

由双硅氧烷偶联剂制备硫醚键合液相色谱固定相的研究及评价

刘妙芬, 李来生*, 杨汉荣
(南昌大学分析测试中心, 南昌 330047)

摘 要: 将等摩尔的乙烯基三甲氧基硅烷与 3-巯丙基三甲氧基硅烷发生加成反应, 合成一种双硅氧烷偶联剂, 然后在快速搅拌下, 将其键合到分散的 10 μm 硅胶上, 并用三甲基氯硅烷封尾, 从而制得一种含硫醚桥基的新型色谱固定相。用红外光谱和热分析等表征新固定相的结构, 在甲醇-水作为流动相的条件下, 以 ODS 柱做参比相, 选用不同的溶质探针评价了新固定相的色谱性能。考察了多环芳烃、极性的取代芳烃、嘌呤类和蒽醌类化合物在该键合相上的色谱行为。结果表明, 该固定相具有明显的反相色谱性能, 在色谱分离和样品的前处理方面将有较好的应用前景。

关键词: 高效液相色谱法; 双硅氧烷偶联剂; 硫醚键合固定相; 制备; 色谱性能评价

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2009)04-001-05

色谱填料的研究, 有力地促进了色谱技术与分离理论的发展。一方面随着分析对象的多样化和复杂化, 有必要从分子角度去构筑具有超分子性能和高分离效能的复杂配体, 以满足蛋白组学等生命科学飞速发展的要求^[1~3]。如: 环糊精、冠醚、环芳烃等因具有特殊的环腔结构, 对溶质有较高的分子识别能力, 用作色谱配体, 尤其是手性配体的研究越来越普遍, 在新兴的手性药物纯化及代谢研究方面极具潜力^[4~7]。另一方面, 制备简便、结构实效的分离材料, 如具有工业规模骨架的整体型分离材料等将有广泛的应用前景^[8~10]。复杂的分离并非必须对应于复杂的配体, 色谱固定相的多元化需要不断地拓展新的制备途径, 这其中环境友好、制备简便、价格低廉和实用性强的色谱固定相和色谱样品前处理材料仍将受到青睐^[11,12]。

本研究通过将巯基和烯基偶联剂反应制得含双烷氧基的偶联剂中间体, 然后与硅胶表面羟基

缩合, 制备得到一种丙基乙基硫醚桥基配体键合硅胶 (Ethyl propyl thioether-bonded stationary phase, 以下简称 ETSP), 这种方法国内外尚未见报道。期望短的硫醚链能降低疏水性, 同时引入杂原子位点, 弥补传统 ODS 长碳链带来的对非极性化合物和极性化合物保留过强或过弱的不足。研究表明, 该硫醚键合相尽管碳链长度不及 C8 固定相, 但对多种类型化合物展示分离选择性, 硫杂碳链和桥基配体结构应该对分离有一定的贡献。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-6A 高效液相色谱仪, 配有 SPD-6AV 紫外-可见光检测器 (日本岛津), 7725 型手动进样器 (Rheodyne 公司), 采用 N-2000 双通道色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所)。Nicolet-5700 傅立叶变换红外光谱仪 (美国尼高力), Diamond TG/DTA 热分析仪 (Perkin Elmer); Elementar vario EL 型元素分析仪 (德国)。

* 收稿日期: 2008-02-04; 修订日期: 2008-04-02

基金项目: 江西省教育厅科技基金 (JJ2007-18) 项目资助

作者简介: 刘妙芬 (1983 -), 女, 硕士研究生; E-mail: liumfunsunny@163.com、lilaishengcn@163.com

球形硅胶 ($\Phi 10\ \mu\text{m}$, 比表面积约为 $260 \sim 280\ \text{m}^2/\text{g}$, 中国青岛美高化工有限公司); 3- 硫丙基三甲氧基硅烷, 乙烯基三甲氧基硅烷 (武汉天目科技发展有限公司); 嘌呤、次黄嘌呤等生化试剂购于中国科学院上海生物化学研究所; 甲醇 (色谱纯, 上海陆都化学试剂厂); 三甲基氯硅烷 (成都市科龙化工试剂厂); 其它均为分析纯试剂, 水为二次蒸馏水。

1.2 硫醚桥基键合相 (ETSP) 的制备

分别移入 1.53 mL 乙烯基三甲氧基硅烷和 1.86 mL 3- 硫丙基三甲氧基硅烷于一个 150 mL 的圆底烧瓶中, 加入 60 mL 无水新蒸甲苯 (金属钠除水), 磁力搅拌促溶, 然后加入 0.05 g 过氧化二苯甲酰作为引发剂, 在 N_2 的保护下回流反应 24 h, 红外检测巯基吸收峰 ($2560\ \text{cm}^{-1}$) 消失。接着加入 9.0 g 干燥活化的球形硅胶, 在 N_2 的保护下回流

