

## 咪唑键合硅胶固定相微柱液相色谱分离酚类和胺类化合物

李 广<sup>1,2</sup>, 牛金刚<sup>1,2</sup>, 刘 霞<sup>1\*</sup>, 蒋生祥<sup>1</sup>

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** : 由于微柱液相色谱( $\mu$ -LC)具有高检测灵敏度、低溶剂消耗、可以与质谱等多种检测器联用的优点,近年来受到广泛关注。将咪唑键合硅胶固定相填充到毛细管中,在自制的微柱液相色谱系统下利用此键合相具有的弱疏水作用,采用不同的流动相对酚类和胺类化合物进行了分离。结果表明,流动相中只需添加少量的有机溶剂就可以实现对一些有机化合物的分离,甚至可以只用纯水作流动相就能分离一些弱疏水性化合物,如酚类。微柱液相色谱的流动相用量少,避免或大大减少了对环境的污染。自制微柱液相色谱系统为下一步微柱液相色谱-质谱联用奠定了一定的基础。

**关键词** : 微柱液相色谱; 离子液体; 咪唑键合硅胶固定相; 酚类化合物; 胺类化合物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)03-0368-04 栏目类别: 技术与应用

## Separation of hydroxybenzenes and amines by microcolumn liquid chromatography with imidazolium functionalized silica stationary phase

LI Guang<sup>1,2</sup>, NIU Jingang<sup>1,2</sup>, LIU Xia<sup>1\*</sup>, JIANG Shengxiang<sup>1</sup>

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

**Abstract** : Microcolumn liquid chromatography ( $\mu$ -LC) has been received extensive attention in recent years because of several key advantages: the ability to work at very low flow rates, which leads to a significantly lower solvent consumption; the possibility to inject very low sample size; the enhanced detection performance with the use of concentration sensitive detection devices as a result of the strongly reduced chromatographic dilution during the separation process (mass sensitivity), the availability to hyphenate to mass spectrometry (MS), et al. A microcolumn liquid chromatographic system was set up. The chromatographic separations of some ordinary hydroxybenzenes and amines were performed with different mobile phases using the weak hydrophobic interaction of imidazolium functionalized silica stationary phase on a microcolumn (150 mm  $\times$  0.25 mm). The results showed that the organic compounds could be well separated when a few organic solvents were added in the mobile phase, and some weak hydrophobic organic compounds such as phenols could be separated using only water as the mobile phase. For the advantages of microcolumn liquid chromatography, this experiment avoided or significantly reduced the use of organic solvents which contaminated the environment. This system provided a base for microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry ( $\mu$ -LC-MS).

**Key words** : microcolumn liquid chromatography ( $\mu$ -LC); ionic liquids; imidazolium functionalized silica stationary phase; hydroxybenzenes; amines

与常规液相色谱相比,微柱液相色谱( $\mu$ -LC)由于具有分离效率高、样品和流动相消耗低、环境污染小、可不分流直接和其他检测器(如质谱(MS))及

二级色谱系统在线联用、柱惰性好适于生物样品分析等常规液相色谱不可比拟的优点,近几年得到了迅速发展<sup>[1]</sup>。离子液体由于具有许多其他有机溶

\* 通讯联系人: 刘霞, 研究员, 博士生导师, 研究方向为液相色谱及相关技术. Tel: (0931) 4968203, E-mail: gsluixia@lzb.ac.cn.  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20527005 和 No. 20775084).

收稿日期: 2008-11-13

剂无法比拟的优点,如不挥发、不易燃、溶解性和稳定性好等而作为一种新型介质被广泛应用于有机合成、催化、电化学、分离分析等化学化工的各个领域<sup>[2]</sup>。离子液体作为一种新型介质在分离分析中也已有不少应用。我们实验室在离子液体应用于液相色谱方面做过不少研究工作,主要包括离子液体用作流动相添加剂<sup>[3-5]</sup>和离子液体改性硅胶用作色谱固定相<sup>[6-9]</sup>两个方面。其中在离子液体改性硅胶方面采用多种键合方法制备了含有离子液体结构的改性硅胶固定相,并用于色谱分离。咪唑是一种有机芳香杂环化合物,咪唑环阳离子是组成离子液体的最普通的一种阳离子。咪唑键合硅胶有着很强的阴离子交换作用,是一种很好的离子色谱固定相,我们对其离子色谱性能也进行了详细的研究<sup>[7]</sup>。另外,该键合相还具有 $\pi$ - $\pi$ 作用、氢键作用、反相疏水作用等机理,其中反相疏水作用的存在使得该键合相具有分离一些碱性、酸性、中性物质的能力<sup>[10]</sup>。

