

咪唑离子液体键合硅胶固定相纯水洗脱分离 碱基、酚类和药物化合物

王旭生, 邱洪灯, 刘 霞, 蒋生祥*

(中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃省天然药物重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 采用 *N*-甲基咪唑和氯丙基咪唑反应的方法制备得到了离子液体键合硅胶固定相, 并利用该固定相中的咪唑环阳离子和被分析物之间存在的多重作用机理如疏水作用、静电吸引和排斥及氢键作用等, 以纯水作为流动相, 成功地分离了碱基(胞嘧啶、胸腺嘧啶、2-氨基嘧啶和 6-氯鸟嘌呤)、酚类化合物(间氨基酚、间苯二酚和间硝基酚)以及 3 种药物化合物(盐酸吗啉胍、阿昔洛韦和头孢氨苄)。采用没有添加任何有机溶剂和缓冲液的纯水作流动相, 既绿色环保, 又节约经济, 简单方便。对该固定相分离这些化合物的保留机理做了探讨。

关键词: 离子液体; 改性硅胶; 固定相; 纯水流动相; 液相色谱; 碱基化合物; 酚类化合物; 药物

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)03-0269-04

Separation of bases, phenols and pharmaceuticals on ionic liquid-modified silica stationary phase with pure water as mobile phase

WANG Xusheng, QIU Hongdeng, LIU Xia, JIANG Shengxiang*

(Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: *N*-methylimidazolium ionic liquid (IL)-modified silica was prepared with the reaction of 3-chloropropyl modified silica and *N*-methylimidazole using toluene as solvent. Based on the multiple interactions between *N*-methylimidazolium IL-modified silica and analytes such as hydrophobic interaction, electrostatic attraction, repulsion interaction, hydrogen-bonding, etc., the bases (cytosine, thymine, 2-aminopyrimidine and 6-chloroguanine), phenols (*m*-aminophenol, resorcinol and *m*-nitrophenol) and three pharmaceuticals (moroxydine hydrochloride, acyclovir and cephalexin hydrate) were separated successfully with only pure water as the mobile phase. These chromatographic separations are environmental friendly, economical and convenient, without any organic solvent or buffer additive. The retention mechanism of these samples on the stationary phase was also investigated.

Key words: ionic liquid (IL); modified silica; stationary phase; pure water as mobile phase; liquid chromatography; bases; phenols; pharmaceuticals

碱基是核苷酸的重要组成部分, 是生命科学领域研究最广泛、最活跃的研究课题。碱基在不同色谱固定相上的保留行为已有不少报道^[1,2]。姚礼峰等^[3]研究了碱基在十二胺-*N,N*-二亚甲基膦酸(DDPA)改性氧化锆固定相(DPZ)上的色谱保留行为, 他们提出由于多种保留机理的存在, 使得碱基在 DPZ 固定相上具有较好的分离选择性。碱基分子中

一般都存在几种极性基团, 除了有碱性的氨基以外, 还存在弱酸性的酰胺基团。酚类化合物是工业废水里面的主要污染物质, 具有致癌的潜在特性。盐酸吗啉胍片和阿昔洛韦片是临床上最常用的抗病毒药物, 头孢氨苄片为抗生素类药, 此 3 种药物化合物的结构示意图见图 1。无论是碱基、酚类还是药物化合物的分离, 在已报道的高效液相色谱法(HPLC)

* 通讯联系人: 蒋生祥, 研究员, 博士生导师. Tel: (0931) 4968266, E-mail: sxjiang@lzb.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(项目编号: 20905073, 20975105)。

收稿日期: 2010-12-02

中多采用碳十八固定相,以缓冲溶液和添加有机溶剂为流动相的分离方法^[4,5]。有机溶剂对人体的健康有很大的危害,因此如何避免使用有机溶剂仍然是 HPLC 研究中的一个重要课题。

另一方面,室温离子液体作为一种新近出现的新溶剂或新材料^[6-9],具有良好的热稳定性、低可燃性、不易挥发及低毒性等优点,已经在有机合成、催化、电化学以及分离科学中得到了广泛的研究,并已在某些领域实现了工业化。离子液体在液相色谱固定相方面的应用研究相对起步较晚^[10,11]。离子液体固定相中有一个较大的芳香基结构的离子液体,结构的复杂性导致了该色谱固定相在分离中与被分析物之间存在多重作用机理,如强阴离子交换作用,同时也具有弱疏水作用和静电作用等^[12-14]。本文采用合成的咪唑基离子液体键合硅胶液相色谱固定相,只以纯水作流动相,成功地实现了对一些碱基、酚类和药物化合物的分离,并进行了保留机制的探讨和解释。相比采用有机溶剂及缓冲溶液作流动相,以纯水作流动相既清洁环保又经济节约,值得探索 and 开发。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