反应 24 h, 待冷却后过滤, 甲苯索氏提取键合硅胶一次 (24 h), 以清除孔道中残留的反应物, 然后分别用乙醇和丙酮洗涤各 2 次, 在红外灯下烘干 1 h, 然后移至真空干燥箱中, 于 80°C 下真空干燥 10 h, 得未封尾的双偶联剂键合硅胶。

往盛有 80 mL 无水甲苯的圆底烧瓶中加入 4.5 g 的双偶联剂键合硅胶, 搅拌下加入 6.2 mL 的三甲基氯硅烷, 通入 N_2 保护气, 在 80°C 下反应 12 h。待混合物冷却后, 键合硅胶用 CH_2Cl_2 洗涤两次, 以除去未反应的三甲基氯硅烷和反应中生成的少量 HCl , 最后用无水乙醇洗涤, 用砂芯漏斗抽滤, 在 80°C 下真空干燥 20 h, 得到硫醚桥基键合硅胶固定相 (ETSP)。新固定相采用红外光谱、元素分析和色谱分析进行表面配体表征。图 1 为 ETSP 制备技术路线图。

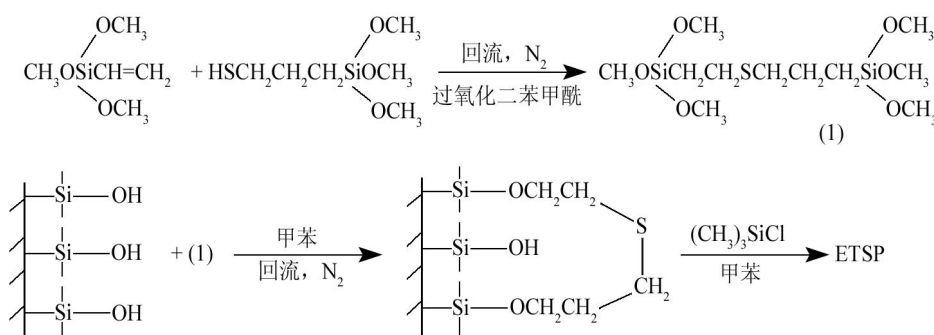


图 1 硫醚桥基键合硅胶固定相 (ETSP) 的制备路线

Fig. 1 Preparation scheme of thioether-bonded silica gel stationary phase (ETSP)

1.3 ETSP 柱的装填和色谱方法

以异丙醇为匀浆剂, 甲醇为顶替液, 用一台 LC-6A 高效液相色谱泵 (日本岛津公司) 恒压装柱, 装柱压力为 25 MPa, 将封尾的 ETSP 固定相填入一根不锈钢色谱柱管 ($4.6\ \text{mm i.d.} \times 50\ \text{mm}$) 中。

用甲醇-水流动相进行平衡, 直至基线平稳后进样测定。试样用甲醇溶解, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 超滤膜过滤后进样分析, 进样体积一般为 $10\ \mu\text{L}$ 。流动相用 G4 砂芯漏斗过滤, 超声脱气 10 min, 流速设为 $0.8\ \text{mL/min}$, 检测波长为 $254\ \text{nm}$, 以溶剂峰的出峰时间为死时间, 所有样品至少重复测定 2 次。

2 结果与讨论

2.1 ETSP 固定相的结构表征

通过反应前后物质红外光谱的对比, 反应

24 h 后, 混合物的红外光谱图中, 典型的巯基吸收峰 ($2560\ \text{cm}^{-1}$) 明显消失, 说明加成反应进行完全; 将键合成的硫醚桥链键合硅胶与空白硅胶的红外光谱进行对照, 发现反应后 $3436\ \text{cm}^{-1}$ 左右的硅羟基伸缩振动强度有所减弱, 说明部分硅羟基参与了偶联反应。2961, 2922, $2851\ \text{cm}^{-1}$ 处有明显的 C-H 伸缩振动峰, 说明硅胶表面负载了有机配体。

在相同的条件下, ETSP 比空白硅胶多失重 5.1 % ($30 \sim 700^\circ\text{C}$, 10°C/min), 推算得键合量为 $0.36\ \text{mmol/g}$ 。C、H 和 S 的元素分析结果为: 2.7 %, 1.08 % 和 1.25 %, 根据碳含量计算键合量为 $0.45\ \text{mmol/g}$ 。同时, 键合后硅胶表面的疏水性明显增强。用甲醇做分散剂将键合硅胶分散在载

