2025 年 7 月 色 谱 Vol.43 No.7
July 2025 Chinese Journal of Chromatography 734~743

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.04015

氨基酸型亲水作用色谱固定相的制备及其色谱性能评价

徐改改[1]， 易 阳[2]， 刘萍萍[2*]， 张文芬[3*]

（1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院，河南 郑州 450002；2. 中国烟草总公司郑州烟草研究院，河南 郑州 450001；3. 郑州大学化学学院，河南 郑州 450001）

摘要：以亲水性 L-羟基脯氨酸和 L-脯氨酸为改性剂，采用连续固液反应，成功制备了两种氨基酸型亲水相互作用液相色谱（HILIC）固定相，并通过红外光谱分析、热重分析、元素分析对其结构进行了系统表征。结果表明，两种功能化色谱固定相制备成功，键合量分别为 0.193 mmol/g 和 0.178 mmol/g，均具有良好的热力学稳定性。在 HILIC 模式下，以磺胺、杂环胺、核苷、植物生长调节剂、黄酮、胺类物质为溶质，考察了两种固定相的色谱分离性能，结果表明，L-脯氨酸固定相和 L-羟基脯氨酸固定相与分析物之间均存在亲水、π-π 等相互作用，并且 L-羟基脯氨酸固定相还存在氢键相互作用。L-羟基脯氨酸固定相对磺胺、植物生长素、黄酮等极性小分子具有良好的分离效果，证明该固定相可用于极性化合物分离。该研究拓展了氨基酸在色谱分离领域的应用，也为 HILIC 固定相的开发提供了新思路。

关键词：L-羟基脯氨酸；L-脯氨酸；氨基酸固定相；亲水相互作用液相色谱

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Preparation and chromatographic performance evaluation of hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on amino acids

XU Gaigai[1], YI Yang[2], LIU Pingping[2*], ZHANG Wenfen[3*]

(*1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China; 2. Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China; 3. College of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China*)

Abstract: To overcome current limitations in polar compound separation and better understand hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) retention mechanisms, we designed and synthesized two novel amino acid-functionalized stationary phases using highly hydrophilic L-hydroxyproline and L-proline as modifiers through a continuous solid-liquid reaction method. The synthesized stationary phases were thoroughly characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analysis (TGA), and elemental analysis. Comparative elemental analysis revealed a substantial increase in carbon (C), hydrogen (H), and nitrogen (N) contents in both L-hydroxyproline-functionalized (L-OH-PSil) and L-proline-functionalized (L-PSil) stationary phases relative to the cyanuric chloride-bonded aminopropyl silica gel (TCT-Sil) intermediate, confirming successful functionalization. Quantitative analysis demonstrated distinct ligand densities for each phase, with L-OH-PSil exhibiting a higher loading (0.193 mmol/g) compared to L-PSil (0.178 mmol/g). Thermal stability assessments indicated both materials maintained excellent structural integrity across a wide temperature range (20–600 ℃), as evidenced by TGA results. To explore the chromatographic separation performance of the prepared L-OH-PSil and L-PSil stationary

收稿日期：2025-04-11

* **通讯联系人**. E-mail: Liu_pingping2012@163.com（刘萍萍）；E-mail: zhangwenfen1988@126.com（张文芬）.

基金项目：河南省科技攻关项目（232102310334）；国家自然科学基金（22374135）.

Foundation item: Henan Province Science and Technology Research Project (No. 232102310334); National Natural Science Foundation of China (No. 22374135).

phases, sulfonamides were selected as solutes, and preliminary chromatographic separation investigations were conducted. The sulfonamide compounds exhibited excellent separation efficiency on both stationary phases, with retention behavior following consistent elution orders strongly correlated with analyte polarity. This observed retention pattern strongly suggested hydrophilic interactions constituted the predominant retention mechanism between the amino acid-functionalized stationary phases and sulfonamide analytes. Further supporting this conclusion, a systematic decrease in retention factors (lg k values) with increasing aqueous content in the mobile phase was observed as a characteristic feature of HILIC. Under optimized HILIC conditions, we further systematically evaluated the separation performance of both stationary phases using heterocyclic amines and nucleosides as model analytes, with direct comparison to a commercial Hypersil NH_2 column. Both custom phases exhibited exceptional column efficiency, with L-OH-PSil achieving 11 582.87 theoretical plates for 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-b]indole (MeAαC) compared to 8 661.45 for L-PSil, while maintaining excellent performance across diverse analyte classes including plant growth hormones, flavonoids, and amines. The L-OH-PSil phase demonstrated superior chromatographic performance relative to both its L-PSil counterpart and the commercial NH_2 column. This superiority is attributable to its unique bifunctional design incorporating two hydroxyl groups, which combine the advantageous features of amino acid and diol-based stationary phases. This structural characteristic enables multiple synergistic interaction mechanisms, including π-π stacking, enhanced ion-exchange capacity, and additional hydrogen bonding sites, collectively yielding improved selectivity for polar small molecules. To further evaluate the chromatographic performance of the amino acid-based stationary phases, we investigated the effects of flow rate and column temperature using nucleosides and heterocyclic amines as model analytes. Remarkably, baseline separation was maintained even at elevated flow rates, demonstrating the robustness of both phases under high-throughput conditions. Temperature-dependent studies revealed that retention times exhibited only minor decreases or remained stable with increasing column temperature, suggesting minimal thermal effects on retention behavior. Van't Hoff analysis yielded excellent linear correlations (r^2=0.992 9–0.999 7) for all tested analytes, confirming that the retention mechanism remains unchanged across the studied temperature range while indicating an exothermic separation process. Method validation confirmed the reliability of the developed system, with chromatographic peaks maintaining excellent shape and retention time stability across varying analyte concentrations. The relative standard deviations (RSDs) of retention times for six nucleosides ranged from 0.29% to 0.59%, underscoring the outstanding operational stability and analytical reproducibility of the L-OH-PSil stationary phase. These results collectively demonstrate the robustness of the amino acid-functionalized stationary phases under varying chromatographic conditions, further supporting their potential for practical applications in polar compound analysis. These results indicate that the L-OH-PSil stationary phase has excellent potential for broad applications in pharmaceutical analysis, environmental monitoring, and bioanalytical separations.

