

黄芩苷键合硅胶固定相的制备和表征

李来生* 陈雄泉 杨汉荣 吴宇梅

(南昌大学分析测试中心,南昌 330047)

摘 要 采用固液相表面连续反应法,以 γ -氨丙基三乙氧基硅烷(TM-550)为偶联剂,制备了一种新型天然配体黄芩苷键合硅胶固定相(BBSP)。采用红外光谱、热重分析和元素分析进行结构表征。以不同结构的溶质为探针,初步评价了新固定相的基本色谱性能,探讨了色谱分离机理。结果表明,该固定相具有较弱的反相色谱性能,除疏水作用外,还存在较强的电荷转移和氢键作用。与 ODS 相比,协同作用使 BBSP 对芳香族化合物表现出较好的色谱分离选择性。由于极性的酰胺官能团和内部亲水性葡萄糖基的存在,能有效抑制亲硅醇基效应,从而能较好地分离碱性化合物。此外,实验发现新固定相对黄酮类化合物有很强的选择性保留,预示其在分离富集黄酮类化合物方面具有应用潜力。

关键词 高效液相色谱法,黄芩苷键合固定相,天然配体,黄芩苷,色谱性能评价

1 引 言

传统的十八烷基键合硅胶(ODS)因具有柱效高、稳定性好、适用范围广、使用方便等优点而成为“广谱型”固定相^[1,2]。但也存在一些不足,如分离某些极性物质尤其是碱性化合物时效果不佳,原因是硅胶表面残留有硅醇羟基。为此,人们设计了静电屏蔽烷基键合固定相用于反相色谱分离^[3~5]。在基质上键合极性配体如胺或酰胺,利用该基团与碱性溶质间的静电排斥作用抑制硅醇基效应,从而改善分离。黄晓佳等^[6]制备了酰胺型固定相并评价了其色谱性能,发现该固定相对碱性物质有良好的分离能力。此外,在分离中草药极性提取物等复杂体系时,ODS 的分离选择性有限。随着制药工业、生物工程和环境工程的发展,样品的多样性需要不同性能的固定相来解决分离难题。

将活性功能成分键合到基质表面,可制备同时具有活性功能和色谱功能的固定相。目前,该类色谱固定相报道不多。1994 年,Amstrong 等^[7]首次制备了具有抗菌活性的万古霉素(vancomycin)等 3 种大环抗生素键合硅胶固定相,并实现了 70 多对手性药物的分离。2001 年,Massolin 等^[8]将青霉素酶键合到硅胶表面,分离了一系列苯氧烷基羧酸对映异构体,并用作表面催化剂,用于制备光学纯氨基青霉素。House 等^[9]将罗芙木生物碱育亨宾(Yohimbine)及其同系物的羟基通过氨基甲酸酯键合到硅胶表面制成色谱固定相,研究发现该配基具有较高的手性辨识能力。由此可见,天然化合物独特的结构使其具有作为色谱配体的开发前景。

传统中药黄芩为唇形科多年生黄芩属草本植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,味苦,性寒,具有清热燥湿、泻火解毒、凉血、止血、除热安胎之功效。主要有效成分黄芩苷分子内具有典型的 $C_6-C_3-C_6$ 黄酮基本骨架,且富含酚羟基等极性基团,可与溶质发生多种作用,从而实现复杂混合物的分离。此外黄芩苷具有较强的抗菌谱,对痢疾杆菌、百喉杆菌、葡萄球菌等多种病菌有抑制作用。黄芩苷键合硅胶本身是一种新型抗菌材料,对生化样品适用性应更好。

本研究以固液相表面连续反应法,以 γ -氨丙基三乙氧基硅烷(TM-550)为偶联剂,制备了一种新的含天然抗菌配体的键合相,即黄芩苷键合硅胶固定相(BBSP)。采用红外光谱、元素分析和热重分析对其进行了结构表征。以多种化合物为溶质探针,初步评价了新固定相的基本色谱性能,探讨了色谱分离机理,并将其与传统 ODS 固定相进行比较研究。结果表明,该固定相具有类似 ODS 的良好反相色谱性能,除疏水作用外,还能对溶质提供氢键作用、 $\pi-\pi$ 共轭作用和 $n-\pi$ 超共轭作用等位点,在电荷转移中作

