

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以對掌性離子溶液共價鍵結於毛細管內壁之毛細管電動層
析法應用於 D-, L-含硫胺基酸分子的分離
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2113-M-041-001-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：嘉南藥理科技大學醫藥化學系

計畫主持人：葉錦芬
共同主持人：林維炤
計畫參與人員：此計畫無參與人員：無、無、無

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年10月31日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

以對掌性離子溶液共價鍵結於毛細管內壁之毛細管電動層析法應用
於 D-, L-含硫胺基酸分子的分離

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC NSC 95-2113-M-041-001

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：葉錦芬

共同主持人：林維炤、何文岳

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學 醫藥化學系

中 華 民 國 96 年 10 月 31 日

一、前言

室溫-離子溶液(Room-temperature ionic liquids, RTILs)為一種熔點接近或略低於室溫的鹽類，其係由一含有有機官能基的陽離子與各種陰離子所組合而成的離子性介質，它們在室溫下以液體的形式存在[1, 2]。RTILs 具有非揮發性、非燃性以及高的熱穩定性等性質，使得它們取代了傳統的有機溶劑而成為綠色化學(green chemistry)的理想溶劑。RTILs 的物性(如吸濕性、黏度、疏水性、表面張力、熔點與熱穩定性)可以由有機官能基環上的烷基碳數與陰離子的本性所主導。這種化學製備上的多樣性，亦使得 RTILs 成為化學溶劑的新寵，亦被稱為“Designer solvents”。目前它們已被廣泛地應用在有機合成、工業催化、電化學、液相萃取及作為氣相層析的固定相等。室溫離子液體的主要特性之一係可依實驗需求被設計、合成，因此目前有愈來愈多新離子液體被合成開發。如 Rogers 等人則發表在 RTIL 上陽離子上的有機官能基衍生成具有與金屬錯合配位劑，此種稱為 task-specific ILs [3]。

二、研究目的與文獻探討

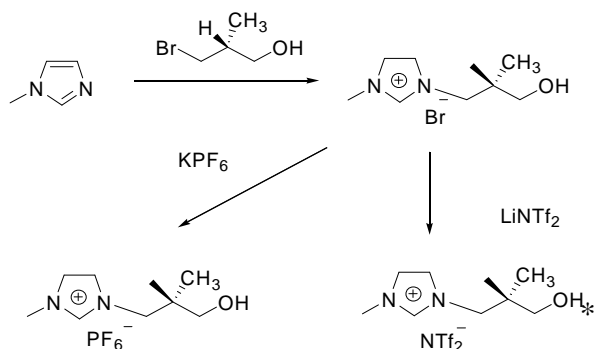
對於製藥學與醫藥科學而言，對掌性異構物的分離是相當受到重視的。此乃由於對掌性異構物雖然具有相似的結構，但在生理學上卻有大相逕庭的表現，有時會對人體造成重大的傷害，藥物的分離便顯得格外重要[4]。由於毛細管電泳為另一種可取代傳統層析之分離技術，其發展與應用亦趨純熟，又基於 RTIL 的多樣性而將毛細管內壁塗覆修飾或鍵結上對掌性-RTIL 靜相，或作為緩衝液的添加劑以進行對掌性分析物的分離之相關文獻在今年亦有發表。如 Francois 等人合成兩種對掌性-RTIL，加入含有 β 環糊精的緩衝液內，探討對於分離 Carprofen 和 Suprofen 的影響[5]。

本研究的設計為毛細管內壁塗佈一層具有對掌性中心的 RTIL，探討以此 CE 系統分離對掌性化合物的可行性。研究中所採用的四種含硫氨基酸皆為直鏈型之對掌性分子，因此將選擇含硫胺基酸為本研究的目標物。由於它們皆為不具螢光基團之一級氨基酸，需先與 NDA 進行衍生，如文獻所報導[6]，一級氨基酸會在氰基(CN⁻)作為親核劑下與 NDA 形成熱穩定性和高量子產率的產物。

三、研究方法

1. 對掌性-RTIL 的合成

建立合成對掌性-室溫離子液體的流程。以 1-甲基咪唑為起始物，與 (R)-3-bromo-2-methyl-1-propanol 進行烷化反應，合成含有鹵素陰離子且具有光學活性之離子化合物後，再將此離子化合物與 KPF₆ 或 LiN(CF₃SO₂)₂ 不同之無機鹽類進行陰離子交換反應，藉此得到具有光學活性與不同極性之室溫型離子液體(圖一)。此離子液體除具有光學活性外，預期其陽離子結構之咪唑芳香環能與待分析之物質產生 π - π interaction、烷鏈之長短可控制分子間的凡得瓦力，而烷鏈上的 OH 官能基亦可形成 Hydrogen bonding。



