

使用氟化钡作为固定相的薄层色谱-红外光谱联用研究

刘溪^{1,2}, 潘庆华², 丁洁^{2,3}, 祝青^{1,2}, 贺安琪², 岳世娟^{2,4}, 李晓佩^{2,4}, 胡丽萍^{1*},
夏锦明⁵, 刘翠格⁴, 魏永巨⁴, 余江³, 杨展澜^{2*}, 朱曦⁶, 徐怡庄^{2*}, 吴瑾光²

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 沈阳 110032
2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871
3. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029
4. 河北师范大学化学与材料科学学院, 河北 石家庄 050016
5. 沈阳度太生物制药研究中心, 辽宁 沈阳 110031
6. 北京大学第三医院危重医学科, 北京 110083

摘要 原位薄层色谱-红外光谱联用在分析复杂混合物上有巨大潜力,但因固定相自身的红外吸收严重干扰样品检测,该方法进展缓慢。本文应用对中红外光透明的氟化钡微小颗粒作为固定相制备薄层层析板,并对该板的层析效果及原位显微反射红外光谱检测的可行性进行了初步的探讨。通过优化反应条件,制备出粒径为 500 nm 左右的氟化钡颗粒;发展出一种制备薄层层析板的新技术——沉降挥发法;通过实验证明,新型薄层板具备分离混合物的能力;原位红外光谱检测结果表明氟化钡作为固定相不干扰样品的检测。应用氟化钡作为新型薄层板固定相,为从技术上实现原位薄层色谱-红外光谱联用打开了大门。

关键词 原位;薄层色谱;红外光谱;联用;氟化钡

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)07-1767-05

引言

薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)是一种快速、简便、高效、经济、应用广泛的色谱分析方法^[1-18]。通常将固定相均匀涂覆在玻璃、金属或塑料等表面上,形成薄层,然后将试样点在薄层上,借助流动相、样品和固定相之间的相互作用,从而达到对试样中不同成分的有效分离。它的特点是可以同时分离多个样品,分析成本低,对样品的预处理简单,对固定相、展开剂的选择自由度大,便于进行二维色谱等多种形式的色谱分析测定。适用于含有不易从分离介质脱附、含有悬浮微粒的样品分析。薄层色谱的应用非常广泛,常用于目标物质的定性检出、化合物纯度的检测、定量分析、有机化合物合成跟踪监测、药物分析及含量测定等多个方面,在定性、半定量以及定量分析中发挥着重要作用。

薄层色谱虽在分离混合物的不同组分上有优势,但对分

离后的未知组分的检出鉴定方面存在局限性。人们通常用薄层色谱分离混合物后,从颜色、紫外吸收或荧光来识别各种组分。对于没有颜色、没有紫外吸收、没有荧光的组分,通常采用的方法是:层析分离后,在色谱板上喷洒显色剂或荧光显色剂,通过显色剂与样品间的相互作用显色或产生荧光来标记这些组分条带的位置;亦可把荧光物质引入到固定相中,通过荧光物质与样品相互作用导致的荧光变化(如荧光猝灭或变色)来标记无颜色无荧光组分条带的位置。上述方法都是基于样品组份与显色剂或荧光物质间的相互作用。而不同组分的分子结构千差万别,与显色剂、荧光物质之间的相互作用以及所导致的颜色或荧光变化差别悬殊,因此,借助显色剂、荧光物质作标记的方法在应用范围上有相当程度的局限性。从这个角度上讲,发展适应薄层色谱要求的万能检测技术对于推动薄层色谱方法的发展将起到积极作用。红外光谱对薄层色谱而言可以被看作是一种具有普适性的检测器,在识别、检测无颜色无荧光的化学组份方面具有传统方法所没有的潜在优势。

收稿日期: 2010-11-25, 修订日期: 2011-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(50973003, 20975029), 国家科技部(863)重大项目(MOST2010AA03A406), 北京大学先进技术研究院培育项目资助

作者简介: 刘溪, 1984年生, 辽宁中医药大学药学院和北京大学化学与分子工程学院联合培养的硕士研究生

* 通讯联系人 e-mail: huliping705@163.com; xyz@pku.edu.cn; yzl@pku.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

