

# 高效液相色谱槲皮素键合硅胶固定相分离极性化合物

方奕珊 李来生\* 陈红 张杨

(南昌大学分析测试中心 南昌 330047)

**摘要** 槲皮素是一种植物体中含量丰富、价格较便宜的黄酮类化合物,本研究以  $\gamma$ -[(2,3)-环氧丙氧]丙基三甲氧基硅烷(KH-560)为偶联剂,将其化学键合到硅胶上,得到一种含天然配体的槲皮素键合硅胶固定相(QUSP)。采用红外光谱、热重分析、元素分析及固体核磁对其结构进行表征,测得硅胶表面槲皮素的键合量为0.139 mmol/g。采用不同结构的溶质作探针,在评价固定相反相液相色谱疏水作用性能的基础上,侧重研究新固定相对极性芳香族化合物的分离能力,探讨了新固定相的色谱分离机理。研究表明,仅采用甲醇或乙腈-水简单流动相,无需用缓冲液精确控制 pH 值,QUSP 就能分别实现吡啶类、芳胺类、苯酚类、苯甲酸类和黄酮类等极性化合物的快速基线分离。QUSP 键合的槲皮素除含疏水性的  $C_6-C_3-C_6$  骨架外,黄酮环还能提供氢键、偶极、 $\pi-\pi$ 、电荷转移等多种作用位点,各种协同作用有利于提高色谱分离选择性,尤其对极性的可离子化的酸性和碱性化合物。

**关键词** 高效液相色谱法,槲皮素键合硅胶固定相,天然配体,色谱性能评价,色谱分离机理

中图分类号:O657.7

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)01-0079-09

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.00489

高效液相色谱(HPLC)是近年来发展最快、应用最广的一种现代分离分析技术,其分离过程一般在常温下进行,不依赖于物质的挥发性和热稳定性,对药物和生化样品有较好的兼容性,已发展成为药物、生化、食品、环境、化工、商检、法医检验和科学研究不可缺少的分析手段之一<sup>[1]</sup>。其中以碳十八硅烷键合硅胶固定相( $C_{18}$ 或 ODS)的反相色谱出色地完成了60%以上的液相色谱分析任务,与正相色谱相比,反相色谱有明显的优势,它可直接进样分析水溶性样品,因而适用范围广,被誉为“标准固定相分离模式”<sup>[2]</sup>。然而,ODS 由于单一的疏水性分离机理,对极性疏水性弱的化合物保留能力弱,分离选择性有限;而对疏水性强的非极性化合物却因保留太强,溶质不易被洗脱,分析时间长。为弥补上述不足常依赖于梯度洗脱方式来解决复杂样品的分离问题<sup>[3]</sup>。建立同时适用快速分离极性、非极性,尤其是碱性化合物复杂体系的方法仍是一个活跃的研究课题<sup>[4]</sup>。

Kirkland 等<sup>[5-6]</sup>将侧链含异丙基和异丁基的  $C_{18}$  长链和一批双齿型键合硅胶作为固定相,黄晓佳等<sup>[7-8]</sup>先后制备了新型烷基醚型、酯型、酰胺型、胺型、双胺型等一系列优良的分离碱性化合物的新型色谱柱填料。这类固定相利用  $C_{18}/C_{18}$  双齿型烷基链或侧位大基团的空间立体效应能有效屏蔽溶质与硅醇基的相互作用,对碱性化合物显示较高的柱效。O'Gara 等<sup>[9]</sup>制得含有内嵌氨基甲酸酯基团的固定相,由于静电和立体阻碍作用,硅醇基的活性也能很好地被抑制,可在较简单的流动相条件下有效地分离碱性化合物,但上述制备方法均涉及复杂的配体合成反应,制备成本高,适用于实验室用做分析型色谱固定相。

近年来,我们直接选用中草药中主要药用成分,如植物中的大蒜素、大黄素、姜黄素等为配体,制备和评价了其色谱分离功能,实现对一些极性和碱性化合物的有效分离<sup>[10-11]</sup>。这类天然药用配体具有大平面的共轭  $\pi$  电子芳香环体系,环上带有多个极性或氢键型基团,活性位点多,作用力种类丰富,因而具有作为反相色谱配体良好的结构条件。在固定相表面引入多种作用位点不仅能有利于提高固定相对

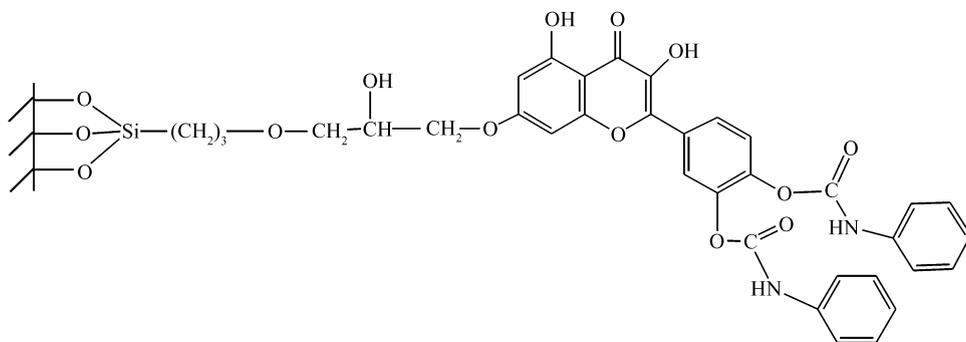
2011-11-03 收稿,2011-12-27 修回

国家自然科学基金(21165012)、江西省自然科学基金(2010GZH0089)、江西省教育厅科技(GJJ1274)资助项目

通讯联系人:李来生,教授; Tel:0791-88304414; Fax:0791-88321370; E-mail:lilaishengcn@163.com; 研究方向:色谱分析与生化分析