在本文研究中,我们自制了微柱液相色谱系统,将咪唑键合硅胶固定相填充到毛细管中,并用于酚类和胺类化合物的分离。对咪唑键合硅胶固定相的反相色谱行为进行了探讨。此自制微柱液相色谱系统为下一步微柱液相色谱-质谱联用奠定了一定的基础。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-10ATvp 高效液相色谱泵(日本岛津公司); 1229 型高效毛细管电泳仪,配紫外检测器(北京新技术研究所);微分流阀(上海通微分析技术仪器有限公司);HW-2000 色谱工作站(南京千谱软件有限公司);弹性石英毛细管(0.25 mm i. d.  $\times$  0.36 mm o. d.,河北永年锐泽色谱器件有限公司)。

$\gamma$ -氯丙基三甲氧基硅烷(CPTMO,纯度为 98%,湖北省白荆州江汉精细化工厂);甲苯(分析纯,重蒸);咪唑、甲醇、乙腈、四氯化碳均为分析纯;硅胶(3  $\mu$ m,比表面积为 220 m<sup>2</sup>/g,孔径为 9 nm,本实验室合成);实验用水为重蒸去离子水;被分析物均为分析纯。

### 1.2 微柱液相色谱系统的建立

与常规液相色谱系统相比,微柱液相色谱系统要求更低的流量、更小的死体积和更小进样体积的进样阀。为此,本实验采用毛细管电泳所用的柱上紫外检测器<sup>[11]</sup>。另外,由于进样器最小进样量、泵最小流量和稳定性的限制,需采用分流技术。同时为了减小样品因在进样阀内的扩散而造成的峰展宽<sup>[1,12]</sup>,本文采用 2  $\mu$ L 定量管进样阀。图 1 为改造后的微柱液相色谱系统装置示意图。

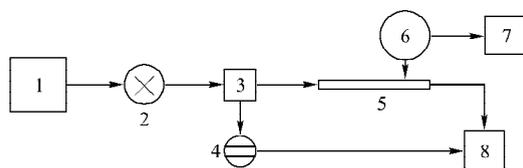


图 1 微柱液相色谱系统装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the microcolumn liquid chromatographic system

1. high performance liquid chromatography pump; 2. injection valve; 3. micro-splitter valve; 4. back pressure regulator; 5. microcolumn; 6. ultraviolet visible detector; 7. data processing system; 8. eluate.

### 1.3 筛板的制备

本实验采用较为简单的溶胶-凝胶法<sup>[13]</sup>制备柱上筛板。

### 1.4 液相色谱微柱的制备

#### 1.4.1 咪唑键合硅胶固定相的合成

根据文献[7]的方法合成咪唑键合硅胶固定相。第一步,将酸化处理过的硅胶(3  $\mu$ m)在干燥的甲苯中与适量的 $\gamma$ -氯丙基三甲氧基硅烷回流反应 24 h,冷却后抽滤洗涤、真空干燥,制得氯丙基硅胶;第二步,氯丙基硅胶与咪唑在甲苯中搅拌回流反应 24 h,冷却后抽滤洗涤、真空干燥,制得咪唑键合硅胶固定相。

#### 1.4.2 液相色谱微柱的填充

微柱的填充主要有匀浆法、干法和电动填充法 3 种方法,其中匀浆法是最常用的方法<sup>[14]</sup>。本文采用匀浆法进行填充<sup>[15]</sup>(见图 2)。称取 20 mg 咪唑键合硅胶固定相,用 1 mL 四氯化碳配制成匀浆液,超声混合均匀后装入匀浆罐中,匀浆罐与高压泵相连并置于超声浴中,以甲醇为顶替液在 35 MPa 压力下将匀浆液压入毛细管中。填充完毕后停止超声,同时逐步降低流速使柱压慢慢降为常压,之后用水在高于运行压力下冲压 2 h。卸下此柱,切去柱头一段未填充均匀的部分,使有效柱长为 15 cm。最后在距筛板后 0.5 cm 的地方烧制 2 mm 左右的窗口进行柱上检测。

