

doi: 10.12452/j.fxcsxb.26021301

双齿键合叔胺/磺酸甜菜碱共修饰亲水硅胶色谱 固定相的制备与应用

孔令毅^{1,2}, 观文娜², 杨海燕², 燕晓飞², 殷亚楠^{1,2}, 刘婷婷², 靳钊^{1*}

(1. 青岛科技大学 高分子科学与工程学院, 山东 青岛 266045; 2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101)

摘要: 该文利用N, N'-二甲基-1, 3-丙二胺与KH560的亲核开环反应, 制备了具有双3-(三甲氧基甲基)的双叔胺硅烷化试剂, 并将其修饰到硅胶表面; 随后将键合有硅烷化试剂的硅球进一步与1, 3-丙磺酸内酯反应得到双齿键合硅胶色谱固定相(Sil-SAI)。红外光谱与元素分析表征结果显示, Sil-SAI硅胶固定相表面修饰有叔胺和磺酸甜菜碱两性离子双官能团。考察了Sil-SAI色谱柱的分离机制、流动相中缓冲盐和pH值对色谱保留性能的影响以及固定相的水解稳定性, 结果表明: Sil-SAI具有典型的亲水相互作用液相色谱(HILIC)分离机理, 由于探针分子与Sil-SAI固定相之间具有亲水作用、偶极-偶极作用、氢键作用和静电作用等多重相互作用, 因此Sil-SAI固定相表现为分配机制和吸附机制的混合分离机理; 随着流动相中缓冲盐浓度和pH值的变化, 探针分子中的中性、酸性和碱性物质表现出不同的色谱保留性能; 由于具有双齿结构, Sil-SAI固定相具有更好的水解稳定性。将Sil-SAI固定相用于分离6种糖类和7种糖醇类化合物, 均表现出较好的分离性能和分离重现性。

关键词: 双齿键合; 磺酸甜菜碱功能基团; HILIC色谱柱; 糖类化合物; 糖醇类化合物

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-0940-11

Preparation and Application of a Hydrophilic Silica Chromatographic Stationary Phase Co-modified with Bidentate-bonded Tertiary Amine and Sulfobetaine

KONG Ling-yi^{1,2}, GUAN Wen-na², YANG Hai-yan², YAN Xiao-fei², YIN Ya-nan^{1,2},
LIU Ting-ting², JIN Zhao^{1*}

(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 study, a tertiary amine silane coupling agent bearing bis[3-(trimethoxysilyl)propyl] groups was first synthesized via the nucleophilic ring-opening reaction of N, N'-dimethyl-1, 3-propanediamine with KH560 (γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane), which was then grafted onto the surface of silica gel. Subsequently, the silane coupling agent-bonded silica microspheres were further reacted with 1, 3-propanesultone to afford a bidentate-bonded silica chromatographic stationary phase (denoted as Sil-SAI). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and elemental analysis (EA) confirmed that the Sil-SAI stationary phase was successfully modified with sulfobetaine zwitterionic and tertiary amine bifunctional groups. Furthermore, the separation mechanism of the Sil-SAI column, the effects of buffer salt concentration and pH value of the mobile phase on chromatographic retention behavior, as well as the hydrolytic stability of the stationary phase were systematically investigated. The results indicated that: Sil-SAI exhibits a typical hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation mechanism. Owing to the multiple interactions (including hydrophilic interaction, electrostatic interaction, hydrogen bonding, and dipole-dipole interactions) between probe molecules and the Sil-SAI stationary phase, this stationary phase presents a mixed separation

收稿日期: 2026-02-13; 修回日期: 2026-03-17

基金项目: 青岛新能源山东省实验室“分析技术开发”计划(QIBEBT ATD 202403)

* 通讯作者: 靳钊, 博士, 副教授, 研究方向: 微球分离材料, E-mail: jinzhao@qust.edu.cn

网络首发日期: 2026-03-27

mechanism involving both partition and adsorption processes; With variations in the concentration and pH of the buffer salt in the mobile phase, the neutral, acidic, and basic probe molecules display distinct chromatographic retention behaviors; Benefiting from its bidentate bonding structure, the Sil-SAI stationary phase possesses superior hydrolytic stability. The application of Sil-SAI stationary phase for the separation of six sugars and seven sugar alcohols demonstrated excellent separation efficiency and satisfactory separation reproducibility for all analytes.

