

新型高效液相色谱酰胺键合固定相的制备与评价

马言顺 龙远德* 翦英红 黄天宝

(中国科学院成都有机化学研究所, 成都 610041)

摘 要 将 YWG80 硅胶和 3-氨基丙基三甲氧基硅烷反应后与 2-壬基丁二酰氯反应制得一种新型双齿酰胺键合固定相(BABSP-2)。采用元素分析和傅里叶变换红外光谱表征了键合相;用芳香族化合物溶质和甲醇-水二元流动相,考察了键合相的疏水选择性和亲硅醇基活性;评估了在酸性条件下(pH 2.5)的水解稳定性。结果表明: BABSP-2 能有效抑制残留硅醇基活性,并具有可比的疏水选择性和较好的水解稳定性。

关键词 高效液相色谱, 键合固定相, 亲硅醇基活性, 疏水选择性

1 引 言

反相高效液相色谱(RP-HPLC)已被广泛地用于生物、化学、制药等领域,而液相色谱固定相是色谱领域研究的重要课题^[1]。烷基硅胶键合相,特别是十八烷基键合相,是应用最广泛的反相色谱固定相,改变流动相组成,就可以实现大多数有机化合物的分离分析。但是,由于硅胶表面残余硅醇基的影响,分离某些极性物质,特别是碱性有机化合物时使色谱峰变形拖尾,灵敏度降低。为了改善碱性物质的分离,静电屏蔽键合相已成为色谱学者们的研究热点^[2~7]。据静电屏蔽原理^[8],在酸性或中性条件下,键合相上极性配体,如胺或酰胺官能团将排斥带正电荷的碱性溶质,抑制了溶质分子与硅醇基之间可发生的离子交换作用,而且键合的官能团与硅胶表面的水合层作用,可给予固定相烷基链高度定向性分配,改善了碱性溶质分子的选择性。

文献[9]报道了烷基取代丙二酰氯制备的含有双齿酰胺结构的键合相,不仅在键合链中引入极性基团,而且具有双齿结构,呈现了较好的反相色谱性能。本文介绍一种由壬烷基取代丁二酰氯制备的双齿酰胺键合相 BABSP-2,并评价了它的色谱性能。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

HPLC 色谱系统由 Waters 6000A 输液泵、Rheodyne 7725i 进样阀、M481 紫外检测器和 Qianpu HW 色谱工作站组成。7 μ m YWG80(青岛海洋化工厂)为无定形硅胶;3-氨基丙基三甲氧基硅烷(Fluka 公司)纯度大于 98%;甲醇(北京化工厂),分析纯;实验用水为二次重蒸馏水;其他试剂为分析纯或经过必要的处理。

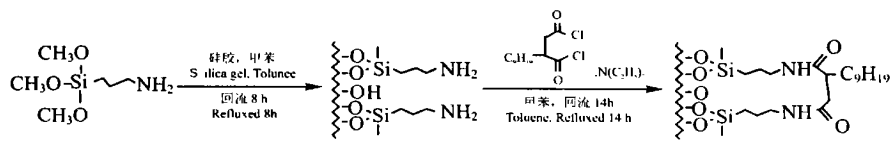
2.2 2-壬基丁二酸酰氯的制备

参照文献[10]方法,首先合成 2-壬基丙二酸,经重结晶处理后按文献[11]方法制成 2-壬基丁二酰氯,待用。

2.3 BABSP-2 键合相的制备

将 3.50 g 硅胶置于 250 mL 三口烧瓶中,减压加热 4 h,加入 2 mL 3-氨基丙基三甲氧基硅烷和 70 mL 甲苯,搅拌,油浴加热,在回流温度下反应 8 h 后,经过滤得到的固体物依次用甲苯和甲醇洗涤,然后减压干燥得 3.91 g 氨基硅胶,元素分析(%): C 6.22, N 2.39, H 1.95。取 3.00 g 氨基硅胶于 250 mL 三口烧瓶中,加入 100 mL 干燥甲苯、3 mL 2-壬基丁二酰氯和 2 mL 三乙胺,加热回流反应 14 h 后,过滤,固体物依次用苯、甲醇-水(11)、甲醇、乙醚洗数次,减压干燥过夜,得 3.32 g BABSP-2,元素分析(%): C 11.62, N 1.62, H 2.19。其合成路线如 Scheme 1 所示:

2002-12-16 收稿;2003-09-22 接受



图示 1 BABSP-2 的制备
Scheme 1 Preparation of bidenate amide bonded stationary phase (BABSP-2)

