

# 酰胺和咪唑基离子液体双极性基团 共嵌入式亲水 C18 硅胶固定相的 制备与应用

陈贝怡<sup>1,2</sup>, 观文娜<sup>2</sup>, 靳 钊<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>2</sup>, 周 睿<sup>1</sup>

(1. 青岛科技大学高分子科学与工程学院, 青岛 266045;

2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101)

**摘要** 利用分步键合法制备了酰胺和咪唑基离子液体双极性基团共嵌入的十八烷基修饰硅胶色谱固定相, 并通过离子交换制备了 2 种具有不同阴离子配位的固定相(Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N). 采用红外光谱和元素分析对 2 种固定相进行了表征, 发现红外光谱中均在 1460 和 661 cm<sup>-1</sup>处出现了咪唑环上 C=C 的伸缩振动峰和 C=N 的弯曲振动峰, 在 2927 和 2856 cm<sup>-1</sup>处出现了一CH 的不对称和对称伸缩振动峰, 证明氨基咪唑离子液体键合成功; 而原有 919 cm<sup>-1</sup>处的伯胺 N—H 面外变形振动峰消失, 说明十八烷基酰氯与氨基已键合. 元素分析结果表明, Sil-IL-AMC18-Cl 的氮元素含量为 3.07%, 碳元素含量为 16.73%, 氢元素含量为 3.07%, Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 的氮元素含量为 2.88%, 碳元素含量为 15.98%, 氢元素含量为 2.95%, 说明已制得 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 色谱固定相. 考察了 2 种固定相的色谱分离模式与分离性能, 结果表明: (1) 在反相色谱模式(RPLC)下, 相较于商品化 C18 色谱柱, 两种固定相均具有更高的柱效; (2) 由于具有双极性基团, 相较于传统亲水改性 C18 硅胶固定相具有更强的亲水能力, 因此可以实现亲水色谱模式(HILIC); (3) 在反相/亲水(RPLC/HILIC)混合色谱模式下, 可同时分离亲水性和疏水性物质. 通过考察发现, Sil-IL-AMC18-Cl 固定相比 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相有更强的亲水性能, 因此在 HILIC 色谱模式下将 Sil-IL-AMC18-Cl 固定相应用于 8 种碱基核苷类物质的分离, 可实现该类强亲水性物质的基线分离, 进样重复性 RSD=0.03%~0.25%(n=9); 在 RPLC 色谱模式下将 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相应用于 6 种苯胺类物质的分离, 不仅可以实现基线分离, 而且可明显改善苯胺类物质的峰拖尾现象, 进样重复性 RSD=0.05%~0.10%(n=9).

**关键词** 亲水改性 C18 硅胶填料; 混合模式液相色谱固定相; 碱基核苷; 苯胺

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20230503

## Preparation and Application of Imidazole-based Ionic Liquid and Amide Bipolar Groups Co-embedded Hydrophilic C18 Silica Gel Stationary Phase

CHEN Beiyi<sup>1,2</sup>, GUAN Wenna<sup>2</sup>, JIN Zhao<sup>1</sup>, LIU Tingting<sup>2</sup>, ZHOU Rui<sup>1\*</sup>

(1. School of Polymer Science and Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266045, China;

2. Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

**Abstract** In this work, octadecyl-modified silica chromatographic stationary phases with amide and imidazole-based ionic liquid bipolar groups co-embedded were prepared by stepwise bonding and two stationary phases with

收稿日期: 2023-12-08. 网络首发日期: 2024-02-23.

联系人简介: 周 睿, 男, 博士, 讲师, 主要从事高分子复合材料方面的研究. E-mail: r.zhou@qust.edu.cn.

基金项目: 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目资助.

Supported by the Instrument and Equipment Function Development Technology Innovation Project of Chinese Academy of Sciences.

different anionic coordinations (Sil-IL-AMC18-Cl and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N) were prepared by ion-exchange, which were characterized by means of infrared spectroscopy and elemental analysis. Both stationary phases showed C=C stretching vibration peaks and C=N bending vibration peaks on the imidazole ring at 1460 and 661 cm<sup>-1</sup>, and asymmetric and symmetric stretching vibration peaks of —CH at 2927 and 2856 cm<sup>-1</sup>, which proved the bonding of amino-imidazole ionic liquid. And the original 919 cm<sup>-1</sup> of primary amine N—H out-of-plane deformation vibration peak disappeared, indicating that octadecanoyl chloride is bonded with amino. The results of elemental analysis showed that Sil-IL-AMC18-Cl contained 3.07% of nitrogen, 16.73% of carbon and 3.07% of hydrogen, and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N contained 2.88% of nitrogen, 15.98% of carbon and 2.95% of hydrogen, which indicated that Sil-IL-AMC18-Cl and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N chromatographic stationary phases were prepared. The chromatographic separation modes and performance of Sil-IL-AMC18-Cl and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N stationary phases were investigated, and the results showed that: (1) the two stationary phases had higher column efficiency than commercial C18 columns in the reversed-phase chromatographic mode (RPLC); (2) since the stationary phase has a bipolar group, it has a stronger hydrophilic ability compared to the traditional hydrophilic modified C18 silica stationary phase, and thus hydrophilic chromatographic mode (HILIC) can be realized; (3) simultaneous separation of hydrophilic and hydrophobic substances in mixed reversed-phase/hydrophilic (RPLC/HILIC) chromatographic mode. It was found that Sil-IL-AMC18-Cl stationary phase had stronger hydrophilic properties compared to Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N stationary phase, so in the HILIC chromatographic mode Sil-IL-AMC18-Cl stationary phase was used for the separation of 8 base nucleosides, which could realize the baseline separation of this kind of strong hydrophilic substances, and the RSD of the injection repeatability was 0.03%—0.25% (*n*=9); in the RPLC chromatographic mode, Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N stationary phase was used for the separation of 6 anilines, which not only could realize the baseline separation, but also improved the peak trailing problem of anilines, and the RSD of the injection repeatability was 0.05%—0.10% (*n*=9).