玻片上,显微镜下发现硅胶仍处于单分散状态。综上分析表明,乙基丙基硫醚桥基键合硅胶被成功地制备。

2.2 柱效与稳定性考察

以联苯为溶质探针, $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 55 : 45$ (0.8 mL/min, 32 °C) 为流动相,在 ETSP 柱上的保留时间为 10.173 min,测得理论塔板数为 6622 块/m。

以甲醇-水或相关酸性溶剂为流动相,重复测定溶质探针的保留时间,以考察新固定相的键合层的稳定性和色谱性能的重现性。经强溶剂的冲洗以及酸性流动相的实验表明 ETSP 的色谱性能保持稳定。

2.3 ETSP 的色谱分离性能

2.3.1 疏水性的考察

首先考察新固定相对中性化合物(苯、甲苯、乙苯和丙苯)的分离,以 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 55 : 45$ 为流动相,发现烷基苯的 $\log k'$ 与亚甲基数 (n) 之间呈良好的线性关系,符合碳数规律,说明 ETSP 具有反相色谱性能。比较后发现 ETSP 的斜率(0.1594)小于同等条件下的 ODS 的斜率(0.3016),这是由于碳链短(含 5 个亚甲基),键合量也较低(0.45 mmol/g),故疏水性比 ODS 弱,保留时间相对较短。

以甲醇-水作为流动相时,在 ETSP 上可实现 8 种多环芳烃的快速分离(约 30 min),并且溶质的

$\log k'$ 与甲醇的含量(ϕ)之间呈良好的线性关系。这说明固定相硫醚配体与多环芳烃间存在疏水性相互作用。该固定相配体仅含有 5 个 C 原子和 1 个 S 原子,能在较短时间内分离 8 种中性的多环芳烃,且分离选择性较高。可能是由于双偶联剂两端同时键合在同粒硅胶表面上,形成了一种环状的桥链烷基结构,二价的硫原子的柔性有利于这种桥链的形成,这种桥链对物质的大小和形状分离应该有一定的贡献,较小的分子可能易渗入桥链中,导致保留和选择性改善,这种作用有待于进一步的实验确证。

2.3.2 对极性芳烃的分离

以极性芳环结构的化合物作为溶质探针,考察 ETSP 对极性化合物的色谱分离选择性。由图 2 可见,2,4,6-三硝基苯酚最先被洗脱,这是由于硝基的吸电子效应导致酚羟基容易电离,极性增强,疏水性减弱,从而最先被洗脱;其次是间苯二酚、苯酚和间硝基苯酚;可电离的极性基团数目越多(如羟基),分子极性越强,中性分子数减少,故溶质保留值降低。随着溶质芳环数增加或疏水链的延长,保留值增大(如: α -萘酚和双酚 A 等)。2,4-二羟基二苯甲酮和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮尽管含可电离的羟基,但它们连接在较大的疏水性骨架上,羟基占整个分子的份额较小,因此保留时间较长。

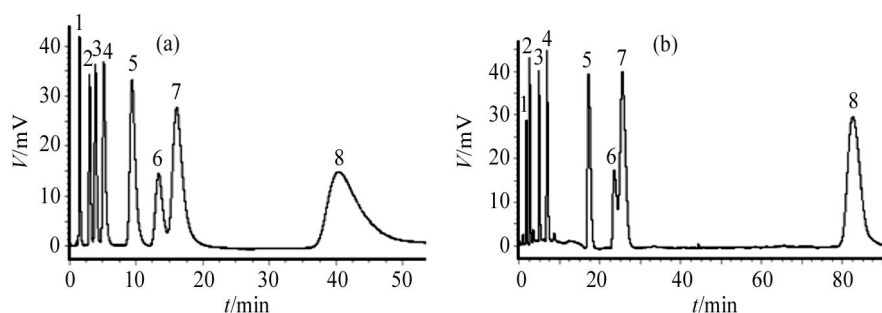


图 2 8 种含极性基团的取代芳烃在 ETSP (a) 和 ODS (b) 上的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of eight polar substituted aromatics on ETSP (a) and ODS (b)

流动相: $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 50 : 50$. 1- 2,4,6-三硝基苯酚; 2- 间苯二酚; 3- 苯酚; 4- 间硝基苯酚; 5- α -萘酚; 6- 双酚 A; 7- 2,4-二羟基二苯甲酮; 8- 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮

比较图 2(a)和(b),从整体来看,这些溶质在 ODS 和 ETSP 两柱上的保留顺序相同,说明在分离极性芳烃化合物时,疏水作用仍是主要作用力。然而,在相同的条件下, α -萘酚、双酚 A、2,4-二羟