Key words: L-hydroxyproline; L-proline; amino acid-functionalized stationary phase; hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)

引用本文:徐改改,易阳,刘萍萍,张文芬. 氨基酸型亲水作用色谱固定相的制备及其色谱性能评价. 色谱,2025,43(7):734-743.
XU Gaigai, YI Yang, LIU Pingping, ZHANG Wenfen. Preparation and chromatographic performance evaluation of hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on amino acids. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(7): 734-743.

高效液相色谱法(HPLC)作为现代分离分析技术的核心手段,在化学、医学、生命科学及环境科学等诸多领域发挥着不可替代的作用[1-4]。依据溶质-固定相相互作用机理的差异,HPLC 主要分离模式包括:反相液相色谱(RPLC)[5]、亲水相互作用液相色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)[6,7]、离子交换色谱[8]以及尺寸排阻色谱[9]。其中,RPLC[5,10]虽对非极性/弱极性化合物展现出卓越的分离选择性和重现性,但其对强极性及离子型化合物的保留能力与分离选择性存在明显局限。相较而言,HILIC[11,12]采用高有机相/低水相流动相体系,无需离子对试剂即可实现对极性化合物的有效保留,同时与质谱[13-15]和蒸发光散射检测器[16]具有良好的兼容性。作为 HPLC 系统的核心组件,色谱固定相通过其功能基团调控多元分子相互作用,不仅决定分离模式的选择,更直接影响分析物的保留行为[17,18]。因此,新型功能化固定相的设计合成[1,19-21]及对其分离机理的深入探究,始终是色谱学科发展的前沿研究方向之一。

极性官能团(如氨基、酰胺基和磺酸基)功能化的 HILIC 固定相[22,23]已被广泛应用于氨基酸[24]、多肽、核苷等生物分子[25,26]的分离分析。然而,现有固定相在亲水性、选择性和重现性等方面存在诸多局限,特别是分离效率不足,严重制约了其实际应用。氨基酸独特的结构特性可以与溶质分子产生多重分子相互作用(如氢键、离子交换和疏水作用等)[27],在色谱固定相设计中展现出显著优势[28,29]。尽管如此,氨基酸功能化固定相仍存在合成路线复杂、化学稳定性不足、选择性与通量之间的平衡难以调控等问题。

基于此,本研究以水溶性 L-羟基脯氨酸和 L-脯氨酸为亲水功能基团,以三聚氯氰为连接手臂,采用连续固液反应制备了两种氨基酸型 HILIC 固定相,并采用红外光谱分析、热重分析和元素分析对固定相的结构和性质进行了表征。结果表明所制备固定相的合成步骤简单、具有较高的稳定性和良好的重复性。实验选取磺胺、杂环胺、核苷、植物生长素、黄酮、胺类等极性分子对所制备固定相的色谱分离性能和分离机理进行了系统研究。结果表明,所制备的两种色谱固定相基于其丰富的活性位点,可以与溶质分子间发生亲水作用、π-π 作用、氢键作用等多重相互作用力,为氨基酸型 HILIC 固定相的商业开发和应用提供了一定的方法和实验基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Flash EA 1112 元素分析仪(美国 Thermo 公司);Bruker Vector 22 红外光谱仪(德国 Bruker 公司);STA 409 PC 热重分析仪(德国 Netzsch 公司);LX-2 纯水机(美国 Millipore 公司);Xk96-B 涡旋仪(姜堰市新康医疗器械有限公司);KQ-2200DA 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);150 mm×4.6 mm 不锈钢柱管(郑州英诺生物科技有限公司);CGY-100B 色谱装柱机(深圳市正大流体机电设备有限公司)。

多孔硅胶(粒径 5 μm,孔径 10 nm,比表面积 300 m^2/g)购自中国科学院兰州化学物理研究所;L-羟基脯氨酸(99%)、L-脯氨酸(99%)和 *N*,*N*-二异丙基乙胺(DIPEA,99%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三聚氯氰(99%)和硅烷化试剂 3-氨丙基三乙氧基硅烷(KH-550,99%)均购自上海晶纯生化科技股份有限公司;磺胺类、杂环胺类、核苷类、植物生长素类、黄酮类、胺类化合物(分析纯)均购自上海麦克林生化科技有限公司;色谱纯甲醇、乙腈购自美国默克公司。其他药品无特殊说明均为分析纯。

1.2 中间体三聚氯氰键合氨丙基硅胶的制备

1.2.1 硅胶的活化

称取 6.0 g 多孔硅胶浸入 120 mL 盐酸溶液(浓盐酸和水的体积比为 1∶3)中,浸泡 24 h,机械搅拌下回流 12 h 除去金属离子,用 G5 砂芯漏斗抽滤,高纯水洗涤至中性,100 ℃真空干燥,即得活化硅胶(SiO_2)。

1.2.2 3-氨丙基三乙氧基硅烷键合硅胶的制备

取 10 mL KH-550 于 250 mL 三口烧瓶中,并加入 100 mL 新蒸的无水甲苯混匀,机械搅拌下缓慢加入 5 g 活化硅胶,N_2 保护下升温至回流状态,反应 24 h 后,冷却,过滤,然后依次用甲苯、丙酮、高纯水、丙酮各洗涤 3 次,80 ℃真空干燥,即得 3-氨丙基三乙氧基硅烷键合硅胶(3-aminopropyltriethoxysilane-bonded silica gel, APS-Sil)。

1.2.3 三聚氯氰键合氨丙基硅胶的合成

称取 1.5 g 三聚氯氰于 250 mL 三口烧瓶中,加入 70 mL 已除水甲醇;称取 3 g APS-Sil 于恒压滴液漏斗中,并加入 100 mL 已除水甲醇和 5 mL DIPEA,在冰浴条件下,将其滴加到烧瓶中,机械搅

拌反应 9 h，停止反应，用 G5 砂芯漏斗过滤，依次用高纯水、甲醇和丙酮洗涤，70 ℃真空干燥 12 h，即得三聚氯氰键合氨丙基硅胶（cyanuric chloride-bonded aminopropyl silica gel，TCT-Sil）。

1.2.4　氨基酸钠的合成

称取 1.5 g 氢氧化钠、1.5 g 氨基酸分别溶于甲醇中，搅拌下将氢氧化钠甲醇溶液缓慢滴加到氨基酸甲醇溶液中，滴加完后，再搅拌反应 30 min，停止搅拌，旋蒸除去溶剂，80 ℃真空干燥 9 h，即得氨基酸钠（L-羟基脯氨酸钠和 L-脯氨酸钠）。

