

手性检测器及手性对映体圆二色光谱标识*

陈胜文¹ 刘维屏^{1, 2*, **} 张大同²

(¹ 浙江大学环境科学研究所, 杭州, 310027; ² 浙江工业大学环境科学研究中心, 杭州, 310032)

摘 要 本文对手性检测的旋光检测器 (ORD) 和圆二色光谱检测器 (CD) 的基本原理进行了介绍, 并阐述了 ORD, CD 及紫外光检测器 (UV) 三者之间的关系. 通过 ORD 与 CD 两者的比较, 圆二色光谱要优于旋光光谱, 提出以圆二色光谱特定波长上的康顿效应宏观标识手性对映体.

关键词 手性检测器, 旋光, 圆二色, 康顿效应.

手性对映体在立体的结构上互为镜像, 在生命体有时相当于两个完全不同的物质, 但其物理、化学性质极其相似, 只有一些光学方面的性质存在差异^[1]. 手性化合物的光学活性差异主要是表现在两个方面, 一是对线性偏振光偏振平面的旋转; 另一是对左、右旋圆偏振光的吸收差异.

利用光学活性的差异, 分别对应两种手性检测器: 旋光检测器 (ORD) 和圆二色检测器 (CD), 其原理如图 1 所示.

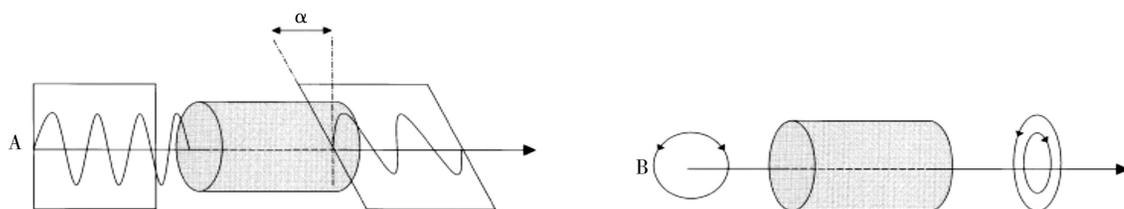


图 1 旋光 (A) 和圆二色 (B) 现象的原理^[2]

Fig 1 Physical representation of the physical basis for optical rotatory dispersion (A) and circular dichroism (B) measurements

1 旋光现象及旋光光谱

当一束平面偏振光通过光学活性物质时, 由于该物质对左、右旋圆偏振光的折射率不同, 传播速度也不相同, 此时叠加产生的平面偏振光其振动面就会发生旋转, 即产生旋光现象. 其偏振平面的偏转角度可由式 (1) 确定.

$$\theta = \frac{\pi L}{\lambda_0} (n_L - n_R) \quad (1)$$

式中, λ_0 为入射光波长, L 为通过的光程, n_L , n_R 分别是左、右旋圆偏振光的吸光系数.

在实际测量中, 多采用旋光仪来测定. 一般采用钠光源 (589 nm) 作为常用光源, 有的仪器采用汞光源 (586 nm). 对某个物质进行旋光度表征时, 多用比旋光度表示, 比旋光度由式 (2) 确定.

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\theta}{C}$$

式中, θ 为实测的偏转角度, l 为通过的光程, C 为物质的浓度.

物质的比旋光度与测定波长有关, 测定时的温度对其也有影响, 所以要标明测定温度和光源的波长. 在不同的波长, 光学活性物质的比旋光度差异较大, 有时可能在某一波长上是左旋而在另一波长上是右旋^[3].

一个旋光物质在旋光光谱仪中, 采用不同的波长可得到不同的旋光度值, 绘制成曲线即旋光光谱 (ORD). 在钠光源下相同或相似的两种旋光物质, 其旋光光谱曲线可能完全不同. 旋光光谱的特征由旋光物质的构型及构象所决定, 也与发色基团和手性中心的相对位置相关. 在大多数情况下, 旋光

* 国家重点基础研究 (2003CB1144002) 及国家杰出青年基金 (20225721) 资助项目. ** 通讯联系人. E-mail: wli@zjut.edu.cn

光谱还与温度和溶剂相关。这些特点使得旋光光谱成为研究有机化合物立体结构的重要方法之一。

对于在紫外和可见光区无发色团的饱和化合物，其旋光光度的绝对值随波长增大而减小。对于旋光度为负值的化合物，ORD谱线从紫外到可见光区呈单调递增；而旋光度为正的化合物呈单调递减。两者都向零线逼近，但不与零线相交，即谱线在一个象限内延伸，既没有峰也没有谷。这类 ORD 谱称为正常的或平坦的旋光谱线，如 2-丁醇，其谱线如图 2 所示。

