

C₁₈ 反相色谱固定相的制备及性能评价 ——介绍一个仪器分析拓展性实验

牛丽红*, 周云, 于莹, 张源, 吴彼伦, 麦炜琦

清华大学化学系, 北京 100084

摘要: 介绍了一个本科生仪器分析拓展性实验——C₁₈ 反相色谱固定相的制备及性能评价。实验内容包含色谱固定相的合成、表征、装填及其性能评价, 实验过程涵盖了有机合成、物理化学和仪器分析知识。通过本实验的实践, 拓展了经典仪器分析实验内容, 有利于培养学生综合运用知识的能力和科研探究能力。

关键词: 仪器分析实验; 色谱; 固定相制备; 性能评价

中图分类号: G64; O6

Preparation and Performance Evaluation of C₁₈ Stationary Phase for Reversed-Phase Chromatography: An Extended Instrumental Analysis Experiment

NIU Lihong *, ZHOU Yun, YU Ying, ZHANG Yuan, WU Bilun, MAI Weiqi

Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China.

Abstract: An extended instrumental analysis experiment “preparation and performance evaluation of C₁₈ stationary phase for reversed-phase chromatography” is recommended for undergraduates. The experiment includes the synthesis, characterization, preparation and properties of the stationary phase. The knowledge of organic synthesis, physical chemistry and instrumental analysis is covered in the experiment. With the practice of the experiment, the typical instrumental analysis experiment is extended. It is helpful for students to cultivate the ability of applying knowledge comprehensively and exercise the ability of scientific research.

Key Words: Instrumental analysis experiment; Chromatography; Stationary phase preparation; Performance evaluation

高效液相色谱(HPLC)及其联用技术广泛运用于食品药品安全分析、环境监测、化学化工、药物研发等领域, 是一种重要的分离分析手段。固定相是色谱分离的核心, 固定相分离材料的制备和应用始终是色谱工作者研究的前沿和热点之一^[1]。

关于高效液相色谱技术, 本校开设了基础类教学实验, 囿于课时的限制, 基本上沿袭了经典的实验内容^[2], 如: “V_E 异构体在正相 HPLC 系统中分析条件的选择”, 此类实验主要注重仪器的操作技能和对基本原理的理解, 可作为初学者的训练性实验。本文介绍的实验以色谱分析工作中比较常用的反相色谱柱为例, 将液相色谱固定相合成、表征、装填、分离效果评价等作为拓展性内容引入仪器分析实验, 具有较强的综合性、实用性和趣味性, 有助于学生深入思考色谱分析原理和方法,

收稿: 2018-10-15; 录用: 2018-10-31; 网络发表: 2018-11-28

*通讯作者, Email: niulh@tsinghua.edu.cn

基金资助: 清华大学教育教学改革基金(53410100537)

熟练掌握红外分析、电镜分析等表征技术。其丰富而系统的实验内容,有利于培养学生综合运用知识的能力和科研探究能力。

1 实验目的

- (1) 了解硅胶表面特定官能团修饰原理。
- (2) 熟练掌握色谱分离的原理。
- (3) 掌握 C_{18} 液相色谱固定相的制备方法,色谱柱装填的基本过程和评价方法。
- (4) 熟练掌握红外光谱仪、高效液相色谱仪、电子扫描显微镜等仪器的基本操作。

2 实验原理

化学的基础是各种分离过程,而色谱是一种最重要的物理化学分离方法^[3],色谱分离是基于混合物各组分在两相中分布系数的差异,当两相做相对移动时,被分离物质在两相间进行连续、多次分配,组分分配系数的微小差异会导致迁移速率产生可被检测到的差异,实现组分分离。其中涉及的主要原理包括硅胶选择性化学吸附能力的改性和柱效率理论塔板数的评价。

