

γ -氨基丁酸键合硅胶毛细管色谱柱填料的绿色制备及其分析性能研究

赵双丽, 罗菲菲, 祝璐琪, 王清江*, 何品刚

(华东师范大学 化学与分子工程学院, 上海 200241)

摘要: 该文在水相溶剂中绿色合成了 γ -氨基丁酸键合硅胶(Sil-GABA)色谱固定相, 采用红外光谱、元素分析等对其进行了表征, 并将制备的 Sil-GABA 材料作为毛细管色谱柱的填料研究了其色谱分离模式和分析性能。结果显示, 在以乙酸铵水溶液为流动相的条件下, 该填料可有效分离硝基氯苯 3 种位置异构体和 7 种磺胺, 表明 Sil-GABA 固定相具有富水作用色谱的特性; 在高浓度有机流动相条件下可有效分离 4 种苯甲酸类化合物, 表明 Sil-GABA 具有亲水作用色谱的特性; 此外, 该 Sil-GABA 固定相在反相模式下对硝基苯胺异构体也有一定的分离能力。在优化条件下, 7 种磺胺保留时间的相对标准偏差小于 3.2%, 表明制得的色谱柱具有良好的重复性。该 Sil-GABA 固定相具有多种保留机理, 在毛细管液相色谱分离领域具有潜在的应用价值。

关键词: γ -氨基丁酸键合硅胶; 绿色合成; 毛细管液相色谱

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)07-0865-05

Green Preparation of a γ -Aminobutyric Acid Bonded Silica Packing Material for Capillary Column and Its Performance Evaluation

ZHAO Shuang-li, LUO Fei-fei, ZHU Lu-qi, WANG Qing-jiang*, HE Pin-gang

(School of Chemistry and Molecular Engineering, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: A γ -aminobutyric acid bonded silica (Sil-GABA) stationary phase was prepared in a green medium with only water as solvent, which was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and elemental analysis. The separation mode and analytical performance of the Sil-GABA stationary phase were evaluated through a series of experiments when it was used as packing material for capillary column. Results showed that three nitrochlorobenzene positional isomers and seven sulfonamides were separated effectively on the Sil-GABA stationary phase with ammonium acetate as mobile phase in an aqueous liquid chromatography mode. Four benzoic acid compounds were separated with high concentrations of organic solvents as mobile phases in a hydrophilic chromatography mode. Additionally, three nitroaniline positional isomers were also separated in a reversed phase chromatography mode. Under the optimal conditions, the relative standard deviations (RSD) of the retention times for the sulfonamides were within 3.2%, indicating that the Sil-GABA column has a good reproducibility. The prepared Sil-GABA stationary phase could provide potential applications in capillary liquid chromatography with multiple retention mechanisms.

Key words: γ -aminobutyric acid bonded silica (Sil-GABA); green preparation; capillary liquid chromatography

色谱柱是色谱分离的核心, 对填充毛细管色谱柱来说, 色谱填料直接影响其对分析物的选择性和分离效率。目前, 色谱固定相大多以多孔二氧化硅为基质进行表面化学修饰制备而成^[1], 根据所键合官能团的不同具有不同的色谱分离机制, 进而为分离复杂样品提供多种选择。在以往研究中, 合成色谱固定相所用溶剂往往是易挥发、有毒的有机溶剂(如甲苯^[2-4]、甲醇^[5-6]、氯仿^[7-8]和 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)^[9-10]等), 但近年来随着环境问题越来越受到人们的关注, 亟待建立不涉及有毒有害溶

收稿日期: 2018-08-23; 修回日期: 2019-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21575042)

* 通讯作者: 王清江, 博士, 教授, 研究方向: 微纳分离分析, E-mail: qjwang@chem.ecnu.edu.cn

剂的“绿色化学”合成技术^[11-12]。

γ -氨基丁酸(GABA)是一种广泛存在于生物体内的活性物质^[13], 其结构中所含氨基、羧基等极性基团具有亲水作用; 此外, GABA 是一种两性物质, 还具有离子交换作用。本文在不含任何有机溶剂的水相条件下, 通过一步反应绿色制备了 GABA 修饰的硅胶固定相(Sil-GABA), 并将其用于不同类型分析物的色谱分离, 结果表明, Sil-GABA 固定相具有多种色谱分离模式的作用机理: 在富水模式下可分离硝基氯苯位置异构体和 7 种磺胺, 亲水模式下可分离 4 种苯甲酸类化合物, 反相模式下可分离硝基苯胺位置异构体。目前尚未见 SiO_2 表面键合 GABA 的色谱固定相报道。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