如果分子中有一个简单发色团（如羰基），其 ORD 谱线与无发色团的 ORD 谱线存在很大的差别。因为羰基在 270nm 附近有一个较弱的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁，这就是紫外光谱在 270nm 附近的弱吸收峰。ORD 曲线在此处越过零点，进入另一个象限，形成一个峰和一个谷组成的 ORD 谱线，称为简单的康顿效应（Cotton Effect）。

当旋光谱波长由长波向短波变化时，ORD 谱线由峰变化到谷，称为正的康顿效应，而 ORD 谱线由谷变化到峰时，则为负的康顿效应。ORD 与零线相交点的波长记为 λ_c ，谷与峰之间的垂直高度称为振幅。

有些化合物同时含有两个或两个以上的发色团，其 ORD 谱线可有多峰和谷，呈复杂的康顿效应曲线。每一个实际的 ORD 曲线都是分子中所有发色团效应的平均结果，包括 200 nm 以下的吸收，分子的各种取向，每种分子构象的贡献。图 3 是樟脑酮的 ORD 谱图，从谱图上来看，这是一个正康顿效应，是其发色团羰基受到不对称环境影响所导致的结果。

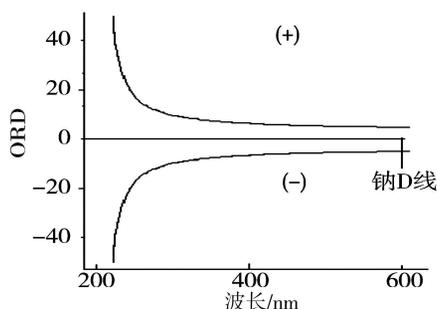


图 2 (+) 和 (-)-2-丁醇的 ORD 曲线
Fig 2 ORD of (+) and (-)-2-butanol

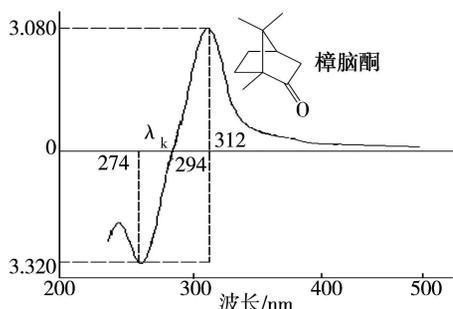


图 3 樟脑酮的 ORD 谱线
Fig 3 ORD of 2-camphanone

2 圆二色性及圆二色光谱

当平面偏振光通过光学活性物质时，因左、右旋圆偏振光的传播速度不同，导致二者吸收存在差异，两者的吸收差异被称为圆二色性（CD），即 CD (ΔA) 信号，其吸收大小由式 (3) 确定，

$$\Delta A = A_L - A_R = \epsilon_L CL - \epsilon_R CL = \Delta \epsilon CL \quad (3)$$

式中， C 为物质浓度， L 为检测池长度， ϵ_L 为物质对左旋光摩尔吸光系数， ϵ_R 为物质对右旋光摩尔吸光系数。

有机物分子中发色团能级的跃迁受到不对称环境的影响是产生 CD 和 ORD 康顿效应的本质原因，一般有三种情况会导致康顿效应的产生^[4]：(1) 由固有的手性发色团产生，如不共面的取代联苯化合物，螺烯等。(2) 原有发色团是对称的，但处在手性环境当中而被歪曲。如手性环己酮中羰基是对称的，但邻位有一个手性中心，导致了其康顿效应的产生。手性烯烃中的双键也同样可以被歪曲而产生康顿效应，如环己酮。(3) 由分子中轨道不互相交叠的发色团耦合相互作用而产生康顿效应。如 (+)-biphenanthryl 2,2'-diol^[5]。

如果让左旋圆偏振光和右旋圆偏振光分别通过光学活性物质，其所得的图谱可用图 4 表达，其中 (a) 是正常的紫外吸收，(b) 是左圆偏振光和右圆偏振光分别的吸收及圆二色吸收。

如果待测样品在 200 nm—700 nm 波长范围内无特征吸收，ORD 呈单调平滑曲线，此时 CD 近于水平线，不呈特征吸收，对解释化合物的立体构型没有作用。若在上述范围内有特征吸收，则 ORD 和 CD 都呈特征康顿效应曲线。图 5 是 *R*-甲霜灵的圆二色光谱图，从图 5 可以看出，在 220nm—

270nm 之间存在正康顿效应, 这是典型的正康顿效应曲线.