圖一 對掌性-室溫離子液體的合成流程

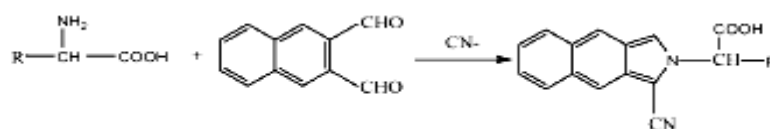
2. 對掌性-RTIL 塗覆於毛細管內壁的過程

- i. 本研究所使用的空毛細管柱為：Polymicro 公司所製，管柱規格為外徑 353 μm 、內徑 50 μm 、長度 47 cm 之融矽石英毛細管柱，填充管柱之 5 mL 注射針為：HAMILTON 公司製造。用於封管柱口之真空膏為 APIEZON 公司所製造，M 級。去除管柱溶劑所用之真空抽氣馬達為 PANCHUM 公司製造，型號 VP-60D。恆溫水槽為 WISDOM 公司製造，型號 BO-2D。用於活化管柱處理之注射式幫浦為 KD 公司所製造，型號 101。
- ii. 在管柱製備之前必須先活化管柱以利離子液體塗佈管壁的效果更佳。利用注射式幫浦依序將 0.1M NaOH 5 mL、二次水 10 mL、Acetone 5 mL 注入管柱內，流速約 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。利用 NaOH 將管柱侵蝕造成管壁腐蝕產生凹洞後，利用二次水將 NaOH 洗淨避免殘留造成管壁阻塞，最後再利用 Acetone 將水揮發，最後利用真空幫浦將管柱溶劑完全抽乾即完成活化管柱的部份。
- iii. 本實驗選用塗佈靜相方法為靜態塗佈法(static method)，先設定所須膜厚，利用公式(1)、(2)計算出欲配製靜相濃度，將已配好之靜相溶液填充入毛細管內後再用真空抽氣馬達將溶劑抽乾，使其在毛細管壁上形成薄膜。而本實驗所有管柱膜厚都固定為 0.33 μm ，利用公式(2)計算[公式(2)由公式(1)經單位換算而得，公式(1)中 d_f 為管柱的膜厚，單位 μm ； c 為靜相濃度以體積百分比表示； r 為管柱的內徑，單位 μm ；公式(2)中 C 為靜相濃度，單位 mg/mL ； ρ 為靜相密度，單位 g/mL]各靜相所須配製濃度皆以二氯甲烷(dichloromethane)為溶劑(TEDIA，ABSLOV 級)，

$$d_f = rc / 200 \dots\dots\dots(1)$$

$$C(\text{mg}/\text{mL}) = 2000\rho d_f / r \dots\dots\dots(2)$$

3. 循文獻[6, 7]進行含硫氨基酸的衍生步驟。其流程如下所示：



取

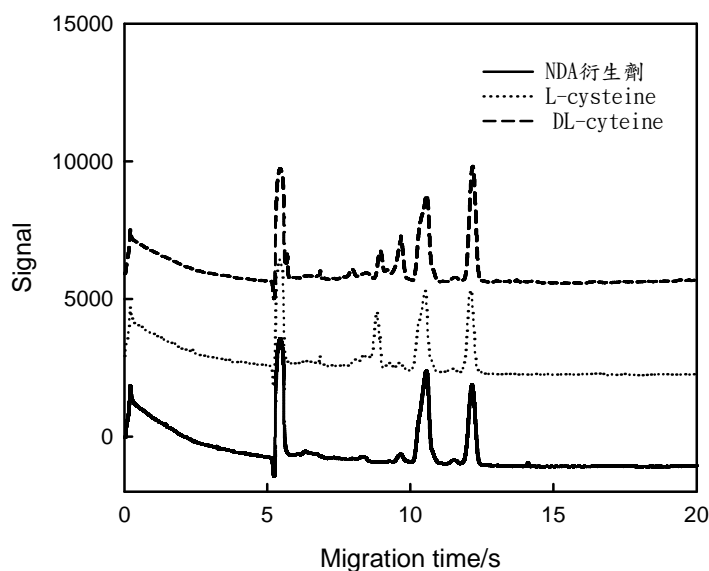
10 mM 含硫氨基酸(DL-cysteine, L-cysteine, DL-cystine, L-cystine 等)20 μL 於內含 40 mM borate 緩衝液(pH 9.5) 150 μL 、2 mM NDA 衍生試劑 50 μL 和 20 mM KCN 溶液 50 μL 之 0.5 mL 的聚乙烯離心管內。將此離心管置於試管攪拌器上攪拌並放在室溫下 30 分鐘。