薄层色谱与红外光谱联用的工作早在 20 世纪 60 年代就已见诸文献报道^[19, 20]。所用的实验方法可分为样品溶剂洗脱转移法和原位测量法两大类。样品洗脱转移法是用溶剂将经薄层色谱分离出的样品条带用溶解转移出来, 再进行红外光谱测量, 该方法的不足之处主要在于操作复杂、耗时, 且转移过程中造成样品损失、分解、污染的风险较大。原位测量法是直接对经薄层色谱分离出的样品条带进行红外光谱测试, 得到样品组份的红外光谱。该方法虽然简单^[21], 但是固定相自身的吸收会对样品的检测产生严重的干扰。本工作的主要目的就是寻找一种对中红外频段透明的物质作为固定相, 以开展原位薄层色谱-红外光谱联用工作。

本课题组长期运用红外光谱开展研究工作。在实验中常使用氟化钡晶片等无机盐窗片为衬底, 负载支撑各种样品, 进行红外光谱测试。由于氟化钡不吸收 800 cm^{-1} 以上的中红外光, 在此区间内, 氟化钡不会干扰样品的红外光谱。当构成无机盐阴、阳离子的原子质量较大时, 其晶格的简正振动仅局限在远红外及中红外的低频区, 使得此类无机盐在很宽的中红外频段内不吸收红外光。(例如, 硒化锌不吸收 $4\ 000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 区间的中红外光, 为了描述方便, 我们称这一性质为对中红外光透明)。它们的另一个特点是化学性质稳定, 不溶于水及大部分有机溶剂。因此, 作为薄层色谱板的固定相, 不会被流动相溶解破坏。所以以氟化钡为代表的此类无机盐作为薄层色谱固定相有可能为突破原位薄层色谱-红外光谱联用的瓶颈提供新的机会。

因此, 我们提出: 采用化学性质稳定、且不吸收中红外光的氟化钡作为新型层析材料, 制备薄层色谱板。将混合物样品用这种薄层色谱板进行层析展开后, 再使用红外光谱方法进行检测。从原理上讲, 用这种方法可以实现原位薄层色谱-红外光谱联用。然而, 固定相颗粒对红外光的光散射效应会造成红外光谱基线抬高, 光谱质量下降, 影响测试效果。减小固定相颗粒的直径可以减弱光散射效应的影响。另外, 固定相颗粒变小会降低理论塔板高度, 提高分离效果。基于上述想法, 我们开展了一些尝试性研究工作: 制备了颗粒在 500 nm 左右的氟化钡颗粒, 红外光谱测试表明其不仅在中红外区没有吸收峰, 而且因颗粒光散射所造成的光谱基线抬高现象也不明显; 同时我们亦发展出用上述难溶无机盐颗粒制备均匀度与传统硅胶板相仿的层析板的新方法; 层析实验证明, 氟化钡颗粒制成的新型薄层色谱板可以起到分离混合物样品(罗丹明 B 和亚甲基蓝的混合物)的作用; 初步的结果证实了我们设想的可行性, 为从技术上实现原位薄层色谱-红外光谱联用打开了大门。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Nicolet Magna iN10 傅里叶变换红外光谱仪(Thermo Scientific)、落地式高速低温离心机(Beckman)、JSM-6700F 扫描电镜(Jeol)。

实验试剂均为市售分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

采用氢氧化钡溶液与氢氟酸反应制备微小 BaF_2 颗粒, 配制一定量饱和氢氧化钡溶液, 按化学计量比取稍过量的氢氟酸用二次水稀释, 在充分搅拌的情况下, 逐滴将氢氟酸加入饱和氢氧化钡溶液中。充分陈化后, 将浑浊液离心离心($8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\times 5\text{ min}$), 沉淀经充分洗涤后, 置于高温烘箱, 在 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 下烘烤 12 h 。

采用 Thermo Scientific 公司生产的红外光谱仪(Nicolet Magna iN10)对 BaF_2 颗粒样品进行红外光谱测试, 光谱分辨率为 4 波数, 扫描 64 次, 扫描范围 $4\ 000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 。原位薄层反射红外检测光谱分辨率为 4 波数, 扫描 64 次。扫描范围: $4\ 000\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 。

将干燥的氟化钡粉体样品用导电胶固定在样品台上, 真空喷金处理, 采用扫描电子显微镜(SEM, JEOL JSM-6700F, 场发射电子扫描显微镜)观察样品的粒径和形貌, 扫描电流为 $10\text{ }\mu\text{A}$, 工作电压为 5 kV 。

