

高效液相色谱苯胺甲基键合硅胶固定相的保留机理研究

周 蓉, 冯钰琦, 达世禄

(武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要 制备了 3 种不同键合量的苯胺甲基键合硅胶固定相, 分别在正、反相色谱条件下研究了它们对芳烃及其极性、酸性、碱性取代衍生物的保留和分离选择性, 探讨了该固定相的色谱保留机理, 并考察温度对溶质在具有不同键合量的固定相上保留的影响。结果表明: 苯胺甲基键合硅胶固定相对溶质的保留是疏水、 π - π 、偶极-偶极和电荷转移等多种作用的结果, 在反相色谱模式中, 疏水作用对溶质的保留起主要作用。

关键词 苯胺甲基键合硅胶固定相; 键合量; 保留机理

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2002)03-0193-04

Studies on the Retention Mechanism of *N*-Methylaniline Bonded Silica for High Performance Liquid Chromatography

ZHOU Rong, FENG Yu-qi, DA Shi-lu

(College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Three *N*-methylaniline bonded stationary phases containing different bonding amounts were prepared by modifying silica gel with *N*-methylanilinetriethoxysilane. Influences of the bonding amounts on the retentions and selectivity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polar-, acid- and basic-substituted aromatic compounds were investigated in reversed- and normal- phase high performance liquid chromatography. In the reversed-phase liquid chromatography, the plots of $\log k'$ against the carbon atom numbers for alkylbenzenes are linear, and the retentions and relative retentions of the solutes (including alkylbenzenes, PAHs and nitrobenzenes) increased with the increase of the bonding amounts and water volume fractions in mobile phase. The results indicated that the hydrophobic interaction played a major role in the retention process. In the normal-phase liquid chromatography, the retentions of PAHs increased and the retentions of nitrobenzenes decreased with the increase of bonding amounts. With the increase of bonding amounts, the retentions of acidic compounds increased and the retentions of basic solutes decreased considerably. It is indicated that the number of imino groups increased and the activity of residual silanols diminished with the increase of bonding amounts. The retentions of solutes on the stationary phases result from acid-basic, dipole-dipole, π - π and charge transfer interactions in the normal phase chromatography.

Key words: *N*-methylaniline bonded silica stationary phase; bonding amount; retention mechanism

在高效液相色谱(HPLC)中, 烷烃键合相以其良好的疏水性能和热、化学稳定性而得到了最普遍的使用^[1~3]。目前, 对于富含 π 电子的环境污染物、药物、诱变剂以及农药的分离得到了人们的普遍关注^[4,5]。这些分离对象有相当大一部分在烷基键合相上不能有效分离, 因此, 研制具有新型结构的固定相一直是高效液相色谱发展新型分离模式、分离技术的基础。探讨这些固定相的结构以及与溶质之间的作用和保留机理, 提供 HPLC 键合固定相分子

结构设计、色谱分离条件优化的理论依据也成为人们关注的对象。一般来说, 溶质的保留特征由三部分因素来决定^[6], 即由固定相键合分子碳氢链的长度和结构、键合量、溶质与固定相的作用力类型决定。色谱保留机理一般是研究色谱过程中溶质与色谱体系(主要是固定相分子)之间的相互作用类型和强弱以及分子识别的物理化学基础。色谱选择性或相对保留值(α)是一个研究固定相保留机理的重要参数, 它反映了两种溶质分子从流动相到固定相转

移过程中 Gibbs 自由能的差别^[7,8]。苯胺甲基键合硅胶($C_6H_5NHCH_2-Si$)固定相是我们近期研制的一种新型 π 电子给体固定相,其制备和色谱性能已在文献[9]中报道。本文制备了 3 种不同键合量的色谱固定相,以芳香烃及其不同极性、酸性、碱性衍生物为探针,根据溶质的保留和选择性差异,研究苯胺甲基键合相的保留机理,并考察了温度对溶质在不同键合量固定相上保留的影响。

1 实验部分

1.1 试剂和样品

硅胶(5 μm ,比表面积为 220 m^2/g ,自制);苯胺甲基三乙氧基硅烷(武汉大学有机硅新材料公司);三甲氯硅烷(上海化学试剂一厂);甲醇(分析纯,上海五四化学试剂厂);水(二次蒸馏水);稠环芳烃、硝基苯类、硝基苯酚类和硝基苯胺类均为分析纯,试样用甲醇溶解。