2007-01-18 收稿;2007-05-15 接受

本文系江西省教育厅科技项目基金资助(Na 2007-18)

* E-mail: lilaishengcn@163.com

为电子受体。与 ODS 相比,由于包埋了极性的酰胺官能团,属于静电屏蔽固定相,而且内层为亲水的葡萄糖基,因此对碱性物质有较好的分离。实验还发现,新固定相对黄酮类化合物有强的选择性保留,预示其在分离富集黄酮类化合物中有应用价值。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪,由 LC-6A 高压泵、SPD-6AV 紫外-可见光检测器(日本岛津公司)和 N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)组成,配有 7125 型手动进样器(Rheodyne 公司);Elementar vario EL 元素分析仪;Nicolet-5700 型 FTIR 红外光谱仪(美国尼高力公司);DT-40 热分析仪(日本岛津公司)。

球型硅胶,10 μm ,比表面积约为 260~280 m^2/g (青岛美高化工有限公司), γ -氨丙基三乙氧基硅烷(武汉天目科技发展有限公司, TM-550);黄芩苷(四川世坤植化公司,经检验纯度 $\geq 94.2\%$);氯化亚砷(天津试剂公司, AR);萘、联苯、苈、菲、蒽和茋等均购于上海化学试剂公司,为分析纯试剂。

用于对照研究的 Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 3.9 mm, 5 μm)购于美国 Waters 公司。

2.2 黄芩苷键合固定相的制备

黄芩苷键合硅胶固定相(BBSP)的制备路线见图 1,制备过程如下:(1)以 3 mol/L HCl 对硅胶进行预处理,以除去硅胶中的金属氧化物杂质并增加硅醇羟基数,然后在 160 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤除水活化 6 h,冷后保存于干燥器中备用。(2)取 4 g 经活化干燥的球型硅胶于带回流冷凝和 CaCl_2 干燥管的 150 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 处理过的无水甲苯(金属钠除水新蒸),搅拌下加入 4 mL γ -氨丙基三乙氧基硅烷(TM550)和 3 滴三乙胺(重蒸),在 N_2 保护下,于 100~120 $^{\circ}\text{C}$ 油浴加热至回流温度,反应 24 h,冷却,抽滤,甲苯抽提 24 h,再依次用甲苯、丙酮、甲醇和丙酮洗涤,80 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 5 h,得 γ -氨丙基硅胶(图中产物 I)。称取 0.5 g 黄芩苷于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 15 mL 氯化亚砷,并在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下回流 2 h,减压蒸除过量氯化亚砷,然后加入 80 mL 无水甲苯溶解上步得到的酰氯化黄芩苷,在搅拌下向瓶中加入 4 g 上述偶联剂硅胶,在 N_2 保护下,隔水蒸汽,于 100~120 $^{\circ}\text{C}$ 油浴回流反应 12 h,过滤,甲苯抽提 24 h,依次用丙酮、甲醇、丙酮洗涤,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 5 h,得最终产物黄芩苷键合硅胶固定相(BBSP)。固定相经真空干燥枪干燥 10 h 后,进行红外光谱、元素分析和热重分析。

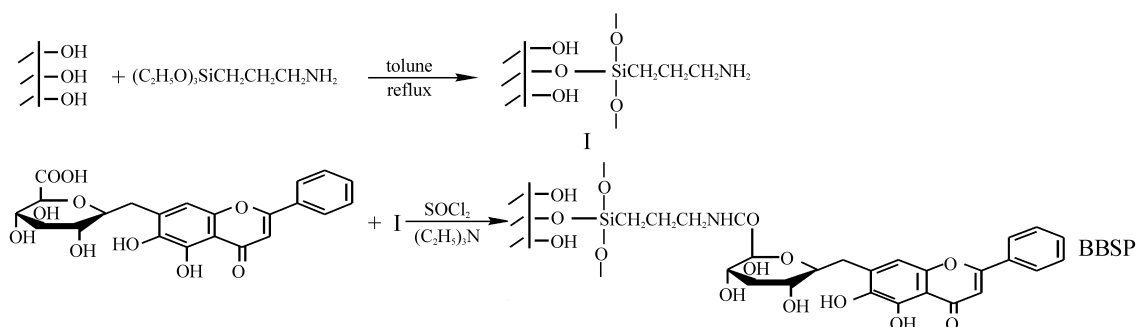


图 1 黄芩苷键合相(BBSP)的制备技术路线

Fig 1 Preparation scheme of baicalin-bonded stationary phase (BBSP)