1.3　亲水型氨基酸固定相的制备

将合成的 TCT-Sil 和 1 g 氨基酸钠加入 250 mL 三口烧瓶中，并向其中加入 150 mL 甲醇和 4 mL DIPEA。先在 50 ℃反应 2 h，再回流反应 8 h。停止反应，用 G5 砂芯漏斗过滤，依次用高纯水、甲醇和丙酮洗涤，80 ℃真空干燥 12 h。得到以三聚氯氰为连接手臂的氨基酸键合硅胶固定相，即 L-羟基脯氨酸键合硅胶固定相（L-hydroxyproline-functionalized stationary phase，L-OH-PSil）和 L-脯氨酸键合硅胶固定相（L-proline-functionalized stationary phase，L-PSil）。合成路线见图 1。

1.4　色谱柱的填装

以四氯化碳作为匀浆液，甲醇作为顶替液，在装柱压力 25 MPa 下装填 10 min，40 MPa 下装填 5 min，将所制备的固定相填料装入洗净的不锈钢柱管（150 mm×4.6 mm）中，30 min 后，缓慢地降压，停泵。将装满填料的柱子柱头压平，然后装上滤片和柱接头，标上柱方向、填料、柱尺寸和装柱日期。在 0.2 mL/min 的流速下用甲醇冲洗 24 h，使用前再用流动相平衡。

1.5　色谱条件

分离磺胺、杂环胺、核苷、植物生长调节剂、黄酮、胺类的流动相均采用乙腈-水。磺胺的波长为 270 nm，其余均为 254 nm，流速均为 1.0 mL/min，采用等度洗脱；柱温均为 30 ℃。

2　结果与讨论

2.1　L-OH-PSil 和 L-PSil 的表征

采用红外光谱分析、元素分析、热重分析对所制备的固定相进行了表征。由表 1 可以看到，与中间体 TCT-Sil 相比，固定相 L-OH-PSil 和 L-PSil 中的 C、H、N 的含量有较为明显的增加，表明氨基酸已成功键合到 APS-氨丙基硅胶上。以碳元素的含量（减去 APS-三聚氯氰的碳含量）计算得到固定相 L-OH-PSil 和 L-PSil 的键合量分别为 0.193 mmol/g 和 0.178 mmol/g。图 2a 为 L-OH-PSil 和 L-PSil 的红外光谱图，相对于 SiO_2，APS-Sil 在 2 933 cm^{-1} 和 2 884 cm^{-1} 附近出现了甲基与亚甲基的 C-H 伸缩振动吸收峰，表明 3-氨丙基三乙氧基硅烷成功键合到活化的硅胶上。与 APS-Sil 相比，TCT-Sil 在 1 595 cm^{-1} 处有 C=N 双键吸收峰，表明三聚氯氰成功键合到 APS 上。在纯硅胶、氨基酸型固定相中含有最多的键是 Si-O 键（1 110 cm^{-1}），含量最多的基团是 Si-OH（3 500~3 200 cm^{-1}），805~465 cm^{-1} 处是硅胶介孔结构中 Si-O 键的特征吸收峰。然而硅胶的特征红外光谱吸收峰掩盖了固定相上 C-C 键的伸缩振动峰（1 250~1 140 cm^{-1}）和醇羟基及 N-H 键的伸缩振动峰（3 500~3 300 cm^{-1}），只能从氨基酸固定相

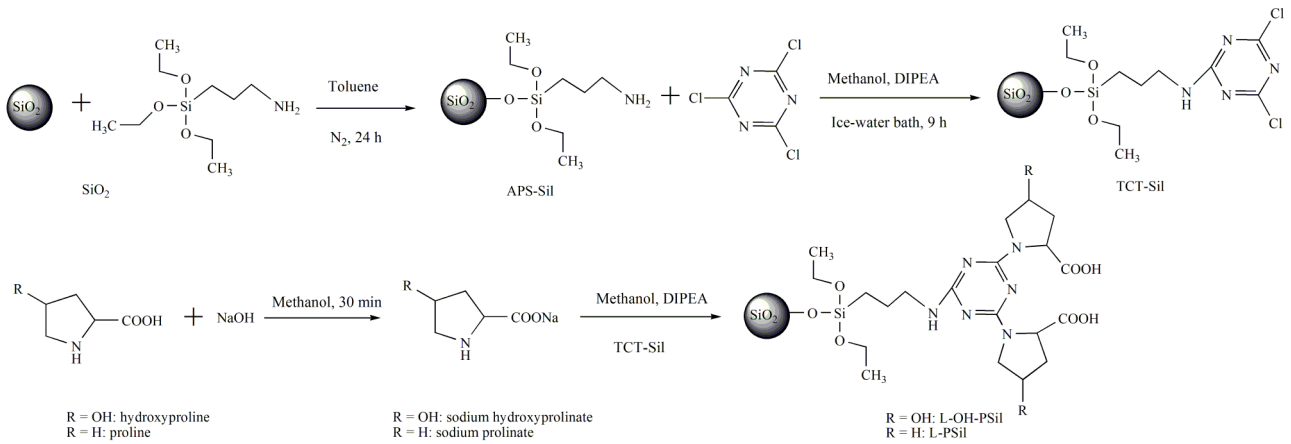


图 1　氨基酸型 HILIC 固定相的合成路线

Fig. 1　Synthetic route of amino acid-functionalized HILIC stationary phases

DIPEA：*N*,*N*-diisopropylethylamine；HILIC：hydrophilic interaction liquid chromatography.

红外光谱图中看到 C-H 键的伸缩振动峰 2 933 cm^{-1} 和 C=N 键的吸收峰 1 595 cm^{-1}。由红外光谱表征图和元素分析数据可知，两种氨基酸均成功键合至硅胶上。由图 2b 可知，L-OH-PSil 和 L-PSil 的失重温度均在 180 ℃以上，且在 20~600 ℃范围内，两种固定相具有较好的热稳定性。

表 1 元素分析结果

Table 1 Elemental analysis results

Analyte	Elemental contents/%			Surface coverage/(mmol/g)
	N	C	H	
APS-Sil	1.558	5.570	1.282	0.928
TCT-Sil	2.831	6.482	1.227	0.253
L-OH-PSil	2.885	8.801	1.520	0.193
L-PSil	2.888	8.614	1.320	0.178

APS-Sil: 3-aminopropyltriethoxysilane-bonded silica gel; TCT-Sil: cyanuric chloride-bonded aminopropyl silica gel; L-OH-PSil: L-hydroxyproline-functionalized stationary phase; L-PSil: L-proline-functionalized stationary phase.

