研 究 简 报

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01615

强极性中药组分的亲水作用色谱保留行为

韩 超 戴小军 雷根虎 卫引茂*
(西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室，化学与材料科学学院，西安 710069)

摘 要 采用亲水作用色谱模式，以二醇基硅胶为固定相，水-有机溶剂为流动相，通过改变流动相中有机溶剂种类及浓度、缓冲盐、有机酸种类及其浓度、柱温等条件，研究了强极性中药组分在亲水作用色谱中的保留行为。结果表明: 流动相中水的比例在 0 ~ 100% (*V/V*) 变化时，溶质保留呈“U”型曲线，属于亲水色谱和反相色谱的混合保留机理。水含量在 0 ~ 50% (*V/V*) 范围时，亲水作用控制溶质的保留。溶质保留随流动相中缓冲盐浓度的增大而增强。对于酸性溶质，其保留随有机酸三氟乙酸、甲酸、乙酸的酸性降低而增大。

关键词 亲水作用色谱; 二醇色谱柱; 强极性化合物; 保留行为

1 引 言

亲水作用色谱(HILIC) 的概念是 Alpert 于 1990 年提出的[1]。该技术是采用极性固定相，有机溶剂-水为流动相的一种分离技术，能有效保留反相色谱中保留不完全或不保留的强极性样品，目前已被广泛应用于蛋白质、肽、氨基酸、寡核苷酸、糖和天然产物提取物的分析和分离中[2,3]。其中，天然产物的分离与分析对于中药研究有重要意义。中药通常是以水煎给药，其水溶性成分中包含着大量的强极性组分。这些强极性组分可能是中药活性组分的重要组成部分，或者对中药发挥药效起着重要作用[4]。对于中药中复杂组分，以反相色谱和 HILIC 组成的二维色谱有可能对中药各组分进行有效分离[4,5]。

HILIC 的分离材料主要有硅胶、氨基键合硅胶、二醇基键合硅胶、离子交换、两性离子和强极性聚合物固定相等[6,7]。二醇硅胶表面键合有邻二醇，呈电中性和亲水性，已广泛应用于糖、氨基酸、胆碱、药物活性组分的分析分离[8,9]。在溶质机理研究方面，依然存在分配和吸附机理的争论[7]，所以，有必要对溶质，特别是天然产物的亲水色谱保留行为进行深入研究。本研究以随机选用的 6 种强极性中药活性成分(绿原酸、丹参素、葛根素、苦杏仁苷、香草酸、阿魏酸) 为溶质，二醇基硅胶为固定相，研究强极性中药组分的 HILIC 保留行为及其影响因素。本研究对中药有效成分的分离条件选择具有一定的指导意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-2010C 高效液相色谱仪、CLASS-VP 色谱工作站(日本岛津公司)。硅胶(粒径 5 μm，孔径 7 nm，中科院兰州化学物理研究所); γ-缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH560，应城市德邦化工新材料有限公司); 阿魏酸、香草酸、葛根素、苦杏仁苷、丹参素和绿原酸(中国药品生物制品检定所，结构见图 1); 乙腈、四氢呋喃(色谱纯，美国 Fisher 公司); 其它试剂均为分析纯。

2.2 固定相的制备

采用文献[10]的方法合成二醇固定相。在 1.5 g 酸化干燥硅胶中加入 40 mL 甲苯，再加入 4 mL KH560，110 ℃回流 14 h。反应完成后，滤出硅胶，依次用甲苯、丙酮和水各洗涤 4 次。然后将其加入到 60 mL 水中，调至 pH 2.8，回流反应 2 h。用水反复洗涤固体，得二醇固定相。

2010-02-05 收稿; 2010-04-15 接受
本文系国家自然科学基金(Nos. 20975080，20875075) 和教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-08-0892) 资助
* E-mail: ymwei@nwu.edu.cn