2.3 BBSP 柱的装填和色谱方法

采用 LC-6A 泵匀浆法灌装色谱柱,以异丙醇作匀浆剂,将制备的 BBSP 填入不锈钢色谱柱中(150 mm $\times$ 4.6 mm)。填充压力为 31 MPa,色谱柱用水和甲醇反复冲洗后,再用流动相平衡,待基线平稳后进样测定。以常用甲醇-水或磷酸盐缓冲溶液为流动相,使用前流动相用 G4 砂芯漏斗过滤,超声脱气 10 min,流速设为 0.8 mL/min,检测波长为 254 nm,溶质探针用甲醇溶解,再用流动相稀释,配制成浓度为 50~250 mg/L 的溶液,进样体积一般为 10 μL 。用 0.05 mol/L NaNO_3 测定死时间,柱温为室温,至

少测两次,记录保留时间平均值。

3 结果与讨论

3.1 BBSP的制备

黄芩苷含一个葡萄糖酸基(见图 1),相关研究表明,苷元结构对抗菌活性起主要作用。为保持键合后配体的活性,本方法设计活化葡萄糖酸的羧基,使其转变为酰氯,然后与活泼的氨基硅胶反应形成酰胺键。所制备的固定相外层含黄酮苷元,芳环具有一定的疏水性作用,使酰胺键耐酸解能力提高,同时黄酮结构易参与色谱过程。此外,极性的酰胺及糖基能通过氢键作用,减小硅醇羟基对色谱分离的负影响。

通过偶联剂制备硅胶键合固定相,通常有二种途径:(1)中间体法:配体与偶联剂活性基团反应制备含配体的硅氧烷试剂,然后与硅胶键合;(2)固液相表面连续反应法:将偶联剂键合到硅胶表面,然后将配体与键合到硅胶固相表面上的偶联剂活性基团反应。BBSP的制备采用了第二种途径。该方法的优点是每步反应后可用溶剂及时除去多余偶联剂或配体,可避免繁琐的分离操作,同时给固定相的结构表征带来便利。

3.2 BBSP的结构表征

键合固定相表征有多种方法,其中固体核磁能确定固定相表面结构,但测定难度较大,费用偏高^[10,11]。通常,红外光谱、元素分析和热分析能够提供有关固定相表面配体及其键合量的足够信息。

图 2 为 BBSP 红外光谱图(硅胶基质为本底)。位于 $3650 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 的硅胶表面的硅羟基伸缩振动强峰减弱或消失, 3444.09 cm^{-1} 处为 $\text{N}-\text{H}$ 及 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, $1647.07, 1558.49, 1509.51, 1456.83 \text{ cm}^{-1}$ 分别为酰胺和峰; $2922.65, 2848.27 \text{ cm}^{-1}$ 处有峰,代表 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰,表明硅胶表面含有机物; 1647.07 cm^{-1} 为黄酮母体中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动; $1558.49, 1509.51, 1456.83 \text{ cm}^{-1}$ 是芳环的骨架振动; 1114.41 cm^{-1} , 801.82 cm^{-1} 与 $\text{Si}-\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{N}$ 和 $\text{C}-\text{O}$ 的重叠吸收带有关,说明大部分硅羟基参与了 TM550 的偶联反应,且有酰胺结构信息,红外光谱暗示硅胶表面存在黄芩苷配体。

根据元素分析结果,按氮含量计算得氨丙基硅胶键合量为 1.22 mmol/g 按照碳含量计算得 BBSP 中黄芩苷的键合量为 0.11 mmol/g 。热重分析结果为 0.087 mmol/g ,与元素分析结果接近。较低的键合量可能是由于结构较复杂,反应中存在位阻效应。用 HF 溶解固定相基质,紫外吸收能发现黄芩苷踪迹。

键合后硅胶表面呈棕黑色,与黄芩苷配体颜色相符。热重分析测得氨丙基硅胶和 BBSP 固定相失重分别为 8.3% 和 12.0% ($30 \sim 800^\circ\text{C}$, $10^\circ\text{C}/\text{min}$),与键合反应增重基本相符。实验还发现,在相同的色谱条件下,多环芳烃(PAHs)在 BBSP 上的保留远比偶联剂键合硅胶强得多,特别是黄芩苷在新固定相上保留很强,应与相似相作用原理有关。以上说明配体被成功地键合到硅胶表面。