溶质的分子识别能力,大平面的共轭芳香环体系能有效地捕获溶质,从而削弱溶质与硅醇基的作用力,实现对极性化合物快速分离的目的,弥补 ODS 柱的不足。直接利用中草药有效成分作固定相配体,可简化配体的复杂合成步骤,扩大制备规模,有望成为工业色谱分离材料,用于高附加值产品的绿色开发<sup>[12]</sup>。

槲皮素是一种具有多种生物活性的最常见的黄酮类化合物,广泛地存在于植物的花、叶和果实中。它具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用<sup>[13]</sup>。同时由于它本身具有典型的 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 黄酮类骨架,富含极性基团,易与各种溶质发生多种作用。我们制备了一种槲皮素键合硅胶固定相( quercetin-bonded silica stationary phase, QUSP, Scheme 1),有关其制备方法、结构表征和基本色谱性能的评价已进行了报道<sup>[14]</sup>,本文在此基础上进一步考察 QUSP 对更广泛的化合物的分离能力,从不同的角度较深入地研究保留机理,为槲皮素键合硅胶将来用做工业色谱填料提供理论依据。



Scheme 1 Chemical structure of a quercetin-bonded silica gel stationary phase(QUSP)

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

ZQ-4000/2695 型高效液相色谱仪(美国, Waters 公司),配有 2695 型自动进样器,2996 型二极管阵列检测器和色谱工作站 Masslynx V4.1。Vario EL III 元素分析仪(德国 Elementar 公司),5700 型红外光谱仪(Nicolet 公司),DTA/TG 同步热分析仪(美国 Perkin-Elmer 公司),Avance III 400 MHz 宽腔固体核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker BioSpin 公司),KQ3200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZKF-030 型电热真空干燥箱(上海实验仪器总厂)。

球形硅胶(粒径 10  $\mu\text{m}$ ,比表面积约为 260 ~ 280  $\text{m}^2/\text{g}$ ,青岛美高化工有限公司), $\gamma$ -[(2,3)-环氧丙氧]丙基三甲氧基硅烷(KH-560,武汉大学有机硅新材料股份有限公司),槲皮素(四川世坤植化公司,纯度  $\geq 94.2\%$ ),芦丁等黄酮类化合物购于中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为 HPLC 色谱淋洗剂,购于上海陆都化学试剂厂。吡啶类、苯胺类、苯甲酸类和苯酚类化合物以及无水甲苯和三乙胺均为分析纯试剂,分别购于国药集团上海化学试剂公司。水为二次蒸馏水。

### 1.2 键合固定相(QUSP)的制备

槲皮素键合硅胶固定相(QUSP)的结构如 Scheme 1 所示,制备过程基本步骤如下<sup>[14]</sup>:1)先用稀盐酸处理硅胶,并用蒸馏水洗至中性,在 160  $^{\circ}\text{C}$  下烘烤除水活化;2)将活化硅胶悬浮于无水甲苯中,加入 KH-560 偶联剂和几滴三乙胺催化剂, $\text{N}_2$  气保护下回流反应 24 h,制得含环氧基的偶联剂键合硅胶(GBS);3)用无水甲苯溶解一定量的槲皮素,随后加入上述偶联剂键合硅胶(GBS)和几滴高氯酸,在  $\text{N}_2$  气保护下,回流反应 12 h,过滤出的固体经洗涤和烘干;4)将上步得到产物分散到甲苯中,加入一定量的异氰酸苯酯将部分活泼的酚羟基转变成氨基甲酸酯,最终制得槲皮素键合硅胶固定相(QUSP)。该固定相分别通过元素分析、红外光谱分析、热重分析和固体核磁表征,根据元素分析碳质量百分含量,计算出 QUSP 配体的键合量为 0.139  $\text{mmol}/\text{g}$ 。在显微镜下观察到 QUSP 仍保持分散性球形硅胶颗粒(粒径约 10  $\mu\text{m}$ ),按 2.1 节装柱后柱压与同粒径的商业柱相当,表明新固定相具有良好的渗透性和机械强度,适

用作高效液相色谱柱填料。

### 1.3 QUSP 柱的填充与色谱方法

以异丙醇为匀浆剂,甲醇为顶替液,采用匀浆法装柱,用一台日本岛津 LC-6A 泵在恒压模式下将新固定相 QUSP 填入不锈钢色谱柱管(4.6 mm × 150 mm)中,填充压力为 25 MPa。用于对照研究的 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm)填装 Waters Symmetry C<sub>18</sub>(5 μm)。QUSP 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。流动相用 G4 砂芯漏斗过滤,超声脱气 10 min,溶质一般用少量甲醇溶解后,然后流动相定容,浓度一般为 50 ~ 250 mg/L,二极管阵列检测波长范围为 220 ~ 280 nm,进样量 10 μL,流速为 0.8 mL/min,柱温为室温(25 ± 2) °C。以甲醇溶剂峰的保留时间为死时间,所有样品至少平行测定 2 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 柱效与稳定性考察

