

亲水作用电色谱用于吡啶类化合物的分离

付红靖¹, 靳文海¹, 肖 华¹, 黄海伟^{1,2}, 邹汉法¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116011;
2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 采用亲水电色谱对强极性吡啶类化合物进行了分离。以亲水性的强阳离子交换填料作固定相, 乙腈-磷酸-三乙胺缓冲液作流动相, 考察了流动相中有机改性剂含量、离子强度及流动相 pH 对吡啶类化合物保留行为的影响。结果表明, 在亲水电色谱模式下, 流动相中有机改性剂含量对吡啶类化合物保留有较大影响, 随着流动相中乙腈含量的增加, 吡啶类化合物的保留迅速增强, 较高 pH 值有利于吡啶类化合物的峰形改善。实验证明, 亲水电色谱是一种适用于极性化合物分离的新型微分离方法。

关键词 毛细管电色谱, 亲水作用, 吡啶类化合物

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)05-0516-04

Separation of Pyridine Derivatives with Hydrophilic Interaction Capillary Electrochromatography

FU Hongjing¹, JIN Wenhai¹, XIAO Hua¹, HUANG Haiwei^{1,2}, ZOU Hanfa¹

(1. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: The separation of pyridine derivatives with hydrophilic interaction capillary electrochromatography (HI-CEC) on a hydrophilic, strong-cation-exchange stationary phase (Poly Sulfoethyl A) was investigated. The negative surface charge of this stationary phase provided a substantial cathodic electroosmotic flow (EOF). The effects of the acetonitrile content, the ionic strength and the pH value of mobile phase on the migration of pyridine derivatives were studied. The results indicated that the content of organic modifier has great influence on the retention behavior of pyridine derivatives and more symmetrical peaks can be obtained using the mobile phase with higher pH values. The satisfactory separation of pyridine derivatives has been achieved in this mode. It was shown that HI-CEC is a potential technique in the separation of polar compounds.

Key words: capillary electrochromatography; hydrophilic interaction; pyridine derivatives

吡啶类化合物是重要的化工原料,也是药物生产的重要中间体。这类化合物多使用气相色谱^[1,2]、液相色谱^[3,4]等方法进行分析和分离。由于许多吡啶类化合物的极性较强并且蒸气压相近,气相色谱对这类化合物的分析、分离效果不太理想。液相色谱则多采用反相离子对液相色谱的方法对其进行分离。最近有文献报道采用以聚乙烯醇-磷酸缓冲溶液为分离介质的毛细管电泳^[5]和毛细管胶束电动色谱^[6]分离吡啶类化合物。Haddad 等人^[7]采用填充硅胶的离子交换电色谱、低 pH 流动相对吡啶类化合物进行了分离,但峰拖尾严重。Hjertén

等人^[8]采用原位柱电色谱在正相模式下分离了吡啶等极性化合物。

亲水作用电色谱(hydrophilic interaction capillary electrochromatography, HI-CEC)是针对极性化合物分离困难而发展的一种新的分离模式。同正相电色谱相似,HI-CEC所使用的固定相极性较强,因此极性化合物的保留较强。与正相电色谱所不同的是 HI-CEC 所使用的流动相不是正相色谱中所使用的非水流动相,而是有机溶剂含量较高的富水流动相。本文采用 HI-CEC 对吡啶及其衍生物进行分离,考察了流动相中有机改性剂乙腈浓度、离子强度

收稿日期 2002-11-18

作者简介:付红靖,女,1975年生,博士研究生,E-mail: hongjingfu@hotmail.com.

通讯联系人:邹汉法,研究员,博士生导师,Tel (0411)3693407,E-mail: zouhfa@mail.dlptt.ln.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目号 20075032).