γ -氨基丁酸(纯度 99%, 阿拉丁试剂); 多孔球型硅胶(粒径: 5 μm , 孔径: 12 nm, 比表面积: 300 m^2/g , 苏州环球色谱有限责任公司); 弹性石英毛细管(河北永年县锐泽色谱器件有限公司); 硝基氯苯位置异构体(纯度 99%)、硝基苯胺位置异构体(邻、间、对位纯度分别为 98%、98%、99%, Acros 试剂); 苯甲酸(纯度 >99%)、4-羟基苯甲酸(纯度 >99%)、3, 4-二羟基苯甲酸(纯度 >98%)、2, 3-二羟基苯甲酸(纯度 >98%)均购自日本 TCI 公司; 磺胺脒(SG)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲基嘧啶(SM1)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺甲噁唑(SMZ)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺喹噁啉(SQ)(纯度 99% 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 3-(2, 3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(纯度 98%, GPS)、硅酸钠、醋酸铵(国药集团化学试剂有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司)。

Trisep-2100 加压毛细管电色谱(pCEC)仪器(上海通微分析技术有限公司), 配有紫外检测器; 2400 II 元素分析仪(美国 Perkin Elmer 公司); Nicolet NEXUS 670 傅立叶变换红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 高压输液泵(北京莱伯泰科仪器股份有限公司)。

1.2 Sil-GABA 固定相的制备

硅胶在使用前需经活化处理^[14]: 称取一定质量硅胶均匀分散于 10% 的稀盐酸中, 置于圆底烧瓶中回流加热 30 min; 冷却至室温, 过滤悬浮液, 超纯水洗涤至流出液呈中性; 将过滤后的硅胶于 180 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 4 h。

Sil-GABA 的制备过程见图 1。首先通过碱性条件下的开环反应实现 GABA 与硅烷化试剂的键合, 然后再修饰到硅胶表面。具体步骤如下: 称取 0.01 g 的 GABA 溶于 20 mL 超纯水中, 用 Na_2CO_3 溶液调至 pH 10.6, 再滴加 22 μL 的 GPS, 混合液于冰水浴下以 230 r/min 磁力搅拌 2 h; 再采用 CH_3COOH 调节反应后的溶液至 pH 6.0 后转移至含有 0.5 g 活化硅胶的圆底烧瓶中, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下回流 2 h。最后, 过滤反应悬浮液, 用超纯水洗涤滤饼, 并于 70 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 6 h, 即制得 Sil-GABA 固定相。

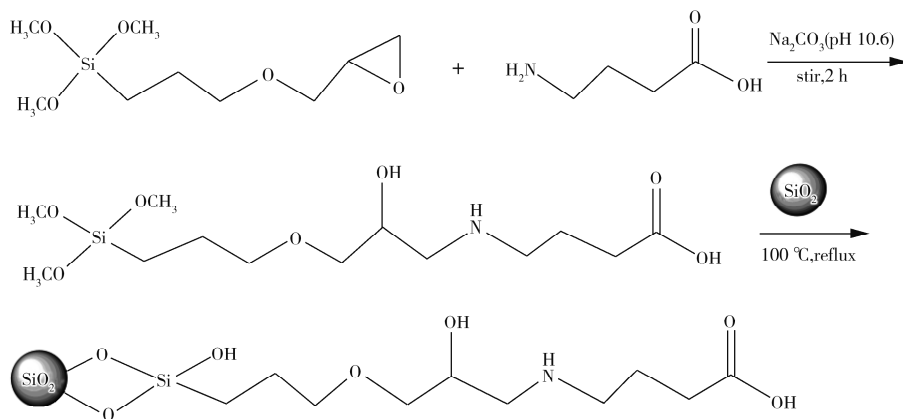


图 1 Sil-GABA 固定相的合成

Fig. 1 Synthesis of the Sil-GABA stationary phase

1.3 毛细管柱的装填

截取 50 cm 石英毛细管, 用 1 mol/L NaOH 处理 0.5 h, 再用超纯水洗涤至流出液呈中性; 然后用 0.1 mol/L HCl 处理 0.5 h, 再用超纯水洗涤至流出液呈中性。将处理后的石英毛细管用于 Sil-GABA