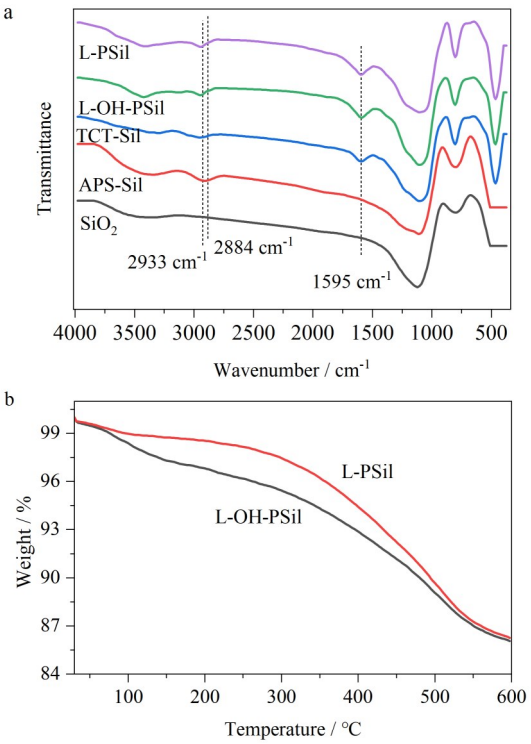


图 2 L-OH-PSil 和 L-PSil 的表征

Fig. 2 Characterization of L-OH-PSil and L-PSil

a. FT-IR spectra of SiO_2, APS-Sil, TCT-Sil, L-OH-PSil and L-PSil; b. TGA of L-OH-PSil and L-PSil.

2.2 L-OH-PSil 和 L-PSil 的色谱分离性能考察

为探究所制备 L-OH-PSil 和 L-PSil 的色谱分离性能，实验选取多种极性靶标为溶质，在 HILIC 模式下考察了其色谱分离行为，初步探究 L-OH-PSil 和 L-PSil 的色谱分离性能以及可能存在的分离机理，见图 3。

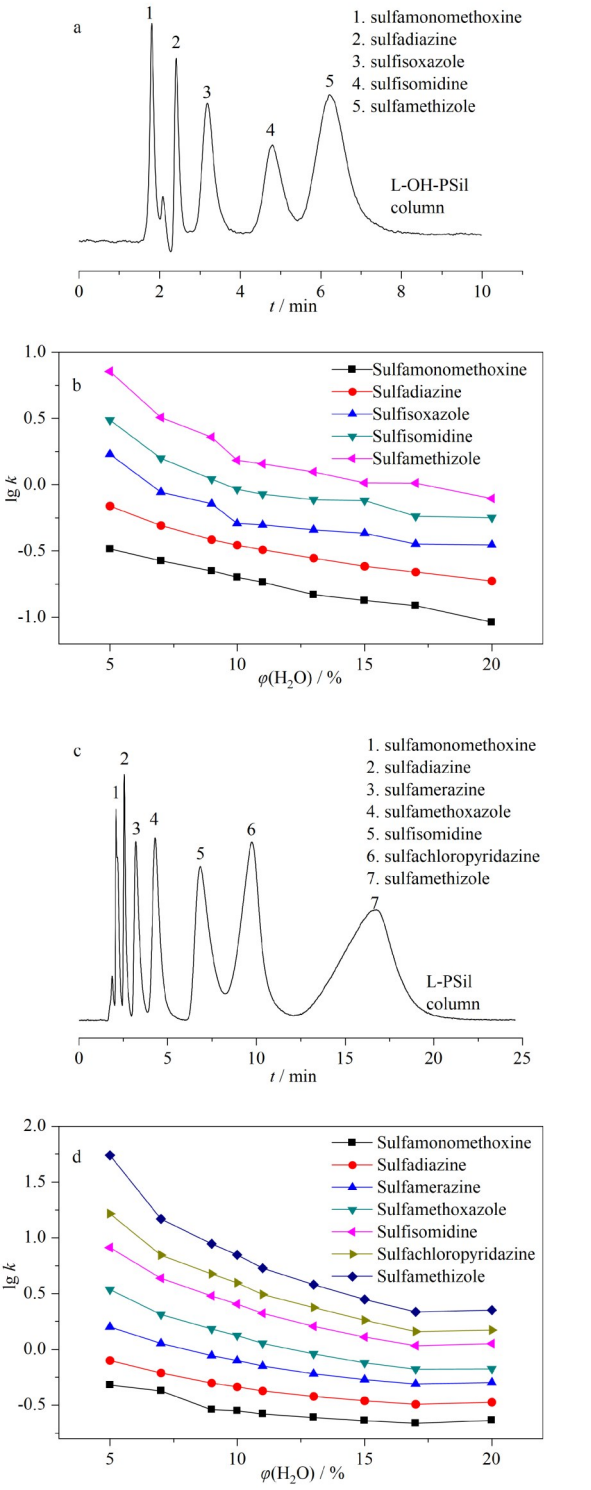


图 3 磺胺在 L-OH-PSil 和 L-PSil 上的分离性能和保留行为

Fig. 3 Separation performance and retention behavior of sulfonamides on L-OH-PSil and L-PSil

Mobile phases: (a, b) L-OH-PSil, ACN-H_2O (93∶7, v/v); (c, d) L-PSil, ACN-H_2O (91∶9, v/v).

首先，如图 3a 和 3c 所示，8 min 内 5 种磺胺类物质在 L-OH-PSil 上实现了分离，20 min 内实现了 7 种磺胺类物质在 L-PSil 上的分离。且同种磺胺类物质在两种氨基酸型固定相上的洗脱顺序一致且与化合物的极性成正比，由此说明两种氨基酸固定相与磺胺类物质间的亲水作用起主导作用。且随着流动相中水含量的增加（图 3b 和 3d），磺胺类物质在两固定相上的 lg k 均逐渐减小，保留减弱，这与 HILIC 的分离机理一致。由此说明 L-OH-PSil 和 L-PSil 具有亲水色谱分离性能。