硅胶(粒径 5 μm ,比表面积为 440 m^2/g ,孔径为 7 nm,实验室自制), γ -氯丙基三甲氧基硅烷(纯度为 98%)购自荆州江汉精细化工厂,甲苯(分析纯,使用时需重蒸),三乙胺、甲基咪唑(分析纯)。胞嘧啶、胸腺嘧啶、2-氨基嘧啶、6-氯鸟嘌呤、间氨基酚、间苯二酚和间硝基酚均为市售分析纯。盐酸吗啉呱(moroxydine hydrochloride)购自山西津华药业有限公司。阿昔洛韦(aciclovir)购自湖北科益药业股份有限公司。头孢氨苄(cephalexin hydrate)购自东北药业集团沈阳市延风制药厂。色谱分离样品均直接采用纯水溶解。盐酸吗啉呱、阿昔洛韦和头孢氨苄药品水溶液分别进行离心后,取上清液放置于冰箱中待用。

所使用的高效液相色谱仪由 Agilent 1100 系列(Agilent,美国)组成,包括二元泵、紫外检测器、20 μL 的定量环和 Rheodyne 7725 进样器。液相色谱柱装填机为 6252B-100 型(北京市北分仪器技术公司)。所得的键合硅胶采用 Vario El 元素分析仪(德国 Elementar 公司)进行元素分析表征。

1.2 色谱柱的制备

根据文献^[10]方法合成甲基咪唑键合硅胶。

第一步,称取 5.0 g 活化硅胶于反应器中,加入 60 mL 干燥甲苯作反应溶剂,机械搅拌,加入 5.0 mL 的 3-氯丙基三甲氧基硅烷,然后再加入 0.5 mL 三乙胺作催化剂,回流 48 h 后冷却,产物经抽滤洗涤后真空干燥,制得氯丙基硅胶;第二步,将 5.0 g 氯丙基硅胶与 5.0 mL 的 *N*-甲基咪唑在 60 mL 甲苯中搅拌回流反应 48 h,产物分别用甲苯、甲醇、水和甲醇洗涤后真空干燥,制得甲基咪唑离子液体键合硅胶(结构示意图如图 1)。将所制备的离子液体键合硅胶固定相以匀浆法装入色谱柱管(200 mm $\times$ 4.6 mm)中,以四氯化碳为匀浆液,以正己烷为顶替液。

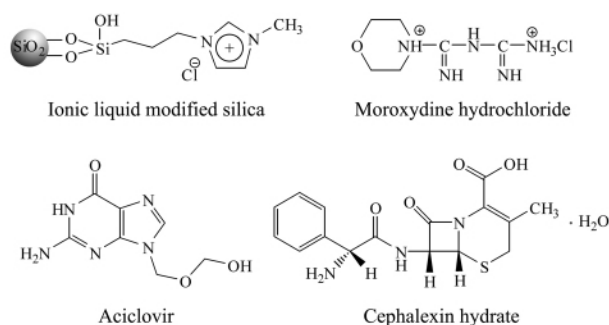


图 1 离子液体键合硅胶固定相及 3 种药物化合物的结构示意图

Fig. 1 Schematic structures of ionic liquid-modified silica stationary phase and three pharmaceuticals

1.3 色谱条件

色谱柱为自制的离子液体键合固定相色谱柱;流动相为纯水,流速为 1 mL/min;检测波长为 254 nm;死时间为溶剂峰出峰时间。

2 结果与讨论

2.1 色谱固定相的表征

甲基咪唑离子液体键合硅胶由氯丙基硅胶和甲基咪唑反应制得,该反应与卤化离子液体的制备过程^[14]一样。经元素分析得到氯丙基硅胶中 C 和 H 元素分别为 5.85% 和 0.85%,根据碳含量计算所得氯丙基硅胶的键合量为 3.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。与甲基咪唑反应后,硅胶表面修饰后 C、H 和 N 元素的含量分别为 8.70%、1.49% 和 3.15%,均有大幅度的提高,充分说明甲基咪唑被成功地键合到硅胶表面;根据氮含量计算所得甲基咪唑键合硅胶的覆盖量约为 2.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。

2.2 对碱基的分离

用纯水作洗脱液,胞嘧啶、胸腺嘧啶、2-氨基嘧啶和 6-氯鸟嘌呤等 4 种碱基在色谱柱上能实现基线

分离(见图 2),得到的色谱参数如表 1 所示。从分离结果可以看出,固定相和样品之间不仅存在弱疏水作用,还存在着一定的静电排斥作用,保留时间都比较短;再者,文献 [3] 的结果表明,固定相的咪唑环阳离子中的 C-2 位氢还会与样品产生氢键作用。多重作用机理使得分离达到了良好的效果,分离度 (R_s) 都大于 1.6,峰形良好,但柱效并不是很高。这除了有装柱本身的原因之外,可能还与该色谱柱并未采用封尾技术有一定的关系。考虑到所采用的流动相为纯水,色谱峰的对称性 (Sym) 还是可以接受的。