2.4 色谱柱的填充和评价

采用日本 Chemco CPP-085 装填机和匀浆法填充不锈钢色谱柱(150 mm ×3.9 mm i. d.)。匀浆液由 20 mL 四氯化碳和 10 mL 1,4-二氧六环组成,甲醇为顶替液,填充压力 35 MPa。在甲醇-水二元流动相,检测波长 254 nm、柱温 30 °C、流速 0.6 mL/min 色谱条件下评价色谱柱,死时间 2.5 min(由硫脲测得)。

3 结果与讨论

3.1 BABSP-2 键合相的红外光谱

如图 1 所示,BABSP-2 键合相在 2928、2856 cm⁻¹处出现了表征 —CH₂— 和 CH₃— 伸缩振动的吸收峰,在 1462 cm⁻¹处出现了碳氢键的弯曲振动峰。同时,在 1546 和 1641 cm⁻¹处出现了二级酰胺的伸缩振动峰,表明硅胶表面存在酰胺基和长链烷基。与硅胶红外光谱图比较,硅醇基吸收峰(947 cm⁻¹)的相对强度明显减弱,表明大部分硅醇基参与了键合反应。

3.2 键合相的疏水选择性

所谓疏水选择性或亚甲基选择性,系指一系列仅相差一个亚甲基基团的同系物的相对保留值,只与溶质和固定相之间的疏水作用有关^[12],容量因子 *k'* 有下述关系:

$$\ln k' = pn + q \text{ 和 } \alpha = \frac{k'_{n+1}}{k'_n} = e^p$$

式中,*n* 是同系物烷基链中的亚甲基数,*p* 是线性关系的斜率, α 为疏水选择性。我们以苯、甲苯、乙苯、丙苯和丁苯为探针溶质,考察了键合相的疏水性,如图 2 所示。在甲醇-水(60/40, V/V) 流动相下线性的

斜率 *p* 为 0.492,线性相关系数 *R* 为 0.999,键合相疏水选择性 α 为 1.64。而在甲醇-水(65/35, V/V) 流动相条件下斜率 *p* 为 0.476,线性相关系数为 0.999,键合相疏水选择性 α 为 1.61。

图 3 和表 1 所示,几个芳香烃在键合相上获得了良好分离,色谱峰的不对称因子在 0.87~1.10 之间,柱效在 30000~42000 塔板/m 之间。芳香族烃类在键合相上的保留依赖于键合相的表面覆盖度和烷基链长,即依赖于键合相的碳含量。通常,也可用甲苯和苯的相对保留值表征固定相的疏水性能。

表 1 某些芳香族烃类在 BABSP-2 上的色谱数据

Table 1 Chromatographic data of some aromatic hydrocarbons on BABSP-2

化合物 Compound	苯 Benzene	甲苯 Toluene	萘 Naphthalene	联苯 Biphenyl	蒽 Anthracene
容量因子 Capacity factor, <i>k'</i>	0.52	0.80	1.55	2.19	4.99
柱效,塔板数/m Column efficiency, <i>n</i> /m	30000	36500	39000	34000	42000
不对称因子 Asymmetry, <i>As</i>	1.10	1.08	0.97	0.87	0.90

流动相(mobile phase): 甲醇(methanol)/水(water) (70/30, V/V)

在甲醇-水为(55/45, V/V) 和(70/30, V/V) 时,甲苯和苯的相对保留值分别为 1.80 和 1.54(分别由表 2 和表 1 中甲苯和苯的容量因子计算),表明键合相具有可比的疏水性能^[13]。而由烷基取代丙二酰氯制备

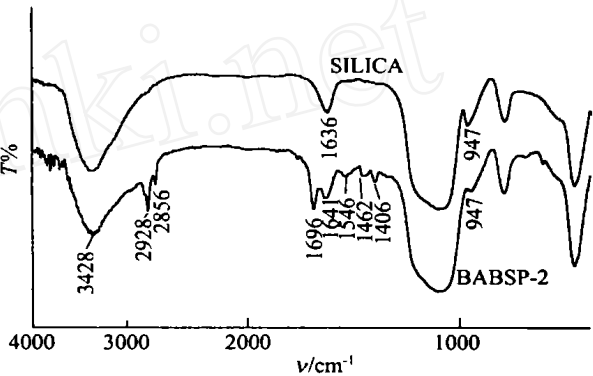


图 1 BABSP-2 和 YWG-80 硅胶的红外光谱
Fig. 1 Infrared spectra of BABSP-2 and YWG-80 silica gel