1.2 仪器

高效液相色谱仪由岛津 LC-6A 泵、SPD-10A 紫外检测器(日本)或 DZ-1 254 紫外检测器(中国科学院上海分院科学仪器厂)、Rheodyne 7125 进样器、CS501-SP 超级数显恒温器(重庆四达实验仪器四厂)、Type3066 记录仪(四川仪表四厂)和 CR-6A 型数字积分仪(岛津,日本)组成;元素分析仪(MOD1106 型,意大利);红外光谱仪(Magna-IR Spectrometer 550, Nicolet, 美国)。

1.3 键合相的制备

制备方法与文献[9]相同,分别取 4 g 硅胶在无水甲苯中与 2 mL、5 mL、10 mL 苯胺甲基三乙氧基硅烷进行硅烷化反应,获得不同键合量的固定相。根据元素分析结果,所得固定相的键合量分别为 0.485 mmol/g、1.280 mmol/g 和 1.743 mmol/g,相应地分别命名为键合相 BSP1、BSP2 和 BSP3。

1.4 色谱柱装填

所制备的固定相用匀浆法装入 150 mm \times 4.0 mm i.d. 的不锈钢柱中。

1.5 色谱条件

以甲醇-水和环己烷、异丙醇为流动相,使用前用 G4 砂芯漏斗过滤,超声脱气 2 min,流速为 1 mL/min。检测波长为 254 nm,以溶剂峰的保留时间作为死时间,所有样品都至少被测定 2 次。

2 结果与讨论

2.1 反相色谱模式

2.1.1 芳烃及其极性、酸性和碱性取代衍生物的保留和选择性

疏水选择性或称亚甲基选择性指的是一系列仅相差一个亚甲基基团的同系物的相对保留值,它只与溶质和固定相之间的疏水作用有关。对于一系列同系物 $R-(CH_2)_{n-1}-CH_3$,容量因子 k' 可写为^[10]:

$$\log k' = pn + q \quad (1)$$

其中 m 是同系物烷基链中的碳原子数, p 是溶质容量因子的对数值 $\log k'$ 与碳原子数 n 关系曲线的斜率。

$$\text{亚甲基选择性为: } \alpha = k'_{n+1}/k'_n \quad (2)$$

$$\text{由方程 (1) 和 (2) 可得: } \alpha = 10^p \quad (3)$$

如方程(1)所示,甲苯、乙苯、丙苯等烷基苯类在不同键合量的苯胺甲基固定相上的 $\log k'$ 与碳原子数 n 呈线性关系,相关系数按键合量由大至小分别为 0.999 76、0.999 68、0.999 21。计算所得的斜率 p 值分别为 0.194、0.169、0.158; α 值分别为 1.563、1.476、1.439;两者均为 BSP1 < BSP2 < BSP3。说明随着硅胶基质上所键合的苯胺甲基基团数目的增加,溶质与固定相之间的疏水作用增大,改善了亚甲基选择性。

以联苯、萘和硝基苯类化合物为探针溶质,考察了改变固定相的键合量对稠环芳烃以及极性衍生物的保留和选择性的影响。图 1 给出了联苯在不同键合量的苯胺甲基键合硅胶固定相上 $\log k'$ 随流动相甲醇-水中水的体积分数变化的关系图。由该图可见,溶质的 $\log k'$ 值与流动相中水含量呈很好的线性关系,其斜率按键合量由大到小,依次为 3.339、3.133、3.064;溶质萘得到类似的线性关系图,其斜率依次为 2.836、2.655、2.460。这些结果进一步表明该固定相在反相色谱条件下的主要作用模式为疏水作用。表 1 列出了在不同水含量的流动相中联苯、萘和硝基苯类的保留值以及相对于苯的相对保留值。与一般反相色谱相同,流动相含水量增加,溶质的保留和分离选择性均上升,除此以外,溶质保留