及 pH 对吡啶类化合物保留的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Beckman P/ACE 5510 型毛细管电泳仪。Waters 510 泵用于填充电色谱柱。强阳离子交换填料 (Poly Sulfoethyl A, $5\ \mu\text{m}$, $30\ \text{nm}$) 由美国 PolyLC 公司赠送; 毛细管 (内径 $50\ \mu\text{m}$) 购自河北永年光纤厂。

1.2 试剂与溶液

乙腈为色谱纯, β -氨基吡啶、4-甲基吡啶、2,5-二甲基吡啶、3-甲基吡啶、3,5-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、2-氨基吡啶和吡啶均为分析纯。

磷酸三乙胺 (TEAP) 缓冲储备液的配制: 磷酸溶液用三乙胺调至所需 pH 值, 定容至 250 mL (PO_4^{3-} 的浓度为 $500\ \text{mmol/L}$)。

流动相的制备: 将适当体积的乙腈、TEAP 储备液和二次去离子水混合。运行前将流动相超声脱气 20 min。

1.3 电色谱柱的制备

电色谱柱的填充方法参考文献 [9]。电色谱柱总长为 27 cm, 填充长度 20 cm。实验前先用流动相平衡 30 min, 然后在电泳仪上用电压平衡 2 h。

1.4 分离条件

若无特殊说明, 电色谱实验中分离电压为 10 kV, 进样为电动进样 ($5\ \text{kV} \times 5\ \text{s}$), 温度设为 $25\ ^\circ\text{C}$, 检测波长为 254 nm。

2 结果与讨论

在本实验中采用的填料是一种强阳离子交换固定相 Poly Sulfoethyl A, 它是在硅胶表面键合一层聚 2-磺基天冬酰胺。该填料的亲水性很好, 可以在 HIC-CEC 模式下分离极性化合物 [10]。

2.1 电渗流

根据 Ye 等 [11] 在亲水作用电色谱柱上对多种不同极性化合物保留行为的考察, 选择甲苯作为死时间 t_0 的标记物。本文系统考察了流动相中乙腈含量、流动相离子强度以及 pH 值对电渗流的影响。实验结果表明, 随着流动相中有机溶剂乙腈含量的增加, 电渗流也相应的增大。当乙腈含量从 30% (体积分数) 增加到 80% 时, 电渗流线性地从 $10.3\ \text{cm}^2/\text{kV}\cdot\text{min}$ 增加到 $15.2\ \text{cm}^2/\text{kV}\cdot\text{min}$ 。其主要原因是因为随着流动相中有机溶剂含量的增加, 双电层厚度增加, 相应的电渗流也增加。由于所使用的固定相为强阳离子填料, 所以流动相的 pH 值对电渗流的影响没有在以 ODS 等为填料的反相电色谱中明显。当流动相 pH 值从 2.8 增加到 6.0 时, 电

渗流线性地从 $13.5\ \text{cm}^2/\text{kV}\cdot\text{min}$ 增加到 $16.4\ \text{cm}^2/\text{kV}\cdot\text{min}$ 。电渗流随着流动相离子强度的增加而减小, 当流动相中 PO_4^{3-} 的浓度从 $20\ \text{mmol/L}$ 增加到 $200\ \text{mmol/L}$ 时, 电渗流降低了 12%。这是因为随着流动相离子强度的增加, 双电层厚度减小, 相应的电渗流也会减小。

2.2 流动相中乙腈含量对被测物保留行为的影响

图 1 描述了在亲水作用电色谱中, 吡啶类化合物的保留与流动相中乙腈含量之间的关系。由图 1 可见, 随着流动相中乙腈含量的增加, 吡啶类化合物的保留也相应的增强。这种现象在亲水作用液相色谱中也有 [10, 12~16]。因此, 在亲水作用电色谱中, 改变流动相中有机溶剂含量是调节极性化合物保留行为的一种有效方法。

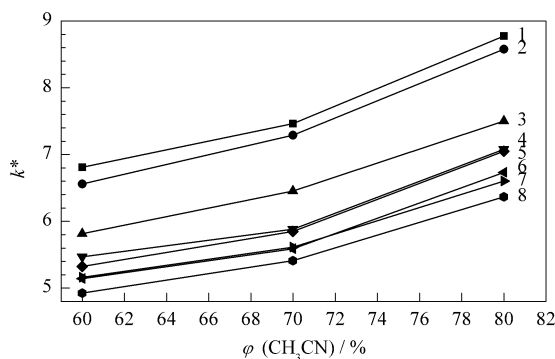


图 1 流动相中乙腈含量对吡啶类化合物保留的影响

Fig.1 Effect of acetonitrile content in the mobile phase on the retention behavior of pyridines

Column: packed with $5\ \mu\text{m}$ Poly Sulfoethyl A, 27 cm (packed length 20 cm) \times $50\ \mu\text{m}$ i. d.. Mobile phase: acetonitrile contents from 60% to 80% in 100 mmol/L TEAP buffer (pH 2.8). Separation voltage: 10 kV.