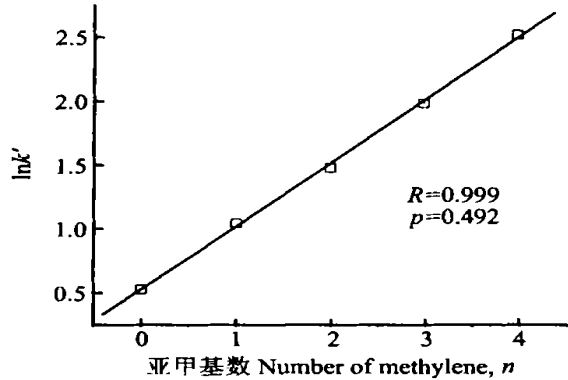


图 2 $\ln k'$ 烷基链中亚甲基数图
Fig.2 Plot of $\ln k'$ vs number of methylene of alkyl group on BABSP-2

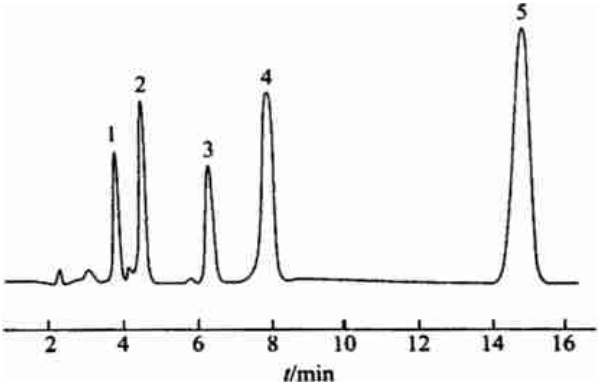


图 3 某些芳香族烃类在 BABSP-2 上的色谱图
Fig.3 Chromatogram of some aromatic hydrocarbons on BABSP-2
流动相(mobile phase); 甲醇(methanol) 水(water) (70:30, V/V)。峰
(peak): 1. 苯(benzene); 2. 甲苯(toluene); 3. 萘(naphthalene); 4.
联苯(biphenyl); 5. 蒽(anthracene)。

的键合相上的甲苯和苯的相对保留值为 1.35 (甲醇水为 80 甲醇 20, V/V)^[9]。

3.3 键合相的亲硅醇基活性

按照疏溶剂理论^[14],在分离碱性化合物时,若存在双保留机理,随着流动相中有机成分含量的增加,疏溶剂效应逐渐减弱,亲硅醇基效应逐渐增强,当疏溶剂效应大于亲硅醇基效应时,待测碱性化合物的容量因子随流动相中有机成分含量的增加而减小;当疏溶剂效应小于亲硅醇基效应时,待测样品的容量因子随流动相中有机成分含量的增加而增加。因此,容量因子与有机成分含量的关系曲线呈“U”形状。为了考察键合相的残余硅醇基的影响,我们用 N,N-二甲基苯胺、邻甲苯胺和吡啶 3 种碱性化合物作为待测物,实验发现 3 种碱性化合物的容量因子均随甲醇含量的增大而减小,未出现“U”状(图 4),表明键合相的亲硅醇基效应被有效抑制。

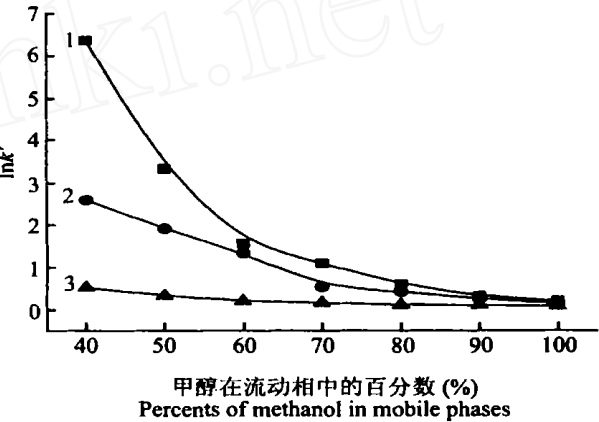


图 4 $\ln k'$ 和流动相中甲醇含量的关系
Fig.4 The relationship of methanol content in mobile phase and $\ln k'$ for three basic compounds

表 2 和图 5 为一组碱性、酸性和中性化合物在键合相上的分离数据和色谱图。吡啶、苯胺和邻甲苯胺 3 种碱性物质的保留行为用来估价键合相残留硅醇基的活性,硫脲用于测定死时间,苯和甲苯用于选择性估价。在给定条件下混合物各个组分有较高的柱效和较好的峰形,而且苯胺先于苯酚流出,它们的不对称因子之比为 1.10 (< 1.3),也表明硅醇基活性可忽略^[13],由于键合链上的酰胺基团增强了链内部的亲水性和对残余硅醇基的静电屏蔽作用。

