

新型聚乙烯亚胺型 HILIC 固定相的制备及其色谱性能研究

朱 萌¹, 黄少华², 仇汝臣^{1*}

(1. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042;

2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东省合成生物学省级重点实验室, 山东 青岛 266101)

摘要: 制备了一种新型聚合物键合硅胶亲水作用色谱 (HILIC) 固定相, 并利用傅里叶红外分析光谱和元素分析对该固定相进行表征, 结果表明, 聚合物已成功固定于硅胶表面。在亲水作用色谱模式下, 利用经典的核苷类化合物对上述固定相的分离性能进行评测, 结果表明, 所制备的固定相对核苷类样品表现出较好的分离效果, 并且其保留行为符合典型的亲水作用色谱的保留特征; 另外, 流动相的种类和柱温对上述固定相的保留行为存在较大的影响。

关键词: 亲水作用色谱; 聚合物键合固定相; 保留行为; 核苷类化合物

中图分类号: TH3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)05-0105-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.05.023

Preparation and chromatographic evaluation of a polyethylenimine modified hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase

ZHU Meng¹, HUANG Shao-hua², QIU Ru-chen^{1*}

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract: In this study, a novel polymer bonded silica hydrophilic interaction chromatography (HILIC) stationary phase is synthesized. The obtained stationary phase is characterized via Fourier transform spectroscopy and elemental analysis, indicating that the novel stationary phase is prepared successfully. Under the hydrophilic interaction chromatographic mode, various classical nucleosides compounds are used to evaluate the separation performance of the stationary phase. It is found that the used analytes can be fully separated by the obtained stationary phase with a typical HILIC characteristic. In addition, the composition of mobile phase and the column temperature are found to have potential effect on the retention behavior of the obtained stationary phase material.

Key words: hydrophilic interaction chromatography; polymer bonded stationary phases; retention behavior; nucleosides compound

自 Alpert 于 1990 年首次提出亲水作用色谱 (HILIC) 概念以来^[1], 其已成为色谱领域一个研究分支, 在各种极性分析物的分离分析方面具有很大的潜力, 如植物提取物、氨基酸、蛋白质、碳水化合物以及核苷酸等极性化合物的分离分析^[2-5]。

到目前为止, 已经有多种类型的 HILIC 固定相被设计和合成以满足不同的分离要求。除了经典的裸硅胶和氨丙基键合硅胶^[6-7], 多种类型的二氧化硅键合相 HILIC 材料也被开发出来, 如酰胺^[8-9]、两性离子^[10-11]、二醇^[12]以及糖苷固定相^[13]等。目前, 医药、食品等行业对液相色谱的需求增加且难度也

在变大, 这就要求有更加高效的 HILIC 固定相来满足市场需求。聚合物键合硅胶固定相一直是 HILIC 的热点, 此类固定相可以提供更多的作用位点, 从而使得其柱容量得到较大提升。

笔者将三甲氧基硅丙基封端的聚乙烯亚胺 (PEI) 键合到硅胶表面, 从而制备出一种新型的季铵化聚合物型 HILIC 分离材料。并通过傅里叶变换红外光谱和元素分析成功地对所获得的材料进行表征。以 6 种核苷混合物为探针样品来评估所制备材料的色谱性能^[14], 并考察了流动相的组成以及柱温等因素对固定相保留行为的影响^[15-16]。

收稿日期: 2018-08-24; 修回日期: 2019-03-15

基金项目: 国家自然科学基金 (21105108)

作者简介: 朱萌 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为绿色化学工艺, zhumeng19901103@163.com; 仇汝臣 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为石油加工, 通讯联系人, 8978122@163.com。

1 实验仪器与试剂

1.1 实验仪器

Nicolet 6700 FT-IR 傅里叶变换红外分析光谱仪,美国赛默飞世尔公司生产;Vario EL cube 元素分析仪,德国 Elementar 公司生产;梅特勒-托利多 DELTA320 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司生产;RPL-ZD10 装柱机,大连日普利公司生产;250 mm×4.6 mm 不锈钢空色谱柱,美国热电集团生产;Waters 1525 二元梯度高效液相色谱仪系统,包括 Waters 2489 紫外检测器、Waters 1525 二元高效液相色谱泵、Waters 2707 自动进样器、Empower 色谱工作站,美国 Waters 公司生产。