为进一步比较 L-OH-PSil 和 L-PSil 色谱柱的分离选择性差异，实验选取结构较为相似的 8 种杂环胺（图 4a）和 7 种核苷（图 4b）进行了色谱分离行为考察，并以 Hypersil NH_2 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm，美国 Thermo 公司）作为对比，结果见图 5。可以看出，本研究制备的两种氨基酸功能化固定相对杂环胺和核苷类化合物的分离性能显著优于商品化氨基色谱柱；此外，在相同色谱条件下，L-OH-PSil 可实现 8 种杂环胺的基线分离（图 5a），而 L-PSil 对 2-氨基二吡啶并[1,2-a:3′,2′-d]并咪唑（Glu-P-2）、2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶（PhIP）、9H-吡啶-[3,4-b]吲哚（Norharman）、2-氨基-1,6-二甲基咪唑并[4,5-b]吡啶（DMIP）和 1-甲基-9H-吡啶-[3,4-b]吲哚（Harman）等化合物表现出共洗脱现象；类似地，L-OH-PSil 可完全分离 7 种核苷（图 5b），而 L-PSil 未能实现尿嘧啶与腺苷的基线分离。从分子结构角度分析，L-羟基脯氨酸固定相相较于 L-脯氨酸固定相额外具有两个羟基官能团，这一结构特征使其兼具 L-PSil 和二醇基固定相双重色谱特性。除溶质在固定相-流动相界面“富水层”中的分配作用、π-π 相互作用、离子交换作用等分子相互作用分离机制外，L-OH-PSil 中羟基提供的氢键作用位点显著增强了其对极性小分子的分离选择性，从而实现了对 8 种杂环胺和 7 种核苷的高效分离。根据表 2 的色谱参数分析，两种氨基酸固定相在杂环胺分离中均表现出优异的柱效，其中 MeAαC 在 L-OH-PSil 和 L-PSil 上的理论塔板数分别达到 11 582.87 和 8 661.45，证实了所开发固定相的高效分离性能。

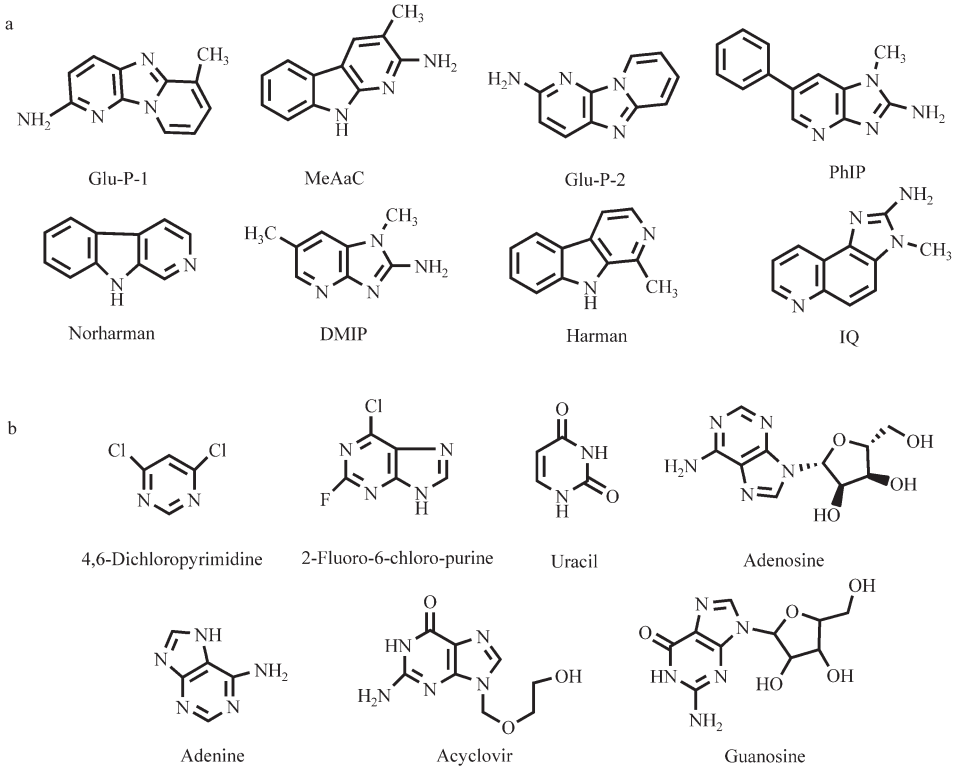


图 4　(a)8种杂环胺和(b)7种核苷的结构式

Fig. 4　Chemical structures of (a) eight heterocyclic amines and (b) seven nucleosides

Glu-P-1: 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3′,2′-d]imidazole; MeAαC: 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole; Glu-P-2: 2-amino-dipyrido[1,2-a:3′,2′-d]imidazole; PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; Norharman: 9H-pyrido[3,4-b]indole; DMIP: 2-amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]pyridine; Harman: 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole; IQ: 2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline.

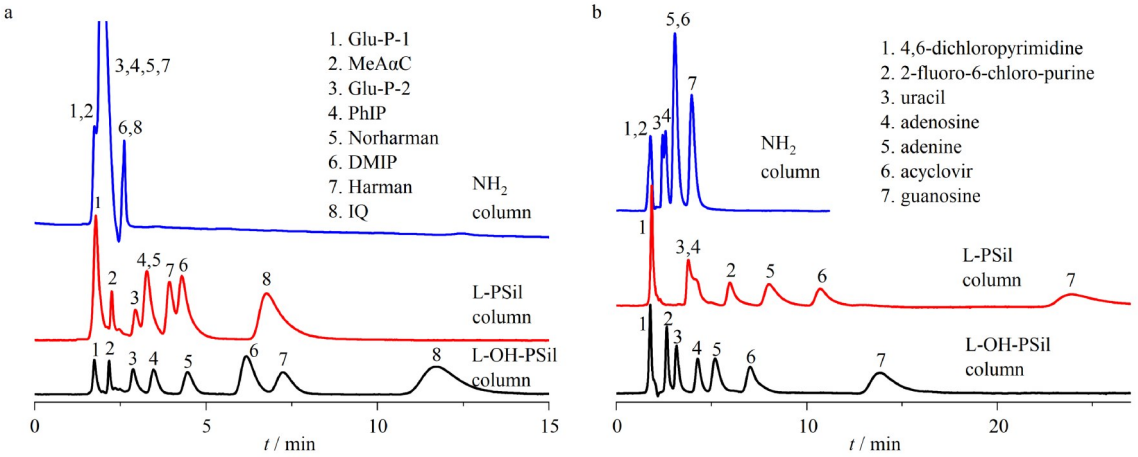


图 5 (a)8 种杂环胺和(b)7 种核苷在 L-OH-PSil、L-PSil 与 Hypersil NH_2 柱的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of (a) the eight heterocyclic amines and (b) the seven nucleosides on L-OH-PSil, L-PSil, and Hypersil NH_2 columns

Mobile phase: ACN-H_2O (87∶13, v/v).