1. N,N-二甲基苯胺 (N,N-dimethylaniline); 2. 邻甲苯胺 (o-toluidine); 3. 吡啶(pyridine)。

表 2 某些酸性、碱性和中性化合物在 BABSP-2 上的色谱数据
Table 2 Chromatographic data of some acidic, basic and neural compounds on BABSP-2

化合物 Compound	硫脲 Thiourea	吡啶 Pyridine	苯胺 Aniline	邻甲苯胺 o-Toluidine	苯酚 Phenol	苯 Benzene	N,N-二甲基苯胺 N,N-Dimethylaniline	甲苯 Toluene
容量因子 Capacity factor, k'	0	0.14	0.44	0.74	0.91	1.77	2.21	3.18
柱效,塔板数/m Column efficiency, n/m		14000	16500	26000	32000	39000	41000	45000
不对称因子 Asymmetry, As		1.27	1.24	1.15	1.13	1.03	1.04	0.95

流动相(mobile phase)甲醇(methanol)-水(water) (55:45, V/V)

3.4 BABSP-2 的水解稳定性

以甲苯和 N,N-二甲基苯胺为检测样品,考察了键合相在甲醇-柠檬酸/ Na_2HPO_4 缓冲液(6535, V/V, pH 2.5)流动相中的水解稳定性,结果如图 6 所示。在 9000 倍柱体积的流动相冲洗键合相后,甲苯和 N,N-二甲基苯胺的容量因子 k' 未见明显的变化,二者的分离因子 R_s 始终维持在 10.1~10.5 之间,表明键合相具有较好的抗水解性能,可在 pH 2.5 的缓冲液流动相中长期使用。

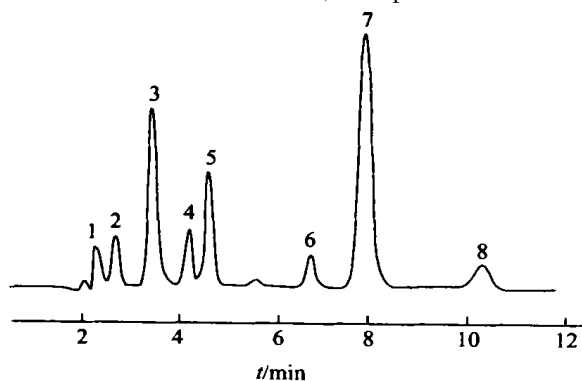


图 5 某些酸性、碱性和中性化合物的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of some acidic, basic and neutral compounds on BABSP-2

流动相(mobile phase): 甲醇(methanol)/水(water) (55/45)。峰(peak): 1. 硫脲(thiourea); 2. 吡啶(pyridine); 3. 苯胺(aniline); 4. 苯酚(phenol); 5. 邻甲苯胺(σ -toluidine); 6. 苯(benzene); 7. N,N-二甲基苯胺(N,N-dimethylaniline); 8. 甲苯(toluene)。

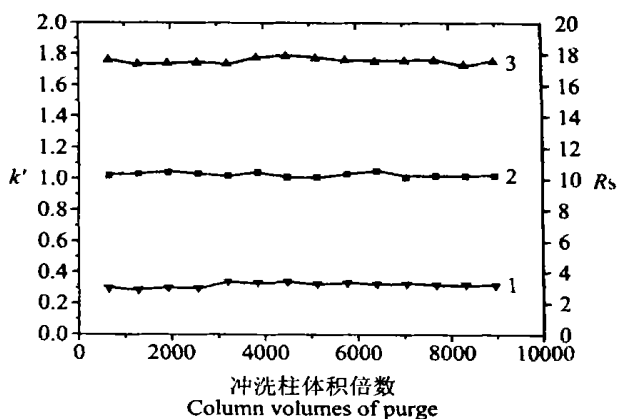


图 6 k' 和 R_s 与冲洗柱体积倍数图

Fig. 6 Plots of k' and R_s vs column volumes of purge

流动相(mobile phase): 甲醇(methanol)-柠檬酸(citric acid) Na_2HPO_4 缓冲溶液(buffer) (6535, V/V, pH 2.5)。