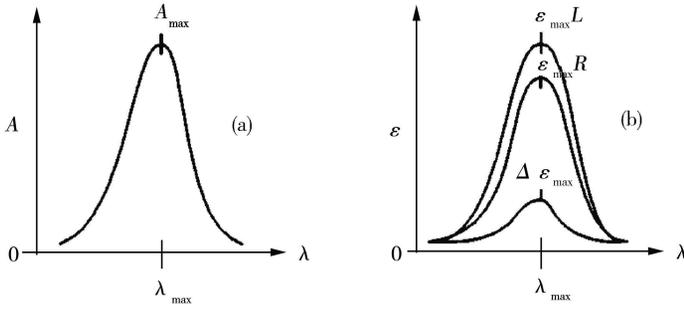


图 4 圆二色性的图解

Fig 4 Pictorial representation of circular dichroism

3 圆二色光谱与紫外光谱的关系

基于上述三种康顿效应产生的原因, 可知只有分子中具备了发色团时, 才可能具有圆二色性, 即在出现紫外-可见光吸收峰的情况下才可能出现圆二色谱的吸收峰, 即康顿效应.

图 6 是 MCPP-M 的一个对映体的圆二色光谱与紫外光谱对照, 从图 6 可以看出, 在 220nm 和 280nm 附近出现了紫外吸收峰, 而圆二色谱图也在这附近出现了两个康顿效应, 但两者出现的 λ_{max} 并不一定同时. 第一个紫外吸收峰在 228nm 处, 而圆二色谱吸收峰却出现在 238nm.

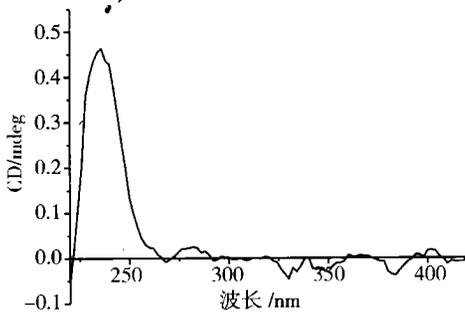


图 5 R-甲霜灵的 CD 图谱

Fig. 5 CD spectrum of R-Metalaxyl

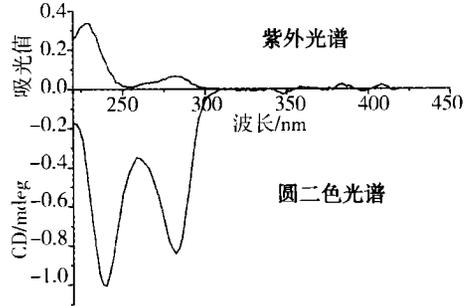


图 6 S-MCPP-M 圆二色光谱和紫外光谱

Fig. 6 CD and UV of S-enantiopure of MCPP-M

4 圆二色光谱与旋光光谱的关系

圆二色光谱和旋光光谱是同一个现象的不同方面, 即都是光与物质的相互作用. CD 光谱反映了光和分子之间的能量交换, 而 ORD 光谱则反映电子运动的情况.

从实际应用上来看, CD 光谱有较好的分辨率, 并且对掩埋在较强康顿效应曲线中的较小的康顿效应也可表现出来. 因此, CD 谱愈来愈多地用来取代 ORD 光谱.

从量子力学的微观角度看, 旋光性和圆二色性都与电子跃迁相关. 当电子由基态跃迁到激发态时, 必然使光强减弱, 对分子而言激发的结果, 使整个电荷分布发生改变, 即产生极化, 这种电荷分布与光波电磁场的相互作用必然影响光的传播速度及折射率.

量子力学用旋转强度 (Rotational Power) 描述光学活性. 分子的旋光性及圆二色性都与旋转强度有关^[6]. 旋转强度 (R_{oa}) 定义为电子的电跃迁矩 (μ_{oa}) 和磁跃迁矩 (m_{ao}) 点积的虚部. R_{oa} 在光学活性理论中是一个重要参数, 一方面它将分子与光谱现象联系在一起, 另一方面它又使立体结构信息转换为光学活性跃迁来表征, 即 R_{oa} 又将分子的电跃迁矩和磁跃迁矩与分子的构象和环境联系起来. 要出现光学活性, 必需 $\sum R_{oa} \neq 0$ 即要求电子跃迁时, 既要沿轴对称, 又要绕轴旋转^[7].

