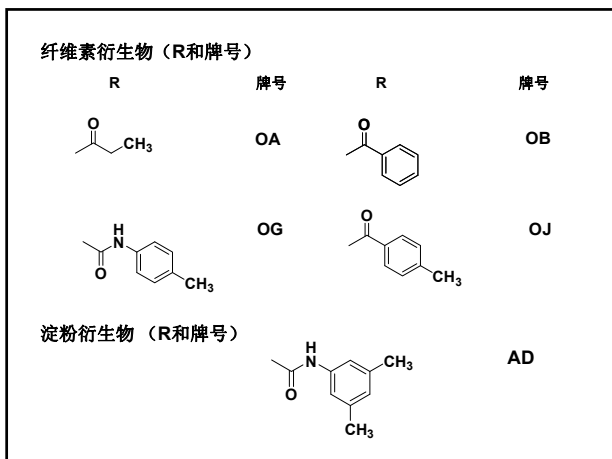
纤维素的结构相对简单、均一，是由D-(+)-葡萄糖以1,4- β -苷键缩合而成的链状高分子。淀粉也是一种天然丰富的多糖类手性材料。

用于HPLC，分析醇、醚、酯、羰基化合物，亚砷等。

CHIRALCEL OD-H

Cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) on a 5 μ m silica-gel substrate

$$R: -C(=O)-NH-C_6H_3(CH_3)_2$$



3) 蛋白质和酶 必须键合到球型硅胶表面

α -酸性糖蛋白 (CHIRAL-AGP)

用于反相色谱, 能分离各种手性化合物, 如: 胺、(强和弱)酸、酰胺、酯、醇等。

人血清蛋白 (CHIRAL-HAS)

是一种稳定的酶, 适用于分析酸性药物。

纤维素二糖水解酶 (CHIRAL-CBH)