3.3 柱效与稳定性考察

以联苯为溶质探针, $V(\text{甲醇})/V(\text{水})=60/40$ 为流动相,流速为 0.8 mL/min ,在 BBSP 中的保留时间为 7.982 min ,测得理论塔板数为 8970 块/米。新柱的柱效远低于商品 ODS 柱,可能与硅胶基质、键合量、配体性质、封尾处理和填装技术等因素有关,本实验简易压填柱效不高。为考察新固定相表面配体对酸的稳定性,采用甲醇或甲醇- $0.01 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$ ($60/40, V/V$, $\text{pH} 2.5$) 反复交替冲洗 BBSP 柱(一星期),联苯保留时间变化很小($7.94 \sim 8.05 \text{ min}$),且柱效变化很小,说明该固定相色谱柱性能较稳定,可能与黄酮苷元层起保护作用有关,长期的稳定性仍需要进一步考察。

3.4 疏水性考察

首先考察新固定相对非极性苯的同系物(苯、甲苯、乙苯和丙苯)的分离。烷基苯的 $\lg k'$ 与亚甲基数(n)之间有较好的线性关系, $\lg k' = 0.1445 + 0.2132n$ ($r = 0.9980$),基本符合碳数规律。实验考察了新

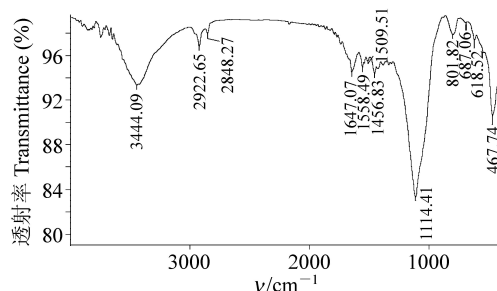


图 2 BBSP 的红外光谱

Fig 2 Fourier transform infrared spectrum of BBSP

固定相对多环芳烃 (PAHs) 的分离。实验发现,随着甲醇含量增加,溶质保留值减小,BBSP 柱上 9 种 PAHs 的 $\lg k'$ 与流动相中甲醇含量 (ϕ) 变化的关系呈线性关系,出峰顺序与 ODS 柱相似,说明 BBSP 属一种反相色谱分离材料,在分离非极性化合物时主要基于疏水作用。

实验发现,在相同条件下 PAHs 在 BBSP 上保留比 ODS 上弱,相应于新固定相比较弱的疏水性。图 4 显示,BBSP 对前 3 种烷基苯分离有限,可能与配体含较多的极性基团和糖基有关。研究也发现,随着分子内苯环数的增加保留迅速增强,说明 BBSP 分离 PAHs 时电荷转移作用强于疏水性作用。分离中固定相上起主要作用的是外层的黄芩苷元,而苷元的 $C_6-C_3-C_6$ 母体具有较好的平面性。一定范围内 PAHs 分子内苯环数的增加,扩大了共轭体系使环上电子密度增大,加大了配体的电荷转移作用面积,作用加强,从而增强保留。苯、萘、蒽的保留因子与分子内苯环数具有良好的线性,线性方程为 $\lg k' = -1.4866 + 0.7105n$, $r = 0.9991$,类似碳数规律,可称为“苯环数规律”。另外新固定相对菲和蒽具有一定分离能力,虽然限于柱效未能完全分离,但也说明其对异构体的立体结构有一定的识别能力。

流动相的酸度对 PAHs 在新固定相上的保留有一定影响。将流动相改为酸性,其它条件不变时 PAHs 保留减弱,原因可能是间隔臂和残存氨基上的氮原子在酸性条件下质子化,在此条件下,间隔基可能参与了分离过程。