旋光色散和圆二色是同时产生的, 表现电子运动不同的两个方面, 并且可以由 Kronig-Kramers 转换方程相互转换^[8].

CD计算 ORD公式如式 (4):

$$[\varphi_{\lambda}] = \frac{2}{\pi} \int \theta(\lambda) \frac{\lambda_i}{\lambda - \lambda_i} d\lambda_i \quad (4)$$

从 ORD 计算 CD公式如式 (5):

$$[\theta_{\lambda}] = \frac{2}{\pi} \int \varphi(\lambda) \frac{\lambda_i}{\lambda - \lambda_i} d\lambda_i \quad (5)$$

CD光谱较 ORD 光谱具有更容易辨别重叠峰, 弱带更容易检测, 康顿效应的正负更容易识别和具有较 ORD 图谱峰更多的结构信息等特点.

在决定化合物的立体结构时, 不论是由 ORD 还是 CD 谱都应得出相应的立体化学结构. 但一般 CD 谱 (不含激子手性法测定的 CD 谱) 的谱线尖锐、简单明了, 比 S 形的 ORD 曲线容易分析, 如图 7 所示.

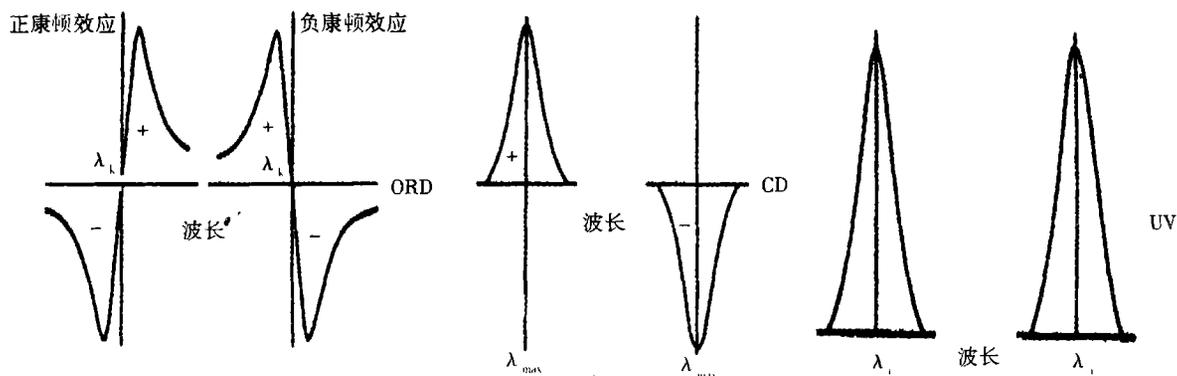


图 7 康顿效应在 ORD, CD 和 UV 上的差异

Fig 7 Difference of cotton effect in ORD, CD and UV

5 圆二色光谱康顿效应对手性对映体的宏观标识

旋光仪和圆二色谱仪的原理不同, 旋光仪所测是平面偏振光的偏振平面的旋转角度; 圆二色光谱所测是左、右旋光的吸收差异性, 所以两者包含关于分子结构的信息也有所不同. 圆二色谱因简单和信息量较大而优于旋光谱, 但在技术现实上, 多数手性化合物的结构判定都以旋光上的左、右旋来确定. 但愈来愈多的研究工作表明该方法存在不少局限性:

(1) 必须知道光学纯体之一的比旋光度. 但大多数未知化合物通过拆分的方法难以得到光学纯体, 文献上已发表的比旋光度, 由于年代的限制也不一定很可靠.

(2) 被测化合物必须具有中等以上旋光能力, 否则误差较大. 而许多手性化合物对钠 D 线的旋光度绝对值很小, 或是趋于零.

(3) 比旋光度的测定受多种因素的影响, 如温度、样品浓度、少量高旋光性杂质和溶剂效应等. 有时会有严重的误差, 尤其当样品分子中含有 $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH_2$ 等功能团时, 分子间氢键的缔合、溶剂与溶质相互作用可能使样品的旋光度随浓度改变而严重偏离正比关系.

(4) 样品用量大. 用单色旋光仪测比旋光度, 样品量通常在几百毫克以上, 而许多复杂天然有机物, 往往经过很多的分离纯化工作, 才能得到几十毫克或几毫克.

康顿效应的正负与特定的发色团及其所处的环境相关, 即康顿效应包含有手性化合物结构方面的信息, 结合一定的理论可以对手性对映体的绝对构型进行判定. 而将手性检测器与液相色谱相连, 可以很好地解决被测物量较少的问题. 手性检测器有 ORD 和 CD 之分, 如果使用 ORD 作为检测器, 只能得到某一波长上该物质的左旋或右旋, 而无法知道在该波长上康顿效应的正负, 对于结构上的信息也不是很明确^[9].