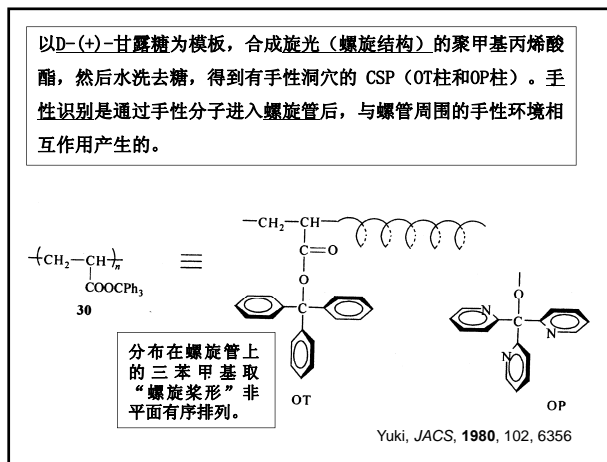
是一种稳定的酶, 适用于分析各种碱性药物。

(b) 合成手性固定相

1) 协作型的手性固定相

各个结构不一定是手性的, 而整体是手性的, 其手性识别通过材料的各个部分的协同作用来实现。

以旋光高聚物为例: 在化学惰性的“模板”存在下, 聚合反应制备高聚物后, 移去模板, 留下手性空穴, 成为能进行手性识别的空间。



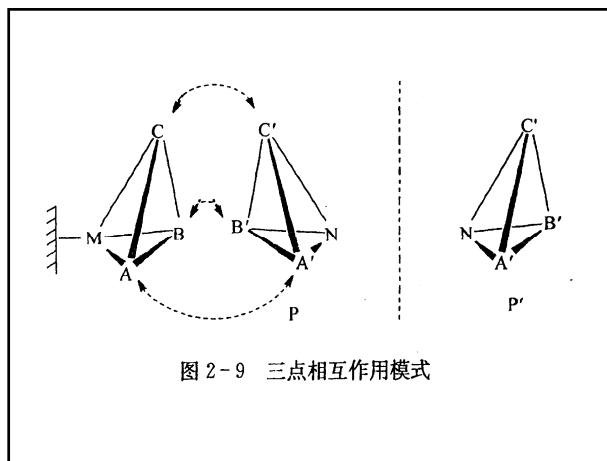
2) 独立型的手性固定相

每个手性分子单独都有手性识别能力, 并连接(或吸附)在固定相上。一般应为含N, O, S的化合物。

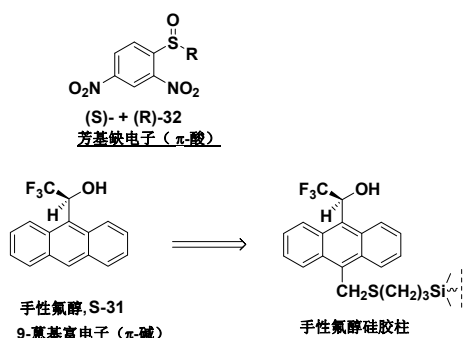
三点作用理论: CSP分子与一个对映体分子最少必须同时有三个点相互作用, 这些作用中至少有一个是由立体化学决定的。

氢键、偶极相互作用、电荷转移络合作用、位阻排斥、疏水吸引、 π - π 堆积等所有分子间的相互作用都可以成为手性识别的贡献因素。

注意: 要使识别效果最佳, 应包括三种不同类型的相互作用, 以免互相换位。

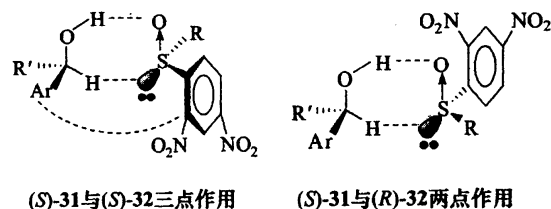


实例：手性氟醇（ π -碱）硅胶柱拆分外消旋的亚砷（ π -酸）

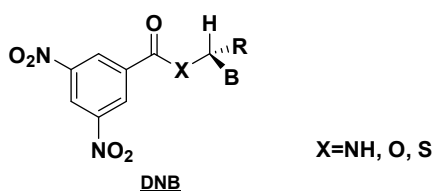


三点作用示意图：

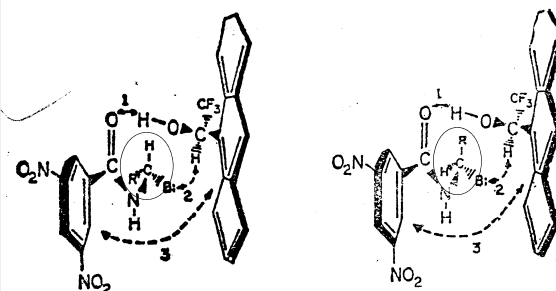
一个异构体有 π - π 相互作用，形成三点作用，较强。
另一异构体仅有两点作用，较弱。



换3,5-二硝基苯甲酰（DNB）衍生物代替亚砷为拆分对象

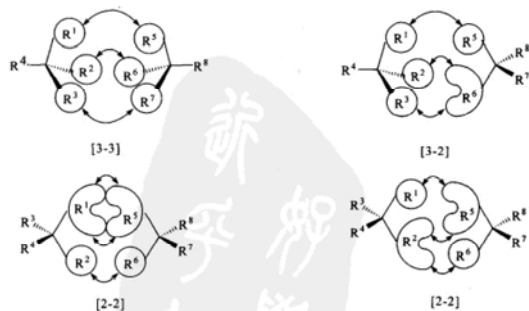


DNB结构中已有一个 π -酸和一个碱点（羰基氧）两个作用点。
第三个作用点（手性识别）由构象决定。



- 酰胺的优势构象为重叠式（图左）。此时，可形成第三点作用（B形成氢键）。
- 图右的构型，没有达到优势构象，形成了氢键但不稳定，而在达到优势构象时，碱基处于另一侧，不能形成氢键。