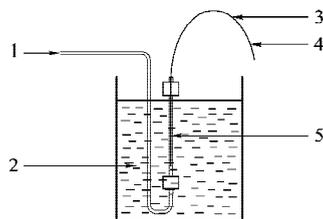


图 2 匀浆法填充毛细管装置示意图

Fig. 2 Schematic diagram of capillary slurry packing arrangement

1. high pressure liquid flow (from packing pump); 2. ultrasonic bath; 3. capillary; 4. frit; 5. slurry reservoir.

### 1.5 色谱条件

色谱柱:咪唑键合硅胶液相色谱微柱(150 mm × 0.25 mm 3 μm);流动相分别为水、乙腈-水(体积比为 5:95)、甲醇-乙腈-水(体积比为 5:5:90)和甲醇-水(体积比为 30:70);流速为 3 μL/min;检测波长为 254 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酚类化合物的分离

在自制的微柱液相色谱体系下用不同的流动相对酚类化合物进行了分离,图 3-a 和图 3-b 是分别以纯水和乙腈-水(体积比为 5:95)为流动相对 5 种酚类化合物进行分离的色谱图,图 3-c 是以甲醇-乙腈-水(体积比为 5:5:90)为流动相对 7 种酚类化合

物进行分离的色谱图。

从图 3-a 和图 3-b 中可以看出,以纯水和乙腈-水为流动相都能将对氨基酚、苯酚、间苯二酚、间苯三酚和间硝基酚这 5 种酚类化合物分开,但是以纯水为流动相分离时这 5 种酚的分离度和峰形与以乙腈-水为流动相相比要差一些。从两图对比中我们还可以看出,与纯水为流动相比较,水中加入乙腈为流动相,酚的保留时间都有所缩短,这是因为固定相与被分析物酚之间存在着反相疏水作用。

从图 3-c 对 7 种酚的分离中可以看出,咪唑键合硅胶微柱液相色谱和常规液相色谱一样,只要选取适当的分离条件就可以将一些结构相似或是较难分离的化合物(如间氨基酚与对氨基酚、间苯三酚与对氯代酚)分开。

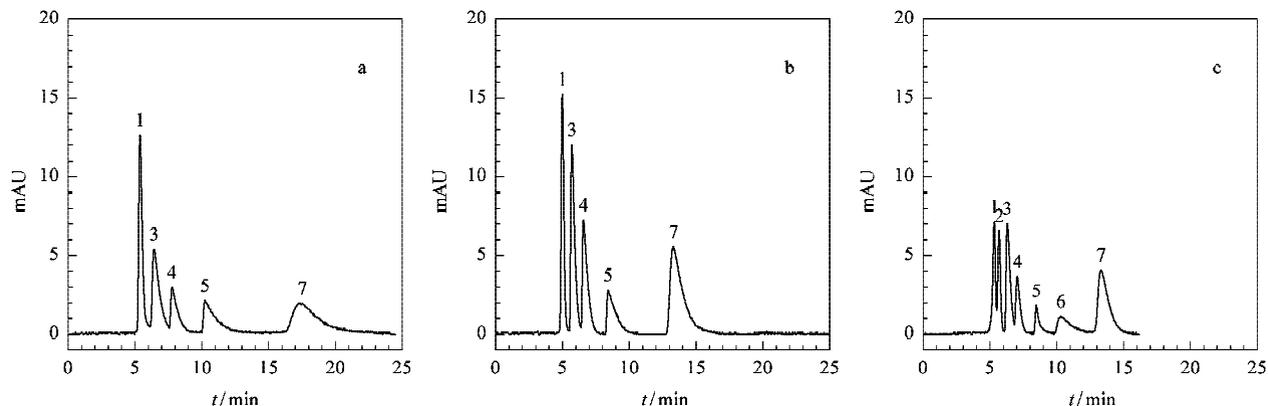


图 3 不同流动相条件下酚类化合物的色谱分离图

Fig. 3 Chromatograms of the separation of hydroxybenzenes by different mobile phases

Chromatographic conditions: column, imidazolium functionalized silica microcolumn (150 mm × 0.25 mm); flow rate: 3 μL/min; detection wavelength: 254 nm; mobile phases: a. water, b. acetonitrile-water (5:95, v/v), c. methanol-acetonitrile-water (5:5:90, v/v/v).