2 结果与讨论

2.1 氟化钡颗粒的制备

在我们采用的氢氧化钡与氢氟酸定量反应中, 除形成难溶的氟化钡外, 氢氧根与氢离子中和形成水, 从而避免了反应所产生的副产物在氟化钡颗粒上的吸附。通过优化反应条件, 得到的氟化钡颗粒的尺寸为几百纳米(如图 1)。降低氟化钡颗粒的尺寸, 一方面可减弱因固定相的光散射效应对样品红外光谱所造成的干扰, 另一方面亦可达到提高塔板数,

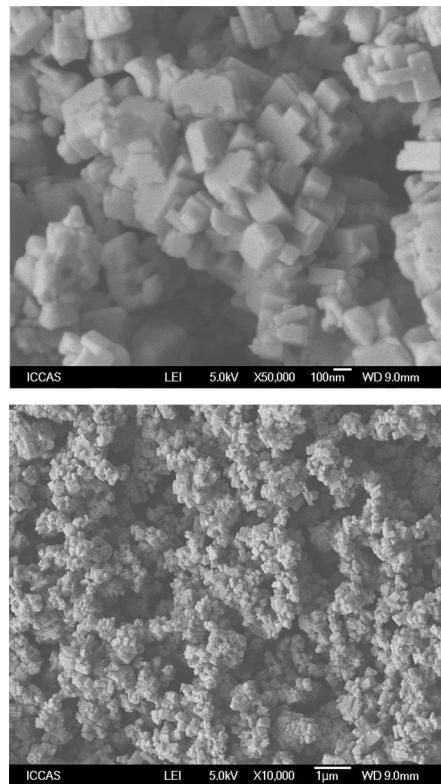


Fig 1 SEM Micrographs of BaF_2 particles Produced by the Reaction between $\text{Ba}(\text{OH})_2$ and HF . The average size of the BaF_2 particles is around 500 nm

改善分离效果的目的。

图 2 给出了氟化钡颗粒的显微红外光谱。可以看出, 在 $4\ 000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ 区间除了空气中 CO_2 在 $2\ 362\text{ cm}^{-1}$ 左右的吸收峰以外, 未见其他吸收峰, 是因为钡离子的原子质量较大, 其构成的氟化钡颗粒的晶格的简正振动仅局限在远红外及中红外的低频区, 使得氟化钡颗粒在很宽的中红外频段内不吸收红外光; 且 $4\ 000\text{ cm}^{-1}$ 处的吸光度仅为 0.3, 表明由氟化钡颗粒光散射所导致基线的升高效应并不严重。符合作为原位薄层色谱-红外光谱联用的薄层固定相的要求。

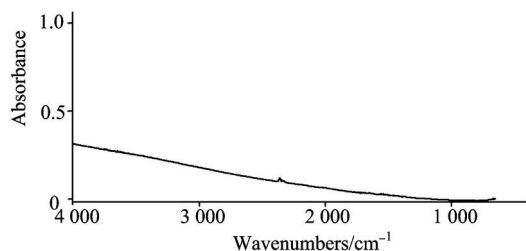


Fig 2 FTIR Spectrum of the BaF_2 particles. No absorption of impurity was observed. Additionally, the elevation of baseline caused by light scattering is insignificant since the size of the barium fluoride particles is much smaller than the wavelength of the Infrared light in FTIR spectral measurements

2.2 用难溶无机盐颗粒制备薄层色谱板的方法研究

人们制备薄层色谱板的方法通常是将高分子胶粘剂与固定相颗粒(如硅胶或氧化铝等)用少量液体(如水)调成糊状, 再将糊均匀涂在基板上, 待液体挥发后, 高分子胶粘剂将固定相颗粒粘结在一起, 形成平整、均匀、机械强度好的层析薄层。然而这种方法并不适合于制备用于原位薄层色谱-红外光谱联用的薄层层析板, 因为高分子粘合剂产生的红外光谱吸收信号将干扰样品的红外光谱检测。