手性识别的四种类型：

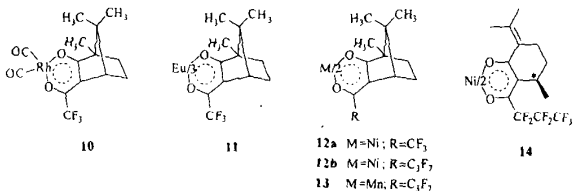


[3-3]模式要求三个作用点来自与手性中心相连的三个不同的基团，空间位置要求太严，缺乏柔顺性，较难满足。[3-2]模式更普遍，识别效果更好。

1.3.2 配体交换色谱

- 将一种能与金属离子形成螯合物的手性配体交联到高聚物载体上。金属离子在与固载化的手性配体螯合的同时，还能与待测分子，双功能基（如： α -氨基酸、 α -羟羧酸）外消旋体中的两个对映体发生动态配位作用，通过配体交换形成稳定性不同的非对映异构络合物，从而实现对映体的拆分（分离）。
- 避免应用强碱性的物质；较多用于气相色谱分析

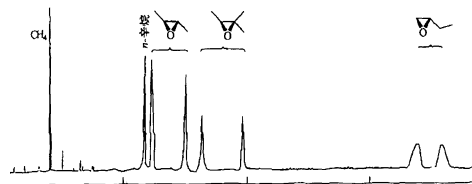
• 手性配体如下例：



• 金属离子可有：Cu²⁺，Ni²⁺，Mn²⁺，Eu³⁺等。

实例：

• 对取代环氧化物的对映体GC拆分。（α：1.14 ~ 1.32）



• 用氨基酸左手型配体，交联到修饰过的硅胶上合成CSP，用于拆分游离的氨基酸特别有效。Davanakov发展的“反相柱”，可成功拆分所有的α-氨基酸，α值可高达16.4。

1.3.3 毛细管电泳法（CE）

电泳定义为在电场作用下带电化合物在凝胶或缓冲溶液中的运动。根据各个分子不同的电泳淌度而达到分离。CE分析法的灵敏度极高（分离因子低也能基线分离）而且快捷。

若在溶液中加入**手性的添加剂**（也称选择剂），样品和选择剂之间形成非对映络合物，可以达到对映体分离的效果。

手性添加剂：手性金属络合物、天然或改性的环糊精、冠醚、大环抗生素、非环的低聚和多聚糖、合成的手性表面活性剂等。

- GC适于挥发性，且热稳定性较好的样品。HPLC和CE则适于无挥发性的样品。
- HPLC不适于带电荷或相对高分子量的样品。
- CE尤其适于相对高分子量的样品，特别是生物大分子样品，如：蛋白质、核酸等的分析。

二. 绝对构型的测定

2.1. X射线衍射法（目前最直接和权威的方法）

1951年土耳其化学家Bijvoet第一个用X-衍射重原子法测定了酒石酸盐晶体的绝对构型。

四圆衍射仪的发展使得单晶结构的测定不必引入重原子。但是，“**仅含轻核（C, H, N, O, F等）的手性化合物的单晶结构分析仍然只能给出空间的相对位置，不能给出对映体的绝对构型**”。