1. k' N,N-二甲基苯胺(N,N-dimethylaniline); 2. R_s ; 3. k' 甲苯(toluene)。

References

- 1 Majors R E. *LC-GC Asia Pacific*, **2001**, 4(3): 8~19
- 2 O'Carra J E, Walsh D P, Alden B A, Casellimi P, Walter T H. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(15): 2992~2997
- 3 McCalley D V. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 844: 23~38
- 4 Kirkland J J, Henderson J W, Martosella J D, Bidlingmeyer B A, Vasta-Russell J, Adams Jr J B. *LC-GC*, **1999**, 17(7): 634~639
- 5 Yu X, Zhao R, Liu G Q. *Chromatography*, **2000**, 52(7/8): 517~519
- 6 Jing Yuqing (景玉清), Long Yuande (龙远德), Huang Tianbao (黄天宝). *Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)*, **2002**, 23(2): 210~212
- 7 Huang Xiaojia (黄晓佳), Liu Ying (刘莺), Cong Runzi (丛润滋), Liu Xueliang (刘学良), Wang Junde (王俊德). *Chinese J. Chromatogr. (色谱)*, **2001**, 19(4): 293~296
- 8 Nawrocki J. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779: 29~71
- 9 Ma Yanshun, Long Yuande, Ding Yongliang, Huang Tianbao. *Chinese Chemical Letters*, **2003**, 14(8): 820~823
- 10 Kates M J, Schauble J H. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61(12): 4164~4168
- 11 Ralston A W, Selby W M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**, 61(5): 1019~1020
- 12 Tchaplal A, Heron S, Colin H, Guiochon G. *Anal. Chem.*, **1988**, 60(14): 1443~1448
- 13 Engelhardt H, Arangie M, Lobert T. *LC-GC Asia Pacific*, **1998**, 1(1): 36~42
- 14 Da Shilu (达世禄). *Introduction to Chromatography (色谱学导论)*. Wuhan (武汉): Univ. of Wuhan Publishing Company (武汉大学出版社), **1988**: 371

Preparation and Evaluation of A Novel Amide Bonded Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography

Ma Yanshun, Long Yuande*, Jian Yinghong, Huang Tianbao

(Chengdu Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract A novel bonded stationary phase, bidenate amide bonded stationary phase (BABSP-2), was prepared by reacting YWG-80 silica gel firstly with 3-aminopropyltrimethoxysilane and then with 2-nonylbutanedioic chloride. Characterization of the prepared packing was carried out with elemental analysis and Fourier transform infrared spectroscopy. Hydrophobic selectivity and silanophilic activity of BABSP-2 were evaluated by using aromatic compounds as analytes and methanol-water as binary mobile phase. Hydrolytic stability of the packing in acidic mobile phase with pH 2.5 was also evaluated. The results show that the novel bidenate amide stationary phase has excellent reversed-phase chromatographic performance and good resistance to hydrolysis. It can be used to separate basic solutes efficiently due to the existence of the bidenate structure containing internal polar amide group contributing to restraining the activity of the residual silanol group.

Keywords High performance liquid chromatography, bonded stationary phase, silanophilic activity, hydrophobic selectivity

(Received 16 December 2002; accepted 22 September 2003)

维护科技道德、加强自律的联合公告

为加强化学科技期刊的精神文明建设,提高各编辑部工作人员的职业道德水平,保障期刊的健康发展,我们在“中国化学会 2003 年期刊工作交流研讨会”期间,经过认真讨论,决定发表如下公告:

1. 提倡追求真理、实事求是、团结协作、诚实劳动;坚持学术民主,鼓励百家争鸣,尊重他人劳动成果;严肃政治纪律,坚决反对伪科学。
2. 严格执行审稿制度,杜绝稿件发表中的不正之风。
3. 维护投稿人的权益,各编辑部须在收稿后的 3 个月内向投稿人通报稿件处理情况,逾期未通报,投稿人有权自行处理所投稿件。
4. 拒绝刊登署名有争议、引用他人著述未注明出处、在上述规定期限内一稿两投或多投的稿件。
5. 对弄虚作假、抄袭剽窃和一稿两投或多投者,一经查实,相关编辑部视其情节轻重分别予以书面警告、通知其所在单位、在刊物上公开曝光并做出若干年内拒绝接收有此稿第一作者和通讯联系人署名的稿件等处理。
6. 强调编者、作者的诚信,鼓励对上述所列违反道德规范的行为进行据实举报。保护举报人的合理要求。不受理匿名举报。对于严重违反科技工作者职业道德、情节恶劣、影响极坏的事件,将及时报请有关部门进行严肃处理。并在签署本联合公告的期刊范围内建立情况通报制度。

本联合公告于各期刊签署并在刊物上刊出后生效,公告将由中国化学会期刊工作委员会监督执行。

中国化学会化学类期刊编辑部