1.2 实验试剂

球形硅胶(粒径为 5 μm,比表面积为 300 m²/g),日本 Daiso 公司生产;三甲氧基硅丙基封端的聚乙烯亚胺(纯度 50%),美国 Gelest 公司生产;N,N-二甲基甲酰胺(AR)、三乙胺(AR)、丙酮(AR)、1,4-二氧六环(AR),国药集团化学试剂有限公司生产;甲醇(GR)、乙腈(GR),德国默克公司生产。

2 实验方法

2.1 合成步骤

聚乙烯亚胺型 HILIC 固定相的合成路线如图 1

所示。称取 4 g 球形硅胶于 150 mL 三口烧瓶中,加入 100 mL 质量分数为 10%的盐酸水溶液,在 110℃ 下搅拌回流 12 h,冷却至室温,然后用超纯水洗涤抽滤,确保盐酸洗去使溶液 pH 呈中性后放入烘箱,于 110℃ 下干燥 12 h 至恒重,得 3.8 g 空白硅胶密封保存备用。

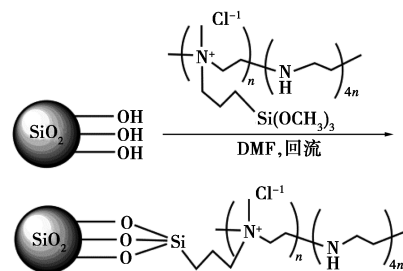


图 1 聚乙烯亚胺型亲水色谱固定相的制备路线

称取已活化好的球形硅胶 3.5 g 于 100 mL 三口烧瓶中,对其进行抽真空干燥,于 150℃ 下油浴加热 4 h。抽真空干燥结束后降为室温。通过滴液漏斗向三口烧瓶中加入 35 mL 二甲基甲酰胺(DMF),加入 1.0 g 三甲氧基硅丙基封端的聚乙烯亚胺,滴入 2 滴三乙胺催化剂,油浴加热反应温度设为 110℃,在氮气保护下磁力搅拌反应 24 h。反应结束后降为室温,用丙酮离心洗涤 3~5 次,放入烘箱于 68℃ 烘干,得到白色恒重粉末,命名为聚乙烯亚胺型 HILIC 固定相(SiO₂-PEI),称其质量为 3.78 g。

(上接第 104 页)

- [7] Schimpf S, Lucas M, Mohr C, *et al.* Supported gold nanoparticles: In-depth catalyst characterization and application in hydrogenation and oxidation reactions[J]. *Catalysis Today*, 2002, 72(1): 63-78.
- [8] 张杨子,祝琳华,何艳萍,等. 纳米金催化剂 Au/ZnAl-LDHs 的制备及在 CO 常温氧化反应中的活性及稳定性[J]. *材料导报*, 2015, 29(2): 10-14.
- [9] 唐月,胡红定,朱明乔,等. 活性炭负载的纳米金催化剂上葡萄糖氧化工艺[J]. *化学反应工程与工艺*, 2012, 28(3): 200-205.
- [10] Manuel S, Léger B, Addad A, *et al.* Cyclodextrins as effective additives in AuNPs-catalyzed reduction of nitrobenzene derivatives in a ball-mill[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(20): 5500-5509.
- [11] Ye Y, Jin M, Wan D. One-pot synthesis of porous monolith-supported gold nanoparticles as an effective recyclable catalyst[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2015, 3(25): 13519-13525.
- [12] Zhao P, Feng X, Huang D, *et al.* Basic concepts and recent advances in nitrophenol reduction by gold- and other transition metal nanoparticles[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2015, 287(10): 114-136.
- [13] Guo L, Liu Q, Li G, *et al.* A mussel-inspired polydopamine coating as a versatile platform for the in situ synthesis of graphene-based

nanocomposites[J]. *Nanoscale*, 2012, 4(19): 5864-5867.