3.5 碱性物质的分离

根据疏溶剂理论,反相色谱模式下分离极性化合物时,若键合固定相存在残留硅醇羟基,由于“亲硅醇基效应”的影响,分离碱性物质将出现峰拖尾,且保留因子与有机成分含量的关系曲线将呈“U 形状”^[12]。本研究以甲醇-水流动相分离了吡啶、喹啉、 β -萘胺、吲哚 4 种碱性物质未发现峰拖尾现象;以吡啶、喹啉、吲哚 3 种碱性物质为探针,考察了甲醇浓度对保留因子的影响 (见图 3)。实验发现,3 种物质的保留因子与甲醇含量的关系曲线未出现明显的“U 形”,说明亲硅醇基效应被有效抑制。原因可能是 BBSP 键合链中极性的酰胺键具有静电屏蔽作用,同时键合链内层亲水的葡萄糖比硅醇羟基能优先与碱性溶质作用,且黄芩苷的黄酮母核具有较大的空间体积,且具有一定数目的羟基,这些因素使碱性物质与残留硅醇羟基的离子交换作用受到抑制,从而减少了峰拖尾现象,峰保持对称性。碱性物质的流出顺序依次为吡啶、喹啉、 β -萘胺、吲哚,采用 ODS 柱对比发现流出顺序一致,可见分离主要基于疏水作用,另外电荷转移、氢键作用也参与了分离过程;喹啉先于 β -萘胺洗脱,可能是因为氨基效应增加萘环电子密度,有利与固定相表面黄酮配体的芳环进行有效的 $\pi-\pi$ 作用,加之 β -萘胺的氨基还能与羟基形成氢键。

3.6 酚类物质的分离

以酚类物质作为溶质探针,考察 BBSP 对极性化合物的色谱分离选择性。分离苯和苯酚时发现,苯先于苯酚流出,与 ODS 流出顺序相反。显然,主要作用不完全靠疏水性,可归因于电荷转移及氢键作用的强度。电荷转移中配体中的黄芩苷是电子受体,酚羟基使苯环电子密度增大从而增强了电荷转移作用,同时也可产生氢键及偶极作用。分离间氨基酚、间二酚、间硝酚、甲萘酚、联萘二酚时出峰顺序与 ODS 柱相同,依次为间氨基酚、间二酚、间硝酚、甲萘酚、联萘二酚。间氨基酚先于间二酚流出 (图 4),原因可能是酸性条件下氨基被部分质子化,与间隔臂中被部分质子化的氮之间存在静电作用,保留值降低;与间二酚相比,间硝酚上硝基的吸电子效应减小了苯环的电子云密度,导致酚羟基容易电离,使得极性增大,疏水性减小,但其保留反而强于间二酚,原因可能是硝基与 BBSP 间除疏水作用外,还存在电荷转移、氢键作用 (如硝基可与间隔基 $N-H$ 之间) 等作用。甲萘酚、联萘二酚因共轭体系依次增大,所以保留更

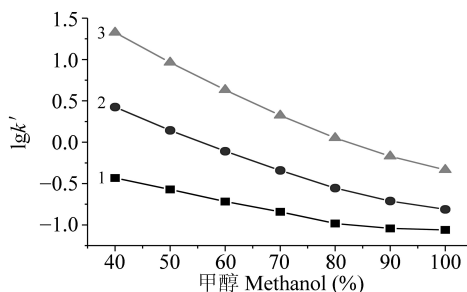


图 3 碱性化合物的 $\lg k'$ 对甲醇含量 (ϕ) 关系图

Fig 3 Plot of $\lg k'$ of basic compounds vs methanol content (ϕ) in mobile phase

流动相 (mobile phases): 甲醇 (methanol)-H₂O; 流速 (flow rate): 0.8 mL/min, UV: 254 nm. 1. 吡啶 (pyridine); 2. 喹啉 (quinoline); 3. 吲哚 (acridine)。

强,联萘二酚最后流出。

3.7 对黄酮类化合物的分离

黄酮是一类非常重要的天然有机化合物,很多黄酮类化合物是其源植物的主要有效成分,因而研究受到广泛重视。BBSP的配体黄芩苷是典型的黄酮糖苷,具有特征的 $C_6-C_3-C_6$ 结构。根据相似相溶原理, BBSP可能对结构相似的黄酮类化合物有较强的作用。分别用 BBSP和 ODS分离了橙皮苷、染料木素、芦丁、紫花牡荆素和槲皮素 5种黄酮类化合物,结果见图 5(前两个峰为未知物质)。实验发现:该 5种黄酮在 BBSP上的保留很强,顺序由弱到强依次为橙皮苷、染料木素、芦丁、紫花牡荆素和槲皮素,而 ODS为芦丁、橙皮苷、槲皮素、染料木素和紫花牡荆素,且芦丁和橙皮苷无法实现良好的分离,表明两者存在不同的分离机理。