1. 3-aminopyridine; 2. 2-aminopyridine; 3. pyridine; 4. 4-methylpyridine; 5. 3-methylpyridine; 6. 2,5-dimethylpyridine; 7. 3,5-dimethylpyridine; 8. 2,4,6-trimethylpyridine.

2.3 流动相的离子强度对被测物保留行为的影响

流动相的离子强度对吡啶类化合物保留行为的影响如图 2 所示。实验结果表明, 吡啶类化合物的保留随着流动相离子强度的增加而减小。这一方面是因为流动相离子强度的增加导致电渗流减小, 另一方面原因是吡啶类化合物与固定相离子交换作用随着流动相离子强度的增大而减小。

2.4 pH 对吡啶类化合物保留的影响

流动相的 pH 值决定吡啶类化合物是以分子还是离子化形式存在, 因而对其保留产生影响。图 3 给出了吡啶类化合物的保留行为随流动相 pH 的变化趋势。由图 3 可见, 随着流动相 pH 值的升高, 大多数吡啶类化合物的保留相应增强。这是因为我们所考察的吡啶类化合物的 pK_a 值在 4.6~6.5 内。当流动相的 pH 值较低时, 吡啶类化合物处于质子

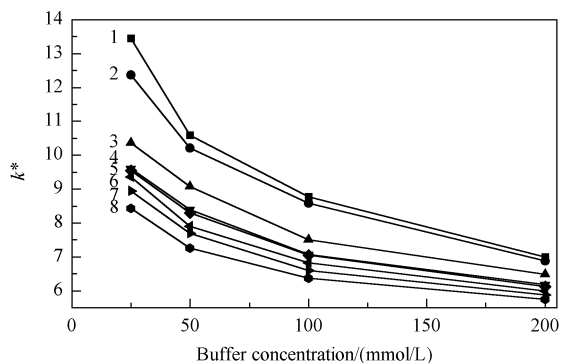


图 2 流动相的离子强度对吡啶类化合物保留的影响

Fig.2 Effect of the eluent ionic strength on the retention behavior of pyridines

Mobile phase : 80% acetonitrile in TEAP buffers with concentrations from 25 to 200 mmol/L (pH 2.8). Others are the same as in Fig. 1.

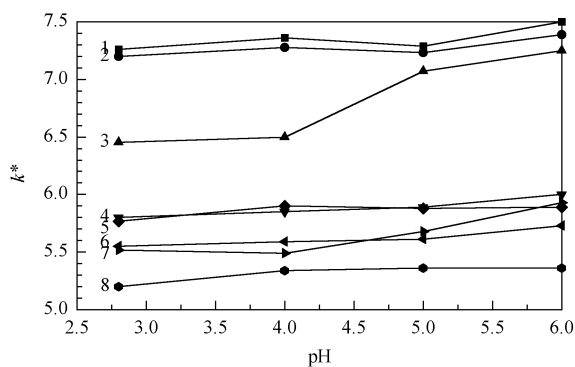


图 3 流动相 pH 对吡啶类化合物保留的影响

Fig.3 Effect of pH value of the mobile phase on the retention behavior of pyridines

Mobile phase : 70% acetonitrile in 100 mmol/L TEAP buffer with pH values of 2.8 , 4 , 5 and 6. Others are the same as in Fig. 1.