- [14] 李丽,季伟捷,区泽棠. 介孔 SiO₂ 负载的纳米金及其催化应用[J]. *化学进展*, 2009, 21(9): 1742-1749.
- [15] 韩丹,张爱文,高官俊,等. 负载型纳米 Au 催化剂光催化性能的研究进展[J]. *化工进展*, 2012, 31(2): 435-440.
- [16] Liu Y, Ai K, Lu L. Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(9): 5057-5115.
- [17] Lynge M E, Van d W R, Postma A, *et al.* Polydopamine—a nature-inspired polymer coating for biomedical science [J]. *Nanoscale*, 2011, 3(12): 4916-4928.
- [18] Zeng T, Zhang X L, Niu H Y, *et al.* In situ, growth of gold nanoparticles onto polydopamine-encapsulated magnetic microspheres for catalytic reduction of nitrobenzene[J]. *Applied Catalysis B Environmental*, 2013, s134-135(9): 26-33.
- [19] Mao Y, Jiang W, Xuan S, *et al.* Rod-like β-FeOOH@ poly(dopamine)-Au-poly(dopamine) nanocatalysts with improved recyclable activities[J]. *Dalton Trans*, 2015, 44(20): 9538-9544.
- [20] Arbeloa F L, Arbeloa T L, Estevez M J T, *et al.* Photophysics of rhodamines: Molecular structure and solvent effects [J]. *Journal of Physical Chemistry*, 1991, 95(6): 2203-2208. ■

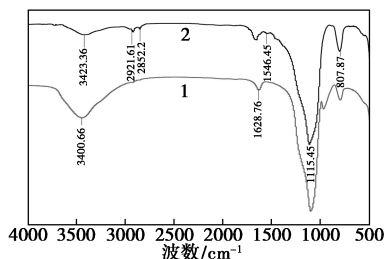
2.2 色谱柱的填装及色谱条件

利用匀浆法将 SiO_2 -PEI 装填成 $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 的高效液相色谱柱:取 3.20 g SiO_2 -PEI 固定相填料分散在 30 mL 1,4-二氧六环匀浆液中,以甲醇为顶替液,在 35 MPa 的压力下填充至不锈钢色谱柱中。在亲水色谱模式下,用尿嘧啶测定柱效与保留时间。流动相为 $V(\text{乙腈})/V(\text{水}) = 90/10$,流速为 1.0 mL/min ,等度洗脱,紫外检测波长设置为 254 nm 。核苷化合物样品均用超纯水作溶剂进行配制,样品质量浓度为 200 mg/L ,并经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,进样量为每次 $10 \mu\text{L}$ 。整个色谱分离过程中,流动相均为等度洗脱,紫外检测波长均为 254 nm 。部分色谱条件下使用 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (浓度为 20 mmol/L) 缓冲液,用醋酸调节酸碱度至目标值。

3 结果与讨论

3.1 SiO_2 -PEI 的表征

为了验证键合实验的结果,利用红外光谱 (FT-IR) 对其进行表征,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,在 2921.2 、 2852.2 cm^{-1} 处有明显的甲基 ($-\text{CH}_3$) 强伸缩振动峰, 1546.45 cm^{-1} 处为 $\text{N}-\text{H}$ 振动吸收峰。这些特征峰可以作为键合成功的有力证据。



1— SiO_2 ; 2— SiO_2 -PEI

图 2 SiO_2 与 SiO_2 -PEI 的红外谱图

为了进一步说明键合实验结果,利用元素分析的表征方法对其进行考察。结果表明,空白硅胶中不含有碳、氮元素,相比之下, SiO_2 -PEI 中含有 9.73% 碳和 3.57% 氮。这 2 个元素质量分数的增加充分说明实验键合是成功的。

3.2 SiO_2 -PEI 的色谱分离性能评价

3.2.1 SiO_2 -PEI 的分离性能评价

以尿嘧啶为探测物, $V(\text{乙腈})/V(\text{水}) (90/10)$ 为流动相,对柱效进行测定,结果表明,所制备的 SiO_2 -PEI 的塔板数达到 25320 (plates/m),对称因子为 1.05 ,说明该分离材料具有较理想的色谱性能。选用 6 种核苷混合物为样品,以 $V(\text{乙腈})/$