Key words: bidentate-bonded; sulfobetaine functional group; HILIC chromatographic column; sugar compounds; sugar alcohols

随着现代化学、生物、医药等领域的迅猛发展, 极性小分子化合物的分离需求变得迫切^[1]。由于此类化合物极性较强, 依靠疏水作用的传统反相色谱无法达到令人满意的分离效果, 而正相色谱流动相的低极性使得此类化合物溶解性不佳, 不能进行有效分离^[2]。1990年, Alpert提出了“亲水相互作用液相色谱(HILIC)”^[3], 其兼顾正相和反相色谱的优点, 以硅胶或一定交联度的聚合物为基质, 表面键合极性基团, 使用乙腈和水作为流动相, 可对强极性化合物进行有效分离^[4]。近些年, 因HILIC在极性小分子、碳水化合物、聚糖和多肽等物质分离上的显著优势, 其相应的色谱固定相材料也得到了极大发展^[5]。目前被广泛报道和使用的HILIC色谱固定相有二醇基^[6]、氨基、酰胺基、糖类、聚合物改性以及两性离子基团等修饰的硅球^[7-8]。其中, 两性离子基团因具有较强的亲水性和更多元化的分离作用力^[9], 已经成为固定相合成的研究热点。

两性离子固定相为阴离子基团和阳离子基团构成的内盐结构, 其带电基团呈现反向对称分布, 空间取向接近垂直^[10]。常用的两性离子基团有磺酸甜菜碱、磷酸胆碱、羧酸甜菜碱等^[4], 其中磺酸甜菜碱色谱柱作为商品化较广的两性离子固定相(如商品化ZIC-HILIC), 同时存在强酸性(磺酸)和碱性(季铵)基团^[11], 因此具有非常强的亲水能力和离子作用力, 这使得其在极性化合物和蛋白质的分离中具有明显优势^[12]。两性离子类色谱固定相一般基于两种基质材料, 一种为聚合物基质, 一种为硅胶基质。Rasheed等^[13]通过控制两性离子单体在聚苯乙烯-二乙烯基苯微球(PS-DVB)表面的键合量, 详细研究了磺酸甜菜碱功能基团数量对色谱固定相分离性能的影响。结果表明, 随着流动相条件的改变, 磺酸甜菜碱固定相可以表现出离子交换、亲水作用以及疏水作用3种不同的保留模式, 不同固定相的两性离子功能单体聚合量(即磺酸甜菜碱电荷量的变化)也显著影响对亲水化合物的分离结果, 即使聚合量差异很小, 色谱柱性能也能表现出明显差异。2021年Liu等^[14]利用丙烯酰胺型磺酸甜菜碱单体与甲基丙烯酸缩水甘油酯-二乙烯基苯微球(GMA-DVB)表面的双键进行共聚, 制备得到一种新型磺酸甜菜碱基两性离子固定相(GDS), 并对其性能进行详细评价。实验结果表明, GDS的pH值使用范围达2.0~12.0, 且在高水相条件下基本没有柱流失, 对于糖类化合物和药用反离子均具有良好的分离能力。Yu等^[15]则利用可逆加成裂解转移(RAFT)聚合法制备了硅胶基质的两性离子磺酸甜菜碱功能化聚丙烯酰胺固定相(TENS), 并证明TENS具有良好的亲水性和化学稳定性。为了进一步研究TENS材料的适用性, 将其用于低聚果糖、三糖异构体和人参皂苷的分离与糖肽的富集, 结果表明这几类物质在TENS材料上均能得到良好的分离, 此外TENS材料对糖肽的富集也表现出良好的选择性。2024年Hu等^[16]利用点击化学将吡啶鎓-磺酸盐两性离子基团结合到二氧化硅表面, 得到硅胶基质的吡啶磺酸甜菜碱型两性离子固定相Sil-PyZIC。相比传统磺酸甜菜碱固定相, Sil-PyZIC在分离亲水化合物时拥有更多元的选择性。