基二苯甲酮和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮在 ETSP 上的保留时间明显比 ODS 短,相反地,溶质的分离选择性却较高,例如:双酚 A 和 2,4-二羟基二苯甲酮在 ODS 柱上未能完全分离,实验中还进行

了条件优化,发现 ODS 也难于实现两者的分离。这可能是由于两溶质结构相似,电离性和疏水性相近,故 ODS 的单一疏水性作用对它们的分离选择有限。可是,ETSP 柱却对上述难分离的物质有较好的分离,显然,这与 ETSP 的短链、较低键合量和弱疏水不符,因此,除疏水以外的作用可能有贡献,硫醚配体含有 S 原子,存在孤电子对,能与被测物质中的羟基形成弱的氢键,另外桥型配体结构等作用,在疏水作用的支配下,协同作用改善了上述分离。ETSP 对 8 种含有极性基团的芳烃在 50 min 内取得较好的分离,且分析时间上比 ODS 更短,分析费用较低,加之该固定相制备简

便低廉,故对极性芳族化合物分离分析有应用优势。

2.3.3 对嘌呤类含氮化合物的分离 采用简单的甲醇-水二元流动相,图 3(a)显示 ETSP 能较快地分离黄嘌呤、嘌呤和茶碱。同时这些含氮碱性化合物在新柱上没有发现拖尾现象,峰形较为对称,柱效较高,说明配体的桥型结构对残存硅羟基有一定的屏蔽作用,这有利于实现碱性化合物的快速分离。而在一般情况下,尽管商业 ODS 填料经过了严格的封尾,链式的十八烷基相互交织,难于彻底去除残存羟基对碱性溶质的“亲硅醇效应”^[13],从图 3(b)中能发现这一点。

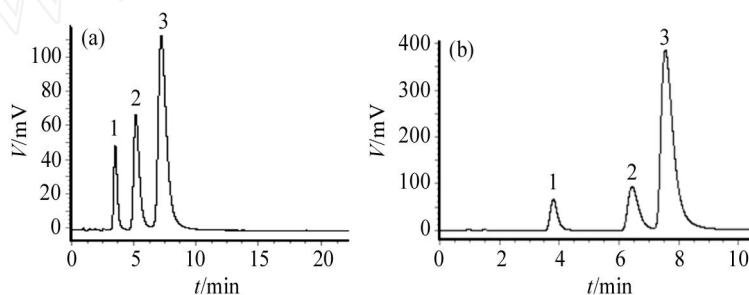


图 3 3 种嘌呤在 (a) ETSP 和 (b) ODS 上的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of three purines on ETSP (a) and ODS(b)

流动相: $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 5 : 95$. 1 - 次黄嘌呤; 2 - 嘌呤; 3 - 腺嘌呤

2.3.4 对蒽醌类化合物的分离 药用大黄^[14]是一种常见的中草药,其主要功效有泻实热、破积滞、行瘀血等,大黄药材一般含有约 3% 蒽醌类化合物,包括游离型和结合型的大黄酚、大黄酸、大黄素及大黄素甲醚等。称取适量的甘肃产药用大黄粉末(磨细)于烧瓶中,加入 $V(15\% \text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{甲醇}) = 2 : 3$ 的混合溶液 50 mL,于 90℃ 水浴中酸解 30 min,冷却至室温后,用乙醚重复萃取 3 次(每次 20 mL),合并乙醚层,挥去乙醚,残渣用甲醇溶解,经 0.45 μm 滤膜过滤,避光保存备用。

实验将新固定相用于大黄提取液中蒽醌类化合物的分离(见图 4),发现用 62% 的甲醇和水二元体系能较好地分离大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚,出峰顺序与 ODS 相同,可知 ETSP 分离蒽醌类化合物主要基于疏水作用。一方面,由于蒽醌类化合物的疏水作用面积大,在 ODS 柱上的保留很强,分离时间也较长,流动相所需有机相的含量较高,在 ODS 柱上的分离甲醇含量一般在 80% 以上,否则大黄素甲醚不易被洗脱。新固

定相疏水性较弱,所需甲醇含量相对较低,可节约有机溶剂,降低分析费用。另一方面,蒽醌类化合物的芳环上有羟基等极性基团,ETSP 中的 S 原子由于带有孤电子对而能与羟基形成弱的氢键,在分离中起到一定的作用,是 ODS 的极好的补充。与 ODS 相比,ETSP 在分离强疏水性的化合物方面速度快,分析成本较低。