固定相的装填(图2), 毛细管一端吸取饱和硅酸钠溶液, 于烧红的电炉丝上加热 1~2 s, 制得临时柱塞; 另一端连接到装有固定相悬浮液(0.2 g Sil-GABA 均匀分散于乙腈中)的不锈钢管中。以 80% 的甲醇为顶替液, 在 20 MPa 的压力下将 Sil-GABA 填料填入毛细管中(为使填料更均匀致密, 在整个装填过程中毛细管需置于超声浴中)。在距离临时柱塞约 24 cm 处, 通过电炉丝加热 Sil-GABA 填料制得另一端柱塞, 即永久柱塞(用同样的方法去除临时柱塞)。撤掉液相色谱泵的压力, 取下毛细管, 反向连接, 在 10 MPa 的压力下去除多余的填料。最后, 在靠近出口端柱塞处, 通过去除毛细管外层涂料, 制得 1~2 mm 左右的检测窗口。

1.4 色谱条件

实验所用石英毛细管色谱柱外径 360 μm , 内径 100 μm , 总长 50 cm; Sil-GABA 固定相有效填充长度为 24 cm; 流动相所用溶剂为色谱纯的甲醇、乙腈; 流动相流速 0.02 mL/min; 检测波长为 254 nm; 溶解样品所用溶剂均为甲醇、超纯水。

2 结果与讨论

2.1 固定相的表征

取 SiO_2 和制备的 Sil-GABA 固定相采用红外光谱进行表征(图3)。结果显示, 1 090 cm^{-1} 处为 Si-O-Si 的伸缩振动峰(曲线 a), 3 450 cm^{-1} 处为硅胶表面游离羟基的吸收峰。Sil-GABA 固定相的红外光谱图中(曲线 b), 2 870、2 950 cm^{-1} 处为 -C-H 键的伸缩振动峰, 1 640、1 570 cm^{-1} 处分别为 -C=O、-N-H 的伸缩振动特征峰, 表明 GABA 已成功键合到硅胶表面。

固定相中各元素含量的分析结果表明: 活化 SiO_2 中 C 含量为 0.294%, H 为 0.784%, 未检出 N; 而 Sil-GABA 中 C 含量为 3.888%, H 为 1.116%, N 为 0.345%。与未修饰的 SiO_2 相比, 制备的固定相中 C、H 含量明显增加, 且在其表面检出 N 元素, 进一步表明已成功制备了 Sil-GABA。由元素分析中 N 含量计算得 GABA 在 SiO_2 表面的覆盖程度为 0.87 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。

2.2 Sil-GABA 作用机理及色谱性能评价

2.2.1 富水模式色谱 富水模式色谱流动相中水占有很高的比例(70%~100%), 可减少有机溶剂的使用^[15]。作为一种绿色色谱分析方法, 富水模式色谱可替代亲水色谱用于一些极性物质的分离。本研究通过对硝基氯苯位置异构体和磺胺类物质的色谱分离, 研究 Sil-GABA 固定相在富水模式下的分离特性。

(1) 硝基氯苯位置异构体的分离: 硝基氯苯具有一定的极性, 其位置异构体的分离色谱图见图 4, 流动相采用 20 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈。结果显示, 流动相中 20 mmol/L 乙酸铵水溶液与乙腈的体积比为 80:20 时, 异构体的保留时间相同, 色谱峰重叠; 当 20 mmol/L 乙酸铵的体积分数由 80% 增至 90% 时, 流动相极性增强, 保留时间增加; 继续升高 20 mmol/L 乙酸铵水溶液的体积分数为 100% 时, 邻、间、对硝基氯苯在 25 min 内可实现基线分离, 保留因子分别为 0.145、0.456、0.754, 分离度分别为 3.2、1.56。表明 Sil-GABA 固定相对硝基氯苯具有良好的选择性, 在富水色谱模式下可用

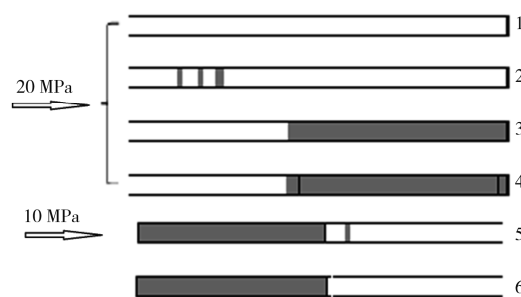


图2 Sil-GABA 的填充示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the Sil-GABA packing procedure
1: preparation of a temporary frit; 2, 3: packing the capillary with the Sil-GABA; 4: preparation of the permanent frits at both ends; 5: elimination of the excess of packings; 6: preparation of a detection window