Peak identifications: 1. *p*-aminophenol; 2. *m*-aminophenol; 3. phenol; 4. resorcinol; 5. phloroglucinol; 6. *p*-chlorophenol; 7. *m*-nitrophenol.

### 2.2 胺类化合物的分离

在微柱液相色谱体系下对对苯二胺、间硝基苯胺、邻硝基苯胺、联苯胺和 β-萘胺 5 种芳胺化合物进行了分离。首先考察了流动相中不同的甲醇含量对这 5 种芳胺化合物保留因子的影响,结果见图 4。从图 4 中可以看出,随着流动相中有机溶剂甲醇含量的增加,芳胺化合物的保留因子都不同程度地有所减小;同时随着被分析物芳胺疏水性的增强,保留强度都明显地增大。图 5-a 和图 5-b 是分别以水和甲醇-水(体积比为 30:70)为流动相对这 5 种芳胺的色谱分离图。从两图对比中可以看出,当以纯水作流动相时,联苯胺和 β-萘胺拖尾严重且相互分不开,而以甲醇-水作流动相时,这种情况则得到了较好的改善。这是由于芳胺的疏水性较大,随着芳香性的增加疏水性变得更强;同时由于咪唑是一个有机芳香杂环结构,与芳香性分子之间存在着一定的

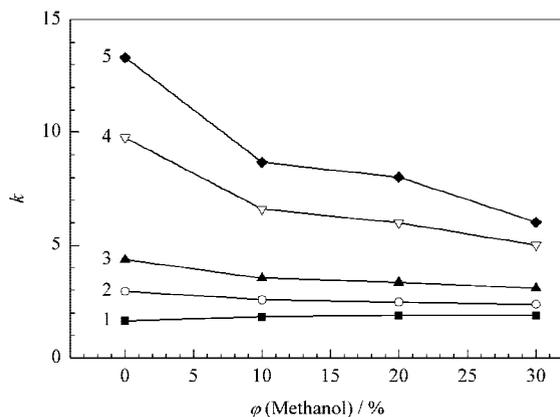


图 4 流动相中甲醇的含量对芳胺化合物保留因子的影响  
Fig. 4 Effect of methanol content in mobile phases on the retention factor ( $k$ ) of amines

Except the mobile phase, other conditions are the same as in Fig. 3.

1. *p*-phenylenediamine; 2. *m*-nitroaniline; 3. *o*-nitroaniline; 4. benzidine; 5. β-naphthylamine.

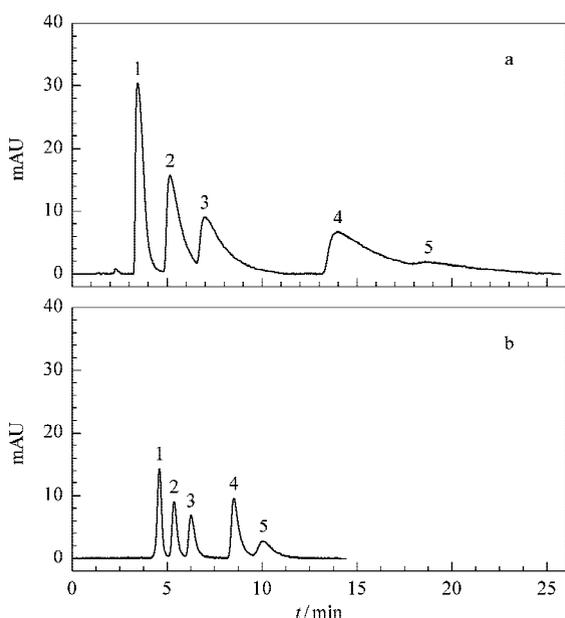


图5 不同流动相条件下芳胺化合物的色谱分离图

Fig. 5 Chromatograms of amines by different mobile phases

Mobile phases : a. water ; b. methanol-water ( 30:70 , v/v ) ; other conditions are the same as in Fig. 3.