为了解决上述干扰, 我们发展出一种称为沉降-挥发法的新技术, 成功制备出质量良好的薄层层析板。该方法是将一定重量的难溶无机盐颗粒(如 0.5 g 氟化钡)加入一定体积的液体(如 40 mL 水)中, 经振荡搅拌形成悬浮液, 再将上述悬浮液加入到放有层析板基底-铝板的容器中, 在通风且防尘的条件下静置, 使难溶盐颗粒缓慢沉降在基底表面, 待液体挥发后, 即可制出平整、均匀、机械强度好的层析薄层(如图 3 所示)。

传统薄层板基底通常采用玻璃片, 将产生明显的红外光谱吸收信号, 干扰样品的红外光谱检测。因此, 我们采用能够反射红外光的铝板作为薄层板基底。图 4 为铝板的红外反射光谱, 可以看出, 纯铝板作为薄层板基底而对样品的红外光谱检测没有干扰。

2.3 氟化钡薄层板层析实验

由实验中选择亚甲基蓝和罗丹明 B 混合物为样品, 流动相为乙醇/乙酸乙酯混和溶液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$), 经 10 min 层析展开的结果可以看出, 罗丹明 B(粉红条带)已与亚甲基蓝(蓝条带)完全分离(如图 5 所示), 表明氟化钡颗粒具

有成为固定相, 用于分离混合物中不同组份物质的潜力。

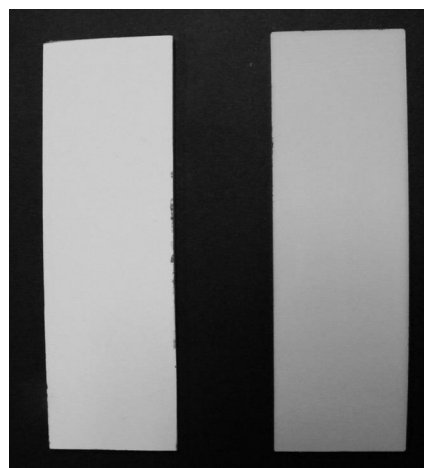


Fig 3 Photographs of TLC Plates

(a) is a commercial TLC plate made of silica gel; (b) is the TLC plate made of BaF_2 particles and prepared by using settlement volatilization technique developed in our lab

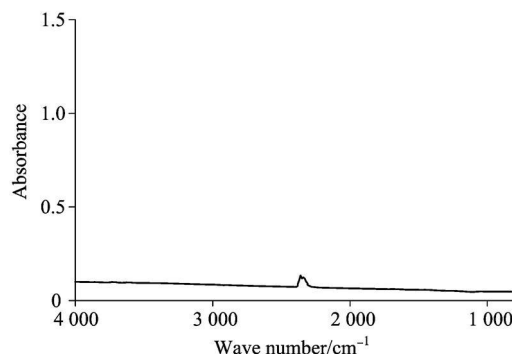


Fig 4 FTIR spectrum of a pure aluminium used as substrate of TLC plate obtained in reflection mode. No absorption of impurities was observable

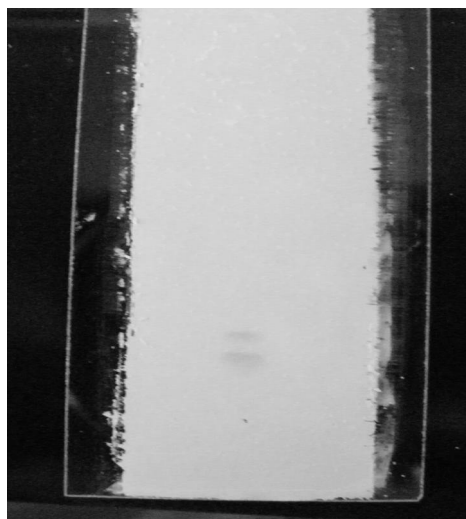


Fig 5 Photograph of a TLC plate after chromatographic experiment. TLC plate using BaF_2 particles as stationary phase can separate Rhodamine B and Methyl Blue Successfully

另外,随着固定相颗粒的减小,单位质量固定相表面积增大,因此在薄层层析时,展开剂与固定相之间的作用力增大,可能导致展开剂展开距离缩短,且完全展开时间延长。因此我们观察了这种新型薄层板的展开距离随时间的变化(如图6所示)。可以看出,新型薄层板的展距并没有因为固定相颗粒的减小而明显缩短,经30 min的层板分离,溶剂前沿可达到5~5.5 cm(薄层板长度为7.5 cm),与常规的硅胶层析板的层析展开速度相仿。