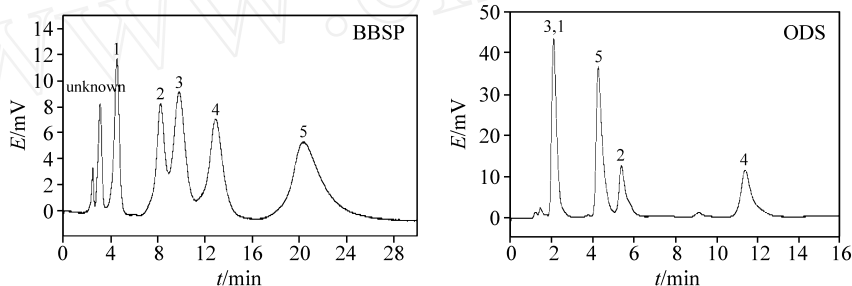


图 5 BBSP和 ODS上的黄酮类化合物色谱图

Fig 5 Chromatograms of flavonoids on BBSP and octadecyl bonded silica (ODS)

流动相 (mobile phases): 甲醇 (methanol)-0.1% H_3PO_4 (80:20 (BBSP), 55:45 (ODS), V/V). 流速 (flow rate): 0.8 mL/min; UV 260 nm. 1. 橙皮苷 (hesperidin); 2. 染料木素 (genistein); 3. 芦丁 (rutin); 4. 紫花牡荆素 (vitexin); 5. 槲皮素 (quercetin)。

显然,黄酮类化合物在 ODS上的分离主要基于疏水性作用。芦丁、橙皮苷、槲皮素、染料木素和紫花牡荆素中,前两者是黄酮糖苷,亲水性的糖基使分子极性较强先流出,分子极性接近故无法分离;其余黄酮按照分子上极性的羟基数目依次减少依次流出。5种黄酮在 BBSP上分离良好,酚羟基数目的增大使环上电子密度增大从而增强了电荷转移,氢键作用也增强, BBSP还有一定的立体选择性。橙皮苷因其黄酮骨架共轭体系较小,电子密度小,不利于电荷转移,且分子极性大,协同作用使其保留最弱;染料木素为异黄酮,骨架不同导致与黄芩苷元的电荷转移作用面小,所以保留较弱;芦丁分子上酚羟基增加为 4个,但糖基减小了疏水性作用,保留居中;紫花牡荆素中 5个甲氧基的推电子效应略弱于羟基,槲皮素是黄酮醇,分子中酚羟基最多,所以保留最强。

此外实验发现, BBSP对黄芩苷有极强的吸附作用,采用常用有机流动相甲醇和乙腈时,即使采用质谱检测器也检不出黄芩苷信号,可能是因为黄芩苷分子间有很强的电荷转移作用和氢键作用。以无定形硅胶制备黄芩苷键合硅胶吸附黄芩苷时也发现,其平衡吸附量远大于常用于黄酮富集的大孔树脂。若能找出合适的解吸剂, BBSP可以用于黄芩苷等黄酮富集,以简单的吸附-解吸两步即可实现黄酮的捕获和提纯,从而节省人力和物力。

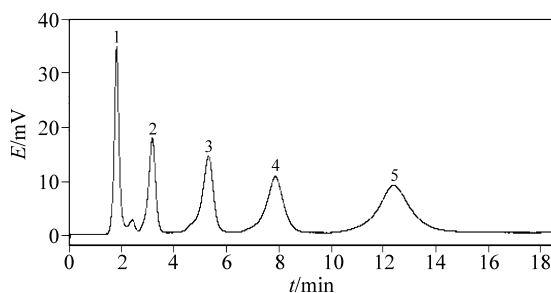
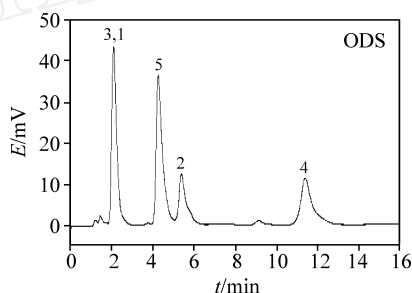