以联苯为溶质探针, $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=40:60$  为流动相,流速为 0.8 mL/min,在 QUSP 中的保留时间为 14.80 min,测得理论塔板数为 16627 块/米。QUSP 柱的柱效低于商品 ODS 柱,可能与硅胶品质、键合量、配体性质和简单的填充技术等因素有关。为考察新固定相表面配体对流动相的稳定性,采用  $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=40:60$  或  $V(\text{甲醇}):V(0.02 \text{ mol/L 醋酸钠})=60:40$  (pH = 3.5) 反复交替冲洗 QUSP 柱长达 7 d,测得联苯的保留时间为  $(14.80 \pm 0.2) \text{ min}$  ( $n > 10$ ),变化很小,这表明新固定相能耐常见有机溶剂和酸的冲洗,色谱柱性能较稳定,溶质保留重现性好。

### 2.2 疏水性的考察

以 5 种烷基苯同系物(苯、甲苯、乙苯、丙苯和丁苯)为探针,通过与 ODS 柱对比,考察了键合相的疏水性。以  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=50:50$  为流动相时,5 种同系物分离良好,苯同系物的保留因子的对数 ( $\lg k'$ ) 与同系物烷基链中的亚甲基数 ( $n$ ) 之间具有良好的线性关系,  $\lg k' = 0.2057n + 0.3544$ ,  $r = 0.9946$  (QUSP),这符合碳数规律,表明槲皮素配体由于含疏水性骨架,主要以疏水作用的反相色谱机理来分离中性的苯同系物。在相同的色谱条件下,测得 ODS 柱上同系物的  $\lg k'$  与亚甲基数 ( $n$ ) 之间的关系式为:  $\lg k' = 0.4252n + 0.3298$ ,  $r = 0.9998$  (ODS)。这表明 QUSP 类似于 ODS,同属反相色谱固定相,只不过前者的疏水性较后者弱,这可能是由于槲皮素结构中除疏水性骨架外,还含较多的极性羰基、羟基的缘故。

### 2.3 碱性化合物的分离

碱性化合物广泛存在于环境、农业以及制药等领域,据统计,约 60% 的药物具有碱性基团,建立分离碱性化合物的有效方法对药物质量控制、临床分析和药物代谢研究具有重要作用。解决碱性化合物的峰拖尾问题,也是考察硅胶基质固定相性能的重要方面。本研究将 QUSP 用于吡啶类和苯胺类碱性化合物的色谱分析。

**2.3.1 亲硅醇基作用的考察** 根据疏溶剂理论,一般在反相模式分离中,当硅胶固定相存在残留硅醇基时,由于硅醇基易解离,可以与溶质阳离子或氢键基团相互作用产生“亲硅醇基效应”,在分离碱性化合物时会使色谱峰拖尾,保留因子 ( $k'$ ) 的对数与流动相中有机改性剂含量的关系将呈“U”形状曲线<sup>[15]</sup>。为了考察 QUSP 的亲硅醇基作用,本实验在甲醇-水为二元流动相条件下,考察了甲醇浓度对吡啶、3-甲基吡啶、甲萘胺、对甲基苯胺、联苯胺 5 种常

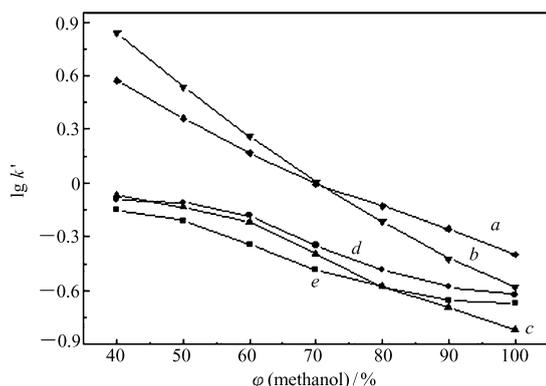


图1 在 QUSP 上碱性化合物的  $\lg k'$  与甲醇含量 ( $\varphi$ ) 的相关曲线

Fig. 1 Plot of  $\lg k'$  of basic compounds versus methanol content ( $\varphi$ ) in the mobile phases

Mobile phases: methanol-water, flow rate: 0.8 mL/min

a. 4,4'-diphenylenediamine; b. 1-naphthylamine;  
c. 4-methylaniline; d. 3-methylpyridine; e. pyridine

见的碱性物质在 QUSP 柱上的保留行为的影响(图 1),实验发现,这 5 种碱性物质的保留因子( $k'$ )均随流动相甲醇含量的增大而减小,显然这种变化与反相色谱行为相符,并未出现“U”形曲线,这说明固定相中亲硅醇基效应得到了有效的抑制。可能是 QUSP 的槲皮素配体含羰基和酰胺键等极性基团,一方面通过多种作用更易捕获碱性溶质,另一方面又能与硅醇基形成氢键,从而降低碱性溶质直接与硅醇基作用的几率,达到有效抑制“亲硅醇基效应”的目的,具有一定的立体屏蔽作用。

2.3.2 吡啶类化合物的分离 图 2 为 5 种代表性的吡啶类化合物(4-羟基吡啶、3-羟基吡啶、4-氰基吡啶、3-甲基吡啶、氯羟吡啶)在 QUSP 柱和 ODS 柱上的分离色谱图。从图 2A 可见,以简单的甲醇-水为流动相,无需调节 pH 值,5 种吡啶类化合物在 QUSP 柱上得到了基线分离,分析时间约 12 min。可是,以甲醇-水做流动相在 ODS 柱上却很难得到良好的分离结果(图 2B),在同等条件下 ODS 的选择性有限,为了寻找 ODS 的最佳分离条件,优化  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=22:78$ ,即便如此,也只实现了部分分离,且峰有一定的扩展,柱效降低。这是因为碱性溶质易质子化,不调节流动相 pH 值,ODS 的分离效果不好。