化状态,此时其电泳方向与电渗流方向一致,因而保留较小。随着流动相 pH 的升高,吡啶类化合物逐渐失去质子成为电中性分子,电泳作用减小,保留也

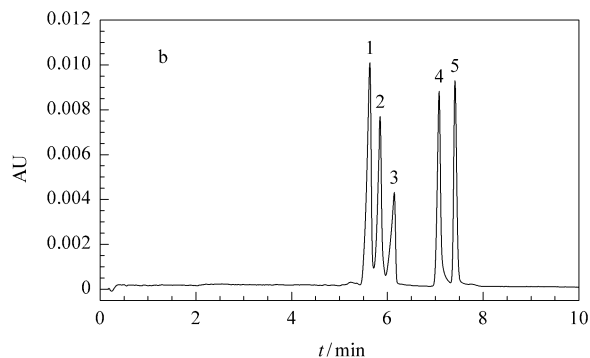
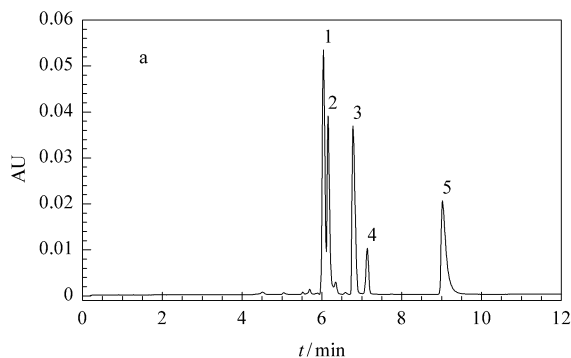


图 5 吡啶类化合物在亲水作用电色谱模式下的分离图

Fig.5 Chromatograms of pyridines in HI-CEC

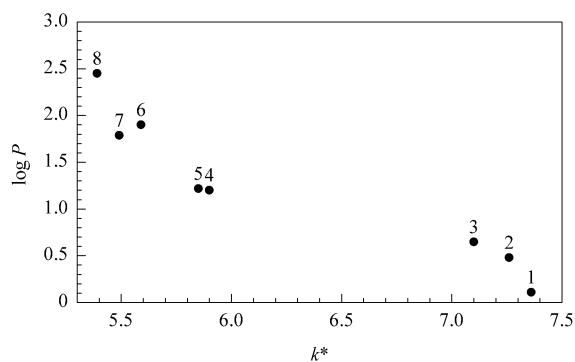
Mobile phase : a. 80% acetonitrile concentration in 100 mmol/L TEAP buffer (pH 2.8); b. 70% acetonitrile concentration in 100 mmol/L TEAP buffer (pH 4.0). Other conditions are the same as in Fig. 1.

1. 2-*δ*-trimethylpyridine ; 2. 3-*δ*-dimethylpyridine ; 3. 2-*δ*-dimethylpyridine ; 4. pyridine ; 5. 3-aminopyridine.

相应的增强。但少数化合物,如氨基吡啶的保留未遵循此规律。

2.5 log P 与 k^* 的关系

通常,化合物的疏水性用其在正辛醇/水中的分配系数 $\log P$ 来表示。吡啶类化合物的 $\log P$ 与其在电色谱中的保留因子 (k^*) 的关系如图 4 所示。由图 4 可见,吡啶类化合物在亲水作用电色谱中的保留随着它们的 $\log P$ 值的增高而降低,与反相色谱相反^[17],具有高 $\log P$ 值的化合物却具有较弱的保留。图 4 中 $\log P$ 与 k^* 的线性相关系数为 -0.93 ,所以在亲水作用电色谱中,亲水作用是吡啶类化合物与固定相间的主要作用。

图 4 吡啶类化合物 log P 与 k^* 的关系Fig.4 Relationship of $\log P$ and k^* of pyridines

Mobile phase : 100 mmol/L TEAP buffer (pH 4.0) containing 70% acetonitrile. Others are the same as in Fig. 1.

2.6 吡啶类化合物的分离

图 5 给出了吡啶类化合物在不同流动相下的分离图。由图 5 可见,结构上具有微小差别的吡啶类化合物在亲水作用电色谱的模式下得到了较好的分离,并且提高流动相的 pH 值对于提高峰的对称性有明显的作

参考文献:

