

多羟基化合物键合亲水色谱固定相的制备及其分离性能

张 静^{1*}, 王玲玲¹, 单联合国², 卫引茂²

(1. 陕西师范大学化学化工学院, 陕西 西安 710062; 2. 西北大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 用硅胶与氨丙基三甲氧基硅烷反应, 再与 δ -葡萄糖酸内酯反应, 制备了一种多羟基化合物键合的新型亲水色谱固定相。以水-有机溶剂(乙醇、乙腈、四氢呋喃)为流动相, 通过改变流动相中有机溶剂的种类及浓度、缓冲盐浓度和柱温, 考察了该固定相对 6 种强极性中药组分的保留行为和保留机理。当水的比例在 0~40% (v/v) 范围时, 溶质的保留随着流动相中水的比例的增大而减小, 属于典型的亲水色谱分离模式; 而当流动相中水的比例在 0~100% (v/v) 范围内变化时, 溶质的保留随着水的比例变化呈“U”形曲线, 属于亲水色谱和反相色谱的混合保留机理。缓冲盐的浓度和 pH 效应说明, 所选用的中药组分与所制备的固定相间还存在弱的静电作用。该固定相对 6 种中药组分以及丹参注射液具有良好的分离性能, 表明其在强极性中药有效成分的分离及其他强极性物质的分离分析中具有一定的应用前景。

关键词: 亲水作用色谱; 多羟基化合物固定相; 强极性中药组分; 色谱保留行为

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)08-0804-06

Preparation of multi-hydroxyl molecular-bonded stationary phase for hydrophilic interaction chromatography and its separation property

ZHANG Jing^{1*}, WANG Lingling¹, SHAN Lianguo², WEI Yinmao²

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. College of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The surface of silica was modified by δ -gluconolactone, a multi-hydroxyl molecule, to prepare a new stationary phase for hydrophilic interaction chromatography (HILIC) of strongly polar compounds from traditional Chinese medicine. The separation properties and separation mechanisms of the stationary phase to six polar components were investigated by changing kinds of organic solvent (ethanol, acetonitrile and tetrahydrofuran) and concentration, salt concentration and column temperature. The retention times of the solutes decrease with increasing the concentration of water in mobile phase from 0 to 40% (v/v), indicating a typical HILIC mode for the separation of the solutes, whilst the curves of the retention times of the six solutes exhibit “U” shape with the change in the concentration of the water from 0 to 100% (v/v), indicating a mixed-mode of hydrophilic interaction and reversed-phase chromatography working on the separation of the solutes. The results of the salt concentration and pH affected the retention time show that there were weak electric interactions between the solutes and the prepared stationary phase. The fact that the strongly polar solutes and Danshen injections could be separated well indicated that the prepared stationary phase has a potential application in the separation of strongly polar components in traditional Chinese medicine and other strongly polar compounds.

Key words: hydrophilic interaction chromatography (HILIC); multi-hydroxyl molecular-bonded stationary phase; strongly polar compounds from traditional Chinese medicine; chromatographic retention behaviors

* 通讯联系人: 张 静, 博士, 副教授, 主要从事分析化学、色谱分离方向的研究. E-mail: zhangjing8902@snnu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173025, 20975080).

收稿日期: 2012-03-20

传统中药中的强极性组分是中药活性组分的重要组成部分,对中药发挥药效起着重要的作用。亲水作用色谱(HILIC)是采用极性固定相、有机溶剂-水为流动相的一种色谱分离技术^[1,2],能有效地保留反相色谱中保留不完全或不保留的强极性样品,因而得到了较广泛的应用^[3-5]。同时,HILIC采用的是水-水溶性有机相作为流动相,不仅有效地改善了极性溶质在流动相中的溶解性,也为其与质谱技术联用提供了可能^[6]。此外,HILIC具有与反相色谱(RPLC)相似的分离效果,这些特点使之成为复杂样品中极性组分的分析和分离的强有力工具^[7-10]。HILIC的固定相主要有硅胶、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^[11,12]。我们课题组在研究强极性中药活性成分的保留机理时,发现选用的酚酸和糖苷类组分(阿魏酸、香草酸、葛根素、苦杏仁苷、丹参素和绿原酸)在二醇基键合硅胶固定相上的保留主要为氢键作用,但是分离效果较差^[13]。本文将一种多羟基化合物—— δ -葡萄糖酸内酯键合在硅胶表面,合成了一种多羟基化合物键合固定相,试图通过提高固定相配体中的羟基数目来增大固定相与溶质之间形成氢键的能力,改善酚酸和糖苷类组分的分离效果,为强极性中药组分的分离分析提供一种高效的分离柱。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu LC-2010C 高效液相色谱仪(配 SPD-20A 紫外-可见波长检测器)、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);氨丙基三甲氧基硅烷(应城市德邦化工新材料有限公司);强极性中药标准品芦丁、芒果苷、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);乙腈、四氢呋喃(色谱纯,美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 多羟基化合物键合固定相的制备