**Keywords** Hydrophilic modified C18 silica gel filler; Mixed-mode liquid chromatography stationary phase; Base nucleoside; Aniline

高效液相色谱(HPLC)是目前最广泛使用的化合物定性和定量测定的分析技术之一<sup>[1]</sup>。色谱固定相作为色谱系统的核心,直接影响物质的分离效果,因此新型色谱固定相的开发一直是液相色谱技术的研究热点<sup>[2]</sup>。目前,反相液相色谱(RPLC)仍在HPLC应用中占主导地位,其中十八烷基修饰硅胶(C18)固定相因有较高的含碳量和较好的疏水性,约占RPLC应用的70%。然而,在解决复杂样品基质的分离问题时,C18固定相因其分离机理单一而显露出局限性。

亲水改性C18固定相可以有效改善传统C18固定相难于分离强极性或离子化物质、不能长时间耐受高含水流动相和碱性化合物拖尾的问题<sup>[3]</sup>,主要分为极性基团封端C18固定相<sup>[4-6]</sup>和极性基团嵌入C18固定相<sup>[7-20]</sup>。极性基团封端C18固定相是在键合C18基础上,采用含有极性基团的封端试剂对剩余的硅羟基进行封端,可保留在反相色谱条件下通常保留性弱的极性分析物。Li<sup>[6]</sup>使用浸渍气相沉积法制备了氨基封端的十八烷基硅烷/氨基丙基硅烷(ODS-APS)色谱固定相,并将其用于复方药物中的中性及离子型活性组分的同时分离。极性基团嵌入C18固定相是采用极性基团嵌入C18烷基长链与硅胶之间,在高比例含水流动相条件下,可以保持烷基链构象自由,并能与极性分析物相互作用,靠近表面的极性官能团的存在还可以屏蔽未反应的硅醇基团的影响<sup>[21]</sup>。常见的极性基团嵌入固定相有:(1)酰胺基嵌入固定相<sup>[7-9]</sup>,O'Gara等<sup>[7]</sup>将酰胺嵌入C8固定相,应用于极性以及碱性化合物的分离;(2)酯基嵌入固定相<sup>[10,11]</sup>,Dietrich等<sup>[10]</sup>用(3-乙氧基丙基)三甲氧基硅烷与长链羧酸反应,制备了酯基嵌入型色谱材料,实现了碱性药物阿米替林较短的保留时间和较好的峰对称性,Bocian等<sup>[11]</sup>制备了磷酸二酯嵌入型固定相,用于分离核苷和核酸碱基;(3)醚键嵌入固定相<sup>[12,13]</sup>,Rafferty等<sup>[13]</sup>制备了醚键嵌入型固定相,并从自由能的角度分析极性嵌入相对化合物保留;(4)氨基甲酸酯基团嵌入固定相<sup>[14,15]</sup>,O'Gara等<sup>[14]</sup>制备了含不同长度烷基链的氨基甲酸酯嵌入型固定相,发现极性氨基甲酸酯基团的存在可能会影响吸附在表面层中的流动相的组成;(5)脲键嵌入固定相<sup>[16]</sup>,Silva等<sup>[16]</sup>合成了尿素嵌入型的C18固定相;(6)杂芳环基嵌入型固定相<sup>[17,18]</sup>,Li等<sup>[17]</sup>通过引入1,3,5-三嗪环制备了一种新型极性包埋固定相,

色谱性能评价表明在酸性条件下,该固定相对于碱性化合物的保留率会下降,Qiu等<sup>[18]</sup>开发了新型咪唑嵌入C18固定相SiImC18,其对多环芳烃(PAH)和极性化合物等不同组分的溶质具有选择性;(7)多种极性基团嵌入型固定相<sup>[19,20]</sup>,Jing等<sup>[19]</sup>合成了带有亚氨基的十八烷酰胺色谱键合固定相,色谱评价表明该固定相对残留硅醇基具有一定的静电屏蔽作用,Liu等<sup>[20]</sup>制备了含有与醚键偶联的磺酰胺官能团的极性嵌入相,该固定相具有低硅醇活性、与100%水流动相的良好兼容性、较高的多环芳烃形状选择性以及对含硝基化合物的强亲和力.然而,由于嵌入极性基团的极性及亲水性不足,导致制备的嵌入式C18固定相仍然多用于RPLC模式的分离,无法进一步达到亲水色谱模式(HILIC),从而无法实现强亲水性物质的高效分离.

离子液体因其良好的热稳定性和化学稳定性,常被用于固定相的修饰<sup>[18,22-25]</sup>,这类固定相上的分离通常综合了多种分离机理,包括 $\pi$ - $\pi$ 作用和偶极-偶极作用等,因此离子液体是一类强极性基团,其改性固定相呈现强亲水性.Qiu等<sup>[22]</sup>将离子液体用于改性HPLC固定相,具有离子交换作用,可分离常见的无机阴离子和有机阴离子.Guo等<sup>[23]</sup>采用1-(3-氨基丙基)咪唑修饰固定相,制备了3种具有不同配位阴离子的HILIC分离材料,对多种糖类化合物、核苷和碱基等样品有良好的分离效果.为了解决目前极性基团嵌入C18固定相的极性和亲水性有限的问题,本文制备了新型酰胺和咪唑基离子液体双极性基团共嵌入式亲水改性C18硅胶固定相,该固定相同时具有疏水作用、 $\pi$ - $\pi$ 作用、偶极-偶极作用、静电作用、氢键作用和空间位阻效应.双极性基团共嵌入模式使制备的亲水改性C18固定相的亲水性能显著提高,不仅可用于RPLC分离模式,还可用于HILIC分离模式.分别在RPLC、HILIC和RPLC/HILIC混合分离模式下,考察了色谱柱的分离机理,并将其应用于强亲水性8种碱基核苷类物质和6种苯胺类物质的分离.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