硅胶微球具有良好的机械强度和传质效率, 因此键合有功能基团的硅球为目前最为常用的液相色谱固定相, 但硅胶基质固定相的主要局限在于: 酸性条件下键合的硅氧烷层易水解, 导致固定相流失; 碱性条件下硅胶基质本身易溶解^[17]。在HILIC模式下, 由于水层的存在使得硅基固定相比在反相模式(RPLC)下更容易发生硅氧键的水解和硅胶的溶解, HILIC色谱柱的使用寿命较短^[18-19], 因此对硅基的屏蔽保护也是目前色谱固定相研究的热点。硅胶基质的保护方法主要有聚合物键合、水平聚合、空间大基团保护、双齿键合和杂化无机-有机固定相的合成等^[20]。1998年, Kirkland等^[17]首次提出了双齿键合方式, 相较于常规单齿键合方式, 双齿键合方式是通过双3-(三甲氧基甲硅烷基)与硅胶表面发生反应, 将功能化基团键合到硅胶表面, 在增加键合牢固度的同时可以有效屏蔽硅羟基, 表现出优异pH值

适用性与水解稳定性。Wang等^[21]利用苯甲酸对果聚糖进行改性,然后将其与键合有3-(三乙氧基甲硅烷基)丙基异氰酸酯的硅胶进行反应,得到具有双齿结构的固定相Benzoic CF6 core-shell,用于分离极性药物、水杨酸类似物、 β -受体阻断药物以及核酸及其碱基,均取得良好的分离效果。Gasparrini等^[22]利用1,2-乙二胺与(3-异氰酸丙基)三乙氧基硅烷反应制备了一种具有双齿结构的脲键固定相USP-HILIC,再进一步对其进行改性处理制得含有游离氨基的双齿极性亲水固定相USP-HILI-C-NH₂。本课题组成功合成了一种双齿键合酰胺基团嵌入式亲水C₁₈固定相^[23],其在酸性条件和碱性条件下的水解稳定性测试结果表明,该固定相相比常规单齿键合C₁₈拥有更长的使用寿命,将其用于儿茶素类、维生素C及其衍生物和抗结核药物的分离,由于极性酰胺基团的引入,分离效果均优于传统C₁₈固定相。

本文通过合成双3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型硅烷化试剂并将其键合到硅球表面,通过进一步与1,3-丙磺酸内酯反应引入两性离子基团,构建具有双齿结构的磺酸甜菜碱基团和叔胺基团共修饰的硅胶色谱固定相。采用红外光谱、核磁共振波谱与元素分析技术,对合成的硅烷化试剂和固定相进行表征,对固定相的色谱性能、分离机制和水解稳定性进行了详细考察评价,并将固定相应用于6种糖类化合物和7种糖醇类化合物的分离,评价了其实际应用效果。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

球形多孔二氧化硅(平均粒径5 μm ,平均孔径100 \AA ,比表面积336 m^2/g ,比孔容0.82 mL/g),日本FUJI公司;浓盐酸、甲苯、甲醇、三乙胺、丙酮,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;1,3-丙磺酸内酯、N,N'-二甲基-1,3-丙二胺,分析纯,上海麦克林生化有限公司;KH560,上海源叶生物科技有限公司。所用甲苯、甲醇和丙酮均经4A级分子筛除水处理,实验用水为Milli-Q超纯水(18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

Vario EL III型元素分析仪,德国Elementar公司; Nicolet 6700 FTIR Spectrometer型傅里叶变换红外光谱分析仪,美国Thermo公司; 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; Vabquish Core UHPLC超快速液相色谱仪,配备VF-D20-A电雾式检测器,美国Thermo公司; P10SNXP1型超高压装柱系统,美国LabAlliance公司; AVANCE III 600型核磁共振谱仪(NMR),德国Bruker公司。

1.2 色谱固定相的制备

(1)硅烷化试剂的合成:在50 mL烧瓶中依次加入甲苯(25.0 mL)、KH560(6 mL),搅拌均匀后加入N,N'-二甲基-1,3-丙二胺(1.75 mL),75 $^{\circ}\text{C}$ 反应24 h,得到双3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型硅烷化试剂(SA)的混合溶液。