硅胶表面含有丰富的硅羟基($Si-OH$),这些硅羟基是硅胶表面的主要吸附位点和最具反应活性的官能基团,是进行表面化学修饰和改性的基础。通常利用硅羟基和有机硅烷进行硅烷化反应,市售的色谱柱一般用十八烷基(C_{18})的硅烷化合物键合硅胶。

对于色谱柱性能评价的一个最重要依据是塔板理论。其基本假设为:将色谱柱比作分馏塔,待分离组分由分馏塔各塔板流下,并形成平衡,当最终流出液峰形对称且呈正态分布时,可以用式(1)求出理论塔板数 N 。

$$N = 5.54(t_R/w_{h/2})^2 \quad (1)$$

式(1)中, t_R 为保留时间, $w_{h/2}$ 为色谱峰半峰宽。通过比较不同组分的理论塔板数就可以得出色谱柱的柱效。

3 仪器与试剂

主要仪器: LC-20A 高效液相色谱仪(岛津), 诺尔泵(博纳艾杰尔公司), 傅里叶变换红外光谱仪(岛津), 日立 SU-8010 冷场发射扫描电镜。

试剂: 甲苯(分析纯), 甲醇(分析纯和色谱纯), 乙醇(分析纯), 十八烷基二甲氧基硅烷(分析纯), 咪唑(分析纯), 多孔硅胶(博纳艾杰尔公司提供, 粒径 $5\ \mu m$)。

4 实验步骤

4.1 固定相合成

在回流装置上加装分水器,在三口烧瓶中加入 80 mL 甲苯和 10.00 g 硅胶,加热至回流,利用恒沸蒸馏的方法,对硅胶进行脱水(注意将分出的甲苯/水的恒沸混合物冷却后放入“非卤化废液”瓶中),反应 2 h 后,将 5.00 g 十八烷基硅烷加入到反应体系中,再加入 2.50 g 咪唑和 50 mL 干燥过的甲苯,氮气保护下加热回流 10 h。产物过滤后,用适量甲苯洗涤沉淀 3 次,再用甲醇洗涤 3 次,最后加入到体积比为 9:1 的甲醇/水混合溶液中, $50\ ^\circ C$ 下搅拌 30 min。抽滤,再用适量甲醇洗涤 3 次,将产品转移到培养皿中, $50\ ^\circ C$ 真空干燥 10 h,置于干燥器中备用。

4.2 装填色谱柱

用匀浆法将干燥后的产品装入不锈钢色谱柱管中,匀浆液为色谱纯的乙醇和甲醇($V(\text{乙醇}):V(\text{甲醇})=90:10$)混合液,顶替液为甲醇,装柱压力为 $40\ MPa\cdot cm^{-2}$ 。

4.3 柱效评价

以苯、甲苯、联苯体系评价。

5 结果与讨论

5.1 红外光谱

将烘干后的样品和烘干的溴化钾粉末按质量比1:100混合并压片,红外光谱见图1。

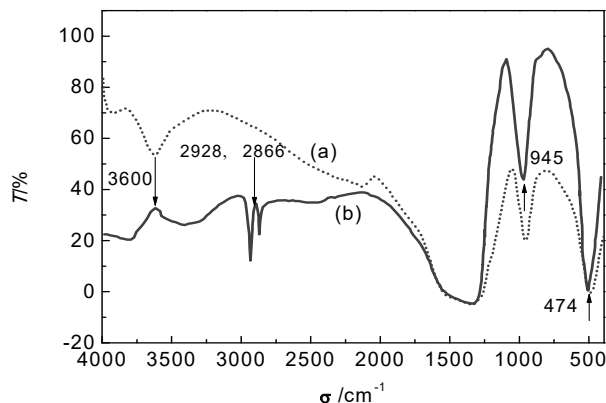


图1 原料硅胶(a)和硅烷化硅胶(b)的红外谱图

由图1可见,二氧化硅烷基化反应后,在2928和2866 cm^{-1} 处,出现明显的吸收峰,这是一 CH_2 —的不对称伸缩振动和对称伸缩振动峰;945、474 cm^{-1} 处的吸收峰有所增强,说明 Si-O 键增多;3600 cm^{-1} 处吸收峰变弱,说明羟基发生了键合。