球形多孔二氧化硅(5  $\mu$ m, 10 nm, 400 m<sup>2</sup>/g),日本Daisogel公司;3-氯丙基三甲氧基硅烷和1-(3-氨基丙基)咪唑,纯度>98.0%,上海迈瑞尔化学技术有限公司;硬脂酰氯,纯度>97.0%,北京伊诺凯科技有限公司;三甲基氯硅烷,纯度>98.0%;鸟嘌呤核苷、二苯胺和2,4,6-三溴苯胺,纯度>99.0%,上海麦克林生化有限公司;胸腺嘧啶、尿嘧啶、2'-脱氧尿嘧啶核苷、尿嘧啶核苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤和2,6-二甲基苯胺,纯度>99.0%;腺嘌呤核苷和邻硝基苯胺,纯度>99.5%,上海阿拉丁试剂有限公司;对氯苯胺,纯度>98.0%,成都艾科达化学试剂有限公司;盐酸、二氯甲烷、甲苯、无水甲醇、甲醇、异丙醇、四氢呋喃、三乙胺和苯胺,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;所用甲苯、二氯甲烷、甲醇、异丙醇、四氢呋喃和三乙胺均经过4A分子筛处理.实验用水为Milli-Q超纯水(电阻率18.2 M $\Omega$ ·cm).

Nexera LC-40型高效液相色谱仪(HPLC)配置SPD-M40二极管阵列检测器,日本岛津公司;ZORB-AX Eclipse XDB-C18色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),美国安捷伦科技有限公司;Vario ELIII型元素分析仪(EA),德国Elementar公司;RPL-ZD10型装柱机,大连日普利科技有限公司;Nicolet 6700型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国Thermo公司.

### 1.2 实验过程

**1.2.1 固定相的合成** 酰胺和咪唑基离子液体双极性基团共嵌入式亲水改性C18硅胶固定相的合成过程如图1所示.

取40.0 g硅胶,加入20%盐酸(200 mL),室温下搅拌10 h.将硅胶用蒸馏水洗至中性,真空干燥,备用.首先,取10 g干燥酸化硅胶分散于50.0 mL干燥甲苯中,在干燥氮气气氛下加入0.2 mL三乙胺和10.0 mL 3-氯丙基三甲氧基硅烷,加热回流24 h.将硅胶分别用甲苯和甲醇洗涤,于80  $^{\circ}$ C真空干燥得到氯丙基键合硅胶(Sil-MPCl).而后,取10.0 g制得的Sil-MPCl分散于50 mL干燥甲苯中,在干燥氮气气氛下加入5.30 mL 1-(3-氨基丙基)咪唑,加热回流48 h.将硅胶分别用甲苯和甲醇洗涤,于80  $^{\circ}$ C真空

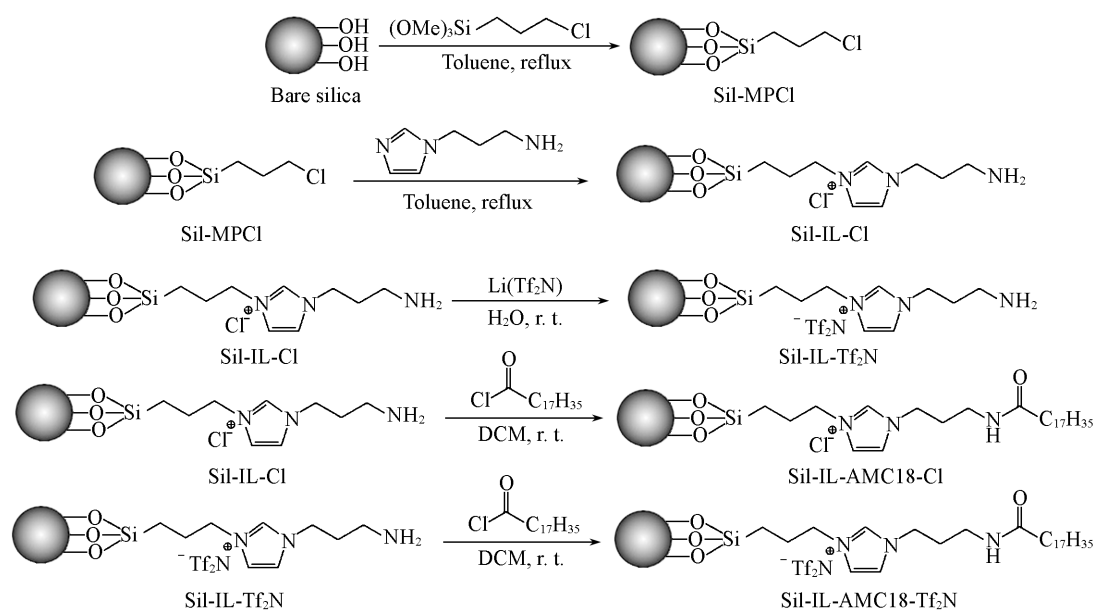


Fig. 1 Preparation process of stationary phase

干燥得到离子液体接枝的硅胶(Sil-IL-Cl)。再取4.00 g制得的Sil-IL-Cl和5.00 g双三氟甲烷磺酰亚胺锂[Li(Tf<sub>2</sub>N)]分散于50 mL超纯水中,Cl<sup>-</sup>与Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>进行离子交换,在干燥氮气气氛下室温反应24 h后,分别用超纯水和甲醇洗涤,于80 °C真空干燥得到离子液体接枝的硅胶(Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N)。分别取4.00 g Sil-IL-Cl硅胶和Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N硅胶分散于20 mL干燥二氯甲烷中,加入0.7 mL三乙胺,在冰浴下剧烈搅拌,滴加1.66 mL硬脂酰氯,50 min内滴毕;升至室温并搅拌反应12 h后,分别用二氯甲烷和甲醇洗涤,于80 °C真空干燥得到离子液体和酰胺基团共嵌入的十八烷基硅胶(Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N)。最后,分别将3.50 g Sil-IL-AMC18-Cl硅胶和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N硅胶分散于12 mL干燥甲苯中,加入0.2 mL三乙胺,滴加0.8 mL三甲基氯硅烷和4 mL干燥甲苯混合溶液,室温下反应6 h后分别用甲苯和甲醇洗涤,于80 °C真空干燥得到三甲基硅氧基封端的离子液体和酰胺基团共嵌入的十八烷基硅胶(Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N)。