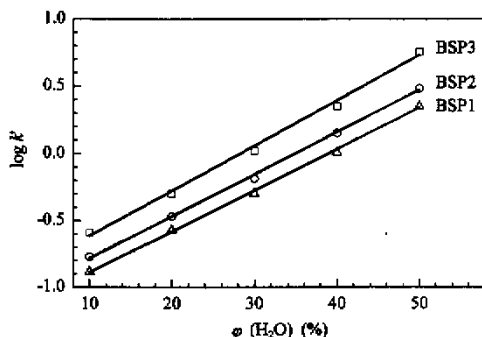


图 1 流动相中水的体积分数对联苯的 $\log k'$ 值的影响
Fig. 1 Effect of water volume fraction in mobile phase on $\log k'$ of biphenyl

值和相对保留值均随着固定相键合量的增加而增加。说明随着键合量增大, 固定相上的苯环、碳氢基

团数量增加, 与溶质之间的 π - π 、偶极-偶极、电荷转移、疏水作用增大, 分离选择性提高。

表 1 溶质在 3 种固定相上的保留值及与苯的相对保留值*

Table 1 Retentions and relative retentions of some solutes on the three bonding phases*

Stationary phase	φ (water) (%)	Solute											
		benzene		naphthalene		biphenyl		nitrobenzene		<i>p</i> -dinitrobenzene		<i>m</i> -dinitrobenzene	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
BSP1	10	0.088	1.000	0.121	1.376	0.131	1.496	0.109	1.248	0.132	1.504	0.165	1.880
	30	0.214	1.000	0.382	1.789	0.506	2.366	0.270	1.262	0.394	1.842	0.450	2.104
	50	0.435	1.000	1.229	2.825	2.240	5.148	0.620	1.424	0.881	2.024	1.022	2.349
BSP2	10	0.105	1.000	0.148	1.401	0.169	1.599	0.137	1.299	0.179	1.701	0.211	2.000
	30	0.258	1.000	0.484	1.875	0.656	2.543	0.334	1.293	0.434	1.875	0.559	2.163
	50	0.573	1.000	1.708	2.980	3.042	5.308	0.823	1.436	1.188	2.072	1.396	2.435
BSP3	10	0.140	1.000	0.209	1.500	0.256	1.835	0.186	1.335	0.268	1.920	0.303	2.170
	30	0.376	1.000	0.729	1.938	1.047	2.782	0.505	1.343	0.764	2.032	0.847	2.251
	50	0.910	1.000	2.900	3.185	6.587	6.247	1.442	1.476	2.163	2.214	2.396	2.453

* Mobile phase, methanol-water at different ratios; φ (water), volume fraction of water in mobile phase; α values refer benzene as 1.000.

表 2 为水的体积分数为 30% 的条件下苯酚类、苯胺类、吡啶的保留值及相对于苯的相对保留值。随着苯胺甲基键合量的增大, 溶质的保留增大。固定相对苯酚类溶质的选择性按 BSP1, BSP2, BSP3 的顺序增大, 而苯胺类和吡啶的相对保留值则依次减少, 说明随着键合到硅胶表面的苯胺基数目的增加, 亚氨基的增多提高了与苯酚类化合物的氢键、酸-碱和离子交换作用, 降低了与苯胺类的极性作用。吡啶是对硅羟基非常敏感的化合物, 它相对于苯的相对保留值也随着键合量增大而减少, 进一步说明随着键合量增加, 残余硅羟基活性降低。

表 2 溶质在 3 种固定相上的保留值及与苯的相对保留值*

Table 2 Retentions and relative retentions of some solutes on the three bonding phases

Solute	BSP1		BSP2		BSP3	
	k'	α	k'	α	k'	α
Benzene	0.214	1.000	0.258	1.000	0.376	1.000
Phenol	0.101	0.473	0.129	0.500	0.230	0.531
Aniline	0.192	0.896	0.215	0.833	0.270	0.719
Pyridine	0.326	1.527	0.344	1.333	0.423	1.126
<i>o</i> -Nitrophenol	0.192	0.896	0.237	0.918	0.353	0.938
<i>m</i> -Nitrophenol	0.135	0.631	0.183	0.708	0.258	0.687
<i>p</i> -Nitrophenol	0.067	0.315	0.118	0.458	0.200	0.531
<i>o</i> -Nitroaniline	0.225	1.054	0.269	1.043	0.353	0.928
<i>m</i> -Nitroaniline	0.202	0.946	0.237	0.918	0.306	0.812
<i>p</i> -Nitroaniline	0.180	0.842	0.215	0.833	0.270	0.719

* Mobile phase: methanol-water (70:30, volume ratio); α values refer benzene as 1.000.