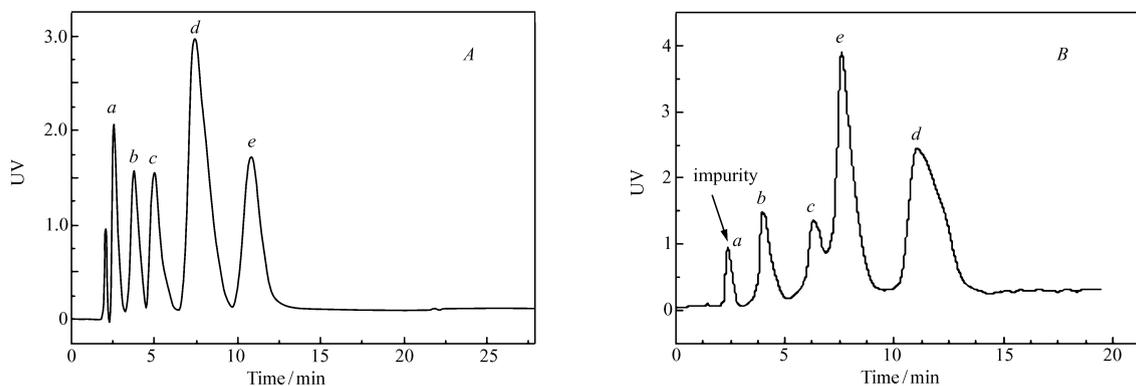


图 2 吡啶类化合物在 QUSP(A) 和 ODS(B) 上的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of pyridines on QUSP(A) and ODS(B)

Mobile phases: A. methanol-water(35:65, V/V) for QUSP; B. methanol-water(22:78, V/V) for ODS; flow rate: 0.8 mL/min.

Peaks: a. 4-hydroxy pyridine; b. 3-hydroxy pyridine; c. 4-cyanopyridine; d. 3-methylpyridine; e. clopidol

由于 5 种溶质均来源于同样的吡啶母体,因此吡啶环上的取代基较大程度地支配着溶质的色谱行为,如极性强的羟基吡啶首先被洗脱,带有一  $\text{CH}_3$  的甲基吡啶最后被洗脱。ODS 按疏水性大小来分离,保留顺序为 4-羟基吡啶 < 3-羟基吡啶 < 4-氰基吡啶 < 氯羟吡啶 < 3-甲基吡啶(图 2B)。5 种溶质在 QUSP 柱与 ODS 柱的保留顺序大致相同,说明 QUSP 柱上的分离也主要基于疏水作用。

然而,吡啶类化合物在 QUSP 上的保留顺序与 ODS 并不完全一致,例如:氯羟吡啶在 ODS 柱上先于 3-甲基吡啶被洗脱,这是因为氯羟吡啶的结构中尽管含 2 个甲基和 2 个氯,但吡啶环上的羟基极性很强,易电离,因此其疏水性弱于 3-甲基吡啶。可是,在 QUSP 柱上,前者由于带有极性羟基,为氢键给体,而 QUSP 上的羰基为氢键受体,氢键作用和偶极-偶极作用增强氯羟吡啶与固定相的作用,故最后被洗脱。从图 2A 和 2B 的比较中,不难发现非疏水作用对提高分离选择性也有重要贡献,可电离的吡啶仅依靠单一的疏水作用达完全分离存在困难,且峰展宽。而 QUSP 还能为溶质提供氢键、偶极- $\pi$ - $\pi$  作用,增强对不同吡啶结构的识别能力,即使用简单的甲醇-水流动相,分离选择性也有一定的提高。另外值得一提的是,上述吡啶在 QUSP 上的作用明显强于 ODS,前者流动相甲醇含量为 35%,而后者仅为 22%,暗示着吡啶环与槲皮素黄酮环平面层叠的  $\pi$ - $\pi$  作用明显存在,使吡啶类化合物与 QUSP 作用普遍加强。

2.3.3 苯胺类化合物的分离 考察了 5 种苯胺类化合物(对苯二胺、磺胺、对氯苯胺、邻硝基苯胺、二苯胺)分别在 QUSP 和 ODS 上的色谱分离,见图 3。比较图 3A 和 3B 可以发现,在简单的流动相(甲醇-水)条件下,QUSP 对 5 种苯胺类化合物的分离优于 ODS,且分析时间短。对苯二胺结构中由于存在 2 个氨基,极性较强,疏水性最弱,在两柱子上均最先被洗脱下来。二苯胺结构中含有 2 个苯环,疏水性最强,

保留强最后被洗脱。邻硝基苯胺由于分子内氢键,疏水性增强,其保留仅次于二苯胺,这一变化与 ODS 相类似,5 种溶质在 QUSP 柱与 ODS 柱的保留顺序也大致相同,说明疏水作用的存在。同时,二苯胺在 QUSP 上的保留明显弱于 ODS,也证明其疏水性比 ODS 弱,这与两固定相的疏水性大小相符。