1.2.2 色谱条件 将制备的Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N固定相分别以四氢呋喃/异丙醇混合液为匀浆液,甲醇为顶替液,在40 MPa下装填入150 mm×4.6 mm不锈钢色谱柱中。

RPLC分离模式:流动相为甲醇和水,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,检测波长254 nm,进样量10 μL。

HILIC分离模式:流动相为乙腈和20 mmol/L甲酸铵水溶液,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,检测波长254 nm,进样量10 μL。

RPLC/HILIC分离模式:流动相为乙腈和20 mmol/L甲酸铵水溶液,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,检测波长254 nm,进样量10 μL。

苯胺类化合物分离条件:流动相为甲醇和水,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,检测波长254 nm,进样量10 μL。

碱基核苷类化合物分离条件:流动相为乙腈和20 mmol/L甲酸铵水溶液,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,检测波长254 nm,进样量10 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定相的表征

2.1.1 红外光谱表征 采用傅里叶变换红外光谱仪分别对裸硅胶、Sil-MPCl、Sil-IL-Cl、Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N、Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N进行了表征。图2所示红外谱线上1042 cm<sup>-1</sup>处的吸收峰为硅胶上

Si—O 键的弯曲振动峰, 3417 和 1632  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰分别为硅胶表面残留的硅羟基 O—H 键的伸缩振动和弯曲振动峰. 与裸硅胶相比, Sil-IL-Cl 和 Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N 的红外光谱均在 1460、661 和 919  $\text{cm}^{-1}$  处出现吸收峰, 分别归属为咪唑环上 C=C 伸缩振动峰、C=N 弯曲振动峰和伯胺 N—H 面外变形振动峰, 说明 1-(3-氨基)咪唑已与 Sil-MPCl 反应. Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 的红外光谱在 2927 和 2856  $\text{cm}^{-1}$  处出现了一 CH 的不对称和对称伸缩振动峰, 而在 919  $\text{cm}^{-1}$  处的伯胺 N—H 面外变形振动峰消失, 表明硬脂酰氯已通过亲核加成反应键合到 Sil-IL-Cl 和 Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N 上.

2.1.2 元素分析 采用元素分析仪对裸硅胶、Sil-MPCl、Sil-IL-Cl、Sil-IL-AMC18-Cl、Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 进行表征, 结果列于表 1 (数值为合成产物平行 3 次测试结果的平均值). 与裸硅胶相比, Sil-MPCl 中 C 和 H 元素的含量分别增加至 5.88% 和 1.26%, 证实氯丙基已键合到硅胶表面. 与 Sil-MPCl 相比, Sil-IL-Cl 中 C 和 N 元素的含量分别增加至 10.20% 和 3.48%, 证实 1-(3-氨基)咪唑已键合到硅胶上. 与 Sil-IL-Cl 相比, Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N 中 S 元素含量增加至 2.08%, 说明 Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N 发生了离子交换. 此外, 相比于 Sil-IL-Cl 和 Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N, Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 中 C 元素含量分别增加至 16.73% 和 15.98%, 证实十八烷基已键合到硅胶上.

Table 1 Elemental analysis results of bare silica, Sil-MPCl, Sil-IL-Cl, Sil-IL-AMC18-Cl, Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N

Analyte	Average elemental content (%)				Bonding density / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ )
	N	C	H	S	
Bare silica	0	0.31	1.22	—*	
Sil-MPCl	0.02	5.88	1.26	—	
Sil-IL-Cl	3.48	10.20	2.08	0.17	
Sil-IL-AMC18-Cl	3.07	16.73	3.07	—	1.27
Sil-IL-Tf <sub>2</sub> N	3.44	9.79	1.78	2.08	
Sil-IL-AMC18-Tf <sub>2</sub> N	2.88	15.98	2.95	—	1.21

\* Not tested.

上述红外光谱和元素分析结果表明, Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 硅胶色谱固定相已制备成功.

## 2.2 色谱柱保留机理

2.2.1 反相色谱模式 由于固定相含有非极性的 C18 基团, 在反相色谱模式 (RPLC) 下 (即流动相为甲醇和水), 利用尿嘧啶、苯酚、4-硝基氯苯和萘 4 种不同极性 (从强极性到非极性) 的探针分子对色谱柱的分离性能进行了评价. 图 3 中 (A<sub>1</sub>)~(A<sub>3</sub>) 和 (B<sub>1</sub>)~(B<sub>3</sub>) 分别为 Sil-IL-AMC18-Cl 柱和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱在不同流动性比例下得到的分离谱图, 甲醇与水的体积比分别为 80:20 [(A<sub>1</sub>) 和 (B<sub>1</sub>)]、75:25 [(A<sub>2</sub>) 和 (B<sub>2</sub>)] 和 70:30 [(A<sub>3</sub>) 和 (B<sub>3</sub>)]. 结果表明, 2 种固定相在反相色谱条件下可以实现对 4 种探针分子的分离, 而且随着流动相中甲醇比例的降低, 2 种疏水性物质 4-硝基氯苯和萘保留增强, 说明在上述条件下溶质在固定相上的保留遵循反相色谱模式.

在流动相为甲醇/水 (体积比 80:20) 条件下考察了 4 种探针分子在 Sil-IL-AMC18-Cl 柱、Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱和商品化 C18 柱上的理论塔板数和对称因子, 结果列于表 2. 可见, 在 RPLC 分离模式下, Sil-IL-AMC18-Cl 柱和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱的理论塔板数比商品化 C18 柱高, 说明该条件下 Sil-IL-AMC18-Cl 柱和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱均具有较高的柱效.