将经过酸化、干燥的 3.0 g 硅胶加入到 50 mL 干燥甲苯中,加热至 110 $^{\circ}\text{C}$ 后滴加 3 mL 氨丙基三甲氧基硅烷,反应 12 h。抽滤,将获得的氨丙基硅胶分别用适量的甲苯和丙酮冲洗,再用水洗。在 50 mL 水中加入 2 g 氨丙基硅胶、2 g δ -葡萄糖酸内酯和 1.0 mL 三乙胺,在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下加热回流 8~10 h。过滤,用水反复洗涤,即得到多羟基键合固定相。

1.3 色谱条件

将所制备的固定相用匀浆法装填在 100 mm $\times$

4.6 mm 的不锈钢色谱柱管中。流动相由二元梯度泵将有机溶剂和醋酸铵溶液按比例混合配制。流动相 pH 值及醋酸铵浓度是指流动相混合前水相中的 pH 值及盐浓度;流速为 1.0 mL/min。进样体积 20 μL ;检测波长为 254 nm。溶质的保留因子 k 按公式 $k = (t_R - t_0)/t_0$ 计算,其中, t_R 为保留时间; t_0 为死时间,为甲苯在以乙腈-水(95:5, v/v)为流动相条件下测得的保留时间。

2 结果与讨论

2.1 固定相的制备

亲水作用色谱是采用极性固定相、以高含量极性有机溶剂的水溶液为流动相的一种分离技术。无论是根据亲水色谱的分配机理还是吸附机理的理论预计,提高固定相的极性都是提高被分离组分保留和选择性的关键因素之一^[12]。二醇基键合硅胶作为一种常用的亲水色谱固定相,其与强极性溶质之间的作用主要是氢键相互作用,但对酚酸和糖苷类组分的分离能力不强。如果用多羟基化合物修饰固定相,则可增强组分与固定相的氢键形成能力,提高溶质的保留强度和分离效果。 δ -葡萄糖酸内酯含有 5 个羟基,且能在温和条件下与氨基反应,所以本文采用如图 1 的反应路线,将 δ -葡萄糖酸内酯键合到硅胶表面,制备一种多羟基化合物键合色谱固定相。元素分析表明,该固定相中的 C 含量为 3.6%,N 含量为 0.82%。红外光谱显示,该固定相在 1726.05 cm^{-1} 处存在羰基的特征吸收和 3447.26 cm^{-1} 处存在氨基吸收。上述这些结果证明 δ -葡萄糖酸内酯已成功地键合在硅胶表面上。

从固定相的结构可看出, δ -葡萄糖酸内酯在硅胶表面上形成了一层亲水性结构。与二醇基键合硅胶相比,羟基含量明显提高,同时分子链的长度增大。研究表明,这种结构不仅可对硅胶表面形成立体保护作用,降低溶质与材料基体的作用^[14,15],而且对于依靠氢键作用保留的溶质而言,能明显地增大其在固定相上的保留和选择性。

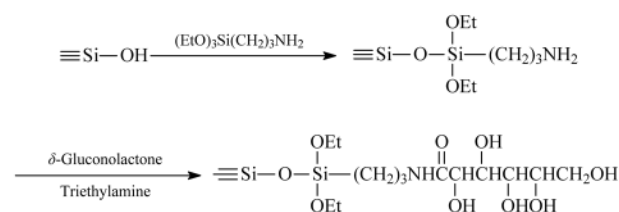


图 1 多羟基化合物键合固定相的制备路线
Fig. 1 Synthesis scheme for preparation of multi-hydroxyl molecular-bonded stationary phase