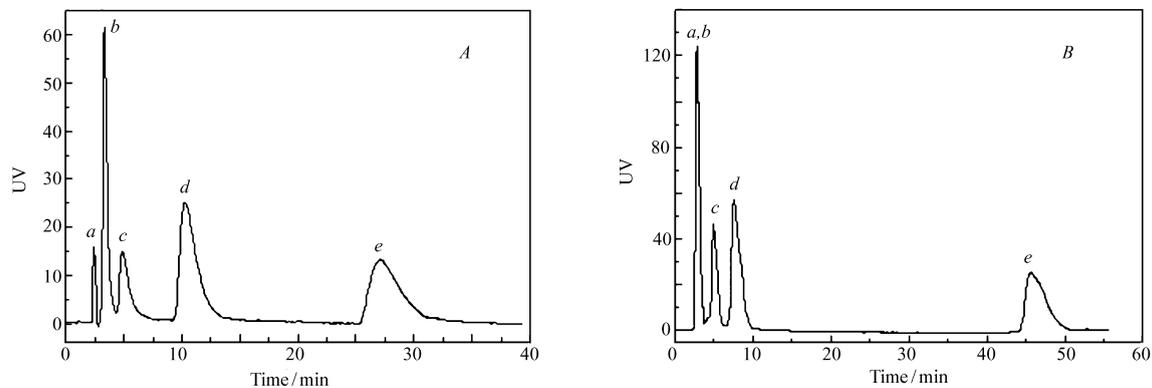


图3 苯胺类化合物在 QUSP(A) 和 ODS(B) 上的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of anilines on QUSP(A) and ODS(B)

Mobile phases: methanol-water(50:50, V/V); flow rate: 0.8 mL/min

Peaks: a. *p*-phenylenediamine; b. sulfanilamide; c. *p*-chloroaniline; d. *o*-nitroaniline; e. diphenylamine

其中,对苯二胺和磺胺两溶质疏水性相当,在 ODS 柱上发生重叠,尽管降低流动相中的甲醇含量也能使对苯二胺和磺胺产生分离,但整体分析时间太长,且苯二胺不出峰,即无法被洗脱,需要梯度洗脱才能解决上述问题。而在同等条件下,对苯二胺和磺胺两物质在 QUSP 柱上得到良好的分离,这是因为槲皮素配体的羰基可与溶质的一NH<sub>2</sub>基间产生氢键和偶极作用,从而使疏水性相近的对苯二胺和磺胺在短时间内产生分离。

第4号峰(邻硝基苯胺)的保留时间在 QUSP(11 min)和 ODS(8 min)上有明显差别,这说明吸电子的硝基有利于加强邻硝基苯胺与槲皮素平面环间  $\pi$ - $\pi$  重叠和电荷转移作用,这样使得邻硝基苯胺与第3号峰(对氯苯胺)分离得更好。二苯胺疏水性较强,在 ODS 上保留时间为 47 min,而在 QUSP 上只有 27 min,明显地, QUSP 可以采用等度洗脱分离较复杂的样品,多种作用对疏水性弱的极性溶质显示较高的分离选择性。

## 2.4 酸性化合物的分离

苯酚和芳香酸类化合物不仅是重要的医药化工原料,也是水体中分布广泛的环境污染物。这类酸性溶质在水中易电离,以分子和离子形式存在,在 ODS 反相色谱分离需要控制 pH 值来抑制其电离。本研究发现, QUSP 在乙腈-水作流动相中,无需调节 pH 值,就能分别实现苯酚类和苯甲酸类酸性化合物的基线分离。

2.4.1 苯酚类化合物的分离 以7种酸性苯酚类物质(邻氨基苯酚、邻苯三酚、苯酚、对硝基苯酚、邻硝基苯酚、2-硝基-1-萘酚、1-亚硝基-2-萘酚)为溶质,分别考察了它们在 QUSP 和 ODS 上的色谱行为,参见图4A和4B。由图4可见,邻氨基苯酚和邻苯三酚被最先洗脱,是因为两溶质带多个极性基团,疏水性弱。2-硝基-1-萘酚和1-亚硝基-2-萘酚保留较强,被最后洗脱,这与疏水性的萘环有关。从整体来看,这些酚类化合物在 ODS 和 QUSP 上保留顺序大致相同,说明疏水作用对其分离起主导作用,这归因于两柱的反相色谱性能。

比较图4A和4B可以看出,在简单的乙腈-水流动相条件下, QUSP 对7种苯酚类化合物的分离明显优于 ODS 柱。其中,对硝基苯酚与邻硝基苯酚在 ODS 柱上分离度较小,2-硝基-1-萘酚与1-亚硝基-2-萘酚也分不开,这是因为疏水性相近, ODS 对它们的分离选择性有限,加之溶质电离导致峰展宽或变形,即使优化条件也难以达到好的分离效果。而在 QUSP 上得到较好的分离,显然二者的分离机理不同,

QUSP 对溶质的分离不完全靠疏水作用,它可为电离性溶质提供诸如氢键、偶极-偶极等作用。从 3 对疏水性相近的溶质(邻氨基苯酚与邻苯三酚、对硝基苯酚与邻硝基苯酚、2-硝基-1-萘酚与 1-亚硝基-2-萘酚)分离中容易看出多作用力的贡献。

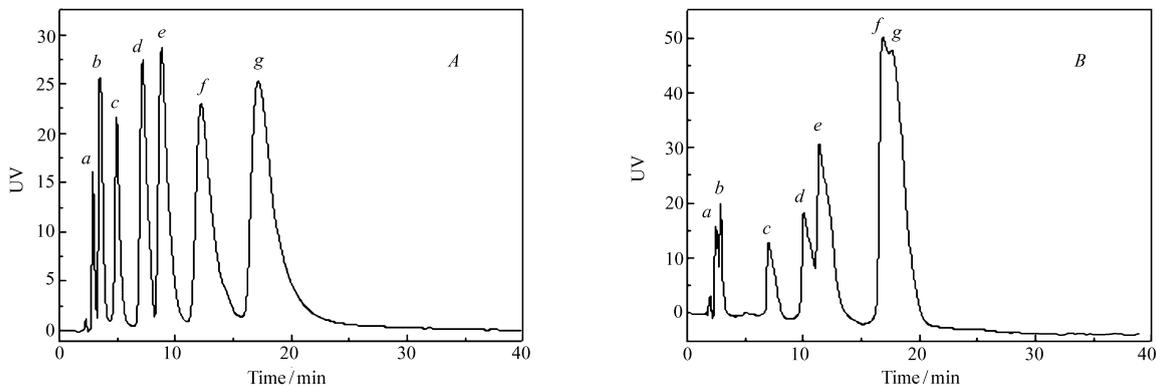


图4 苯酚类化合物在 QUSP(A)和 ODS(B)上的色谱图

Fig.4 Chromatograms of phenols on QUSP(A) and ODS(B)