(2)双齿键合叔胺/磺酸甜菜碱共修饰硅胶色谱固定相的合成:取20.0 g硅胶,加入20.0%盐酸(100 mL),室温搅拌10 h后,用蒸馏水反复清洗直至上清液pH值为中性,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到活化硅胶(Bare silica);取活化硅胶(5.0 g),在干燥甲苯(25.0 mL)中充分搅拌分散,将上一步含有SA硅烷偶联剂的混合溶液全部加入,干燥氮气环境下105 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应24 h,然后用甲苯和甲醇洗涤,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥得到双齿键合硅胶(Sil-SA);取5.0 g制备的Sil-SA键合硅胶,加入30 mL丙酮搅拌至均匀,然后逐滴加入1,3-丙磺酸内酯(3.02 g)和丙酮(10 mL)的混合溶液,50 min内滴加完毕,55 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 h,用丙酮和甲醇进行洗涤,80 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥得到双齿键合叔胺/磺酸甜菜碱共修饰硅胶色谱固定相(Sil-SAI)。

1.3 色谱柱性能测试

将完全干燥的Sil-SAI固定相均匀分散在甲醇中,以甲醇为顶替液,于50 MPa条件下填充至250 mm \times 4.6 mm不锈钢色谱柱中。

分离性能评价:流动相为乙腈-0.1% H₃PO₄水溶液(90:10,体积比),流速为1.5 mL/min,柱温为45 $^{\circ}\text{C}$,示差检测器温度为40 $^{\circ}\text{C}$,进样量为20 μL 。

HILIC机制评价:采用不同比例的乙腈和50 mmol/L甲酸铵溶液为流动相,流速为1.0 mL/min,柱温为30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为254 nm,进样量5 μL 。

水解稳定性测试：新色谱柱首先用40倍柱体积的乙腈进行活化。选用尿嘧啶作为低pH值条件下水解稳定性测试的探针分子，测试条件：流动相为乙腈-1% TFA水溶液(75 : 25, 体积比, pH=1.45), 流速为1.0 mL/min, 柱温为40 °C, 检测波长为254 nm, 进样量为10 μ L; 选用胞嘧啶作为高pH值条件下水解稳定性测试的探针分子，测试条件：流动相为乙腈-50 mmol/L 三乙胺水溶液(75 : 25, 体积比, pH=10.75), 流速为1.0 mL/min, 柱温为40 °C, 检测波长为254 nm, 进样量为10 μ L。

1.4 应用研究的液相色谱条件

6种糖类化合物分离条件：流动相为乙腈-水(83.5 : 16.5, 体积比), 柱温为35 °C, 流速为1.0 mL/min, 进样量10 μ L, 检测器为电雾式检测器(CAD), 蒸发管温度为35 °C。

7种糖醇类物质分离条件：乙腈为流动相A, 水为流动相B, 梯度洗脱条件为：0~36 min, 90% A, 36~46 min, 90%~80% A, 46~66 min, 80% A, 66~71 min, 80%~90% A, 71~80 min, 90% A; 流速为1.0 mL/min, 进样量10 μ L, 柱温35 °C, 检测器为电雾式检测器(CAD), 蒸发管温度为35 °C。