2.2 酚酸和糖苷的分离

酚酸和糖苷是中药中两大类主要活性成分。本文从酚酸和糖苷类组分中随机选取亲水性强的葛根素、芒果苷、苦杏仁苷、丹参素钠、绿原酸和芦丁作为溶质,采用 4 种常见流动相考察固定相的分离性能。在水溶液-有机溶剂的体积比均为 20:80 时,溶质在甲醇-水溶液流动相中的保留弱且分离效果差(图略),而在乙腈、乙醇和四氢呋喃分别与水溶液组成的流动相中均获得了良好的分离(见图 2),且按照

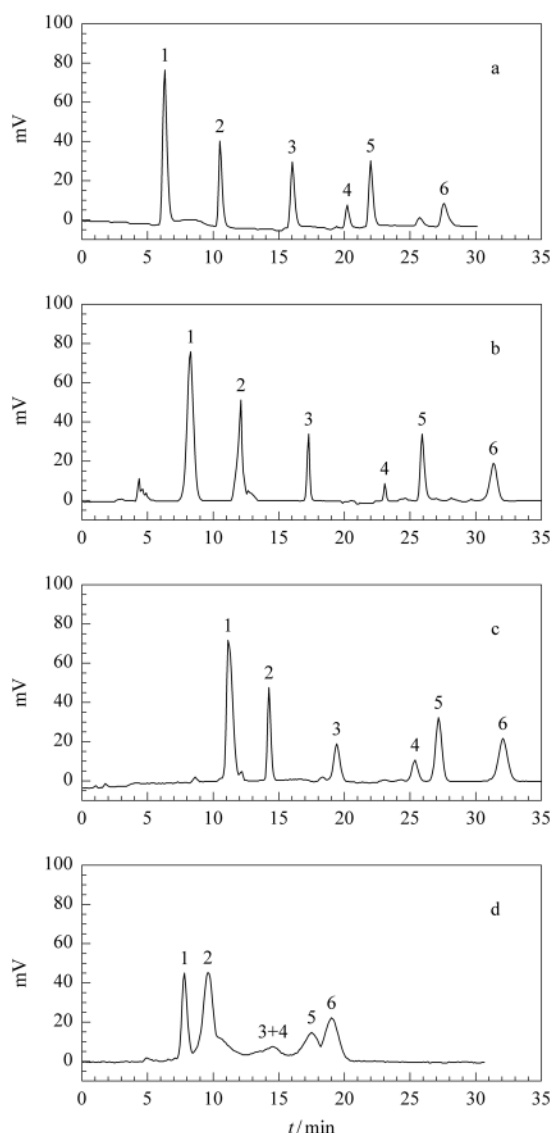


图 2 溶质在 3 种流动相中的分离效果

Fig. 2 Chromatograms of solutes in three different mobile phases

Chromatographic columns: a—c. δ -gluconolactone bonded column (100 mm $\times$ 4.6 mm); d. silica column (100 mm $\times$ 4.6 mm). Mobile phases: a. ethanol-ammonium acetate aqueous solution (80:20, v/v); b. tetrahydrofuran-ammonium acetate aqueous solution (80:20, v/v); c, d. acetonitrile-ammonium acetate aqueous solution (80:20, v/v). Ammonium acetate aqueous solution: 15 mmol/L, pH 5.2.

Solutes: 1. amygdalin; 2. puerarin; 3. rutin; 4. mangiferin; 5. chlorogenic acid; 6. salvianic acid A sodium.

苦杏仁苷、葛根素、芦丁、芒果苷、绿原酸和丹参素钠的顺序被洗脱,其中以乙腈-水溶液体系的分离效果最好。由于甲醇具有强的氢键作用能力,可与水溶液竞争吸附于固定相表面,形成含有甲醇的“富水层”,从而增强了固定相表面的疏水性,使固定相与溶质之间作用力的差异减小,所以溶质在甲醇-水溶液中的分离效果较差。图 2d 为 6 种溶质在未改性的固定相上的分离,可以看出其分离效果远远低于改性的固定相。