Mobile phases: acetonitrile-water(30:70, V/V); flow rate:0.8 mL/min

Peaks; a. *o*-aminophenol; b. benzene-1,2,3-triol; c. phenol; d. *p*-nitrophenol; e. *o*-nitrophenol; f. 2-nitro-1-naphthol; g. 1-nitroso-2-naphthol

2.4.2 苯甲酸类化合物的分离 图 5A 和 5B 为没食子酸、间苯二酸、对甲基苯甲酸、对硝基苯甲酸和水杨酸分别在 QUSP 和 ODS 上的分离色谱图。从图中可看出, QUSP 在流动相中乙腈含量(33%)比 ODS 柱(25%)高的情况下,对 5 种溶质的分离优于 ODS 柱,且分离时间较短。从流动相中乙腈含量可以推测这些羧酸在 QUSP 上的保留均强于 ODS,说明羧酸电离会大大降低溶质的疏水性,使其与 ODS 作用力减弱,而在 QUSP 上情况不同。明显地,具有一定碳链长度的功能分子均会有明显的疏水分配作用,槲皮素不同于 ODS 的是其分子中有一些极性基团和可以形成氢键的基团,这才是它改善极性分子分离的关键所在。

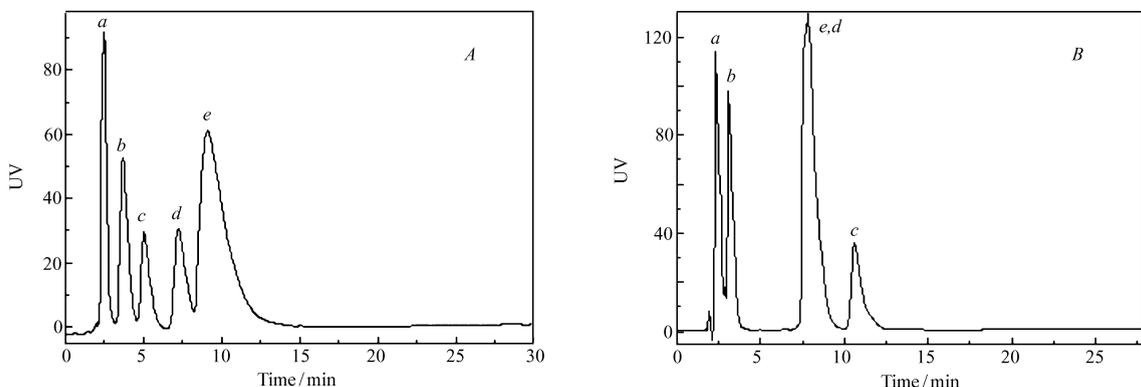


图5 苯甲酸类化合物在 QUSP(A)和 ODS(B)上的色谱图

Fig.5 Chromatograms of benzoic acids on QUSP(A) and ODS(B)

Mobile phases: A. acetonitrile-water(33:67, V/V) for QUSP; B. acetonitrile-water(25:75, V/V) for ODS, flow rate:0.8 mL/min

Peaks; a. gallic acid; b. isophthalic acid; c. 4-methylbenzoic acid; d. *p*-nitrobenzoic acid; e. salicylic acid

从图中也不难发现,溶质在 QUSP 上的保留顺序与 ODS 并不完全一致,对甲基苯甲酸 < 对硝基苯甲酸 < 水杨酸(QUSP, 图 5A), 水杨酸 < 对硝基苯甲酸 < 对甲基苯甲酸(ODS, 图 5Bb)。以水杨酸为例,由于苯环上同时含有极性羟基和羧基,疏水性在上述 3 种溶质最弱,在 ODS 上保留最短,可是在 QUSP 上保留却最长,因此分离这些可电离性溶质必定存在其它作用机制。在 QUSP 柱上,水杨酸除本身易形

成分子内氢键外,也与 QUSP 配体之间有着较强的氢键作用和偶极作用,故保留最强,最后被洗脱。另外,硝基苯甲酸中硝基的吸电子效应使其作为电子受体与 QUSP 配体的大  $\pi$  电子体系也发生了较强的电荷转移作用,通过协同作用,使得其在 QUSP 上的保留较对甲基苯甲酸强。因此,配体的丰富作用位点,更有利于分离极性的可电离性溶质,甚至无需精确调节 pH 值也能达到基线分离,缩短了建立分析方法的时间。

## 2.5 黄酮类化合物的分离

黄酮类化合物是以  $\alpha$ -苯基苯并吡喃酮为主体的一系列物质的总称。黄酮类物质作为一类具有多种生理活性的天然物质,它常以黄酮苷或黄酮苷元形式存在于水果、蔬菜和豆类等多食源性植物中。由于黄酮类化合物具有多种药理作用,在药用方面具有很大的重要性,是一类具有广泛开发前景的天然药物,分离和纯化黄酮类化合物均有重要意义和实用价值<sup>[16]</sup>。槲皮素是最具代表性的黄酮类化合物,具有特征的  $C_6-C_3-C_6$  结构。根据相似性作用原理,本实验考察槲皮素配体的黄酮环对 5 种常见的黄酮类化合物的分离能力(芦丁、大豆苷、染料木素、紫花牡荆素、黄芩苷)。