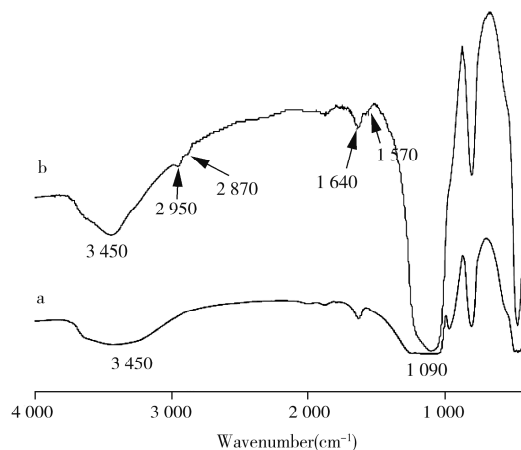


图3 硅胶和 Sil-GABA 的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of silica and Sil-GABA
a. SiO_2 , b. Sil-GABA

于硝基氯苯位置异构体的分离。

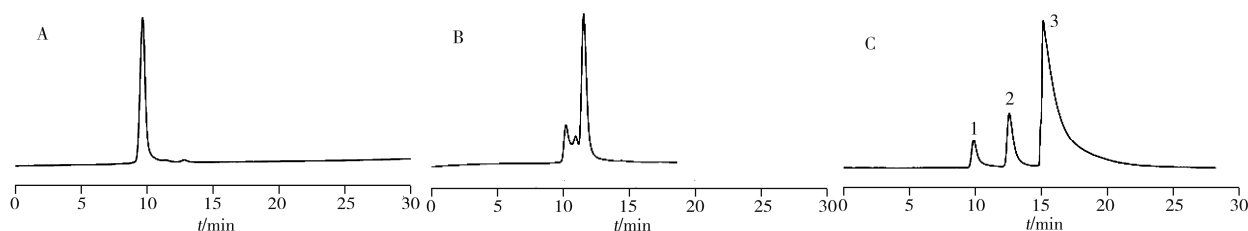


图4 硝基氯苯位置异构体的分离色谱图

Fig. 4 Chromatograms of nitrochlorobenzene isomers

A, B, C: ammonium acetate - acetonitrile was 80 : 20, 90 : 10, 100 : 0 (by volume);
1. *m*-nitrochlorobenzene, 2. *o*-nitrochlorobenzene, 3. *p*-nitrochlorobenzene

(2) 磺胺类药物的分离: 以7种磺胺(SG、SD、SM1、SM2、SMZ、SDM、SQ)为分离对象, 20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相探讨了在富水色谱模式下的分离条件。由于GABA是一种两性离子化合物, 流动相pH值和浓度会影响分析物在固定相上的保留情况, 因此实验考察了pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、8.0时7种磺胺的保留情况。结果表明, 随着pH值增大, SG的保留时间基本不变, 但其余6种磺胺在Sil-GABA固定相上的保留时间都有所增加。这是因为GABA的等电点为7.19, 随着流动相pH值的增加, 越来越多的GABA会以负离子形式存在, 固定相与磺胺的相互作用增强, 造成保留时间延长。另外, 乙酸铵的浓度也会改变溶剂的离子强度, 进而影响分析物在固定相上的峰形和分离效率^[16]。因此实验还考察了乙酸铵浓度分别为10、20、40、50、100 mmol/L时对磺胺保留的影响, 结果发现随着乙酸铵浓度的增加, 7种磺胺在Sil-GABA固定相上的保留减弱, 这是因为溶液离子强度增加, 缩短了保留时间。

在流动相为20 mmol/L 乙酸铵(pH 4.0)的条件下, 除SM2、SMZ外, 其余5种磺胺都实现了良好的分离(图5)。

2.2.2 亲水模式色谱 在高亲水性有机溶剂乙腈为流动相的条件下, 考察了4-羟基苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸、2,3-二羟基苯甲酸、苯甲酸在Sil-GABA固定相上的保留特征(图6)。结果显示, 随着流动相中乙腈含量的增加, 上述化合物保留