2.3 流动相组成对溶质保留的影响

2.3.1 流动相中有机溶剂种类和比例的影响

分别以乙醇/水溶液、乙腈/水溶液、四氢呋喃/水溶液体系作为流动相,考察溶质在不同流动相中的保留行为。图 3 给出了溶质保留与流动相中水溶液的比例的关系。显然,当流动相中水溶液的比例由 5% 开始增大时,6 种溶质的保留均逐渐减小,体现出典型的 HILIC 保留特征,溶质的洗脱顺序为苦杏仁苷、葛根素、芦丁、芒果苷、绿原酸和丹参素钠。但是,当水溶液的比例继续增加时,溶质的保留时间随之增大,而且所有溶质的出峰顺序完全颠倒,顺序变为丹参素钠、绿原酸、芒果苷、芦丁、葛根素和苦杏仁苷的次序,说明此时水变为弱洗脱剂,溶质保留转变为反相色谱保留机理。从水溶液的比例为 0~100% 范围来看,溶质在 3 种流动相中的保留均呈现“U”形曲线,说明溶质保留存在混合机理,即 HILIC 和反相色谱的双重保留机理。这些药物在二醇基键合硅胶上的保留也呈现“U”形曲线^[13]。

在亲水色谱中,溶质的保留遵循分配机理、吸附机理或者是两者混合保留机理,但多数研究倾向于分配机理^[12]。亲水色谱中的分配机理认为,固定相因吸附流动相中的水而在其表面形成一个动态的“富水层”,溶质的保留主要是依靠其在流动相与此“富水层”中的分配来实现^[1],溶质的保留因子与强洗脱剂浓度间的关系可用式(1)^[12]表示:

$$\log k = \log k_w - SC_B \quad (1)$$

式(1)中, C_B 为流动相中强洗脱剂的浓度(以体积分数表示), k_w 为溶质在纯的弱洗脱剂中的保留因子, S 为斜率。

如果溶质的保留类似于一般正相色谱,属于吸附机理,则保留因子与流动相中强洗脱剂浓度间的关系遵循式(2)^[12]:

$$\log k = \log k_B - (A_s/n_B) \log N_B \quad (2)$$

式(2)中, k_B 为纯水作溶剂时的保留因子, A_s 和 n_B 分别是溶质在固定相表面所占据的横截面积和水的分子数, N_B 是流动相中水的摩尔分子数。

选取图 3 中水溶液的比例为 5%~40% 的保留因子数据,即在亲水相互作用起主要作用的流动相范围内,以 $\log k$ 对 C_B 作图,发现所有溶质的 $\log k$ 对 C_B 呈线性关系(相关系数 r 为 0.975~0.997)。但是,当用 $\log k$ 对 $\log N_B$ 作图时,线性关系却较差(r 为 0.885~0.941)。这说明溶质在固定相上的 HILIC 分离服从分配机理。

实验还发现,在相同有机溶剂比例下,溶质在乙醇-水溶液流动相中的保留因子均弱于其在四氢呋喃

喃-水溶液、乙腈-水溶液中的保留因子(见表 1)。这种现象与有机溶剂分子的结构有关。乙醇分子中的羟基既是质子给予体,也是质子接受体,可与固定相上的羟基产生强的氢键作用。另一方面,所分离的溶质也与固定相之间存在氢键作用。也就是说,溶质与溶剂在固定相表面存在竞争性作用,所以溶质的保留必然减弱^[16]。而四氢呋喃与乙腈仅为弱的质子接受体,与固定相之间的氢键作用弱,导致溶质和溶剂在固定相上的竞争作用较弱,因此溶质的保留较强。