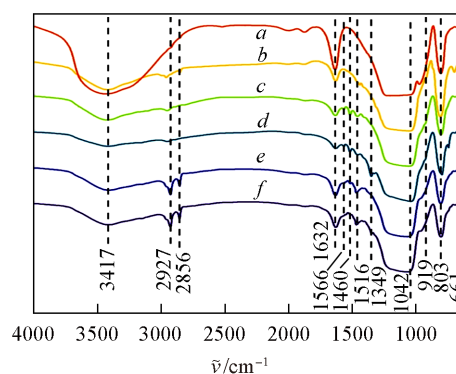
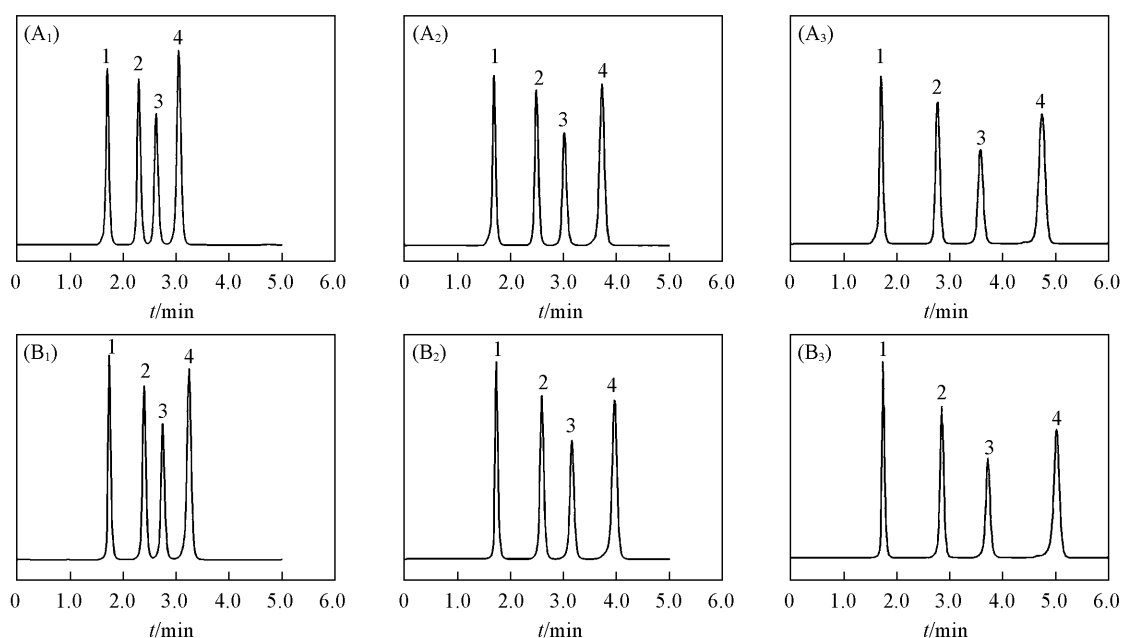


Fig. 2 FTIR spectra of bare silica(a), Sil-MPCl(b), Sil-IL-Cl(c), Sil-IL-Tf<sub>2</sub>N(d), Sil-IL-AMC18-Cl(e) and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N(f)



**Fig. 3** Reversed-phase mode chromatographic performance evaluation chromatograms on **Sil-IL-AMC18-Cl(A)** and **Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N(B)**

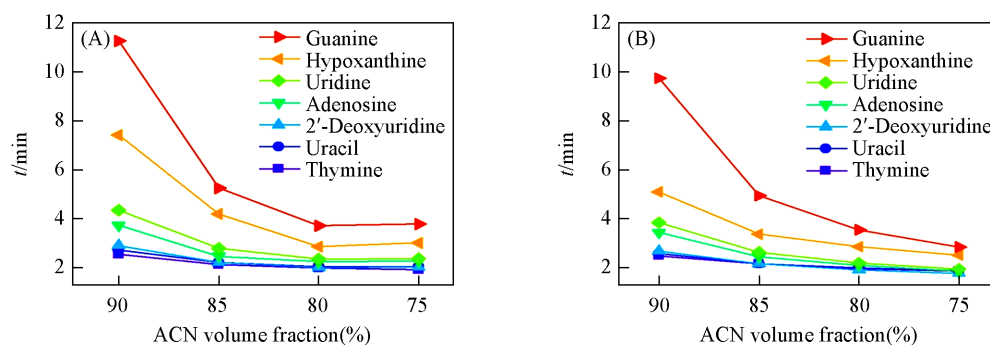
Peak 1. uracil; peak 2. phenol; peak 3. 4-chloronitrobenzene; peak 4. naphthalene.

$V(\text{CH}_3\text{OH}):V(\text{H}_2\text{O})=80:20(\text{A}_1, \text{B}_1)$ ;  $75:25(\text{A}_2, \text{B}_2)$ ;  $70:30(\text{A}_3, \text{B}_3)$ .

**Table 2** Column efficiency data of 3 columns under reversed-phase conditions

Compound	Tailing factor			Theoretical plate number/ <i>m</i>		
	Sil-IL-AMC18-Cl column	Sil-IL-AMC18-Tf <sub>2</sub> N column	XDB-C18 column	Sil-IL-AMC18-Cl column	Sil-IL-AMC18-Tf <sub>2</sub> N column	XDB-C18 column
Uracil	1.004	1.202	1.400	19053	22660	4160
Phenol	1.123	1.052	1.130	26007	29113	10807
4-Chloro-1-nitrobenzene	1.098	1.020	1.349	29333	33880	18460
Naphthalene	0.993	0.917	1.399	33067	37547	25260

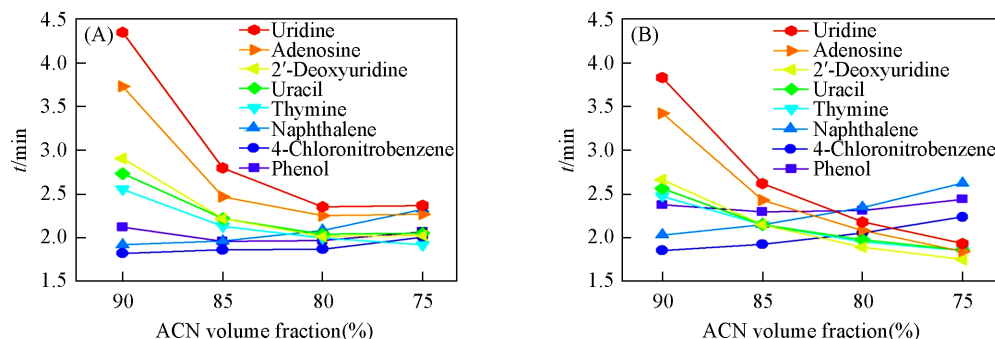
2.2.2 亲水色谱模式 以碱基核苷类强极性化合物为待测物质, 考察了 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相在亲水模式(HILIC)下的分离性能. 在 HILIC 分离模式下, 色谱固定相对待分离物质的保留行为及选择性不仅与固定相种类有关, 还与流动相组成密切相关. 因此, 通过改变流动相中乙腈的比例, 考察了色谱柱在 HILIC 模式下流动相中有机相的比例对 7 种碱基核苷类物质保留行为的影响. 从图 4 可以看出, 随着流动相中乙腈比例的递减, 待分离物质在 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相上的保留都逐渐减弱, 证实合成的固定相具有典型的 HILIC 色谱分离性能, 可通过