表 2 8 种杂环胺在两种氨基酸型固定相上的理论塔板数

Table 2 Theoretical plate numbers of the eight heterocyclic amines on two amino acid-functionalized stationary phases

Column	Glu-P-1	MeAαC	Glu-P-2	PhIP	Norharman	DMIP	Harman	IQ
L-OH-PSil	3696.98	11582.87	3414.64	3889.27	4174.57	3701.19	3666.03	3299.56
L-PSil	2292.08	8661.45	3628.90	4376.20	4696.48	3377.73	3821.84	2950.15

为进一步探究两根色谱柱在亲水化合物分离中的通用性,选取植物生长素、黄酮类物质、胺类物质进行分离,结果见图 6。

可以看出,7 种植物生长调节剂、5 种黄酮类物质、4 种胺类物质在 L-OH-PSil 上均得到了较好的分离(图 6a~c);而对于 L-PSil,只有 3 种极性较弱

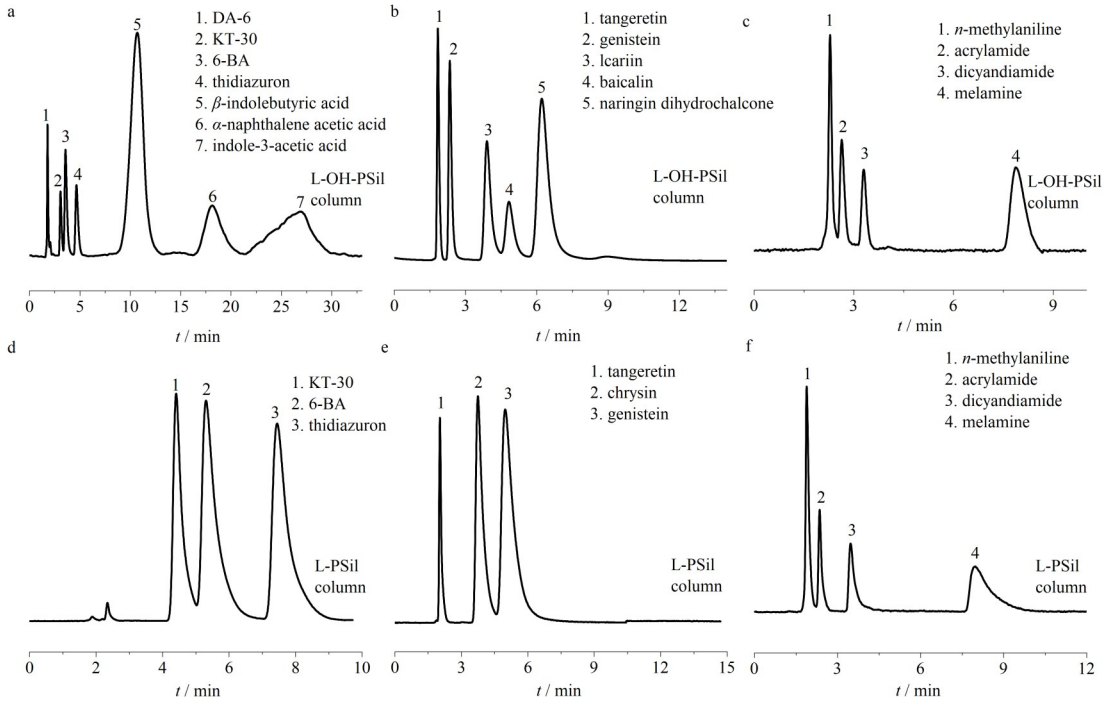


图 6 L-OH-PSil 和 L-PSil 柱对亲水性物质的分离

Fig. 6 Separation of hydrophilic compounds on L-OH-PSil and L-PSil columns

Mobile phases: a. ACN-H_2O (92∶8, v/v); b. ACN-H_2O (87∶13, v/v); c. ACN-H_2O (87∶13, v/v); d. ACN-H_2O (89∶11, v/v); e. ACN-H_2O (90∶10, v/v); f. ACN-H_2O (89∶11, v/v).

的植物生长素、3 种黄酮类物质在 L-PSil 上实现了基线分离（图 6d~f）。由此说明羟基等基团能够调控色谱固定相的保留行为，在实现化合物的高效分离中扮演着重要角色。

2.3　不同流速、柱温对色谱固定相分离性能的影响

色谱分离过程中，流速往往会影响各个溶质组分的保留时间及峰宽，从而对混合物的分离造成影响。实验分别考察了不同流速、柱温条件下核苷在 L-OH-PSil 及杂环胺在 L-PSil 上的分离效果，由图 7a 和图 7d 可知，随着流速的增加，核苷和杂环胺在两种固定相上的保留时间和分离度均逐渐降低。但即使在较高的流速条件下，核苷和杂环胺也能在两种氨基酸型固定相上进行较好的基线分离，这表明 L-OH-PSil 柱对核苷、L-PSil 柱对杂环胺具有较好的分离选择性，可在较高的流速下分离极性物质。

实验考察了不同柱温（15~40 ℃）对两种色谱柱色谱分离的影响。由图 7b 和图 7e 可以看出，随着柱温的升高，6 种核苷在 L-OH-PSil 柱的保留时间以及 6 种杂环胺在 L-PSil 柱的保留时间略微减少或基本不变，这说明核苷以及杂环胺在色谱柱上的分离并不是简单的放热过程，这说明核苷在 L-OH-PSil 色谱柱上的分离以及杂环胺在 L-PSil 色谱柱上的分离并不是简单的放热过程，可能由溶质分子与 HILIC 固定相间存在的分配作用、氢键作用、π-π 作用等多重作用力引起；此外，由表 3 和表 4 可知，大部分核苷及杂环胺的分离选择性并不是单纯呈现上升或下降趋势，不同拐点可能是因为除亲水、疏水、分配作用外，固定相和靶标间还存在氢键作用等其他相互作用，导致趋势呈现复杂性。