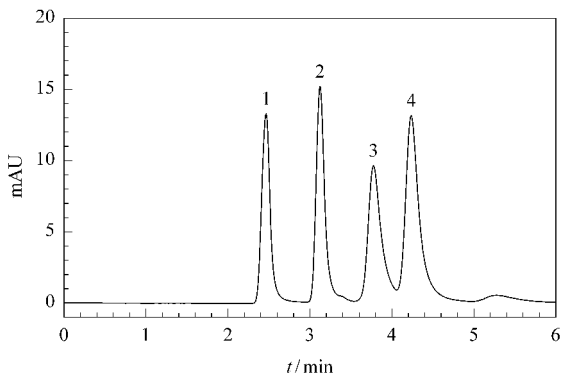


图 2 以纯水作流动相离子液体键合硅胶固定相分离 4 种碱基的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of four bases on ionic liquid-modified silica column with pure water as mobile phase

Peaks: 1. cytosine; 2. thymine; 3. 2-aminopyrimidine; 4. 6-chloroguanine.

表 1 以纯水作流动相离子液体键合硅胶固定相分离 4 种碱基的色谱参数

Table 1 Chromatographic parameters of four bases on ionic liquid-modified silica column with pure water as mobile phase

Base	t_R /min	N/m	R_s	Sym
Cytosine	2.46	14300	—	0.93
Thymine	3.12	23700	3.60	0.74
2-Aminopyrimidine	3.77	14500	2.83	0.63
6-Chloroguanine	4.23	18100	1.64	0.64

t_R : retention time; N/m : column efficiency; R_s : resolution; Sym: symmetry.

2.3 对酚类化合物的分离

用纯水作洗脱液,间氨基酚、间苯二酚和间硝基酚在色谱柱上能实现基线分离(见图 3),得到的色谱参数如表 2 所示。间氨基酚、间苯二酚和间硝基酚都是在间位上有个取代基的苯酚, $-NO_2$ 、 $-OH$ 等吸电子基的存在使得酚的酸性增强,保留时间增长; $-NH_2$ 斥电子基的存在使得酚的酸性减弱,保留时间缩短。

表 2 以纯水作流动相离子液体键合硅胶固定相分离 3 种酚类化合物的色谱参数
Table 2 Chromatographic parameters of three phenols on ionic liquid-modified silica column with pure water as mobile phase

Phenol	t_R /min	N/m	R_s	Sym
<i>m</i> -Aminophenol	2.99	12800	—	1.41
Resorcinol	4.13	11600	3.93	0.44
<i>m</i> -Nitrophenol	5.09	5900	2.05	0.44

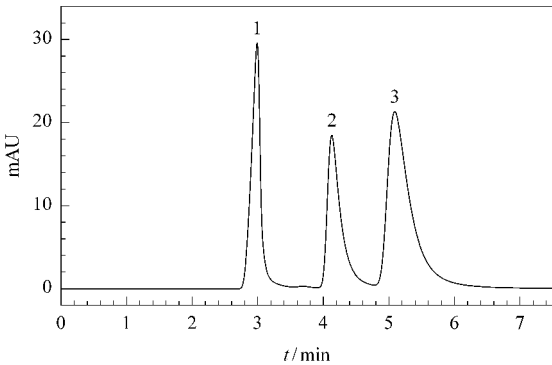


图 3 以纯水作流动相离子液体键合硅胶固定相分离 3 种酚类化合物的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of three phenols on ionic liquid-modified silica column with pure water as mobile phase

Peaks: 1. *m*-aminophenol; 2. resorcinol; 3. *m*-nitrophenol.

2.4 对药物化合物的分离

以纯水作流动相,不仅可以分离碱基和酚类化合物,也可以对一些药物分子进行分离。图 4 为以纯水为流动相在离子液体键合硅胶固定相上对盐酸吗啉呱、阿昔洛韦和头孢氨苄 3 种药物进行有效分离的色谱图。3 种药物中,盐酸吗啉呱呈阳离子形式,在离子液体固定相中受到较强的静电排斥作用,所以保留很弱,在死时间内即被洗脱。而阿昔洛韦为弱碱性,也会受到一定的静电排斥作用,但是由于该固定相同时存在的弱疏水作用和氢键作用,阿昔洛韦的保留相对较强。由于头孢氨苄分子较大,含有的一个羧基可以产生一定的静电吸引作用,含有的一个苯基与固定相中的芳香咪唑阳离子可产生 $\pi-\pi$ 作用,从而保留最强。这个色谱现象也是和固定相的多重作用机理相一致的。3 种药物可以只用纯水洗脱就在该固定相中得到分离,保留时间短,分离度大,不需要添加有机溶剂和缓冲溶液,简单方便,因此该类型固定相可以在以后的药物分离分析中发挥应有的作用。不足之处是药物分子的色谱峰对称性较差,拖尾比较严重,这与只以纯水作流动相有一定的关系,若添加有机溶剂或缓冲液可以改善峰形,但是本文的目的就是考察纯水作流动相的可行性,因此没有考察添加有机溶剂或缓冲液的分离