**Fig. 4** Effect of acetonitrile volume fraction in mobile phases on retention of 7 base nucleosides in HILIC chromatographic mode on **Sil-IL-AMC18-Cl(A)** and **Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N(B)**

调节有机相的比例来改变不同待分离物质的保留行为,从而提高各分离物质间的分离度.

**2.2.3 RPLC/HILIC 色谱模式** 由于 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相在不同的流动相体系中表现出不同的分离模式,因此以乙腈和 20 mmol/L 甲酸铵水溶液作为流动相,通过改变流动相中乙腈的体积分数进行 8 种不同极性探针分子的分.如图 5 所示,随着流动相中乙腈含量的降低,亲水性物质(5 种碱基核苷类化合物)在 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱上的保留明显降低,表现出典型的 HILIC 色谱模式保留特征;与之相反,当流动相中乙腈含量降低,疏水性物质(4-硝基氯苯、萘和苯酚)的保留增强,表现出典型的 RPLC 色谱模式保留特征.因此,在 Sil-IL-AMC18-Cl 柱和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱上单次运行即可实现 RPLC/HILIC 的混合分离模式.



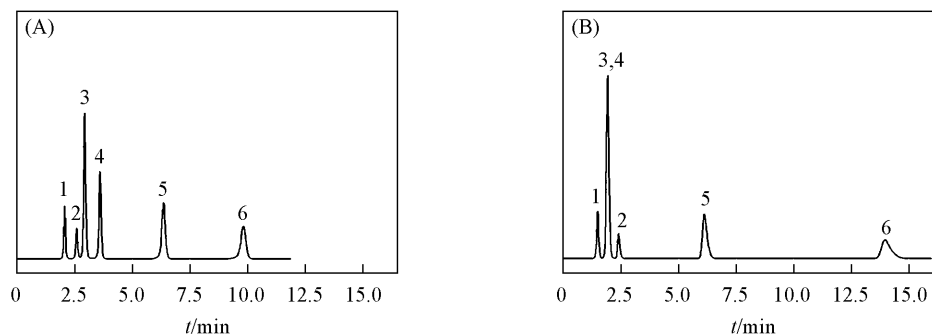
**Fig. 5** Effect of acetonitrile content in mobile phases on retention of 8 compounds with different polarities in mixed chromatographic mode on Sil-IL-AMC18-Cl(A) and Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N(B)

对比两种固定相的变化趋势可以看出,疏水性物质在 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 上的保留作用更强,强亲水碱基核苷类物质在 Sil-IL-AMC18-Cl 固定相上的保留作用更强,因此 Sil-IL-AMC18-Cl 固定相比 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相有更强的亲水性能,其原因可解释为双三氟甲烷磺酰亚胺阴离子比氯离子空间体积更大、电负性较弱,致使强亲水碱基核苷类物质在 Sil-IL-AMC18-Cl 固定相上的保留作用更强,因此咪唑基离子液体基团的配位阴离子部分能够对固定相的整体分离性产生影响.

通过考察 Sil-IL-AMC18-Cl 和 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 两种固定相色谱的分离机理,发现 Sil-IL-AMC18-Cl 柱具有更强的亲水性能,因此后续采用 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱进行苯胺类化合物的分离应用研究,采用 Sil-IL-AMC18-Cl 柱进行碱基核苷类化合物的分离应用研究.

## 2.3 应用研究

**2.3.1 苯胺类化合物的分离** 苯胺类化合物是合成药物、染料、杀虫剂、高分子材料和炸药等的重要原料之一<sup>[26]</sup>.苯胺及其衍生物具有生物毒性,还具有致癌和致突变的作用<sup>[27]</sup>.分别采用疏水性能更强的 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱和商品化 C18 柱对 6 种苯胺类化合物(苯胺、2,6-二甲基苯胺、对氯苯胺、邻硝基苯胺、二苯胺和 2,4,6-三溴苯胺)进行分离,流动相为甲醇/水(70:30),色谱图见图 6.



**Fig. 6** Chromatographic separation of 6 anilines on Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N column(A) and XDB-C18 column(B)

Peak 1: aniline; peak 2: 2,6-dimethylaniline; peak 3: 4-chloroaniline; peak 4: 2-nitroaniline; peak 5: diphenylamine; peak 6: 2,4,6-tribromoaniline.

在 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱中, 苯胺、2,6-二甲基苯胺、二苯胺和 2,4,6-三溴苯胺的出峰顺序与商品化 C18 柱中出峰顺序一致, 说明这 4 种物质以反相分离模式为主. 在商品化 C18 柱上, 对氯苯胺和邻硝基苯胺两种物质的色谱峰完全重叠, 无法实现分离; 在 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱上这两种物质可实现基线分离, 其主要原因是苯胺类化合物与固定相咪唑环之间存在的  $\pi$ - $\pi$  共轭作用力. 由于邻硝基苯胺中 =NO<sub>2</sub> 具有强吸电子效应, 降低了苯环体系的电子云密度, 使邻硝基苯胺成为强电子接受体,  $\pi$ - $\pi$  共轭作用力增强, 对氯苯胺中 -Cl 的电负性比较大, 具有吸电子诱导效应, 氯原子的 *p* 轨道与苯环碳上的 *p* 轨道平行重叠, 氯原子的孤电子对离域到苯环上, 因此  $\pi$ - $\pi$  共轭作用力相对较弱. 由于两种化合物与 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 固定相间的  $\pi$ - $\pi$  共轭作用力不同, 使这两种物质实现了良好的分离.