2.1.2 温度对溶质保留的影响

在反相液相色谱中, 分离是基于溶质分子在流动相与固定相之间分配的不同。溶质从流动相到固定相的转移焓 (ΔH) 和焓 (ΔS) 通过下式得到:

$$\ln k' = -\Delta H/RT + \Delta S/R + \ln \Phi \quad (4)$$

其中, T 是绝对温度, R 是气体常数, Φ 是相比(固

定相与流动相体积之比)^[11]。

图 2 为间二硝基苯在温度 32 °C ~ 52 °C 时在 3 种不同键合量固定相上的 $\ln k'$ 与 $1/T$ 的关系图, 线性关系良好; 联苯也同样获得了相似的线性关系图, 表明芳烃和极性取代衍生物两类溶质在该类型的固定相上具有基本相同的保留机理。根据关系图中 $\ln k' \sim 1/T$ 的斜率 ($-\Delta H/R$) 求得间二硝基苯在 3 种固定相上的转移焓, 按键合量由小到大分别为 -15.045 kJ/mol, -17.846 kJ/mol, -21.715 kJ/mol; 联苯的转移焓分别为 -19.399 kJ/mol, -21.519 kJ/mol, -24.505 kJ/mol。随着键合量的增加, 固定相与溶质之间的疏水、电荷转移作用增强, 溶质从流动相到固定相的转移焓绝对值也增大。

2.2 正相色谱模式

为了排除疏水作用的影响, 考察溶质与苯胺甲基键合硅胶固定相的 π - π 、偶极-偶极、电荷转移作用及键合相残余硅羟基的活性, 研究了上述溶质在

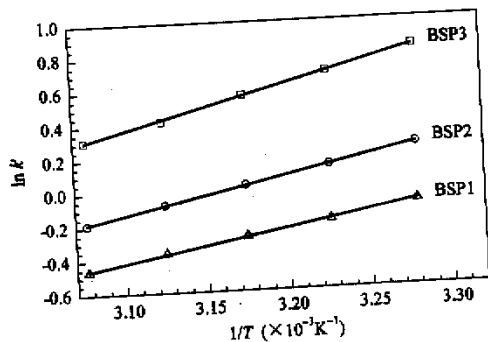


图 2 间二硝基苯在 3 种固定相上的 $\ln k'$ 与 $1/T$ 关系图
Fig.2 Comparison of the linear dependence of $\ln k'$ on the inverse temperature ($1/T$) for *m*-dinitrobenzene on the three bonding phases

Mobile phase: methanol-water (50:50, volume ratio).

3种固定相上的正相色谱性能。表3是在以100%环己烷为流动相的条件下,稠环芳烃和硝基苯类化合物在3种不同键合量的固定相上的保留值和相对保留值。同反相色谱相似,联苯、萘和硝基苯类化合物在3种固定相上的保留值和相对于苯的 α 值基本上都随键合量的增加而增大,即BSP1<BSP2<BSP3;但同表1比较可见:稠环芳烃的保留值在反相色谱条件下由于分子体积的差别 α 值有较大不同,但在正相条件下却相差甚微;与此相反,硝基苯类化合物在正相条件下的保留值和 α 值却大大超过其在反相条件下的值。这是因为苯胺甲基键合相仅具有一个苯环,与芳环化合物的 π - π 作用非常弱,以至于不能使稠环芳烃达到分离,但亚氨基的存在,大大增加了苯环的偶极-偶极和电荷转移作用,正相条件下这些极性作用对 π 电子受体溶质的影响更加突出,从而提高了对极性溶质的分离选择性。这亦说明在反相色谱中,疏水作用加强了固定相与溶质之间的 π - π 作用,从而提高了对稠环芳烃的分离能力,但同时也降低了基于电荷转移和偶极作用的硝基苯类化合物的分离选择性。

表3 溶质在3种固定相上的保留值及与苯的相对保留值*

Table 3 Retentions and relative retentions of some solutes on the three bonding phases*

Solute	BSP1		BSP2		BSP3	
	k'	α	k'	α	k'	α
Benzene	0.174	1.000	0.189	1.000	0.208	1.000
Naphthalene	0.272	1.562	0.345	1.827	0.417	2.003
Biphenyl	0.272	1.562	0.355	1.883	0.428	2.057
Nitrobenzene	1.250	7.180	1.833	9.717	2.362	11.34
<i>p</i> -Dinitrobenzene	5.251	30.15	6.333	33.57	6.987	33.54
<i>m</i> -Dinitrobenzene	6.306	36.21	7.000	37.10	7.146	37.18

* Mobile phase: 100% cyclohexane; α values refer benzene as 1.000.