Peak identifications : 1. *p*-phenylenediamine ; 2. *m*-nitroaniline ; 3. *o*-nitroaniline ; 4. benzidine ; 5.  $\beta$ -naphthylamine.

$\pi$ - $\pi$  作用 ,故只用纯水作流动相对芳胺化合物进行分离时峰形较宽且拖尾。这也证实了咪唑键合硅胶固定相反相疏水作用的存在。

通过微柱色谱体系下咪唑键合硅胶固定相对酚类及胺类化合物的分离可以看出 ,以纯水为流动相 ,被分析物的保留时间相对都比较长 ,峰比较宽且拖尾 ,而以纯水加入少许有机溶剂为流动相 ,被分析物的保留时间均有所缩短 ,并且明显改善了被分析物的选择性和柱效 ,证实了咪唑键合硅胶固定相反相疏水作用的存在。

### 3 结论

咪唑键合硅胶固定相存在着多重作用机理 ,除了强阴离子交换作用机理外 ,反相疏水作用也是此

键合相的一种重要的色谱作用机理 ,在自制的微柱液相色谱系统下利用这种作用可以对一些有机化合物进行分离 ,甚至用纯水作流动相就可以分离一些弱疏水性物质。此自制微柱液相色谱系统为下一步微柱液相色谱-质谱联用奠定了一定的基础。同时 ,微柱体系下对几种酚类及胺类化合物的有效分离也为一些实际样品中酚类或胺类混合物的分离检测提供了一种参考方法。

### 参考文献 :

- [ 1 ] Chen L X , Guan Y F , Ma J P. Progress in Chemistry ( 陈令新 , 关亚凤 , 马继平. 化学进展 ) , 2003 , 15( 2 ) : 107
- [ 2 ] Qiu H D , Hu Y Y , Liu X , et al. Chinese Journal of Chromatography ( 邱洪灯 , 胡云雁 , 刘霞 , 等. 色谱 ) , 2007 , 25( 3 ) : 293
- [ 3 ] Zhang W Z , He L J , Gu Y L , et al. Anal Lett , 2003 , 36( 4 ) : 827
- [ 4 ] He L J , Zhang W Z , Zhao L , et al. J Chromatogr A , 2003 , 1007( 1/2 ) : 39
- [ 5 ] Xiao X H , Zhao L , Liu X , et al. Anal Chim Acta , 2004 , 519( 2 ) : 207
- [ 6 ] Qiu H D , Jiang S X , Liu X. J Chromatogr A , 2006 , 1103( 2 ) : 265
- [ 7 ] Qiu H D , Jiang S X , Liu X. J Chromatogr A , 2006 , 1116( 1/2 ) : 46
- [ 8 ] Qiu H D , Jiang Q , Wei Z , et al. J Chromatogr A , 2007 , 1163( 1/2 ) : 63
- [ 9 ] Jiang S X , Liu X. Chinese Journal of Chromatography ( 蒋生祥 , 刘霞. 色谱 ) , 2007 , 25( 2 ) : 163
- [ 10 ] Qiu H D , Sun Y J , Jiang S X , et al. Analysis and Testing Technology and Instruments ( 邱洪灯 , 孙亚捷 , 蒋生祥 , 等. 分析测试技术与仪器 ) , 2006 , 12( 2 ) : 82
- [ 11 ] Ma J P , Ding M Y , Zhu H N , et al. Journal of Instrumental Analysis ( 马继平 , 丁明玉 , 朱华年 , 等. 分析测试学报 ) , 2008 , 27( 1 ) : 42
- [ 12 ] Dong X C , Zhang T. Yunnan Chemical Technology ( 董学畅 , 张甜. 云南化工 ) , 2004 , 31( 5 ) : 23
- [ 13 ] Zhang X M , Huang S. J Chromatogr A , 2001 , 910( 1 ) : 13
- [ 14 ] Wang Y H , Zhang Q H , Su L Q , et al. Modern Scientific Instruments ( 王玉红 , 张庆合 , 苏立强 , 等. 现代科学仪器 ) , 2004( 4 ) : 13
- [ 15 ] Boughtflower R J , Underwood T , Paterson C J. Chromatographia , 1995 , 40( 5/6 ) : 329