由范特霍夫曲线（图 7c，f）可以看出，6 种核苷在 L-OH-PSil 柱和 6 种杂环胺在 L-PSil 柱上均呈现良好的线性关系，相关系数（r^2）分别为 0.994 2~0.996 8 和 0.992 9~0.999 7（表 5），表明温度变化并没有改变溶质在固定相上的保留机制。根据溶质保留因子（k）和柱温（T，K）符合的范特霍夫方程：$\ln k=-\Delta H/RT+\Delta S/R$，研究核苷和杂环胺分别在两种氨基酸固定相分离过程中的热力学过程。由表 5 可知，6 种核苷在 L-OH-PSil 上和 6 种杂环胺在 L-PSil 上的焓变均为负值，这表明核苷和杂环胺在两

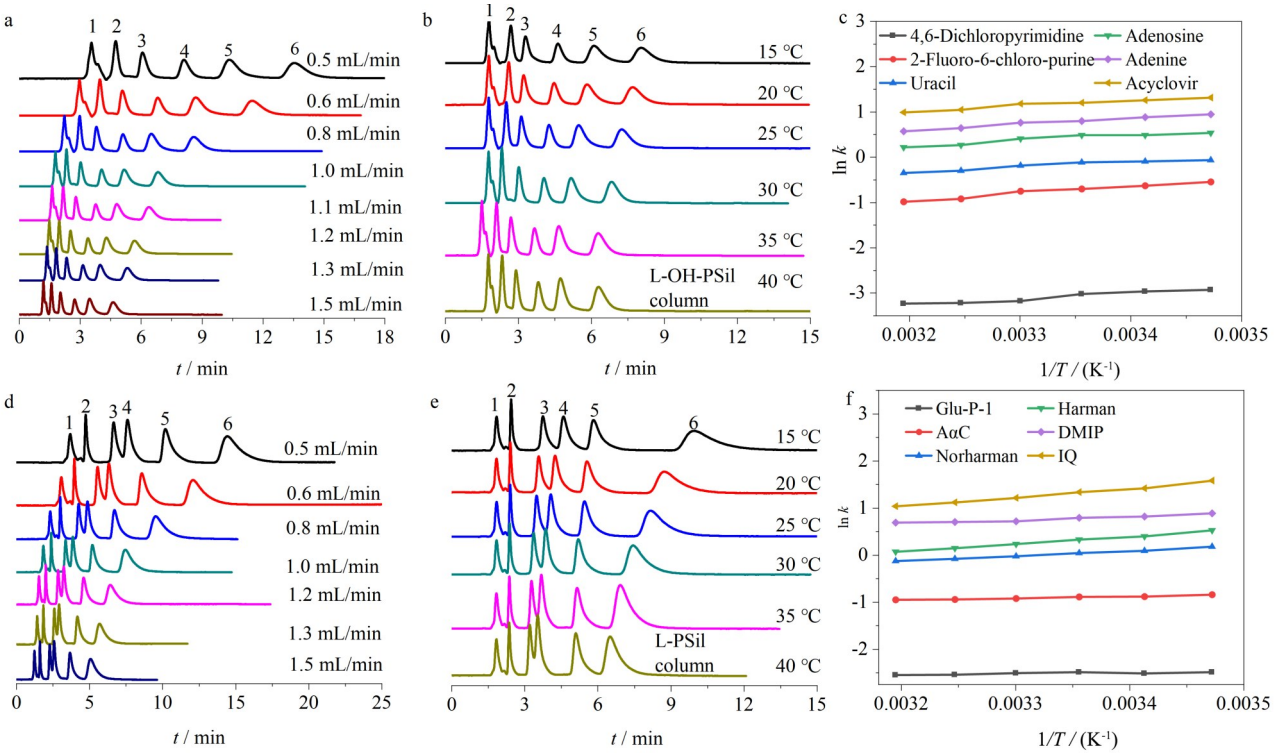


图 7　核苷在 L-OH-PSil 以及杂环胺在 L-PSil 柱上的分离性能

Fig. 7　Separation characteristics of nucleosides on L-OH-PSil and heterocyclic amines on L-PSil columns

Separation efficiency of nucleosides on the L-OH-PSil column at (a) different flow rates and (b) different column temperatures; (c) Van't Hoff plots of nucleosides on the L-OH-PSil column; separation efficiency of heterocyclic amines on the L-PSil column at (d) different flow rates and (e) different column temperatures; (f) Van't Hoff plots of heterocyclic amines on the L-PSil column.

Mobile phase: heterocyclic amines, ACN-H_2O (87∶13, v/v); nucleosides, ACN-H_2O (89∶11, v/v).

表 3 不同温度下 L-OH-PSil 对 6 种核苷的选择因子

Table 3 Selectivity factors of the six nucleosides on L-OH-PSil at different temperatures

T/℃	4,6-Dichloropyrimidine	2-Fluoro-6-chloropurine	Uracil	Adenosine	Adenine	Acyclovir
15	-	10.88	1.61	1.84	1.51	1.44
20	-	10.28	1.72	1.78	1.49	1.46
25	-	10.20	1.79	1.82	1.37	1.50
30	-	11.35	1.76	1.80	1.43	1.52
35	-	9.96	1.87	1.77	1.45	1.50
40	-	9.48	1.89	1.76	1.43	1.52

表 4 不同温度下 L-PSil 对 6 种杂环胺的选择因子

Table 4 Selectivity factors of the six heterocyclic amines on L-PSil at different temperatures

T/℃	Glu-P-1	AαC	Norharman	Harman	DMIP	IQ
15	-	5.19	2.77	1.41	1.43	2.01
20	-	5.12	2.64	1.36	1.51	1.83
25	-	4.94	2.54	1.33	1.59	1.73
30	-	4.86	2.46	1.30	1.62	1.64
35	-	4.96	2.37	1.26	1.74	1.51
40	-	4.94	2.29	1.22	1.86	1.41

表 5 核苷在 L-OH-PSil、杂环胺在 L-PSil 柱上的热力学参数 ΔH、ΔS 和拟合曲线的相关系数

Table 5 Thermodynamic parameters (ΔH, ΔS) and fitting quality (r^2) of nucleosides on L-OH-PSil column and heterocyclic amines on L-PSil column

Column	Analyte	ΔH/(kJ/mol)	ΔS/(J/(mol·K))	r^2
L-OH-PSil	4, 6-dichloropyrimidine	−10.54	−60.81	0.9959
	2-fluoro-6-chloro-purine	−13.31	−50.95	0.9961
	uracil	−8.91	−31.21	0.9953
	adenosine	−9.94	−29.76	0.9968
	adenine	−11.29	−31.22	0.9942
	acyclovir	−9.71	−22.63	0.9949
L-PSil	Glu-P-1	−1.85	−27.06	0.9961
	AαC	−3.33	−18.93	0.9978
	Norharman	−9.07	−30.08	0.9931
	Harman	−13.31	−42.29	0.9962
	DMIP	−5.93	−13.38	0.9997
	IQ	−16.08	−42.87	0.9928