表4列出了以环己烷-异丙醇(95:5,体积比)溶液为流动相时苯酚类和苯胺类溶质的保留和 α 值。极性溶质在正相色谱中的保留和 α 值均比在反相色谱中高。苯酚类化合物的保留值按BSP1、BSP2、BSP3的次序依次增加,而苯胺类的保留顺序则相反,说明随键合量增大,残余硅羟基减少,亚氨基数目增多,对酸性化合物的作用增强,而对碱性化合物的作用减弱。从该表也可看出,正相色谱条件下,硝基苯酚、硝基苯胺邻位异构体由于形成分子内氢键,与固定相的偶极作用降低,其保留值最低。比较表2与表4苯酚与苯胺的保留可知:正相条件下,键合

量大小对固定相与酸性溶质之间基于氢键、偶极和离子交换作用的保留影响较小,但基于残余硅羟基作用的碱性溶质的保留却增强,表明正相色谱条件下,硅羟基的活性增强且大于亚氨基。

表4 溶质在3种固定相上的保留值和相对保留值*

Table 4 Retentions and relative retentions of some solutes on the three bonding phases*

Solute	BSP1		BSP2		BSP3	
	k'	α	k'	α	k'	α
Phenol	0.204	1.000	0.303	1.000	0.333	1.000
<i>o</i> -Nitrophenol	0.087	0.426	0.202	0.667	0.278	0.835
<i>m</i> -Nitrophenol	0.310	1.520	0.337	1.112	0.400	1.201
<i>p</i> -Nitrophenol	0.495	2.426	0.495	1.634	0.555	1.667
Aniline	2.483	1.000	2.067	1.000	1.933	1.000
<i>o</i> -Nitroaniline	1.917	0.772	1.667	0.806	1.567	0.811
<i>m</i> -Nitroaniline	4.100	1.651	3.117	1.508	2.583	1.713
<i>p</i> -Nitroaniline	7.283	2.933	4.933	2.387	34.850	1.992

* Mobile phase: cyclohexane-2-propanol(95:5, volume ratio); α values refer phenol as 1.000 for nitrophenols and aniline as 1.000 for nitroanilines.

参考文献:

- [1] Vonk E C, Langeveld-Voss B M W, van Dongen J L J, et al. J Chromatogr A, 2001, 911: 13
- [2] Sander L C, Sharpless K E, Pursch M. J Chromatogr A, 2000, 880: 189
- [3] Miyabe K, Guiochon G. J Chromatogr A, 2000, 903: 1
- [4] Bordelanne O, Delville M H, Félix G, et al. Chromatographia, 2000, 52: 51
- [5] LIU Yue-qi, GE Yong-hui, CAI Qing-song, et al. Chemical Journal of Chinese Universities, 2000, 21(12): 1828
刘月启,葛永辉,蔡青松,等. 高等学校化学学报, 2000, 21(12): 1828
- [6] Schunk T C, Burke M F. J Chromatogr A, 1993, 656: 289
- [7] Sándi A, Szepeszy L. J Chromatogr A, 1998, 818: 19
- [8] Waksmundzka-Hajnos M, Petruczynik A, Hawryl A, et al. J Chromatogr A, 2001, 919: 39
- [9] ZHOU Rong, FAN Yi, FENG Yu-qi, et al. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2002, 19(1): 66
周蓉,范毅,冯钰钰,等. 应用化学, 2002, 19(1): 66
- [10] Tchaplá A, Heron S, Colin H, et al. Anal Chem, 1988, 60: 1443
- [11] Guillaume Y C, Guinard C. Anal Chem, 1996, 68(17): 2869