2 结果与讨论

2.1 固定相的表征

按照图1所示路线合成双齿键合叔胺/磺酸甜菜碱共修饰硅胶色谱固定相(Sil-SAI)。

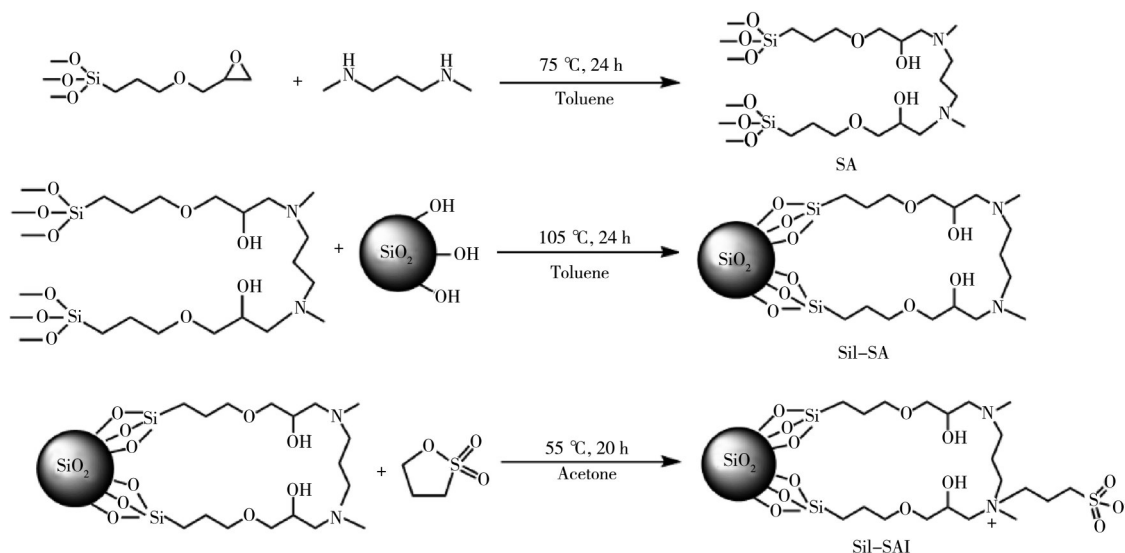


图1 Sil-SAI的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of Sil-SAI

2.1.1 双3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型硅烷化试剂的表征 采用核磁共振氢谱对合成的双3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型硅烷化试剂(SA)进行表征, 结果见图2。 δ 3.56、3.53对应SA中硅氧甲基上C的氢核, δ 3.62、3.38对应5和5'号位上亚甲基的氢核, δ 3.75对应6和6'号位与羟基相连亚甲基的氢核, δ 3.35对应4和4'号位亚甲基的氢核, δ 2.37对应8和8'号位亚甲基的氢核, δ 2.25为9和9'号位和叔胺相连末端甲基上的氢核, δ 2.43对应10和10'号位上亚甲基的氢核, δ 1.59对应11号位亚甲基氢核, δ 0.66对应2和2'号位亚甲基的氢核, δ 1.69对应3和3'号位亚甲基的氢核。氮原子的存在使得部分峰出现裂分, 并且产物具有强亲水性, 极易发生分子间交联固化使产物不纯净, 导致7号位羟基的特征峰受到影响无法清晰观测。以上数据证明合成的产物为双3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型硅烷化试剂。

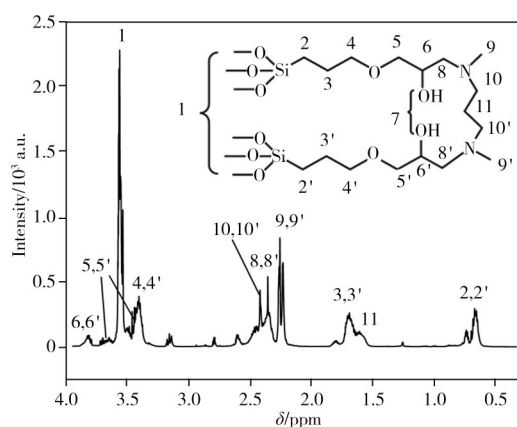


图2 SA的核磁共振谱图

Fig. 2 ^1H NMR spectrum of SA

2.1.2 固定相的红外表征 采用傅里叶红外光谱对裸硅球、Sil-SA和Sil-SAI进行表征。在图3中,

1 643、3 446 cm^{-1} 处的吸收峰为硅球表面残留硅羟基的弯曲振动和伸缩振动峰, 1 087 cm^{-1} 处为硅球上 Si—O 的弯曲振动峰。与裸硅球相比, Sil-SA 红外谱图的 1 485 cm^{-1} 处出现了 N—CH₃ 的弯曲振动峰, 在 2 952、2 882 cm^{-1} 处出现了一CH 的不对称和对称伸缩振动峰, 表明双 3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型结构已经键合在硅球表面; 与 Sil-SA 相比, Sil-SAI 在 731 cm^{-1} 处出现 S—O 的伸缩振动峰, 表明磺酸内酯已经和叔胺反应生成了磺酸甜菜碱。