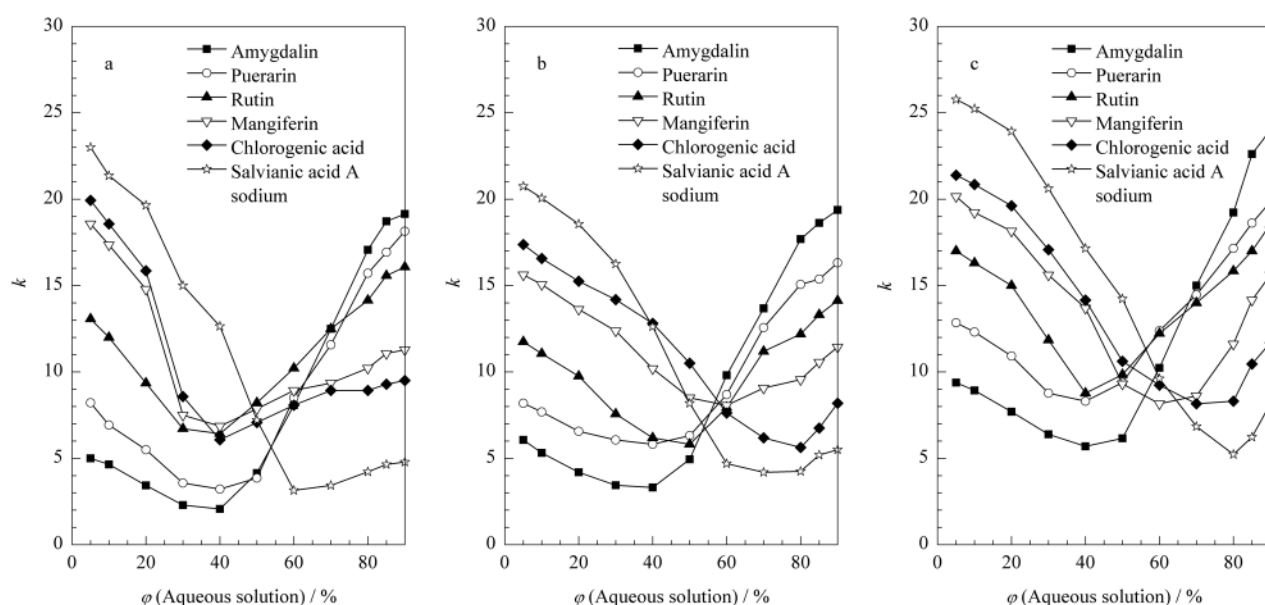


图 3 溶质保留与流动相组成的关系

Fig. 3 Effect of components of mobile phase on the retention of solutes

Chromatographic column: δ -gluconolactone bonded column (100 mm $\times$ 4.6 mm). Mobile phases: a. ethanol-15 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (pH 5.2); b. tetrahydrofuran-15 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (pH 5.2); c. acetonitrile-15 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (pH 5.2).

表 1 流动相中的有机溶剂种类对溶质保留因子的影响

Table 1 Effect of organic solvent species in mobile phase on retention factor (k) of solutes

Organic solvent	Chlorogenic acid	Salvianic acid A sodium	Amygdalin	Puerarin	Rutin	Mangiferin
Ethanol	27.4	31.3	7.9	11.1	18.2	25.7
Tetrahydrofuran	28.1	33.7	10.1	13.9	19.3	25.7
Acetonitrile	28.4	34.1	12.9	17.3	22.5	26.3

Mobile phase: organic solvent-ammonium acetate aqueous solution (90:10, v/v).

2.3.2 盐浓度的影响

选择乙腈-醋酸铵溶液作流动相,通过改变醋酸铵的浓度(15、20、30、40 和 50 mmol/L)考察缓冲盐浓度对溶质保留的影响。从图 4 看出,随着醋酸铵浓度的增大,溶质保留值逐渐减小,说明溶质与固定相之间存在一定的离子交换作用。如图 1 所示,由于存在空间位阻等原因,固定相表面上的氨基不能完全与 δ -葡萄糖酸内酯反应,所以固定相表面可能残存少量的氨基;而所分离的溶质为酚酸类化合物,具有弱酸性;因此,溶质和固定相间除了氢键作用外,存在弱的静电作用力。

2.3.3 流动相 pH 的影响

在乙腈-醋酸铵溶液流动相中,当 pH 从 4 增大至 5.5 时,除苦杏仁苷外,其他 5 种溶质的保留值变小;而当 pH 继续增大时,溶质的保留值却逐渐增大(见图 5)。溶质保留的这一特征可能与其本身结构和固定相的结构有关。这 5 种物质本身是酸性物质,随着 pH 增大,其解离程度增大,分子亲水性增强,造成亲水作用增强。但另一方面,固定相上的残存氨基的解离度减小,引起与溶质的静电作用力减小。这两种相反的作用导致随着 pH 的增大,溶质的保留值呈先减小后增强的变化。

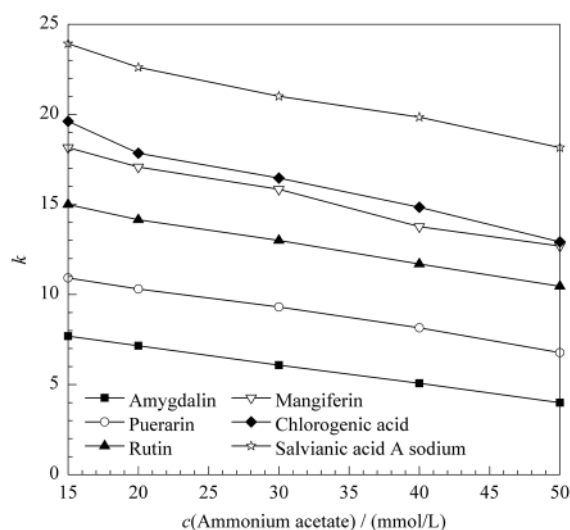


图 4 流动相中缓冲盐浓度对溶质保留值的影响

Fig. 4 Effect of the concentration of buffer in mobile phase on retention of solutes

Mobile phase: acetonitrile-ammonium acetate aqueous solution with different concentrations (pH 5.2; 80:20, v/v). Other conditions were the same as in Fig. 3.