含**重核**的对映体的单晶结构测定（含比氯重的原子，或引入含重原子的基团，但不影响手性中心）

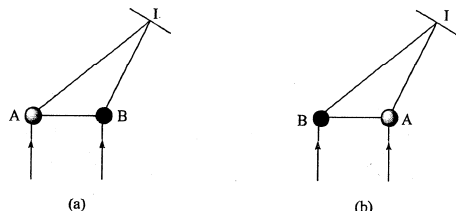


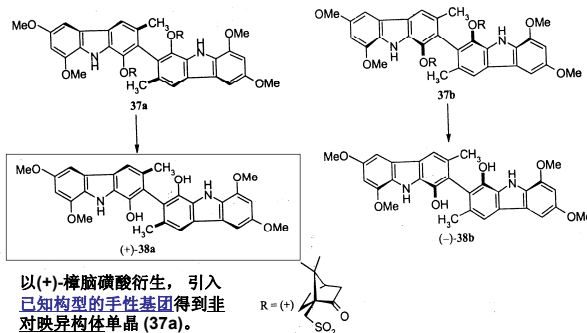
图 4-1 X射线被分子 A—B 及其镜像分子 B—A 衍射示意图

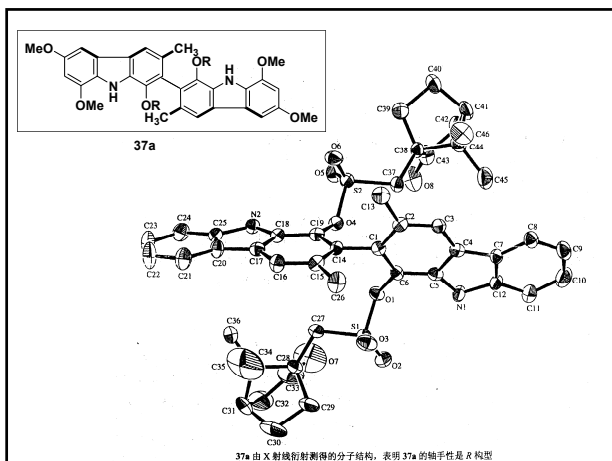
将A换成重原子

- a) A-I > B-I A滞后 在 I 处衍射差 ↑
b) A-I < B-I B滞后 在 I 处衍射差 ↓

(1) 确定天然产物的构型

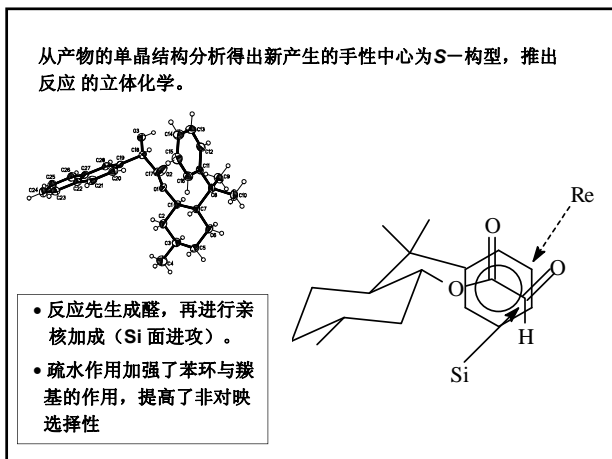
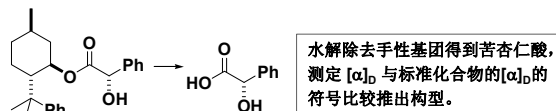
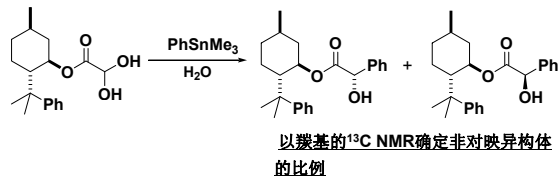
双卡吧啉化合物是轴手性化合物，(+)-38a由植物黄皮分离得到，具有生理活性。须确定(+)-38a的构型。