3 结论

通过硫烯加成反应先合成双烷氧基的偶联剂,然后键合到硅胶表面制备了硫醚桥键合相,色谱性能研究表明,新固定相具有弱的疏水性,其中引入的 S 原子具有孤电子对,在分离极性溶质时可以形成弱的氢键,对难分离的极性化合物表现出与 ODS 不同的分离选择性;桥型配体能部分克服嘌呤类碱性化合物硅醇基效应;能快速分离强疏水性的蒽醌类化合物;制备方法简便,原料价廉易得。桥联型索套可能在血浆药物分离和样品前处理方便有应用潜能,这方面在进一步研究开发之中。

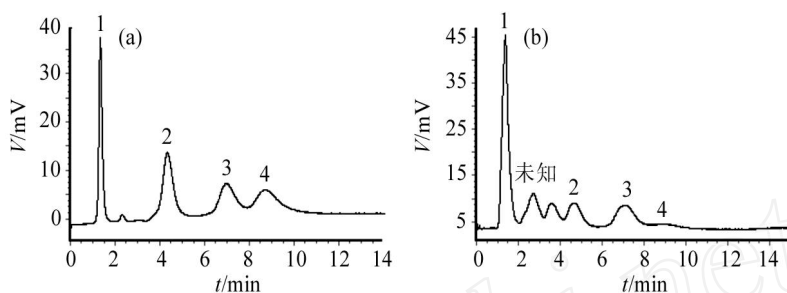


图 4 4 种蒽醌类化合物对照品 (a) 和大黄提取物 (b) 在 ETSP 上的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of four anthraquinone standards (a) and extraction from *Rheum palmatum* L (b) on ETSP

流动相: $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 62 : 38$. 1- 大黄酸; 2- 大黄素; 3- 大黄酚; 4- 大黄素甲醚

参考文献

- [1] Da S L, Feng Y Q, Da H N *et al.* J Chromatogr Sci, 1999, 37(5): 137
- [2] Stalcup A M, Chang S C, Armstrong D W. J Chromatogr, 1991, 540: 113
- [3] Feng Y Q, Xie M J, Da S L. Anal Chim Acta, 2000, 403(1/2): 187
- [4] 张纪贵, 郝爱友. 化学研究与应用, 2003, 15(3): 303
- [5] 唐雪惠, 周在德, 谢明贵等. 化学研究与应用, 1999, 11(5): 472
- [6] Takeuchi T, Fukuma D, Matsui J. Anal Chem, 1999, 71: 285
- [7] Zhang Q, Zou H F, Wang H L *et al.* J Chromatogr A, 2000, 866: 173
- [8] Jun H, Hisako T. J Chromatogr A, 1997, 777: 241
- [9] Chen Z L, Hobo T. Anal Chem, 2001, 73: 3348
- [10] Takeuchi T, Fukuma D, Matsui J. Anal Chem, 1999, 71: 285
- [11] 陈雄泉, 李来生, 杨汉荣. 分析化学, 2007, 35(9): 1279
- [12] 许丽丽, 李来生, 杨汉荣等. 色谱, 2007, 25(3): 374
- [13] 王俊德, 商振华, 郁蕴璐等. 高效液相色谱法. 北京: 中国石化出版社, 1992. 107
- [14] 宋小妹, 唐志书. 中药化学成分提取分离与制备. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 57

Study on the preparation and evaluation of a thioether-bonded silica gel stationary phase via bisalkoxysilyl coupling reagent for HPLC

LIU Miao-fen, LI Lai-sheng* and YANG Han-rong (Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047), Fenxi Shiyanshi, 2009, 28(4): 1~5

Abstract: A bisalkoxysilyl coupling reagent was first synthesized via the addition reaction between vinyltrimethoxysilane and (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane, and then a new thioether-bonded silica gel stationary phase (ETSP) for high performance liquid chromatography was prepared by using the above coupling reagent and 10 μm mono-dispersal silica gel with strong stirring. Finally, the bonded phase was endcapped with trimethylchlorosilane so as to minimize the residual silanols. The structure of new stationary phase was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, thermal analysis and so on. The chromatographic performance and the retention mechanism on the new packing material were evaluated by using polycyclic aromatic hydrocarbons, polar substituted aromatics, purines and anthraquinones as solute probes and methanol-water as mobile phases. According to chromatographic data, it can be concluded that new thioether-bonded silica gel stationary phase has excellent reversed-phase chromatographic property, and the proposed preparation method is a practical low cost process. It can be used in both chromatographic separation and sample pretreatment.

Keywords: High performance liquid chromatography; Bisalkoxysilyl coupling reagent; Thioether-bonded stationary phase; Preparation; Chromatographic evaluation