$V(\text{水}) = 70:30$ 作为流动相对其进行初步评测,结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,6 种核苷类物质在 10 min 内可以被基线分离,并且具有较良好的峰形。被分析物依次洗脱顺序及对应的物质极性:胸苷 ($\log P = -0.93$)、腺苷 ($\log P = -1.05$)、尿苷 ($\log P = -1.98$)、胞苷 ($\log P = -2.51$)、鸟苷 ($\log P = -1.90$) 和肌苷 ($\log P = -2.10$),其中, $\log P$ 值来源于 Homepubchem compound-NCBI 的网址上查得。在亲水作用色谱中,具有较高 $\log P$ 值的化合物亲水性较低,因此在 HILIC 模式下保留较短。前 4 种样品洗脱顺序与这个规律相符;后 2 种物质异常的保留行为是由于分子结构中的酰胺和氨基基团与分析物的相互作用引起的,使其在固定相洗脱中最慢。

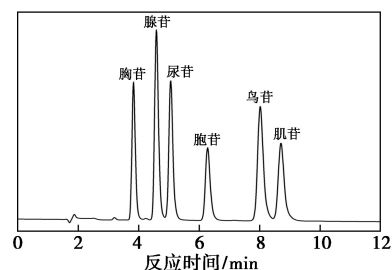
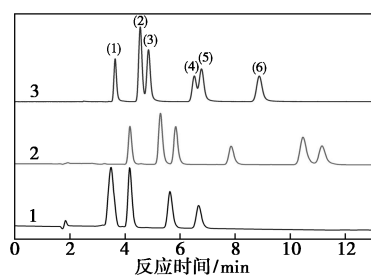


图 3 6 种核苷类化合物在 SiO_2 -PEI 上的分离结果

注:色谱条件:流动相 $V(\text{乙腈})/V(\text{水}) = 70/30$,流速为 1.0 mL/min ,检测器为 UV,柱温为 30°C 。

3.2.2 流动相的组成对 SiO_2 -PEI 保留行为的影响

流动相的组成对分析物的保留行为和峰形特征有着较深远的影响。以乙腈、甲醇和 KH_2PO_4 缓冲液构成 3 种流动相分别分离 6 种核苷样品的色谱图如图 4 所示。由图 4 可以看出,核苷组分在 $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 75/25$ 的流动相中不能被完全分离,且具有微弱的保留作用;核苷组分在 $V(\text{乙腈})/V(\text{水}) = 75/25$ 的流动相中完全被分离且具有较强保留作用。这种保留行为的变化是溶质在甲醇/水和乙腈/水中分配系数不同而引起的。也就是说,较高的 $\log P$ 值的溶质可以更容易地转移到甲醇/水相中,而不是转移到乙腈/水相中,导致在甲醇/水流动相中较弱的滞留。至于 KH_2PO_4 缓冲液,其引入可以为所用分析物提供优良的峰形,但在 $V(\text{乙腈})/V(\text{缓冲液}) = 75/25$ 流动相中具有更少的洗脱时间。这一结果意味着这些核苷分析物在乙腈/水相中以非中性形式存在,这是因为缓冲液可用于控制分析物和固定相的电离状态,从而影响他们之间的相互作用。



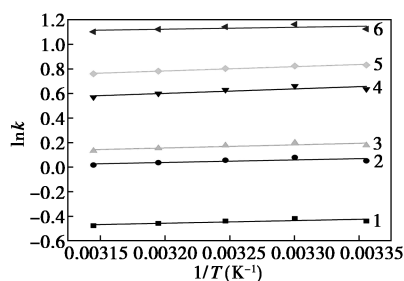
1— $V(\text{甲醇})/V(\text{水})=75/25$; 2— $V(\text{乙腈})/V(\text{水})=75/25$;
3— $V(\text{乙腈})/V(\text{缓冲液})=75/25$

图 4 在 $\text{SiO}_2\text{-PEI}$ 上 3 种流动相分离 6 种核苷的色谱图

注: 色谱条件: 流速为 1.0 mL/min ; 检测器为 UV 检测器, 254 nm ; 柱温为 30°C 。6 种核苷分别为: (1) 胸苷; (2) 腺苷; (3) 尿苷; (4) 胞苷; (5) 鸟苷和 (6) 肌苷。