5.2 形貌分析

通过SEM观察了原料和反应后的硅胶形貌,如图2所示,硅胶颗粒反应前后粒径和形貌变化不大,分布比较均匀,颗粒保持完整,说明该填料具有良好的机械强度、良好的机械稳定性以及完整的颗粒形貌,制备的 C_{18} 反相键合硅胶适合于色谱柱的装填^[4]。

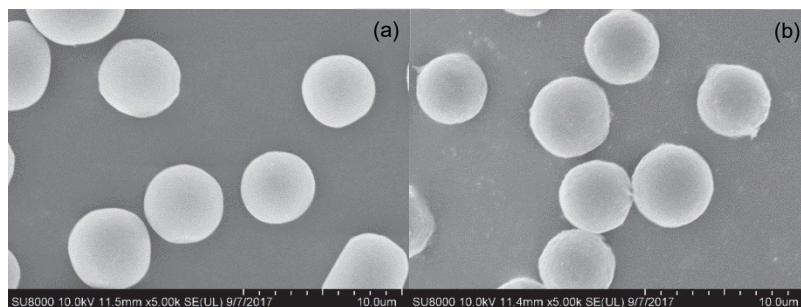


图2 原料硅胶(a)和硅烷化反应10 h硅胶(b)的SEM图

5.3 分离效果

以色谱纯甲醇为溶剂,分别配制1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苯、甲苯、联苯溶液,在50 mL容量瓶中定容;分别取10 mL上述溶液于新的50 mL容量瓶中定容;检测条件为:流动相为甲醇/水($V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:20$),流速为1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为254 nm,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,结果见图3和图4。

图3和图4分别是商品色谱柱和自制色谱柱分离色谱图。二者均能将三种组分完全分离,出峰的顺序为苯、甲苯、联苯。自制色谱柱的峰宽随洗脱时间增加而逐步增大,出现了拖尾,平均拖尾因子 T 为2.0,而商品柱为1.3,可能是由于未反应的羟基较多,发生与分离对象的 π - π 、氢键、疏水等相互作用^[5]。相应地,自制柱的保留时间长于商品柱,理论塔板数小于商品柱都可能是这个原因。根据式(1)数据处理后的保留时间 t_R 、半峰宽 $W_{h/2}$ 、理论塔板数 N 和拖尾因子 T 见表1。

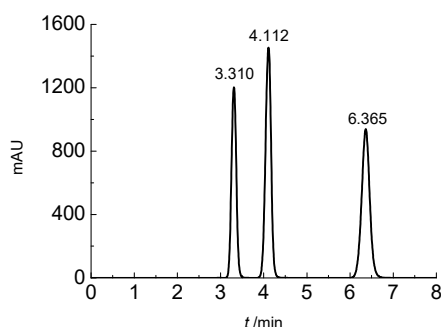


图3 商品色谱柱分离色谱图

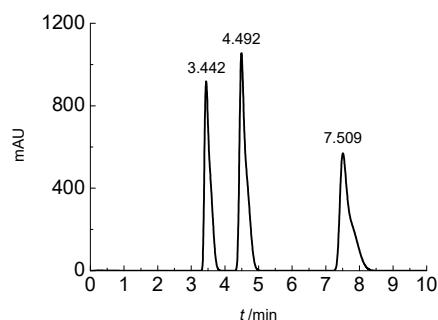


图4 自制色谱柱分离色谱图

表1 商品柱与自制柱色谱分离结果

样品	保留时间 t_R/min		半峰宽 $W_{h/2}/\text{min}$		理论塔板数 N/m		拖尾因子 T	
	商品柱	自制柱	商品柱	自制柱	商品柱	自制柱	商品柱	自制柱
苯	3.31	3.44	0.123	0.171	3999	2245	1.872	1.940
甲苯	4.11	4.49	0.151	0.191	4119	3058	0.944	1.986
联苯	6.37	7.51	0.190	0.262	6218	4558	1.003	2.215