增强, 分离度增大, 与亲水模式色谱的保留机理一致。当乙腈体积分数增至80%时, 4种苯甲酸类化合物实现了良好的分离, 出峰顺序依次为2,3-二羟基苯甲酸($pK_a = 2.96$)、苯甲酸($pK_a = 4.20$)、3,4-二羟基苯甲酸($pK_a = 4.45$)、4-羟基苯甲酸($pK_a = 4.57$), 与其 pK_a 值由小到大的顺序一致。这是因为键合GABA后硅胶表面的羧基具有弱阳离子交换作用, 离子交换是其完成色谱分离的主要机制。

2.2.3 反相模式色谱 以甲醇-水为流动相, 以硝基苯胺位置异构体为分离对象, 探究Sil-GABA固定相的反相色谱模式, 邻、间、对位硝基苯胺的色谱分离图见图7。流动相中甲醇体积分数为20%时, 邻、对硝基苯胺的色谱峰重叠, 当甲醇体积分数由20%降至10%时, 从色谱图上可以观察到邻硝

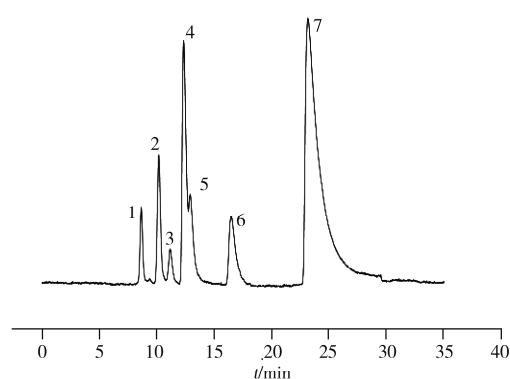


图5 7种磺胺的分离色谱图

Fig. 5 Chromatograms of seven sulfonamides
mobile phase: 20 mmol/L ammonium acetate (pH 4.0); 1. SG,
2. SD, 3. SM1, 4. SM2, 5. SMZ, 6. SDM, 7. SQ

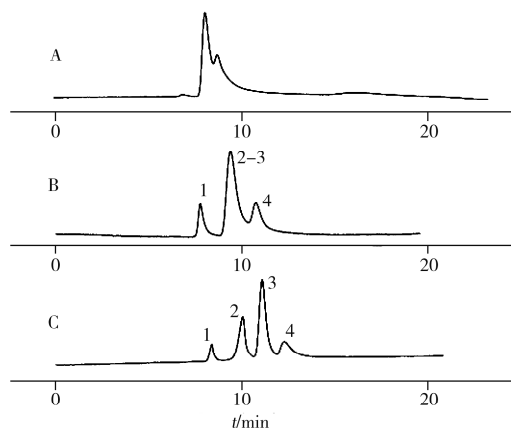


图6 4种苯甲酸类化合物的分离色谱图

Fig. 6 Chromatograms of four benzoic acid compounds
mobile phase: 20 mmol/L ammonium acetate, A, B, C: water -
acetonitrile was 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80 (by volume); 1. 2,
3-dihydroxybenzoic acid, 2. benzoic acid, 3. 3, 4-
dihydroxybenzoic acid, 4. 4-hydroxybenzoic acid

基苯胺的色谱峰;当甲醇体积分数降至5%时,各分析物的保留增强,3个异构体之间的分离度增加,可在20 min内实现分离,保留因子分别为0.966、1.228、1.448,分离度分别为2.15、1.60。由此可见,Sil-GABA具有反相色谱的保留特性。但色谱峰出峰顺序为间位($LgP = 1.338$)、对位($LgP = 1.195$)、邻位($LgP = 1.669$),与疏水性顺序不一致,表明Sil-GABA存在多种保留机理。

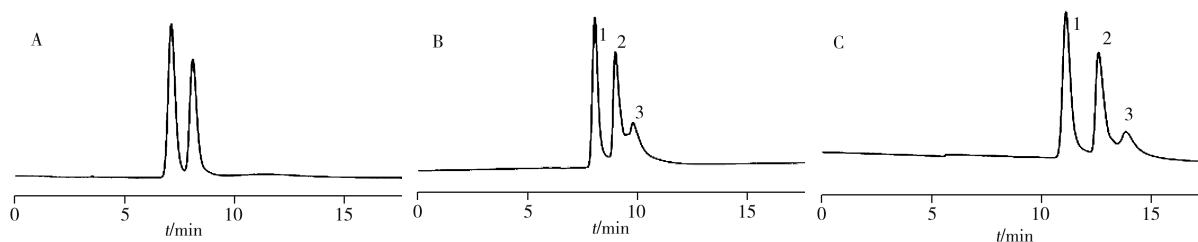


图7 硝基苯胺位置异构体的分离色谱图

Fig. 7 Chromatograms of nitroaniline positional isomer

A, B, C: water-methanol was 80:20, 90:10, 95:5 (by volume); 1. *m*-nitroaniline, 2. *p*-nitroaniline, 3. *o*-nitroaniline