从技术上讲, ORD 检测器的灵敏度较 CD 检测器的灵敏度要低, 对于很多手性化合物, ORD 没有响应, 所以将圆二色检测器与液相色谱联用, 通过康顿效应的正负来宏观标识手性对映体更具现实意义^[10-11].

随着圆二色光谱技术的进步, 圆二色检测器相继在手性研究领域和手性药物生产领域开始应用, 给手性对映体宏观标识提供了一个新的方法. 圆二色值的正负改变称为康顿效应, 以某一波长上的康顿效应的正负可以对手性对映体进行宏观标识. 在这方面, 我们将特定波长上的康顿效应对手性对映体宏观标识的结果列于表 1.

表 1 几种化合物对映体流出峰的康顿效应宏观标识

Table 1 Characterization of cotton effect to chiral compounds

化合物	第一流出峰	第二流出峰	手性分离柱	化合物	第一流出峰	第二流出峰	手性分离柱
敌草胺	CE(-) ₂₂₀	CE(+) ₂₂₀	OJH	布洛芬	CE(-) ₂₅₄	CE(+) ₂₅₄	OJH
2,4-滴丙酸甲酯	CE(+) ₂₃₆	CE(-) ₂₃₆	OJH	水胺硫磷	CE(+) ₂₅₄	CE(-) ₂₅₄	OD-H
甲霜灵	CE(-) ₂₃₆ (S)	CE(+) ₂₃₆ (R)	OJH	甲胺磷	CE(+) ₂₅₄	CE(-) ₂₅₄	OD-H
2-甲-4-氯苯氧丙酸甲酯	CE(+) ₂₃₆	CE(-) ₂₃₆	OJH	咪唑啉酮类除草剂	CE(+) ₂₅₄	CE(-) ₂₅₄	OJH

注: CE (康顿效应); 下标数字为测定波长.

参 考 文 献

- [1] Liu P, Gan J J, Schlenk D et al., Enantioselectivity in Environmental Safety of Current Chiral Insecticides. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 2005, **102** (3): 701-706
- [2] Bobbit D R, Linder S W, Recent Advance in Chiral Detector for High Performance Liquid Chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, **20** (3): 111-123
- [3] 尤田 稔, 手性化合物的现代研究方法. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993
- [4] Harada N, Nakanishi K, The Exciton Chirality Method and Its Application to Configurational and Conformational Studies of Natural Products. *Accounts of Chemical Research*, 1972, **5**: 257-263
- [5] 吴立军, 旋光谱和圆二色光谱在有机化学中的应用. 沈阳药学院学报, 1989, **6** (4): 293-296
- [6] Lindell IV, Sihvola A H, Tret'yakov S A et al., Electromagnetic Waves in Chiral and Biotropic Media. Artech House, Boston London 1994
- [7] Hicks J M, Chirality. Physical Chemistry. Oxford University Press, 2002
- [8] 肖枚英, 丁小平, DNA 的 CD 谱和 ORD 谱的变换. 首都师范大学学报 (自然科学版), 1997, **18**: S52-S55
- [9] Purdie N, Swallows K A, Analytical Application Polarimetry Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism. *Analytical Chemistry*, 1989, **61** (2): 77A
- [10] Jenkins A, Hedgepeth W A, Analysis of Chiral Pharmaceuticals Using HPLC with CD Detection. *Chirality*, 2005, **17**: S24-S29
- [11] Rousselet C, Rio A D, Pierron-Sanders J et al., Chiral Liquid Chromatography Contribution to the Determination of the Absolute Configuration of Enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1037**: 311-328

CHIRAL DETECTORS AND CHARACTERIZATION WITH CIRCULAR DICHROISM OF CHIRAL PESTICIDES

CHEN Shengwen¹ LIU Weiping^{1, 2} ZHANG Datong²

(1 Institute of Environmental Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

2 Research Center of Environmental Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310032, China)

ABSTRACT

This paper introduced the principles of optical rotatory dispersion (ORD) and circular dichroism (CD) chiral detectors and also discussed the relationship between ORD, CD and ultraviolet detector (UV). Comparing ORD with CD, it was clearly indicated that the characterization of enantiomers with CD was better than that with ORD. Cotton effect was suggested to describe the absolute configuration of enantiomer.

Keywords optical rotatory dispersion, circular dichroism, cotton effect, chiral pesticide