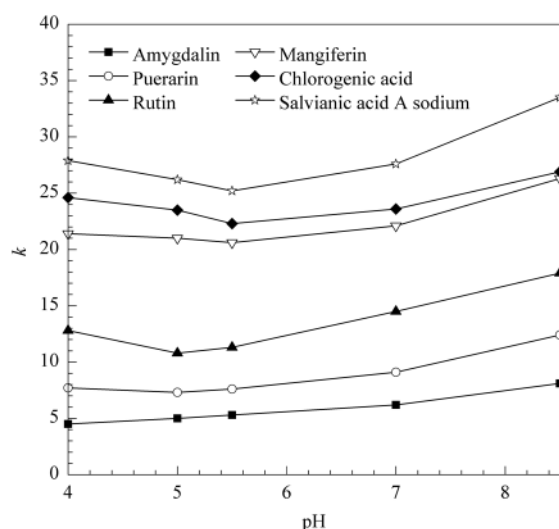


图 5 流动相 pH 值对溶质保留行为的影响

Fig. 5 Effect of pH values of mobile phase on retention of solutes

Mobile phase: acetonitrile-15 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (80:20, v/v). Other conditions were the same as in Fig. 3.

2.4 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,本文使用乙腈-水溶液流动相,在 20~50 °C 范围内研究了柱温对溶质保留的影响。结果发现,随着温度升高,溶质的保留值均减小。

在色谱保留过程中,溶质的保留因子 k 与温度 T 之间的关系可用 Van't Hoff 方程表示:

$$\ln k = -\Delta H^\theta / (RT) + \Delta S^\theta / R + \ln \varphi \quad (3)$$

$$\Delta G^\theta = \Delta H^\theta - T\Delta S^\theta \quad (4)$$

式(3)中: R 为气体常数; φ 为柱相比,因其与溶质种类无关,与流动相和固定相相关,在相同的流动相和固定相条件下,为了处理方便取其值等于 1^[13,17]; ΔH^θ 和 ΔS^θ 分别表示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 种溶质的线性相关系数都在 0.992 0 以上。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(见表 2),显示了溶质由流动相到固定相的迁移过程是放热过程,有利于溶质保留。溶质的 ΔS^θ 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。但由于熵的损失可通过焓变予以补偿,溶质在迁移过程中总的自由能变为负值,因而保留时间随着温度的升高而减小。

表 2 6 种溶质由流动相到固定相的迁移过程中的熵变和焓变

Table 2 Entropy changes and enthalpy changes of six solutes in transition from mobile phase to stationary phase

Solute	$\Delta S^\theta /$ (J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	$\Delta H^\theta /$ (J · mol ⁻¹)
Chlorogenic acid	-304.1	-135.0
Salvianic acid A sodium	-331.4	-153.8
Amygdalin	-126.1	-53.6
Puerarin	-233.9	-96.7
Rutin	-244.1	-103.1
Mangiferin	-248.1	-115.3

2.5 固定相在丹参注射液有效成分分离中的应用

复方丹参注射液由丹参和降香组成,具有活血化瘀、理气开窍、扩张冠状动脉等功效,是临床治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死的常用药物。其成分可分为脂溶性和水溶性两部分,水溶性成分主要的有效成分为丹参素和原儿茶醛。鉴于 δ -葡萄糖酸内酯键合固定相对丹参素钠有较强的保留,我们以复方丹参注射液作为研究对象,选用乙腈-醋酸铵溶液为流动相,对复方丹参注射液进行分离。可以看到,原儿茶醛和丹参素获得了良好分离(见图 6)。同时,这两种组分保留时间和峰面积的日内相对标准偏差分别为 0.5% 和 1.3% ($n=5$),日间相对标准偏差分别为 0.7% 和 1.3% ($n=5$)。另外还发现,在 pH 2.0~8.0 的范围内,应用所制备的固定相连续分离复方丹参注射液 2 个月,原儿茶醛和丹参素的保留时间在 (31.5 ± 0.5) min 之间变化。这些结果说明 δ -葡萄糖酸内酯键合固定相具有良好的稳定性。可以预计,该固定相在中药的强极性组分分离分析中具有一定的应用价值。