表 3 列出了 6 种苯胺类物质在 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱和商品化 C18 柱上分离时的对称因子. 与商品化 C18 柱相比, 6 种碱性苯胺类物质在 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 柱上的色谱峰形对称性更好, 因此该固定相在分离碱性化合物时不易出现拖尾问题, 其原因可能为: 咪唑环分子较大, 具有空间位阻效应, 可以屏蔽硅胶表面残余的硅羟基, 从而使其无法与碱性化合物产生氢键作用, 酰胺基团的存在也进一步增强了固定相的亲水性和对残余硅醇基的静电屏蔽作用.

Table 3 Tailing factors for the separation of 6 anilines on Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N column and XDB-C18 column

Compound	Tailing factor	
	Sil-IL-AMC18-Tf <sub>2</sub> N Column	XDB-C18 Column
Aniline	0.978	1.054
2,6-Dimethylaniline	1.077	1.274
4-Chloroaniline	1.033	—*
2-Nitroaniline	0.968	—
Diphenylamine	0.885	1.386
2,4,6-Tribromoaniline	0.837	1.482

\* On the XDB-C18 column, 4-chloroaniline and 2-nitroaniline didn't have tailing factors because their peaks overlapped.

图 7 为 6 种苯胺类物质连续进样 9 次的色谱图, 用于考察 Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N 色谱柱在 RPLC 模式下的使用重复性. 结果表明, 6 种苯胺类物质保留时间的相对标准偏差 RSD=0.05%~0.10% (*n*=9), 证实其具有较好的分离重现性.

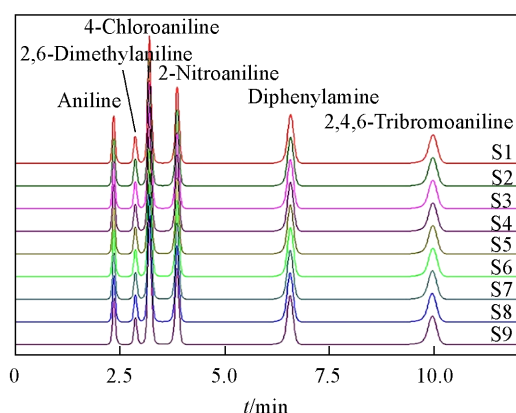


Fig. 7 Comparative chromatogram of 9 consecutive separations of 6 anilines on Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N column

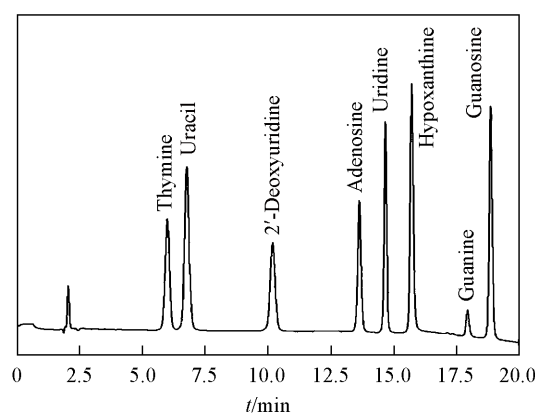


Fig. 8 Chromatographic separation of 8 base nucleosides on Sil-IL-AMC18-Cl column

2.3.2 碱基核苷类化合物的分离 碱基核苷类物质为生化领域的一类重要化合物, 具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性<sup>[28]</sup>, 由于是一类强亲水性物质, 因此在传统 C18 色谱柱上较难分离. Sil-IL-AMC18-Cl 柱由于具有酰胺和咪唑基离子液体双极性基团, 因此具有强极性和强亲水作用力, 可实现 8 种碱基核苷类化合物 (胸腺嘧啶、尿嘧啶、2'-脱氧尿嘧啶核苷、腺嘌呤核苷、尿嘧啶核苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤和鸟嘌呤核苷) 的基线分离, 所得色谱图如图 8 所示. 碱基核苷类化合物的最优分离条件

如下: 流动相A为乙腈, 流动相B为20 mmol/L甲酸铵水溶液; 流速1.0 mL/min; 柱温25 °C; 梯度洗脱条件为0~1 min, 98%A, 1~6 min, 98%~97%A, 6~10 min, 97%~95%A, 10~20 min, 95%~75%A. Sil-IL-AMC18-Cl柱对碱基核苷类化合物具有良好的分离能力, 在20 min内即可完成8种碱基核苷类化合物的分离。

在上述色谱条件下, 对8种碱基核苷类化合物连续进样9次以考察Sil-IL-AMC18-Cl色谱柱在HILIC模式下的使用重复性, 所得色谱图见图9. 结果表明, 8种碱基核苷类物质保留时间的相对标准偏差RSD=0.03%~0.25% (n=9), 证实其具有较好的分离重现性。

### 3 结 论

采用分步键合反应制备了具有不同阴离子的咪唑离子液体和酰胺基团共同修饰C18的混合模式硅胶色谱固定相(Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N), 并采用元素分析和红外光谱对固定相的合成过程进行了表征. 由于酰胺和咪唑基离子液体双极性基团的同时嵌入, 该固定相比单亲水官能团改性C18固定相具有更强的极性和更高的亲水性, 因此可以在RPLC模式、HILIC模式以及RPLC/HILIC混合模式下使用. 对两种固定相的色谱分离性能进行了考察, 发现Sil-IL-AMC18-Cl比Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N有更强的亲水性能, 说明咪唑环配位阴离子对固定相的性能有影响. 将Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N柱在RPLC色谱模式下应用于6种苯胺类化合物的分离, 与商品化C18柱相比, Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N柱可实现6种苯胺的完全分离, 而且色谱峰的拖尾问题得到改善; 将Sil-IL-AMC18-Cl柱在HILIC色谱模式下应用于8种碱基核苷类强亲水物质的分离, 可实现完全分离; 色谱固定相的使用重复性考察结果表明, Sil-IL-AMC18-Cl和Sil-IL-AMC18-Tf<sub>2</sub>N固定相均具有理想的使用重复性, 因此该固定相在解决不同极性物质复杂样品分离难题方面具有一定的应用前景。