4. 含硫胺基酸衍生物於 RTIL-coated 毛細管之分離行為的探討

選用附有 UV 偵測器之 P/ACE 5500 CE 系統(Beckmann, U.S.A.)，內徑 50 μm 之已塗覆毛細管 47 cm (有效長度為 40 cm)，UV 偵測器波長設定在 254 nm。樣品以施加壓力的方式注入 8 s，施加分離電位在 15 kV，毛細管溫度設定在 25°C。每次樣品注入前，依序以 0.1 M NaOH、水、緩衝液清洗毛細管 2 分鐘。

四、結果與討論

由於毛細管電泳結合發光二極體誘導螢光器(CE-LEDIF)的自行組裝系統仍未建立完善，因為訊號靈敏所以穩定的背景基線較難獲得。因此改以 CE-UV 商業化系統探討對掌性-RTIL 塗覆於毛細管內壁對含硫氨基酸分離的影響。



上圖為 NDA-d/l-cysteine 的電泳圖，使用的管柱為內徑 50 μm 之已塗覆毛細管 47 cm(有效長度為 40 cm)，以 40 mM borate 緩衝液(pH 9.5)作為分離電解質，施加分離電位在 15 kV，毛細管溫度設定在 25°C UV 偵測器波長設定在 254 nm，樣品以施加壓力的方式注入 8 s。由圖所示，在此分離條件下有助於對 d/l-半胱氨酸的分離，但仍需更進一步實驗以確保結果的重複性。另外，電解質緩衝液的種類、濃度等會影響對掌性-RTIL 塗覆於毛細管內壁的穩定性，造成多次實驗後對掌性-RTIL 塗覆量的減少。希望未來能建立一套將對掌性-RTIL 能共價鍵結於毛細管內壁的完整技術。

五、計畫成果與自評

首先感謝貴單位的經費補助，讓新進人員—我能在獲得博士學位後，回到教學單位仍可擁有繼續學術研究的環境。執行迄今，研究內容與原計畫相符程度約五成左右；對於達成預期目標情況，尚有一些困難需要突破解決。目前本計畫之成果在於已經建立一套毛細管塗佈的裝置，並合成 $[\text{C}_8\text{MIM}][\text{NTf}_2]$ 、 $[\text{C}_{10}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$ 、 $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$ 將之塗佈於長 10 m，內徑 250 μm 作為氣相層析之毛細管分離管柱，並測試不同碳數鏈長之烷類(C8~C20)和苯、甲苯、二甲苯、乙苯在 GC 管柱之分離能力。此測試如同 Armstrong 等人以烷基咪唑陽離子為主之離子液體應用在氣相層析上，當作管柱的靜相之相關文獻[8~10]所示，有著不錯的結果。但此靜態塗佈方式對於 CE 之毛細管的適用性需要更謹慎的評估。另外，私立科技大學的學生素質不足，帶領著他們進行專題研究，需要更多的耐心與時間的付出。因此，研究如何與教學並重亦考驗著在私立科技大學任教的我，當然與不同領域的學術研究工作者合作亦是條途徑吧！

六、參考文獻

1. Welton, T.; Chem. Rev. 1999, 99, 2071
2. Villagrán, C.; Deetlefs, M.; Pitner, W. R.; Hardacre, C.; Anal. Chem. 2004, 76, 2118
3. Visser, A. E.; Swatoski, R. P.; Reichert, Mayton, R.; Sheff, S.; Wierzbicki, A.; Davis, J. H.; Rogers, R. D.; Chem. Commun. 2001, 135
4. 謝茜如、魏國佐 Chemistry (The Chinese Chem. Soc. Taipei) 2001, 59, 409

5. Francois, Y.; Varenne, A.; Juillerat, E.; Villemin, D.; Pierre G.; J. Chromatogr. A 2007, 1155, 134
6. Roach, M. C.; Harmony, M. D.; Anal. Chem. 1987, 59, 411
7. Zhao, S.; Wang, H.; Pan, Y.; Zhao, Z.; J. Chromatogr. A 2007, 1145, 246
8. Anderson, J. L.; Armstrong, D. W.; Anal. Chem. 2003, 75, 4851
9. Ding, J.; Welton, T.; Armstrong, D. W.; Anal. Chem. 2004, 76, 6819
10. Anderson, J. L.; Armstrong, D. W.; Anal. Chem. 2005, 77, 6453