6 实验注意事项

- (1) 装填色谱柱阶段, 装柱压力为 $40 \text{ MPa}\cdot\text{cm}^{-2}$, 使用时注意安全。
- (2) 所用硅胶颗粒较小, 请戴好口罩, 做好个人防护措施; 转移硅胶、装填色谱柱过程在通风橱内进行。
- (3) 为提高柱效, 装填色谱柱时硅胶颗粒在介质中要尽量分散; 被分散的颗粒要悬浮在介质中^[6]。
- (4) 填装压力是影响柱效的一个重要因素, 压力过大, 填充床层可能产生裂纹或结块; 压力过低则填充密度小。裂纹和低的填充密度都会产生沟道作用, 从而使柱效降低。实验中, 选择 $40 \text{ MPa}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。

7 实验特点及教学组织运行建议

- (1) 本实验共 16 学时, 是面向化学系大三年级学生开设的仪器分析实验选修部分, 建议学生先修仪器分析理论课程、仪器分析实验基础内容部分以及有机化学实验。
- (2) 实验前期合成阶段, 时间总计为 10 h, 期间可暂停, 做好隔绝空气措施即可。
- (3) 实验前, 学生要做好预习工作, 查阅相关文献, 了解硅胶修饰的方式、高效液相色谱分离的难点及其发展前景。
- (4) 本实验综合探究性强, 实验时间长, 建议将学生分成 2-3 人一组, 以利于小组合作。
- (5) C_{18} 色谱柱对于一些极性化合物的分离及一些极性差别较大的混合物的分离效果一直不是很理想, 如果时间允许, 可要求学生根据需求设计新分子, 制备出混合型的硅胶基质色谱填料, 探索用于特定组分的分离。
- (6) 硅胶颗粒的大小和制备方法都会影响色谱柱的分离效能, 可采取溶胶-凝胶方法制备硅胶, 探讨表面处理和高温煅烧等对分离效能的影响, 从而将本实验拓展为一个综合性更强的实验。

8 结语

本文介绍了一个仪器分析拓展性实验, 包括 C_{18} 反相色谱固定相合成、表征、装填以及分离效果评价。本实验来源于工业实践, 前期准备工作历时一年有余, 经历了工厂实地调研、厂家专业

人员指导试做、教师试做、参与清华大学科研训练项目(Student Research Training, 简称 SRT)的学生试做四个阶段, 确认教学内容、安全性、组织形式、时间安排等各方面满足教学要求, 于 2016、2017 和 2018 年, 在仪器分析拓展性实验中成功开设。参与的学生对实验给予了高度评价, 特别是其较强的应用背景, 大大提升了学生学习仪器分析实验的兴趣。实验过程涵盖了物质制备、表征、性质测试等有机合成、物理化学和仪器分析知识, 色谱固定相的分子设计为学生留下了充足的思考和发挥空间, 体现了化学学科的创造性和实用性。

致谢: 感谢博纳艾杰尔公司对本项目的支持。

参 考 文 献

- [1] 沈爱金, 郭志谋, 梁鑫淼. 化学进展, **2014**, 26 (1), 10.
- [2] 陈培榕, 李景虹, 邓勃. 现代仪器分析实验与技术. 北京: 清华大学出版社, 2005: 203–205.
- [3] 武汉大学. 分析化学. 北京: 高等教育出版社, 2007: 468–471.
- [4] Neue, U. D.; Alden, B. A.; Walter, T. H. *J. Chromatogram* **1999**, 849 (1), 101.
- [5] 张维冰, 高羽, 彭丽, 赵祎曼. 分析化学, **2016**, No. 6, 835.
- [6] 唐意红, 朱道乾, 关亚风. 分析化学, **2001**, No. 10, 1228.