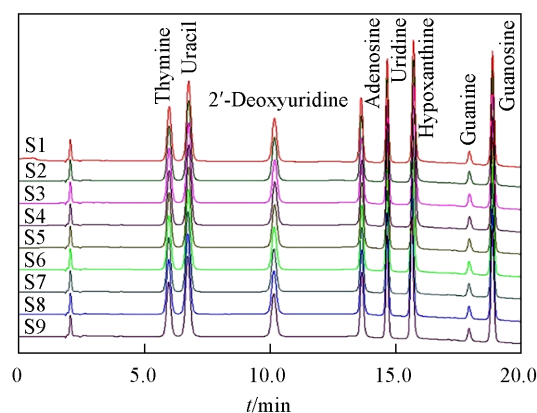


Fig. 9 Comparative chromatogram of 9 consecutive separations of 8 base nucleosides on Sil-IL-AMC18-Cl column

### 参 考 文 献

- [1] Sobańska A. W., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2021**, 51(7), 631—655
- [2] Unger K. K., Skudas R., Schulte M. M., *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184, 393—415
- [3] Layne J., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 957(2), 149—164
- [4] Coym J. W., *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(10), 1712—1718
- [5] Xiang Z. O., Sun X. L., Liu P., Li X. Y., Jiang R., *Chromatographia*, **2010**, 72, 23—32
- [6] Li Y., *Amino-endcapped Octadecylsilane Bonded Silica Mixed-mode Stationary Phase for the Simultaneous Separation of Neutral and Ionizable Drugs*, Tianjin University, TianJin, **2021** (李妍. 氨基封端十八烷基硅胶混合模式色谱固定相及其在多组分药物同时分析中的应用, 天津: 天津大学, 2021)
- [7] O'Gara J. E., Alden B. A., Walter T. H., Petersen J. S., Niederlaender C. L., Neue U. D., *Anal. Chem.*, **1995**, 67(20), 3809—3813
- [8] Kirkland J. J., Henderson J. W., Martosella J. D., Bidlingmeyer B. A., Vasta-Russell J., Adams J. B., *LGC North Am.*, **1999**, 17(7), 634—639
- [9] Ali A., Alharthi S., Shad S., Al-Shaalan N. H., Iqbal M., *J. Chromatogr. A*, **2022**, 1684, 463534
- [10] Dietrich B., Holtin K., Bayer M., Friebolin V., Kuhnle M., Albert K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(7), 2627—2633
- [11] Bocian S., Paca M., Buszewski B., *Analyst*, **2013**, 138(18), 5221—5229
- [12] Yu X., Zhao R., Liu G. Q., *Chem. J. Chinese Universities*, **2000**, 21(7), 1043—1044 (喻昕, 赵睿, 刘国诠. 高等学校化学学报, **2000**, 21(7), 1043—1044)
- [13] Rafferty J. L., Siepmann J. I., Schure M. R., *Anal. Chem.*, **2008**, 80(16), 6214—6221
- [14] O'Gara J. E., Walsh D. P., Alden B. A., Casellini P., Walter T. H., *Anal. Chem.*, **1999**, 71(15), 2992—2997
- [15] Omamogho J. O., Stack E. M., Santalad A., Srijaranai S., Glennon J. D., Yamen H., Albert K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397(6), 2513—2524

- [16] Silva C. R., Jardim I. C. S. F., Airoidi C., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 127—138
- [17] Li Y. Y., Dai P. C., Ke Y. X., Jin Y., Liang X. M., *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(19), 2998—3004
- [18] Qiu H., Mallik A. K., Takafuji M., Liu X., Jiang S., Ihara H., *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 738, 95—101
- [19] Jing Y. Q., Long Y. D., Huang T. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2002**, 23(2), 210—212(景玉清, 龙远德, 黄天宝. 高等学校化学学报, **2002**, 23(2), 210—212)
- [20] Liu X., Bordunov A., Tracy M., Slingsby R., Avdalovic N., Pohl C., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1119, 120—127
- [21] Majors R. E., Przybyciel M., *LC. GC. Eur.*, **2003**, 16(2), 584—590
- [22] Qiu H. D., Jiang S. X., Liu X., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103, 265—270
- [23] Guo D. D., Yang C. X., Qiu R. C., Huang S. H., *J. Chromatogr. A*, **2020**, 1625, 461331
- [24] Lei G. H., Xiong X. H., Huo Y. M., Wei Y. M., Zheng X. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2008**, 29(2), 268—272(雷根虎, 熊晓虎, 霍艳敏, 卫引茂, 郑晓晖. 高等学校化学学报, **2008**, 29(2), 268—272)
- [25] Ji S. Q., Jin Z., Guan W. N., Pan X. Y., Guan T., *Chem. J. Chinese Universities*, **2022**, 43(6), 20220008(季双琦, 靳钊, 观文娜, 潘翔宇, 关彤. 高等学校化学学报, **2022**, 43(6), 20220008)
- [26] Dom N., Knapen D., Benoot D., Nobels I., Blust R., *Chemosphere*, **2010**, 81(2), 177—186
- [27] Wang C., Wang W. L., Liu X., Wu Q. Y., Hu H. Y., *Acta Sci. Circumstantiae*, **2019**, 39(10), 3434—3441(王纯, 王文龙, 刘鑫, 吴乾元, 胡洪营. 环境科学学报, **2019**, 39(10), 3434—3441)
- [28] Ding X. J., Xiong L., Zhou Q. M., Ye Q., Guo L., Liu L., *J. Chengdu Univ. Tradit. Chin. Med.*, **2018**, 41(2), 102—108(丁兴杰, 熊亮, 周勤梅, 叶强, 郭力, 刘菲. 成都中医药大学学报, **2018**, 41(2), 102—108)

(Ed.: N, K)