情况。峰形不够理想,除了固定相本身没有进行封尾处理外,还有可能是由于所采用的药物分子并不是纯化合物,而是市售药物胶囊,胶囊中含有的一些其他杂质对色谱峰有一定的干扰。

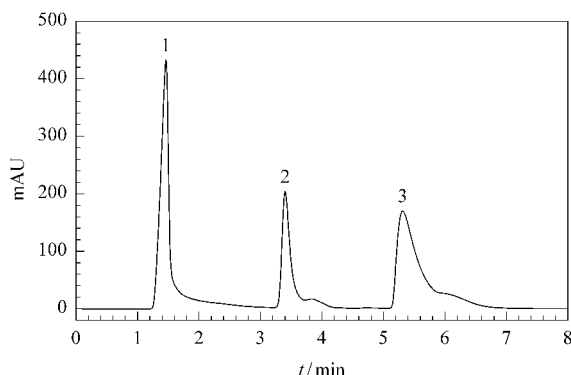


图 4 以纯水作流动相离子液体键合硅胶固定相分离 3 种药物的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of three pharmaceuticals on ionic liquid-modified silica column with pure water as mobile phase

Peaks: 1. moroxydine hydrochloride; 2. acyclovir; 3. cephalixin hydrate.

3 结论

采用氯丙基硅胶和甲基咪唑反应的方法制备了离子液体键合硅胶固定相。该固定相中含有的咪唑基团是一个相对体积较大、电荷分散的芳香有机杂环阳离子。该离子液体固定相的基体为硅胶,所耐 pH 值范围应与大多数硅胶的 pH 适应范围类似。在以前的研究^[10]中我们发现该固定相具有阴离子交换能力,与样品之间还存在弱疏水作用、静电排斥作用和氢键作用等多重相互作用。本文正是利用该固定相的多重作用机理,以纯水作流动相,有效分离

了一些有机化合物如碱基、酚类和药物化合物,避免了使用有机溶剂和缓冲溶液,为以后建立该类型样品的分析方法提供了一个简单有效、节约经济又环保健康的研究基础。

参考文献:

- [1] Huang X, Li L Q, Chen Y H, et al. Chinese Journal of Chromatography (黄晓兰, 李良秋, 陈云华, 等. 色谱), 2000, 18(6): 500
- [2] Wang Z H, Zhou R, Da S L. Journal of Instrumental Analysis (王忠华, 周蓉, 达世禄. 分析测试学报), 2003, 22(3): 28
- [3] Yao L F, Feng Y Q, Da S L. Chinese Journal of Chromatography (姚礼峰, 冯钰铮, 达世禄. 色谱), 2005, 23(1): 69
- [4] Song Y Z, Zhang W G, Ying Q F, et al. Chinese Journal of Chemical Physics (宋远志, 张维光, 尹起范, 等. 化学物理学报), 2005, 18(3): 362
- [5] Li G, Niu J G, Liu X, et al. Chinese journal of Chromatography (李广, 牛金刚, 刘霞, 等. 色谱), 2009, 27(3): 368
- [6] Qiu H, Zhang Q, Chen L, et al. J Sep Sci, 2008, 31: 2791
- [7] Wan X, Tian M, Row K H. J Anal Chem, 2010, 65(8): 798
- [8] Qiu H D, Hu Y Y, Liu X, et al. Chinese Journal of Chromatography (邱洪灯, 胡云雁, 刘霞, 等. 色谱), 2007, 25(3): 293
- [9] He L J, Lü F, Wu Y, et al. Journal of Instrumental Analysis (何丽君, 吕芳, 伍艳, 等. 分析测试学报), 2007, 26(1): 139
- [10] Qiu H, Jiang S, Liu X. J Chromatogr A, 2006, 1103: 265
- [11] Qiu H, Jiang Q, Liu X, et al. Chromatographia, 2008, 68: 167
- [12] Van Meter D S, Sun Y, Parker K M, et al. Anal Bioanal Chem, 2008, 390: 897
- [13] Qiu H, Takafuji M, Liu X, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217: 5190
- [14] Qiu H, Takafuji M, Sawada T, et al. Chem Commun, 2010, 46: 8740