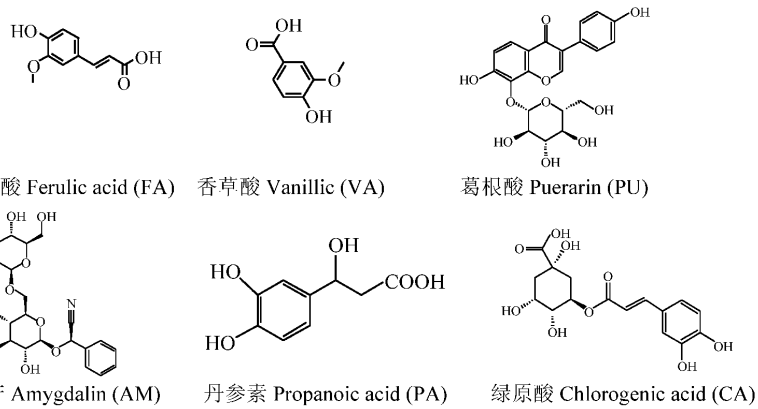

图1 6种样品的结构图

Fig. 1 Structure of six solutes

2.3 色谱条件

将二醇固定相用匀浆法装填在不锈钢色谱柱管(100 mm×4.6 mm I. D.)中。将流动相(有机溶剂和水溶液)按比例混合。流动相pH值及缓冲盐浓度是指流动相混合前水相的pH值及盐浓度。检测波长为254 nm; 流速为1.0 mL/min; 进样体积20 μL。溶质保留因子 $k=(t_R-t_0)/t_0$,其中,t_R 为保留时间,t_0 为死时间。t_0 用甲苯在乙腈-水(95∶5, *V*/*V*)条件下测量。

3 结果与讨论

3.1 流动相中有机溶剂浓度对溶质保留行为的影响

本研究以甲醇、乙醇、乙腈、四氢呋喃(THF)/水体系为流动相,考察溶质在不同流动相中的保留行为。图2给出了乙腈/水体系中溶质的保留行为与流动相中水的含量的关系。显然,当流动相中水的含量由0增大到50% (*V*/*V*)时,6种溶质的保留均减小,体现出HILIC保留的典型特征,水为强洗脱剂。但是,当水的比例继续增大,溶质保留反而呈现增大的趋势,水变为弱洗脱剂,溶质保留转变为反相色谱保留机理。溶质在其它3种流动相体系的保留曲线与图2类似。水含量在0~100%时,溶质在4种流动相中的保留均呈现"U"型曲线,说明溶质保留机理是混合机理,即HILIC和反相色谱的双重保留机理。另一方面,对于这4种流动相体系,当水含量为0~50%时,溶质保留随水浓度变化程度远大于水含量为50%~100%的变化程度,说明强极性化合物与固定相之间的作用以亲水相互作用为主,因此,在选取分离条件时,水含量为0~50%较适宜。按照亲水色谱的分配机理[9],固定相表面吸附流动相中的水,形成一个动态的"富水层",亲水色谱的保留主要是依靠溶质在流动相与此"富水层"中的分配来实现,这与反相色谱的分配机理类似。在反相色谱中,常用经验式(1)来描述溶质的保留行为[11]:

$$\ln k = \ln k_w - S\varphi_B \qquad (1)$$

式中,φ_B 为流动相中强洗脱剂的体积分数,k_w 是纯弱洗脱剂为流动相时对应的容量因子,S 表示斜率。

选取图2中亲水色谱部分保留数据,以 $\ln k$ 对 φ_B 作图发现,所有溶质的 $\ln k$ 与 φ_B 均呈线性关系(相关系数 $r=0.9838\sim0.9973$)。溶质在其它3种流动相体系中的保留也可以用公式(1)描述。说明在溶质HILIC中,强极性天然产物的保留也可采用反相色谱中分配机理的公式进行处理。实验发现,相同浓度的有机溶剂条件下,溶质在甲醇-

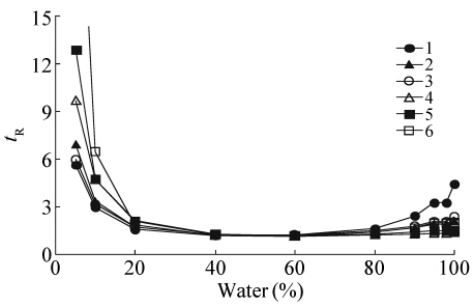

图2 流动相组成对溶质保留的影响

Fig. 2 Influence of mobile phase on retention time of six solutes

1. 阿魏酸(FA); 2. 葛根素(PU); 3. 香草酸(VA); 4. 苦杏仁苷(AM); 5. 丹参素(PA); 6. 绿原酸(CA); 流动相(Mobile phase), CH_3CN-15 mmol/L CH_3COONH_4, pH 5.0。

水、乙醇-水流动相中的保留均弱于其在 THF-水、乙腈-水中的保留行为(表 1)。这种现象与有机溶剂分子结构有关。甲醇、乙醇分子中的羟基既是质子给予体，也是质子接受体，可与固定相上邻二醇配体产生强的氢键作用。另一方面，所采用溶质与固定相之间存在氢键。也就是说，溶质与溶剂在固定相表面存在竞争性作用。所以，溶质保留必然减弱[12]。而 THF 与乙腈仅为弱的质子接受体，与固定相之间的氢键作用弱。溶质与溶剂在固定相上的竞争作用较弱，导致溶质保留增强。