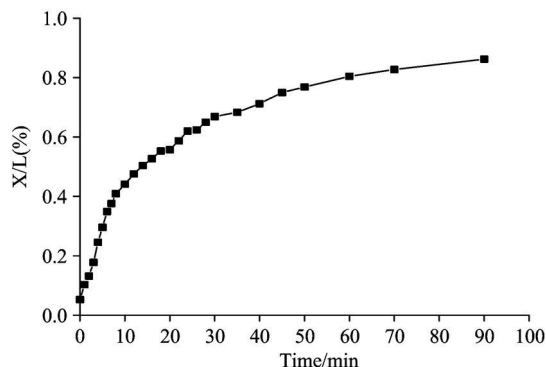


Fig 6 The distance of the start line to the solvent front as a function of time. This result indicates that the time for TLC separation by using BaF_2 fine particles as stationary phase is comparable with conventional TLC plate made of silica gel

2.4 原位红外光谱检测

用我们制备的 BaF_2 新型薄层板,将浓度为0.1%的次甲基蓝甲醇溶液用毛细管点在薄层板上,待溶剂完全挥发后,用100%甲醇展开,静置10 min,待展开剂完全挥发后,采用显微反射红外法原位测定薄层板上被展开的次甲基蓝,层析板基底采用能够反射红外光的纯铝板,其反射红外图谱测定如图7a所示,与纯次甲基蓝标准显微红外光谱相比,除少数特征峰稍有峰位漂移,绝大多数的谱峰波数匹配度很高。

而且,相对峰强也很相称。进一步表明氟化钡作为原位薄层色谱-红外光谱联用的固定相对中红外光是透明的,不干扰样品的中红外光谱检测。另外,反射红外光谱检测也可作为原位薄层样品检测的有效手段。

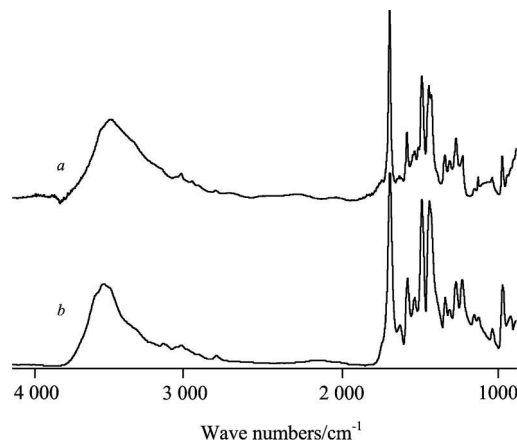


Fig 7 FTIR spectrum of methylene blue spot (a) after TLC separation using BaF_2 as stationary phase and methanol as mobile phase. For comparison, standard FTIR spectrum of methylene blue (b) were also shown

3 结 论

上述结果初步表明,采用氢氧化钡与氢氟酸反应的合成路线,通过优化反应条件,能够制备出中红外透明、粒度小的氟化钡颗粒;利用沉降挥发法可以制备出均匀、光滑、机械强度好的薄层色谱板;氟化钡作为一种新型固定相具有一定的层析分离能力。由于氟化钡颗粒在4000~800 cm^{-1} 区间的中红外光透明,将不会干扰样品的红外光谱检测。因此氟化钡颗粒用于新型的固定相可以基本满足原位薄层色谱-红外光谱联用的要求。

References

- [1] HE Liyi(何丽一). Method and Application of Planar Chromatography (2nd ed.) (平面色谱方法及应用). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005.
- [2] SUN Yur-qing, HU Yur-zhu(孙毓庆, 胡育筑). Selection and Optimization of HPLC Solvent System(液相色谱溶剂系统的选择与优化). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2007.
- [3] WANG Jing-zun, QU Hui-sheng(王敬尊, 瞿慧生). Introduction of Comprehensive Analysis: Analysis of Technology of Complex Samples (复杂样品的综合分析 剖析技术概论). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000.
- [4] BAI Hua, LIU Guang-rong(白桦, 刘广荣). Analytical Instrument(分析仪器), 1997, 4: 1.
- [5] DONG Huiru, ZHANG Jian-jun(董慧茹, 张建军). Physical Testing-Chemical Analysis(理化检验 化学分册), 2001, 37: 430.
- [6] WANG Yuan, ZHU Ruo-hua, CHEN Hui(汪媛, 朱若华, 陈惠). College Chemistry(大学化学), 2006, 21(3): 34.
- [7] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1988, 60: 74R.
- [8] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1990, 62: 255R.
- [9] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1992, 64: 134R.
- [10] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1994, 66: 67R.
- [11] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1996, 68: 1R.
- [12] Joseph Sherma. Anal. Chem., 1998, 70: 7R.
- [13] Joseph Sherma. Anal. Chem., 2000, 72: 9R.