- [1] Titton M C , Nardillo A M. J Chromatogr A , 1995 , 699 : 403
- [2] Husain S , Sarma P N , Swamy S S. J High Resolut Chromatogr , 1991 , 14 : 493
- [3] Ueno K , Fujimoto H , Nishino I , Umeda T. Anal Sci , 1991 , 7 : 727
- [4] LoBrutto R , Jones A , Kazakevich Y V , McNair H M. J Chromatogr A , 2001 , 913 : 189
- [5] Bednár P , Stránský Z , Barták P , Adamovsky P. J Chromatogr A , 1999 , 838 : 89
- [6] Lin C , Chen C , Chen H , Huang H , Lin C , Liu Y. J Chromatogr A , 2001 , 910 : 165
- [7] Klampfl C W , Haddad P R. J Chromatogr A , 2000 , 884 : 277
- [8] Maruška A , Ericso C , Végvári A , Hjertén S. J Chromatogr A , 1999 , 837 : 25
- [9] Zou Hanfa , Liu Zhen , Ye Mingliang , Zhang Yukui. Capillary Electrochromatography and Its Applications. Beijing : Science Press , 2001. 63
- 邹汉法 , 刘震 , 叶明亮 , 张玉奎. 毛细管电色谱及其应用. 北京 : 科学出版社 , 2001. 63
- [10] Alpert A J. J Chromatogr , 1990 , 499 : 177
- [11] Ye M , Zou H , Kong L , Lei Z , Wu R , Ni J. LC-GC , 2001 , 19 : 1 076
- [12] Zhu B Y , Mant C T , Hodges R S. J Chromatogr , 1992 , 594 : 75
- [13] Mant C T , Litowski J R , Hodges R S. J Chromatogr A , 1998 , 816 : 65
- [14] Strega M A. Anal Chem , 1998 , 70 : 2 439
- [15] Olsen B A. J Chromatogr A , 2001 , 913 : 113
- [16] Yoshida T. Anal Chem , 1997 , 69 : 3 038
- [17] Zou Hanfa , Zhang Yukui , Lu Peizhang. High Performance Liquid Chromatography. Beijing : Science Press , 1998. 112
- 邹汉法 , 张玉奎 , 卢佩章. 高效液相色谱法. 北京 : 科学出版社 , 1998. 112

《中国药理学文摘》、《中国药理学文摘》数据库网络版及光盘(2004年)

中国药理学文献数据网络系统即《中国药理学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药理学文献大型检索和查询系统。该系统于1981年创建,主要收载国内外公开发行的700余种医药学及相关学科期刊中的药理学文献,以文摘、简介、题录等形式进行报道。

该系统内容涵盖药理学各个领域,共设12个栏目:药理学理论与发展动态、生药学和中药材、药物化学、药物生产技术、药剂学和制剂技术、药理学和毒理学、生物药剂学、药物分析、临床应用与药物评价、药品管理、制药设备和工厂设计及包装、药品和新药介绍等。该系统拥有32万多条数据,本数据库每年以3万多条数据递增,且内容丰富,查询方便,可为医药生产、科研、教学、流通、医院药房、药店、情报和管理机构服务。该系统采用全新的系统结构和快速检索的新标引法,实现了对大容量、大范围全文本信息资料的零等待智能快速查询。根据实际工作需要,实现了库、刊、网为一体的服务系统,大大提高了查全率和查准率,既可全文检索,又可从文献类型、主题词、关键词等12个入口检索、查询。读者可分别从网络、光盘、文本三种途径查到所需要的文献。该系统曾获国家科技进步三等奖,文本版即国内外公开发行的杂志《中国药理学文摘》曾多次获得有关部委的奖励(国家科委、国防科工委、中国科学院、中国科协、国家自然科学基金会五大部委的全国科技信息系统优秀成果二等奖、全国科技检索期刊一等奖、第二届全国优秀科技期刊评比三等奖、全国医药情报成果二等奖、第二届国家期刊奖百种重点期刊奖)。

《中国药品检验文摘》2004年征订启事

收载我国公开发行的药理学杂志、医学杂志、地方医药杂志、医药院校学报等700余种刊物及300种医药内刊、报纸中有关药品检验及药物分析等方面的内容。采用文摘、提要、简介、题录四种形式报道,并附有中文主题词与外文药名两套索引。开辟栏目有:药政管理法规、药品安全性研究及新药开发、药品抽检、地方举措、新药审批及药品保护、中药材鉴定与鉴别、中西药及其制剂的分析与检验、药物的血药浓度测定、生物利用度与生物等效性、药品质量标准与质量控制、药品卫生学检验、分析方法介绍与综述。为半年刊,16开本,每期230页,全年160元。

以上两种刊物均为国家食品药品监督管理局信息中心主编,订阅的读者可直接与本中心《中国药理学文摘》编辑部联系,汇入行开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心;开户行:建设银行北京展览路分理处,账号:2610002517;通讯地址:北京市西城区北礼士路甲38号(邮编:100810)发行部或北京市海淀区文慧园南路甲2号(编辑部)(邮编:100088);电话:(010)62214715、62214665或(010)68313344-3803;传真:(010)62214715;联系人:刘晴