表 1　不同有机溶剂对溶质保留的影响

Table 1　Influence of different organic solvent on retention of solutes

容量因子 k	绿原酸 CA	丹参素 PA	苦杏仁苷 AM	葛根素 PU	香草酸 VA	阿魏酸 FA
甲醇 Methanol	0.08	0.1	0.05	0.1	0.03	0.03
乙醇 Ethanol	0.09	0.1	0.06	0.12	0.04	0.03
四氢呋喃 THF	0.94	0.41	3.11	1.53	0.18	0.16
乙腈 Acetonitrile	0.83	0.47	3.22	1.78	0.22	0.19

*　流动相(Mobile phase)，有机溶剂-水-三氟醋酸(Organic solvent-water-trifluoracetic acid，90:10:0.1，V/V)；THF：tetrahyclrofuran。

3.2　盐种类及其浓度对溶质保留的影响

以乙腈-水为流动相，研究流动相中添加的盐种类及其浓度对溶质保留的影响。由于许多盐在高浓度的乙腈中溶解度较低，所以，本研究选择 4 种在较高浓度的乙腈中仍能溶解的盐(乙酸铵、甲酸铵、乙酸钠、甲酸钠)进行研究。实验发现，在含这 4 种盐的流动相中(浓度为0 ~ 50 mmol/L)，所有溶质的保留均随盐浓度的增大而增强。这是由于盐电离所产生的离子与流动相中的水分子产生静电或氢键作用，从而削弱了强洗脱剂水对溶质的洗脱能力，盐浓度越大，水洗脱能力减小程度也越大。因此，溶质保留随盐浓度增大而增强。

实验发现，不同盐对这 6 种溶质保留的影响不同，但无规律可循(图 3)，很难用 Hofmeister 效应[13]对溶质保留进行解释。

3.3　有机酸对溶质保留的影响

当乙腈-水流动相中加入 0.1% 甲酸、乙酸和三氟乙酸，溶质保留值的变化程度不同(图 4)。葛根素、苦杏仁苷为中性化合物，流动相中有机酸对其保留影响不大。阿魏酸、香草酸由于保留弱，对酸效应不敏感，其保留变化也不明显。绿原酸和丹参素保留较强且为酸性化合物，在实验条件下发生一定程度的解离，流动相中添加有机酸可抑制溶质的解离。由于未解离化合物的亲水性弱于解离生成的酸根离子，因此外加有机酸会使溶质亲水性减弱，导致保留减小。此外，在相同有机酸浓度下，绿原酸和丹参素的保留按照三氟乙酸、甲酸、乙酸的酸性强弱顺序依次增大，这也是由于强酸对溶质解离抑制能力比较强的缘故。

当有机酸添加量在 0 ~ 0.2% 时，溶质保留随酸浓度增加而减小的程度比较明显。但继续增加有机酸的量，溶质保留趋于保持恒定。由此可见，流动相中有机酸对溶质保留有重要影响，但影响程度因溶质分子结构而异，所以在天然产物分离中，可通过在流动相中添加有机酸来改变酸性组分的分离选择性，但添加浓度控制在 0 ~ 0.2% 即可。

3.4　柱温对溶质保留的影响

为从热力学角度研究溶质在固定相上的保留行为，在 10 ~ 50 ℃ 范围内研究了柱温对溶质保留的影响。随着温度的升高，各溶质的保留值均减小。

在色谱保留过程中，溶质保留因子与温度之间的关系可用 Van´t Hoff 方程表示：

$$\ln k = -(\Delta H^{\theta}/RT) + (\Delta S^{\theta}/R) + \ln\varphi \quad (2)$$

$$\Delta G^{\theta} = \Delta H^{\theta} - T\Delta S^{\theta} \quad (3)$$

其中，k 为保留因子，R 为气体常数，φ 为柱相比，其值等于 1。T 为柱温，ΔH^{θ} 和 ΔS^{θ} 分别表示该溶质在固定相与流动相间分配的摩尔焓变和熵变。

以 $\ln k$ 对 $1/T$ 进行线性回归，6 种溶质的相关系数均大于 0.9920。由直线的斜率和截距可以分别得出热力学参数 ΔH^{θ} 和 ΔS^{θ}。ΔH^{θ} 值均为负值(表 2)，显示了溶质由流动相到固定相的迁移过程是放