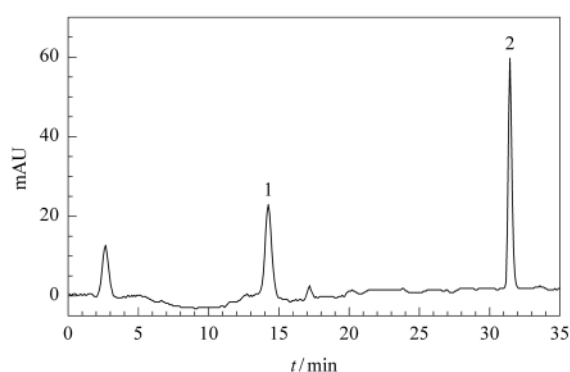


图 6 δ -葡萄糖酸内酯键合固定相对复方丹参注射液的分离谱图

Fig. 6 Chromatogram of Danshen injection on δ -gluconolactone-bonded stationary phase

Chromatographic column: δ -gluconolactone bonded column (100 mm $\times$ 4.6 mm); mobile phase: acetonitrile-15 mmol/L ammonium acetate aqueous solution (pH 5.2)(85:15, v/v).

Solutes: 1. protocatechuic aldehyde; 2. danshensu.

3 结语

本文用硅胶与氨丙基三甲氧基硅烷反应,再与 δ -葡萄糖酸内酯反应,制备了一种多羟基化合物修饰的亲水色谱固定相。该固定相对 6 种酚酸和糖苷以及丹参注射液具有良好的分离性能。所制备的固定相为强极性中药组分分离分析提供了一种新的可供选择的色谱固定相,具有一定的应用前景。

参考文献:

[1] Alpert A J. J Chromatogr A, 1990, 499: 177

- [2] Liang X M. Chinese Journal of Chromatography (梁鑫淼. 色谱), 2011, 29(3): 191
- [3] Huang G H, Chen S J, Lin X C, et al. Chinese Journal of Chromatography (黄桂华, 陈思谨, 林旭聪, 等. 色谱), 2010, 28(12): 1173
- [4] Zhuo R J, Wang L, Wang L X, et al. Chinese Journal of Chromatography (卓荣杰, 王莉, 王龙星, 等. 色谱), 2010, 28(4): 379
- [5] Lin X C, Lin X, Wang J B, et al. Chinese Journal of Chromatography (林旭聪, 林霞, 王家斌, 等. 色谱), 2010, 28(3): 284
- [6] Mei S B, Hou J, Zhang W G, et al. Chinese Journal of Chromatography (梅少博, 侯晋, 张文国, 等. 色谱), 2010, 28(12): 1189
- [7] Oyler A R, Armstrong B L, Cha J Y, et al. J Chromatogr A, 1996, 724: 378
- [8] Yu L, Li X L, Guo Z M, et al. Chem Eur J, 2009, 15: 12618
- [9] Guo Z M, Lei A W, Zhang Y P, et al. Chem Commun, 2007, 43: 2491
- [10] Tanaka H, Zhou X J, Masayoshi O. J Chromatogr A, 2003, 987: 119
- [11] Ikegami T, Tomomatsu K, Takubo H, et al. J Chromatogr A, 2008, 1184: 474
- [12] Hemstrom P, Irgum K. J Sep Sci, 2006, 29(12): 1784
- [13] Han C, Dai X J, Lei G H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (韩超, 戴小军, 雷根虎, 等. 分析化学), 2010, 38(11): 1615
- [14] He Y, Wei Y M, Zheng X H, et al. Electrophoresis, 2010, 31(4): 630
- [15] Wang Q C, Svec Jean F, Fréchet J M J. Anal Chem, 1995, 67(3): 670
- [16] Geng X D, Bian L J. Science in China: Series B (耿信笃, 边六交. 中国科学 B 辑), 1992, 35(3): 263
- [17] Geng X D. Acta Chimica Sinica (耿信笃. 化学学报), 1995, 53(4): 369