图 6 为 5 种黄酮类化合物在 QUSP 和 ODS 柱的色谱图。从图 6 可以看出,5 种黄酮类化合物在 QUSP 上的分离相对较好,保留顺序为:芦丁 < 大豆苷 < 染料木素 < 紫花牡荆素 < 黄芩苷。而在 ODS 其出峰顺序为:芦丁 < 黄芩苷 < 大豆苷 < 染料木素 < 紫花牡荆素。可见两柱对黄酮类化合物分离选择性存在一定的差别,其中黄芩苷的行为最为明显,这说明分离机理的差异性。

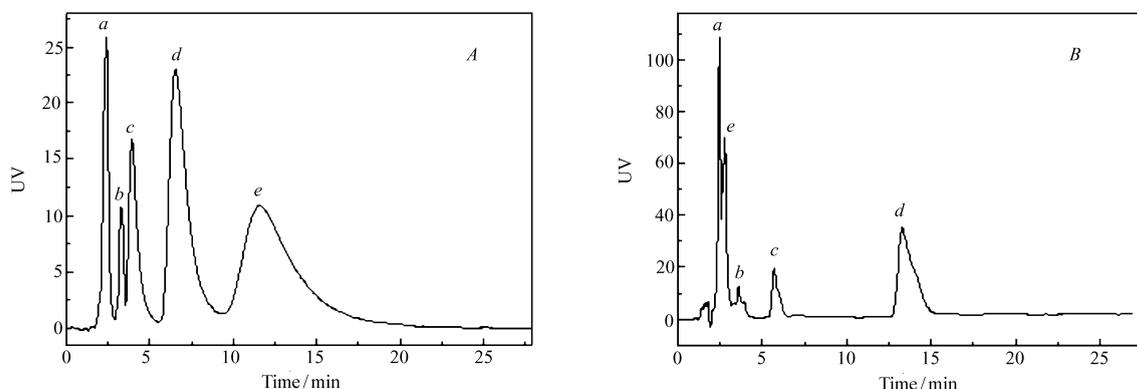


图 6 黄酮类化合物在 QUSP(A) 和 ODS(B) 上的色谱图

Fig. 6 Chromatograms of flavonoids on QUSP(A) and ODS(B)

Mobile phases: acetonitrile-water(33:67, V/V); flow rate: 0.8 mL/min. Peaks: a. rutin; b. daidzin; c. genistein; d. casticein; e. baicalin

从图 6B 中可知,芦丁、黄芩苷和大豆苷在 ODS 上的保留时间短,由于它们的结构中含有多羟基的糖基或糖酸基,亲水性的糖基增强了极性易被洗脱,但由于分子极性接近,这几种几乎一齐被洗脱。紫花牡荆素结构中含有 4 个  $-CH_3O$ ,疏水性相对较强,在 ODS 柱上被最后洗脱。从图 6A 中发现,QUSP 有较强的能力识别含极性的糖基的黄酮,展示更好的分离,可能是因为槲皮素与被分离溶质间有类似的平面黄酮环,更易接近溶质,通过氢键或偶极等作用识别溶质黄酮环不同位置上的取代基,导致作用力的差异而产生分离。黄芩苷是典型的黄酮糖苷,其黄酮苷元骨架与槲皮素相似,结构上富含极性羟基或羧基,黄芩苷分子与配体槲皮素分子间结构上更匹配,通过氢键、偶极、 $\pi$ - $\pi$  等协同作用加强与 QUSP 的作用力,故在最后被洗脱。由此可见,疏水作用与氢键、偶极、 $\pi$ - $\pi$ 、电荷转移作用相结合,有利用提高对极性化合物的分离选择性,分析条件的选择将变得更简单和便利。

## 3 结论

将天然配体槲皮素与色谱键合硅胶制备技术相结合,采用固液相连续反应法,制备了槲皮素键合硅胶固定相(QUSP)。考察了新固定相对多种相似芳环结构的极性化合物的分离能力,探讨了色谱分离机

理。研究表明, QUSP 具有良好的反相色谱性能, 对中性、碱性、酸性和黄酮类化合物显示较好的分离选择性, 尤其是可有效地用于碱性化合物的分离分析。其保留机理存在疏水作用、氢键作用、 $\pi$ - $\pi$  作用和偶极-偶极作用等多种作用力机制。由于 QUSP 配体中含有典型的 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 黄酮类骨架、酰胺基和极性羰基, 加之本身的药用抗菌功能, 在复杂样品分析和生化样品分析方面有广泛的应用潜力。