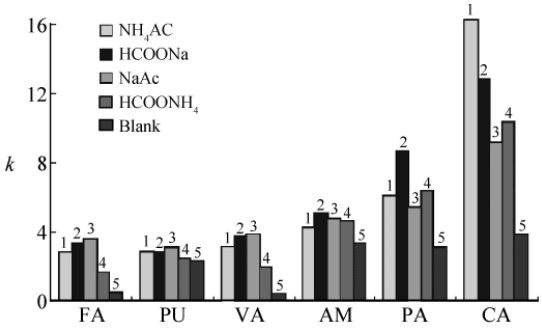

图3 盐种类对溶质保留的影响

Fig. 3 Influence of buffer types on retention of solutes

流动相(Mobile phase),90% **乙腈**(Acetonitrile)/10% H_2O。1,2,3,4 **分别表示流动相水中含有** 25 mmol/L **的** NH_4AC, HCOONa, NaAc, $HCOONH_4$ **时溶质的保留**(1, 2, 3 and 4 denote the retentions of solute in mobile phase containing 25 mmol/L NH_4AC, HCOONa, NaAc and $HCOONH_4$ respectively); 5 **表示流动相中不加盐时溶质的保留**(5 denotes retentions of solutes in pure water)。

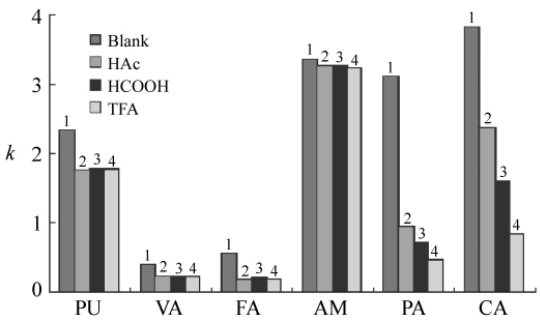

图4 外加酸对保留的影响

Fig. 4 Influence of acidic additive on retention of solutes

1. **表示未加酸时溶质的保留**(Retention of solutes in pure water); 2,3,4 **分别表示流动相中加入** 0.1% CH_3COOH, HCOOH, trifluoracetic acid **时溶质的保留**(Retention of solutes in 0.1% CH_3COOH, HCOOH and trifluoracetic acid, respectively); **流动相**(Mobile phase),90% **乙腈**(Acetonitrile)/10% H_2O。

热过程,有利于溶质保留。除绿原酸外,其余5种溶质的 ΔS^θ 均为负值,说明溶质由流动相到固定相的迁移熵不利于溶质保留。但是,由于熵的损失可以通过焓变予以补偿,因而溶质在迁移过程总的自由能变为负值,保留时间随温度升高而减小。

表2 溶质保留过程的热力学参数

Table 2 Thermodynamics parameters of solutes in transformation process form mobile phase to stationary phase

	绿原酸 CA	丹参素 PA	苦杏仁苷 AM	葛根素 PU	香草酸 VA	阿魏酸 FA
摩尔焓变 ΔH^θ(kJ/mol)	-2.47	-8.42	-11.52	-7.25	-13.10	-12.85
摩尔熵变 ΔS^θ(J/(mol·K))	10.30	-14.85	-28.84	-19.08	-41.67	-42.26

本研究采用 HILIC **模式,以二醇硅胶为固定相,水-有机溶剂为流动相,通过改变流动相中有机溶剂种类及浓度、盐和有机酸种类及其浓度、柱温等条件,研究了强极性中药组分在** HILIC **中的保留行为。使用二醇固定相、水-乙腈流动相,以** HILIC **模式分离强极性中药组分时,为使溶质保留遵循** HILIC **模式,应控制流动相中水的比例在** 0~50% **范围为宜。流动相中添加的盐和有机酸可改变溶质的分离选择性,但其变化程度因溶质和盐、酸种类而异。一般情况下,溶质保留随流动相中盐浓度增大而增强,酸性溶质随流动相中酸性降低而增大,添加酸的比例一般为流动相体积的** 0~0.2%(*V/V*) **即可。**

References

1 Alpert A J. *J. Chromatography*, **1990**, 499: 177~196

2 Oyler A R, Armstrong B L, Cha J Y, Zhou M X, Yang Q, Robinson R I, Dunphy R, Burinshy D. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 724(1-2): 378~383