种固定相上的分离过程为放热过程。

为系统评价 L-OH-PSil 的稳定性，以 6 种核苷分子为模型分析物进行分析研究。改变 5 μg/mL 核苷混合标准溶液的进样体积分别为 1、3、5、7、9、10 μL，考察不同进样量对色谱分离的影响，实验叠加色谱图（图 8）显示，各分析物色谱峰形保持良好，保留时间稳定，相对标准偏差（RSD）为 0.29%~0.59%，充分证实 L-OH-PSil 色谱柱具有优异的操作稳定性和分析重复性，完全满足定量分析要求。特别值得注意的是，保留时间 RSD 全部低于 0.59%，表明该材料在色谱分离应用中具有显著优势。

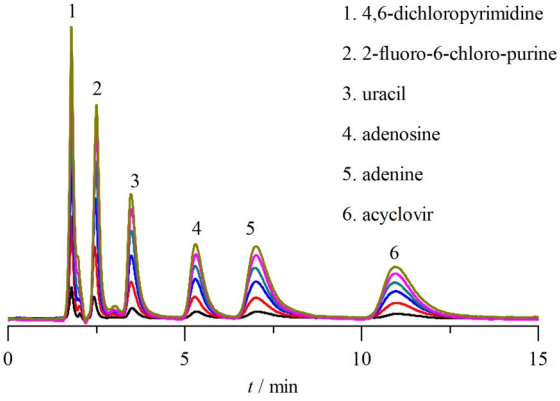


图 8 不同进样体积下 L-OH-PSil 分离 6 种核苷的稳定性

Fig. 8 Separation stability of the six nucleosides on L-OH-PSil stationary phase under varying injection volumes

Mobile phase: ACN-H_2O (87∶13, v/v).

3 结论

本文以亲水性 L-羟基脯氨酸和 L-脯氨酸为改性剂，采用连续固液反应，成功制备了两种氨基酸型 HILIC 固定相（L-OH-PSil 和 L-PSil）。选取磺胺、杂环胺、核苷、植物生长调节剂、黄酮、胺类物质等极性小分子为溶质，对 L-OH-PSil 和 L-PSil 柱的分离性能和保留机制进行了考察，结果表明 L-OH-PSil 和 L-PSil 具有良好的亲水色谱分离性能，并且 L-OH-PSil 柱对极性化合物展现出卓越的分离选择性。L-OH-PSil 柱表面丰富的活性位点在分离中具有调控亲水分配作用、氢键作用、π-π 堆积、离子交换作用等多重相互作用的协同效应，显著提高了固定相的分离选择性。此外，L-OH-PSil 柱在不同进样量下均表现出良好的重复性和稳定性。基于所制备固定相的活性位点以及良好的色谱性能，有望在药物分析、植物生理研究、代谢组学等领域展现出广阔的应用前景。

参考文献：

[1] Zheng Q, Huang J, He Y, et al. ACS Appl Mater Interfaces, 2022, 14(7): 9754

[2] Kobidze G, Sprega G, Daziani G, et al. J Chromatogr A, 2024, 1718: 464709

[3] Zhang Q, Wu F, Liu J, et al. Chin Chem Lett, 2024: 110649
[4] Wang Q, Sun L, Wu H, et al. J Pharm Anal, 2022, 12(5): 783
[5] Kadlecová Z, Kalíková K, Tesařová E, et al. J Chromatogr A, 2022, 1681: 463473
[6] Li Z, Li S, Zhang F, et al. Talanta, 2021, 231: 122340
[7] Yu Z, Li Z, Zhang F, et al. J Chromatogr A, 2023, 1708: 464328
[8] Yang Y, He H, Chen Y, et al. Chemosphere, 2024, 358: 142227
[9] Panda S K, Al-Qunaysi T A, Al Taha M, et al. Fuel, 2021, 302: 120914
[10] Zhang Q-F, Xiao H-M, Zhan J-T, et al. Chin Chem Lett, 2022, 33(11): 4746
[11] Fekete S, DeLano M, Harrison A B, et al. Anal Chem, 2022, 94(7): 3360
[12] Tang Z K, Wan H H, Li H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(9): 799
唐泽坤, 万慧慧, 李红, 等. 色谱, 2023, 41(9): 799
[13] Wang Y Q, Wang K, Ke Q Q, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(12): 1164
王亚琴, 王坤, 柯庆青, 等. 色谱, 2024, 42(12): 1164
[14] Gao W, Zhang F, Zhang S, et al. Sep Purif Technol, 2023, 305: 122426
[15] Feng J, Zhong Q, Kuang J, et al. Anal Chem, 2021, 93(45): 15192
[16] Zhao H, Lai C-J-S, Yu Y, et al. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 476
[17] Guo D M, Xia Y R, Rahman M U, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(12): 1045
郭冬梅, 夏一然, Mujeeb ur RAHMAN, 等. 色谱, 2023, 41(12): 1045
[18] Liu J, Wu F, Gan L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(10): 843
刘锦, 吴帆, 甘霖, 等. 色谱, 2023, 41(10): 843
[19] Zhang T, Liang X, Wang L, et al. Chin Chem Lett, 2025, 36(1): 109889
[20] Jiang Q, Xin X, Zhang S, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2024, 174: 117680
[21] Liu Q, Zhou K, Liu Y, et al. Anal Chim Acta, 2024, 1299: 342445
[22] Ma L, Liu S-M, Yao L, et al. J Chromatogr A, 2015, 1376: 64
[23] Shuang Y, Liao Y, Zhang T, et al. J Chromatogr A, 2020, 1619: 460937
[24] Zhang S, Ee K H, Goh R M V, et al. Food Chem, 2025, 472: 142846
[25] Wu S, Li X, Zhang F, et al. Analyst, 2015, 140(12): 3921
[26] Tsutsumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, et al. J Agric Food Chem, 2021, 69(13): 3904
[27] Liang M, Liu D, Nie Y, et al. Chin Chem Lett, 2022, 33(6): 3123
[28] Nam D, Ji M, Kang C, et al. Anal Chem, 2024, 96(25): 10219
[29] Coppens S, Drinkwater G, Mussell C, et al. Alzheimer's & Dementia, 2022, 18(S5): e063409