3.2.3 柱温对 $\text{SiO}_2\text{-PEI}$ 分离性能的影响

柱温是影响 HILIC 中极性化合物保留的另一个重要因素。以 $V(\text{ACN})/V(\text{水})=70/30$ 为流动相, 在 HILIC 模式下考察不同柱温对 6 种核苷保留行为的影响, 结果如图 5 所示。由图 5 可以看出, 当温度从 25°C 增加到 45°C , 核苷的保留呈现降低的趋势。这些分析物的斜率也随着他们极性的增加而减小, 符合亲水作用色谱变化的规律。



1—胸苷; 2—腺苷; 3—尿苷; 4—胞苷; 5—鸟苷; 6—肌苷

图 5 柱温的倒数 ($1/T$) 对 $\text{SiO}_2\text{-PEI}$ 上 6 种核苷保留因子对数的影响

注: 色谱条件: 流动相 $V(\text{ACN})/V(\text{水})=70/30$; 流速为 1.0 mL/min ; 检测器为 UV 检测器, 254 nm ; 柱温分别为 25°C 、 30°C 、 35°C 和 45°C 。

4 结论

以三甲氧基硅丙基封端的聚乙烯亚胺键合为功能基团, 将之键合到硅胶表面, 得到一种亲水作用色谱固定相。以核苷类物质为分析物, 通过改变流动相的组成、柱温对保留行为的影响来探索固定相的保留行为, 结果表明, 核苷类样品在此分离材料上得到较优异的分, 其保留行为符合典型的 HILIC 色谱特征, 说明所制备的 HILIC 材料在分离高极性物

质上具有更大的潜力。

参考文献

- [1] Alpert A J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds [J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 499: 177-196.
- [2] Pazourek J. Fast separation and determination of free myo-inositol by hydrophilic liquid chromatography [J]. *Carbohydr Res*, 2014, 391: 55-60.
- [3] Dousa M, Srbek J, Stransky Z, *et al.* Retention behavior of a homologous series and positional isomers of aliphatic amino acids in hydrophilic interaction chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37: 739-747.
- [4] Noga S, Jandera P, Buszewski B. Retention mechanism studies of selected amino acids and vitamin B6 on HILIC columns with evaporative light scattering detection [J]. *Chromatographia*, 2013, 76: 929-937.
- [5] Zhou W L, Wang P G, Ogunsola O A, *et al.* Rapid determination of hexapeptides by hydrophilic interaction LC-MS/MS for in vitro skin-penetration studies [J]. *Bioanalysis*, 2013, 5: 1353-1362.
- [6] Karatapanis A E, Fiamegos Y C, Stalikas C D. Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column [J]. *Chromatographia*, 2010, 71: 751-759.
- [7] Linden J C, Lawhead C L. Liquid chromatography of saccharides [J]. *J Chromatogr*, 1975, 105: 125-133.
- [8] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1092: 246-249.
- [9] Kalková K, Kozlík P, Gilar M, *et al.* Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36: 2421-2429.
- [10] Yin W, Chai H, Liu R, *et al.* Click *N*-benzyl iminodiacetic acid: Novel silica-based tridentate zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2015, 132: 137-145.
- [11] Kip C, Tuncel A. HILIC stationary phase based on monodisperse porous polymethacrylate beads functionalized with zwitterionic molecular brushes [J]. *Chromatographia*, 2017, 80: 565-575.
- [12] Yu D, Guo Z, Shen A, *et al.* Synthesis and evaluation of sulfobetaine zwitterionic polymer bonded stationary phase [J]. *Talanta*, 2016, 161: 860-866.
- [13] Liang T, Fu Q, Shen A, *et al.* Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1388: 110-118.
- [14] Liu S, Xu H, Yu J, *et al.* Novel imidazolium-embedded *N,N*-dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 8989-8997.
- [15] Karger B L, Snyder L R. An introduction to separation science [M]. New York: John Wiley and Sons, 1973.
- [16] Yu Yang. A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 11: 4. ■