3 Troyer J K, Stephenson K K, Fahey J W. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 919(2): 299~304

4 GUO Zhi-Mou(**郭志谋**), ZHANG Xiu-Li(**张秀丽**), XU Qing(**徐 青**), LIANG Xin-Miao(**梁鑫淼**). *Chinese Journal of Chromatography*(**色谱**), **2009**, 27(5): 675~681

5 Wang X D, Li W Y, Rasmussen H T. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083(1-2): 58~62

6 Ikegami T, Tomomatsu K, Takubo H, Takubo H, Horie K, Tanaka N. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184(1-2): 474~503

7 Hemstrom P, Irgum K. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29(12): 1784~1821

8 Brons C, Olieman C. *J. Chromatogr.*, **1983**, 259(1): 79~86

9 Tanaka H, Zhou X J, Masayoshi O. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987(1-2): 119~125

10 Jurado L A, Mosley J, Jarrett H W. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 971(1-2): 95 ~ 104
11 Jin G W, Guo Z M, Zhang F F, Xue X Y, Jin Y, Liang X M. *Talanta*, **2008**, 76(3): 522 ~ 527
12 Xindu Geng, Liujiao Bian. *Science in China* (*Series B*), **1992**, 35(3): 263 ~ 269
13 Yang Z. *Journal of Biotechnology*, **2009**, 144(1): 12 ~ 22

Retention Behaviors of Strongly Polar Compounds from Traditional Chinese Medicine in Hydrophilic Interaction Chromatography

HAN Chao, DAI Xiao-Jun, LEI Gen-Hu, WEI Yin-Mao*
(*Key Laboratory of Synthetic and Natural Function Molecule Chemistry of Ministry of Education*, *College of Chemistry & Material Science*, *Northwest University*, *Xi'an* 710069)

Abstract The retention behaviors of six polar compounds from traditional Chinese medicine were investigated with hydrophilic interaction chromatography (HILIC) by changing kinds of organic solvent and concentration, additives (salt and organic acid) in mobile phase and column temperature. The retention curves of six solutes exhibit "U" shape with the change in the concentration of water from 0 to 100% (*V*/*V*) in mobile phase, indicating a mixed-mode of hydrophilic interaction and reversed phase chromatography. The retention times of all solutes increased with the increase of salt concentration, and the retention of the acidic solutes increased with the decrease of the acidity of organic acid, trifluoroacetic acid, formic acid and acetic acid in the same concentration of the additives in the mobile phase. These results might have some instruction role to select the condition in the separation of traditional Chinese medicine.

Keywords Hydrophilic interaction chromatography; Diol column; Strongly polar compounds; Retention behavior

(Received 5 February 2010; accepted 15 April 2010)

《光谱学与光谱分析》2011 年征订启示

国内统一刊号: CN11 - 2200/O4　　**国际标准刊号: ISSN 1000 - 0593**
国际 CODEN 码: GYGFED　　**国内邮发代码: 82 - 68**
国外发行代码: M905　　**广告经营许可证: 京海工商广字第 8094 号**

《光谱学与光谱分析》1981 年创刊，北京大学出版社出版，由钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学联合承办，中国科协主管。

主要刊登: 激光光谱测量、红外光谱、拉曼光谱、紫外、可见光谱、吸收光谱、X-射线荧光光谱、光谱化学分析、光谱仪器、国内外光谱化学分析领域内的最新研究成果、学科发展前沿和最新进展。设有高科技创造性研究论文、研究简报、综合评述、仪器装置、新仪器、问题讨论、新书评介、学术活动简讯等栏目。《光谱学与光谱分析》适用于冶金、地质、机械、环境保护、国防、医药卫生、农林、化学化工、进出口商检等领域的科研单位、厂矿、高等院校、光谱仪器设计、制造厂家从事光谱学与光谱分析的研究人员、实验人员、研究生、高等院校有关专业的师生、科技管理干部。《光谱学与光谱分析》是我国自然科学核心期刊、中国科协精品科技学术期刊。《光谱学与光谱分析》，已被国内外"中国科技论文统计与分析"、"中国学术期刊文摘"、"中国科学引文数据库"、"中国物理文摘"及 SCI, Ei, CA, AA, MEDLINE, AJ 等文献权威数据库收录。

《光谱学与光谱分析》2011 年每期定价 40 元，全年 480 元。月刊，大 16 开，每期 292 页，每月 1 日出版。

《光谱学与光谱分析》期刊社地址: 北京市海淀区学院南路 76 号，邮编 100081 电话 010 62181070，

网址 http://www.gpxygpfx.com　　办公电子信箱: chngpxygpfx@vip.sina.com