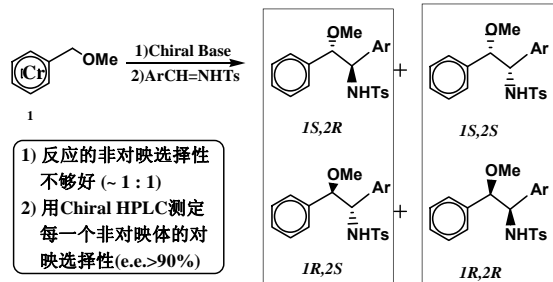


(2) 确定新产生的手性中心的构型

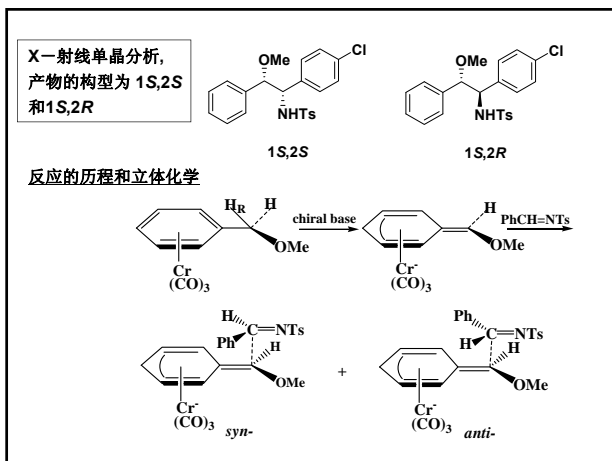
a) 研究反应的立体化学



b) 研究反应的历程

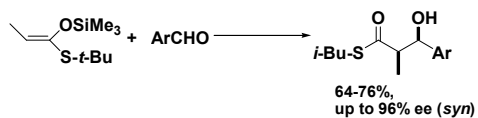


- 1S,2R与1S,2S; 1R,2S与1R,2R为非对映体
- 1S,2R与1R,2S; 1S,2S与1R,2R为对映体



2.2. 与标准化合物比较

- 1) 旋光的符号比较,注意:相同的测试条件:浓度、溶剂、温度等。
- 2) Chiral HPLC的保留时间和流出顺序与已知化合物比较



相同的测试条件: Column: Daicel Chiralcel OD. Same eluent and conditions.

Ref: $t = 16.2$ (major) and 25.0 min (minor). 构型: 2R, 3R
实测: $t = 16.2$ (major) and 26.2 min (minor) 同一是 2R, 3R

2.3. NMR法 这来源于一个期待和追求！！

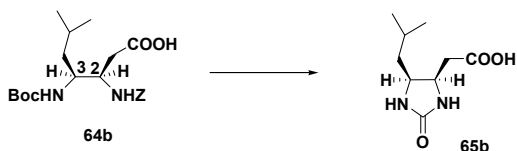
R. Riguera,
"The Assignment of Absolute Configuration by NMR",
Chem. Rev. 2004, 104, 17-117

“从本综述列出的许多试剂和实验结果可以得出结论：
其中，仅有很少的实验结果表明“用NMR归属构型”是可信的，因为，被测化合物的数目不够多，所提供的数据不足以推断出一般的规律。”

Overhauser效应 (NOE) 用于构型测定。

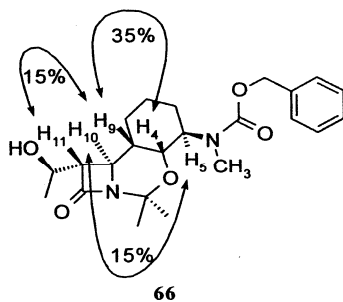
在两个质子间观察到NOE意味着两个质子（空间）非常接近。

例1:



64b的H-2和H-3观察不到NOE，
而65b成环后则有显著的NOE。

例2. 抗生素GV129606的绝对构型

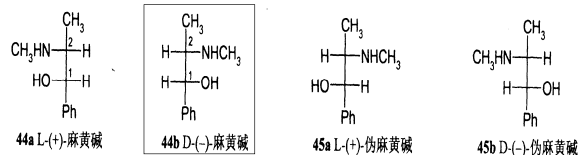


H-4, H-9, H-11处于同侧，而H-5, H-10在另一侧

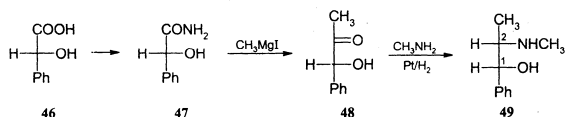
2.4. 化学相关法

将欲测的手性化合物通过化学方法转变成另一个构型已知的化合物，然后比较它们的旋光符号或相应的GC, HPLC, 推导出其绝对构型。

例1: 麻黄碱分子绝对构型的确定



- 由(R)-苦杏仁酸衍生D-(-)-麻黄碱，证明D-(-)-麻黄碱的C1构型与(R)-苦杏仁酸一致，为(R)-构型。



- D-(-)-麻黄碱的C2构型与(S)-丙氨酸相关联，C2构型为(S)。

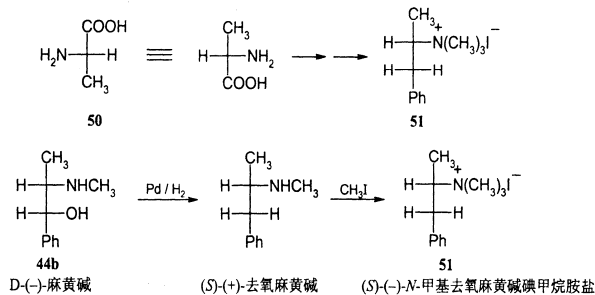
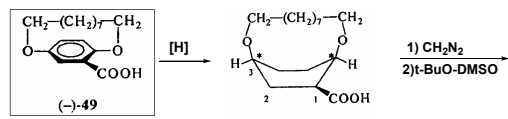
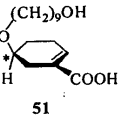