2.3 重复性试验

以磺胺类药物为分析物,考察了该色谱柱的重复性,实验结果见表1。结果显示,7种磺胺保留时间的日内和日间相对标准偏差(RSD)分别为0.42%~1.3%、0.49%~3.2%。在整个分析测试期间,重复进样色谱峰的峰形和分离效率均无明显变化,表明此毛细管填充柱具有良好的分析重现性和稳定性。

表1 磺胺的重复性试验

Table 1 Repeatability test of seven sulfonamides

Analytes		SG	SD	SM1	SM2	SMZ	SDM	SQ
Retention time(RSD,%)	Intra-day($n=5$)	0.42	0.76	0.68	0.75	1.3	1.3	1.3
	Inter-day($n=3$)	0.49	0.94	1.8	1.4	2.7	3.2	1.2

3 结论

本文在水相溶剂中绿色制备了Sil-GABA色谱填料,采用红外光谱、元素分析对其结构进行了表征,发现该填料具有多种保留机理,可用于磺胺、硝基氯苯位置异构体、苯甲酸类化合物和硝基苯胺位置异构体的分离,且具有良好的稳定性和重现性。该Sil-GABA填料制备方法简单、绿色无毒,作为色谱填料在毛细管液相色谱中有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Hemström P, Michal Szumski A, Irgum K. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(20): 7098-7103.
- [2] Zhou X H, Li X L, Cao A J, Qiao L J, Yu A J, Zhang S S, Wu Y J. *Talanta*, **2015**, 144: 1044-1051.
- [3] Zhang M L, Chen J, Gu T N, Qiu H D, Jiang S X. *Talanta*, **2014**, 126: 177-184.
- [4] Wang Y X, Zhao K L, Yang F, Tian L, Yang Y, Bai Q. *Chin. Chem. Lett.*, **2015**, 26(8): 988-992.
- [5] Yu D P, Guo Z M, Shen A J, Yan J Y, Dong X F, Jin G W, Long Z, Liang L, Liang X M. *Talanta*, **2016**, 161: 860-866.
- [6] Peng Y H, Hou Y J, Zhang F F, Shen G B, Yang B C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408(13): 3633-3638.
- [7] Qiu H D, Zhang M L, Chen J, Gu T N, Takafuji M, Ihara H. *Anal. Methods*, **2013**, 6(2): 469-475.
- [8] Qiu H D, Mallik A K, Takafuji M, Jiang S X, Ihara H. *Analyst*, **2012**, 137(11): 2553-2555.
- [9] Zhang Y Q, Ai L F, Wang M M, Wang X S, Liu S, Hou N. *J. Instrum. Anal.* (张瑶琴, 艾连峰, 王曼曼, 王学生, 刘珊, 侯宁. 分析测试学报), **2016**, 35(8): 981-986.
- [10] Cao Z G, Li L S, Cheng B P, Zhang H F, Zeng C, Qiao T. *J. Instrum. Anal.* (曹志刚, 李来生, 程彪平, 张宏福, 曾春, 谯婷. 分析测试学报), **2016**, 35(1): 16-22.
- [11] Gu T N, Zhang M L, Chen J, Qiu H D. *Chem. Commun.*, **2015**, 51(48): 9825-9828.
- [12] Zhang H J, Qiao X, Cai T P, Chen J, Li Z, Qiu H D. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409(9): 1-10.
- [13] Bown A W, Shelp B J. *Trends. Plant Sci.*, **1999**, 4(11): 446-452.
- [14] Zhang Y, Zhang Y, Wang G, Chen W J, He P G, Wang Q J. *Analyst*, **2015**, 141(3): 1083-1090.
- [15] Li Y Y, Xu L, Chen T, Liu X Y, Xu Z G, Zhang H X. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 726(5): 102-108.
- [16] Guo Z M, Jin Y, Liang T, Liu Y F, Xu Q, Liang X M, Lei A W. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(2): 257-263.

(责任编辑:周启动)