### 参 考 文 献

- [1] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L. Practical HPLC Method Development, 2nd Edition[M]. Chichester, New York: John Wiley & Sons Inc, 1997: 1-20.
- [2] Qiu H D, Liang X J, Sun M, *et al.* Development of Silica-based Stationary Phases for High-performance Liquid Chromatography[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, **399**(10): 3307-3322.
- [3] Guillarme D, Russo R, Rudaz S, *et al.* Chromatographic Performance of Silica-Based Stationary Phases in High Temperature Liquid Chromatography: Pharmaceutical Applications[J]. *Curr Pharm Anal*, 2007, **3**(4): 221-229.
- [4] McCalley D V. The Challenges of the Analysis of Basic Compounds by High Performance Liquid Chromatography: Some Possible Approaches for Improved Separations[J]. *J Chromatogr A*, 2010, **1217**(6): 858-880.
- [5] Kirkland J J, Henderson J W. Reversed-Phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases[J]. *J Chromatogr Sci*, 1994, **32**(11): 473-480.
- [6] Kirkland J J, Adams J B, Straten M A, *et al.* Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography[J]. *Anal Chem*, 1998, **70**(20): 4344-4352.
- [7] HUANG Xiaojia, WANG Junde, LIU Xueliang. Synthesis, Characterization and Evaluation of a Novel Double-amine Packing for Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2002, **30**(9): 1048-1052 (in Chinese).  
黄晓佳, 王俊德, 刘学良, 等. 双胺型键合固定相的制备及评价[J]. *分析化学*, 2002, **30**(9): 1048-1052.
- [8] HUANG Xiaojia, LIU Xueliang, WANG Junde, *et al.* Synthesis, Characterization and Evaluation of a Novel Ester-bonded for Reversed-phase HPLC[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2002, **23**(9): 1684-1687 (in Chinese).  
黄晓佳, 刘学良, 王俊德, 等. 新型酯型反相高效液相色谱填料的制备、表征及性能评价[J]. *高等学校化学学报*, 2002, **23**(9): 1684-1687.
- [9] O'Gara J E, Alden B A, Walter T H. Simple Preparation of a C<sub>8</sub> HPLC Stationary Phase with an Internal Polar Functional Group[J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(20): 3809-3813.
- [10] LI Laisheng, CHEN Xiongquan, YANG Hanrong, *et al.* Preparation and Characterization of a Baicalin-bonded Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2007, **7**(9): 1279-1284 (in Chinese).  
李来生, 陈雄泉, 杨汉荣, 等. 黄芩苷键合硅胶固定相的制备和表征[J]. *分析化学*, 2007, **7**(9): 1279-1284.
- [11] CHEN Huiming, LI Laisheng, MA Haiping, *et al.* Study on the Preparation of Emodin-bonded Silica Stationary Phase and Its Application in Separation of Nucleoside Bases by HPLC[J]. *Chinese J Anal Lab*, 2010, **29**(3): 14-18 (in Chinese).  
陈会明, 李来生, 马海洋, 等. 大黄素键合硅胶固定相的制备及其在核苷碱基药物分离中的研究[J]. *分析实验室*, 2010, **29**(3): 14-18.
- [12] LI Laisheng, YANG Hanrong, LUO Liping, *et al.* Preparation, Characterization and Bacteriostasis of Diallyl Trisulfide-bonded Silica Gel[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2007, **24**(7): 782-785 (in Chinese).  
李来生, 杨汉荣, 罗丽萍, 等. 二烯丙基三硫化物键合硅胶的制备、表征及抗菌作用[J]. *应用化学*, 2007, **24**(7): 782-785.
- [13] LIU Yanfang, QIN Li, ZHANG Da, *et al.* Progress of the Biological Activity of the Quercetin[J]. *Int J Ophth*, 2009, **9**(5): 941-943 (in Chinese).  
刘彦芳, 秦莉, 张达, 等. 槲皮素的生物学活性研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2009, **9**(5): 941-943.
- [14] Li L S, Fang Y S, Chen H, *et al.* Preparation and Characterization of a New Quercetin-bonded Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chin J Chem*, 2012, **30**(5): 1144-1154.
- [15] Marszall M P, Baczek T, Kaliszan R. Reduction of Silanophilic Interactions in Liquid Chromatography with the Use of Ionic Liquids[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, **547**(2): 172-178.
- [16] Merken H M, Beecher G R. Measurement of Food Flavonoids by High-performance Liquid Chromatography: a Review[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**(3): 577-599.

# Study on the Quercetin-bonded Silica Gel Stationary Phase for the Separations of Polar Compounds by High-performance Liquid Chromatography

FANG Yishan, LI Laisheng\*, CHEN Hong, ZHANG Yang

(Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract** Quercetin is one of the abundant and cheap flavonoids in herbs. In this paper, quercetin was first chemically bonded to silica gel. A natural ligand quercetin-bonded silica gel stationary phase (QUSP) was obtained by using  $\gamma$ -[(2,3)-glycidyloxypropyl trimethoxysilane (KH-560) as a coupling agent. Its chemical structure was characterized by infrared spectrometry, thermogravimetric analysis, elemental analysis and  $^{13}\text{C}$  solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). The amount of bonded quercetin was determined to be about 1.39 mmol/g. The reversed-phase property of QUSP based on hydrophobic interaction was first evaluated on high-performance liquid chromatography. The separation abilities of new stationary phase for different polar aromatic compounds were systematically studied by using basic and acidic solutes with different structures as probes. Some retention mechanism in the above separations was also discussed. The results showed that the novel quercetin-bonded stationary phase exhibited high separation selectivity for polar compounds, including pyridines, aromatic amines, phenols, benzoic acids, and flavonoids. The baseline separations of the above species were easily achieved by using only simple methanol or acetonitrile water as the mobile phases without fine adjustment of pH in isocratic mode. This is because besides the hydrophobic  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$  skeleton, the quercetin ligand QUSP can also provide various active sites for polar solutes, such as hydrogen bonding, dipole-dipole,  $\pi\text{-}\pi$  and charge transfer interactions, in which the synergic interactions could improve separation selectivity, especially for the ionized acidic and basic compounds.

**Keywords** high-performance liquid chromatography, quercetin-bonded stationary phase, natural ligand, evaluation of chromatographic property, separation mechanism