图 1-21 44b 与 50 转化为 51 的反应

例2: 平面手性分子构型的确定

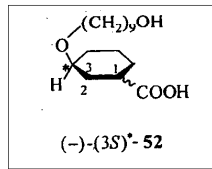


龙胆酸的壬二醇环内醚



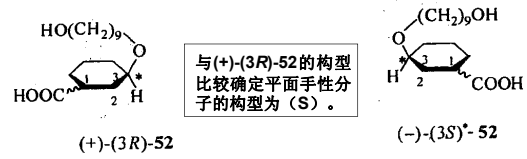
51

[H]



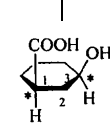
(-)-(3S)-52

经拆分得到未知构型的平面手性分子 (-)-49, 衍生反应得到(-)-(3S)-52。



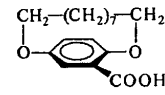
(+)-(3R)-52

(-)-(3S)-52



cis-(1S,3R)-53

已知构型



(-)-49

二醇醚环在平面的上方

2.5 圆二色谱

圆二色谱 (CD, Circular Dichroism)

非对称有机分子对左旋和右旋圆偏光的吸光系数不同, 即:

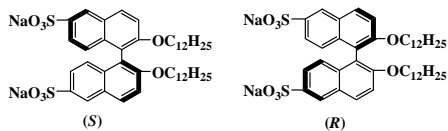
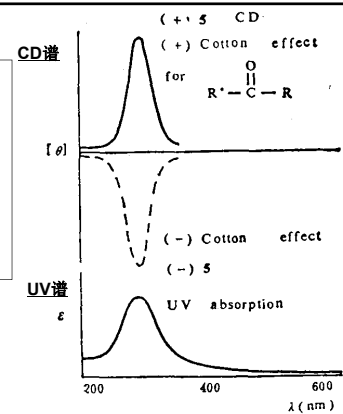
$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

以 $[\theta] = 3300 \times \Delta\epsilon$ ($[\theta]$: 摩尔椭圆度) 对波长 λ 作图, 为 CD 谱。

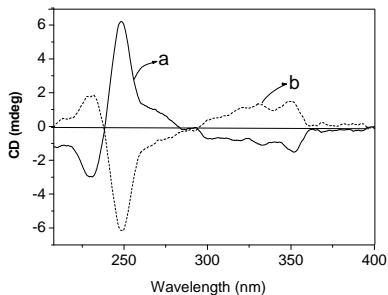
Cotton效应

$\Delta\epsilon$ 可有正值或负值, 称为 Cotton 效应。

CD 曲线有 **正性** Cotton 效应曲线和 **负性** Cotton 效应曲线。



手性表面活性剂

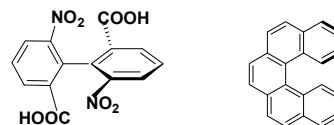


有机分子中发色团能极跃迁受到 **不对称环境** 的影响是产生 Cotton 效应的基本原因。

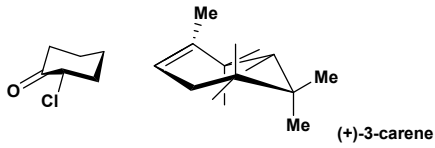
通过将已知绝对构型的化合物的 Cotton 效应与结构相似的化合物的 Cotton 效应比较, 可以推导出后者的绝对构型。

“不对称环境”的几个类型:

(1) 由固有的手性发色团产生的, 如不共面的取代联苯化合物等。



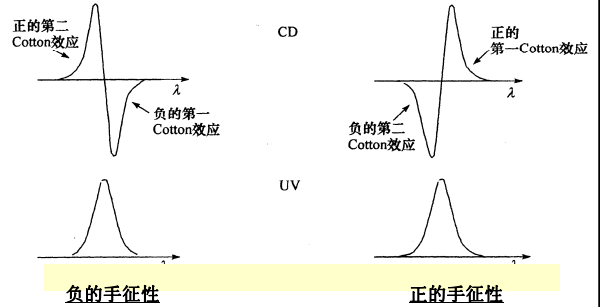
(2) 原有发色团是对称的，但处手性环境中被歪曲。



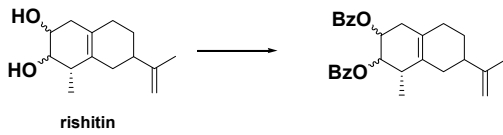
(3) 手性激发态耦合

由分子轨道不互相交叠的发色团偶极相互作用产生。
两个处于相关环境中的相同的发色团，其电子跃迁偶极矩发生作用，称为**激发耦合**。
两个发色团的空间关系会影响Cotton效应

在UV λ max处裂分为符号相反的两个吸收，处于高波长的称为第一Cotton效应，低波长的为第二Cotton效应。

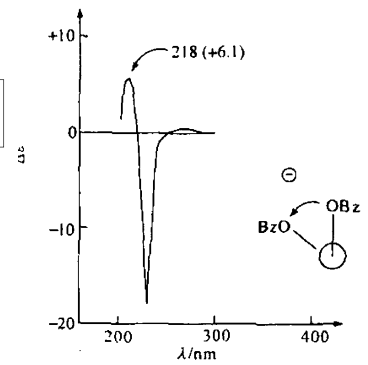


实例1: Rishitin是一个抗菌的正倍半萜，含两个羟基

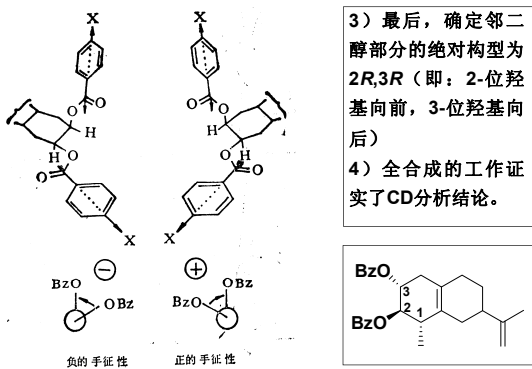


- 1) 先衍生成苯甲酸酯，
- 2) 然后，测定其CD谱。

显示负的手征性裂分
CD Cotton效应



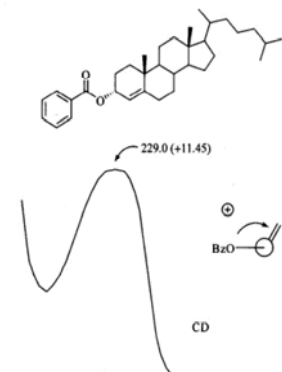
3) 最后，确定邻二醇部分的绝对构型为2*R*,3*R* (即：2-位羟基向前，3-位羟基向后)
4) 全合成的工作证实了CD分析结论。



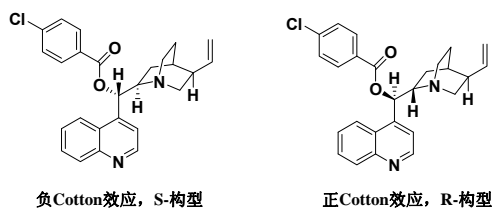
实例2: 胆石-4-烯-3-醇的构型确定

羟基转化成苯甲酸酯基发色团 ($\lambda=230\text{nm}$)，虽然与双键发色团 ($\lambda=195\text{nm}$) 相差较大，但仍有作用。

在230nm处表现为正Cotton效应。可以确定构型为*R*。



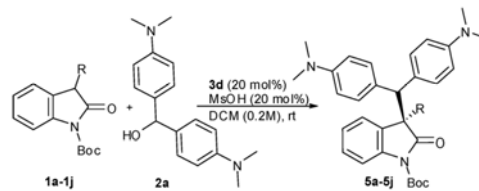
实例3: 金鸡纳碱分子手性中心构型的确定



喹啉发色团与对氯苯甲酸酯基的相互作用引起不同的Cotton效应。

2.6 Vibrational Circular Dichroism (VCD)

(a) *J.Nat.Prod.* 2007, 70, 1167. (b) *J.Am.Chem.Soc.* 2008, 130, 6507



Liu, *Chem. Commun.* 2013, 49, 1636