- [14] Joseph Sherma. Anal. Chem., 2002, 74: 2653.
- [15] Joseph Sherma. Anal. Chem., 2004, 76: 3251.
- [16] Joseph Sherma. Anal. Chem., 2006, 78: 3841.
- [17] Joseph Sherma. Anal. Chem., 2008, 80: 4253.
- [18] Somsen G W, Morden W, Wilson I D. Journal of Chromatography A, 1995, 703: 613.
- [19] McCoy R N, Fiebig E C. Anal. Chem., 1965, 37: 593.
- [20] Priscilla A Sturm, Parkhurst R M, Skinner W M. Anal. Chem., 1966, 38: 1244.
- [21] Stahlmann S, et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 12: 461.

Using Barium Fluoride Fine Particles as Stationary Phase for TLC/FTIR Analysis

LIU Xi^{1,2}, PAN Qing-hua², DING Jie^{2,3}, ZHU Qing^{1,2}, HE An-qin², YUE Shijuan^{2,4}, LI Xiaopei^{2,4}, HU Liping^{1*},
XIA Jirong⁵, LIU Cui-ge⁴, WEI Yong-ju⁴, YU Jiang³, YANG Zhaolan^{2*}, ZHU Xi⁶, XU Yizhuang^{2*}, WU Jirong²

1. College of Pharmacy, Liaoning University Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

2. The State Key Laboratory of Rare Earth Materials Chemistry and Application, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

3. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

4. College of Chemistry and Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

5. Shenyang Dootel Biopharmaceutical Research Center, Shenyang 110031, China

6. Intensive Care Unit, Peking University Third Hospital, Beijing 110083, China

Abstract *In situ* TLC/FTIR technique has tremendous potential in the analysis of complex mixtures. However, the progress in this technique was quite slow. The reason is that conventional stationary phase such as silica gel etc. has strong absorption in FTIR spectrum and thus brings about severe interference in the detection of samples. To solve the problem, the authors propose to use barium fluoride fine particles as stationary phase of TLC plate. The reasons are as follows: Barium fluoride wafer has been extensively used as infrared window in FTIR experiments and it has no absorbance in an IR region between 4 000 and 800 cm^{-1} . As a matter of fact, the atomic mass of barium and fluoride is quite large, thus the normal vibration of BaF_2 lattice is limited in far IR region and low frequency part of mid IR region. Therefore, the interference caused by IR absorption of stationary phase can be resolved if BaF_2 is used as stationary phase of TLC plate. Moreover, BaF_2 is quite stable and insoluble in water and most organic solvents and it will not be dissolved by mobile phase or react with samples in TLC separation. Additionally, decreasing the particle size of BaF_2 is very important in TLC/FTIR analysis technique. The reason is two fold: First, decreasing the particle size of stationary phase is helpful to improving the efficiency of separation by TLC plate; second, decreasing the size of BaF_2 particle can improve the quality of FTIR spectra by alleviating the problem of light scattering. By optimizing the synthetic conditions, fine particles of barium fluoride were obtained. SEM results indicate that the size of the BaF_2 particles is around 500 nm. FTIR spectrum of the BaF_2 particles shows that no absorption of impurity was observed. Moreover, the elevation of baseline caused by light scattering is insignificant. The authors have developed a new technique named "settlement volatilization method" to prepare TLC plate without polymeric adhesive that may bring about significant interference in FTIR analysis. Preliminary TLC experiments proved that the TLC plate using BaF_2 fine particles as stationary phase can separate rhodamine B from methylene blue successfully. Applications of barium fluoride fine particles as stationary phase have bright perspective in the development of new *in situ* TLC/FTIR analysis techniques.

Keywords *In situ*; TLC; FTIR; Couple with; Barium fluoride

* Corresponding author

(Received Nov. 25, 2010; accepted Feb. 21, 2011)