图 4 BBSP分离酚类化合物色谱图

Fig 4 Chromatogram of phenols on BBSP

流动相 (mobile phases): 甲醇 (methanol)-0.1% H_3PO_4 (55:45, V/V). 流速 (flow rate): 0.8 mL/min; UV 254 nm. 1. 间氨基酚 (*m*-aminophenol); 2. 间二酚 (*m*-benzenediol); 3. 间硝酚 (*m*-nitrophenol); 4. 1-萘酚 (1-naphthol); 5. 联萘二酚 (1,1'-bi-2-naphthol)。



References

- 1 Zou Han-Fa (邹汉法), Zhang Yu-Kui (张玉奎), Lu Pei-Zhang (卢佩章). *High Performance Liquid Chromatography* (高效液相色谱法). Beijing (北京): Sciences Press (科学出版社), 1998: 79 ~ 125
- 2 Yu Shi-Lin (于世林). *HPLC Methods and Applications* (高效液相色谱方法及应用). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2000: 245 ~ 322
- 3 Ascar T L, Feibush B. *J. Chromatogr.*, 1990, 506: 357
- 4 O Gara J E, Alden B A, Walter T H, Peterson J S, Niederlaender C L, Neue U D. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 3908
- 5 Czajkowska T, Jaroniec M. *J. Chromatogr. A*, 1997, 762: 147
- 6 Huang Xiao-Jia (黄晓佳), Liu Ying (刘 莺), Cong Run-Zi (丛润滋), Liu Xue-Liang (刘学良), Wang Jun-De (王俊德). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2001, 19 (4): 293 ~ 296
- 7 Armstrong D W, Tang Y B, Chen S S, Zhou Y, Bagwill C, Chen J R. *Anal. Chem.*, 1994, 66 (9): 1473 ~ 1484
- 8 Calleri E, Massolini G, Liodice F. *J. Chromatogr. A*, 2002, 958 (1/2): 131 ~ 140
- 9 House David W. *United States Patent*, 6, 132, 606, 2000
- 10 Li Lai-Sheng (李来生), Da Shi-Lu (达世禄), Feng Yu-Qi (冯钰琦), Liu Min (刘 敏). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2005, 26 (7): 1228 ~ 1232
- 11 Brindle R, Albert K, Harris S J. *J. Chromatogr. A*, 1996, 731: 41 ~ 46
- 12 Wang Jun-De (王俊德), Shuang Zhen-Hua (商振华), Yu Yun-Lu (郁蕴璐). *High Performance Liquid Chromatography* (高效液相色谱法). Beijing (北京): China Petroleum Press (中国石化出版社), 1992: 126 ~ 131
- 13 Li Lai-Sheng (李来生), Yang Han-Rong (杨汉荣), Chen Xiong-Quan (陈雄泉), Xu Li-Li (许丽丽). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2006, 34 (8): 1183 ~ 1186

Preparation and Characterization of a Baicalin-bonded Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography

Li Lai-Sheng*, Chen Xiong-Quan, Yang Han-Rong, Wu Yu-Mei
(Analytical and Testing Center, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract The solid-liquid reaction method was used for the preparation of a new HPLC baicalin-bonded stationary phase (BBSP) via the amido linkage between coupling reagent γ -aminopropyltriethoxy silane (TM-550) and baicalin. Its structure of ligand was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, elemental analysis and thermal analysis etc. The chromatographic performances of BBSP were preliminarily evaluated, and related retention mechanism was studied by using different solutes as probes. Meanwhile, the comparative study between BBSP and conventional octadecyl bonded silica (ODS) was also carried out under the same conditions. The results show that the new stationary phase has a relatively weak reversed phase chromatographic property. Besides hydrophobicity, BBSP can also provide various sites, such as hydrogen-bonding, π - π and n - π charge transfer interactions. Synergistic interactions improved the separation selectivity of BBSP for aromatic compounds and their positional isomers when compared with ODS. It can also be observed that the polar amide linkage and hydrophilic glucose residue can minimize the silane hydroxyl effect and improve the separation of basic nitrogen-containing compounds. Additionally, the new packing has strong affinity to flavonoids because of similar structures. BBSP can be used as enriching column packing for natural organic flavonoids from medicine herbs.

Keywords High performance liquid chromatography, baicalin-bonded stationary phase, natural ligand, baicalin, chromatographic evaluation

(Received 8 January 2007; accepted 15 May 2007)