2.1.3 固定相的表面形貌表征 为了观察硅胶固定相在键合前后的表面形貌变化, 采用 SEM 对 SiO₂、Sil-SAI 的表面形貌进行表征, 结果如图 4 所示。相比于未改性的 SiO₂ (图 4A), 改性后的硅球大小和形态均未发生改变, 硅球周围和表面也无明显的聚合物和硅球碎片出现 (图 4B), 固定相仍然保持良好的球形结构和单分散形态, 确保了键合后的硅胶固定相满足色谱测试基准。

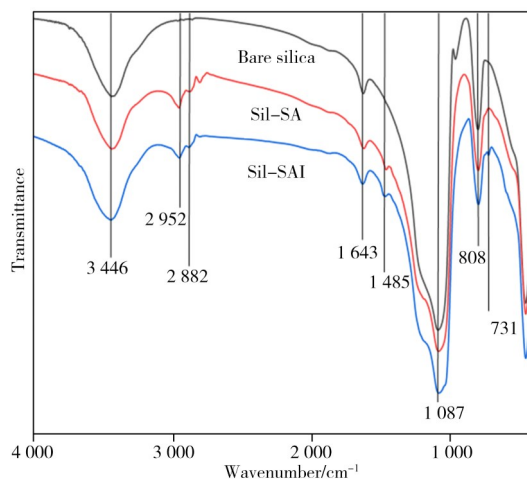


图 3 裸硅球、Sil-SA 和 Sil-SAI 的红外谱图
Fig. 3 Infrared spectra of bare silica, Sil-SA and Sil-SAI

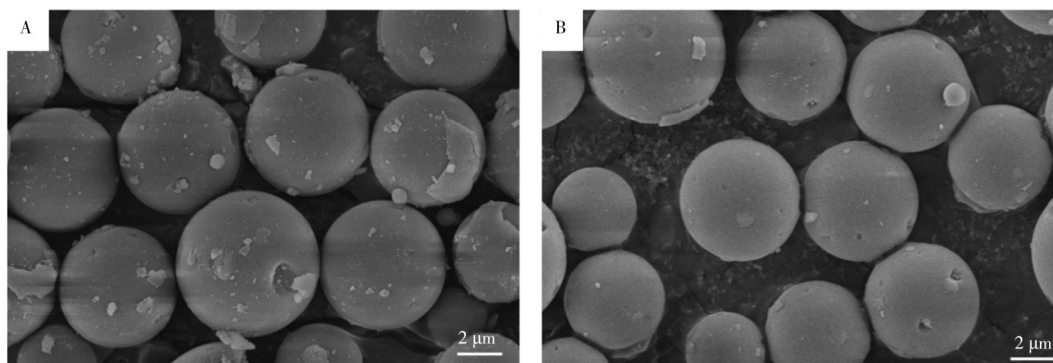


图 4 裸硅球(A)和 Sil-SAI(B)的 SEM 图像
Fig. 4 SEM of bare silicon spheres(A) and Sil-SAI(B)

2.1.4 固定相的元素分析表征 采用元素分析仪分别对裸硅球、Sil-SA、Sil-SAI 固定相进行表征 (平行合成 3 次, 取平均值)。固定相表面元素键合量公式和表面键合密度公式分别为式 (1)、式 (2):

$$\text{Total bonded amount of individual element} = \frac{\omega_1 - \omega_0}{M} \times 10^4 \quad (1)$$

$$\text{Bonding density} = \frac{\omega_1 - \omega_0}{M \times n \times S} \times 10^4 \quad (2)$$

其中 ω_1 和 ω_0 分别为键合在固定相与裸硅球中的质量分数, M 为相对原子质量, n 为键合固定相结构中的原子个数, S 为硅胶比表面积。

相对于 Sil-SA, Sil-SAI 的结构仅通过叔胺基团与 1, 3-丙磺酸内酯的亲核反应引入磺酸基团 (S 元素), 因此可以通过计算对比 Sil-SA 的 N 元素键合量和 Sil-SAI 的 S 元素键合量来对最终得到的固定相结构进行确定, 同时用 S 元素计算 Sil-SAI 固定相表面的键合密度, 计算结果见表 1。与裸硅胶相比, Sil-SA 固定相的 C 元素、N 元素和 H 元素均明显增加, 表明双 3-(三甲氧基甲硅烷基)-双叔胺型基团已经键合在硅胶表面。Sil-SAI 的硫元素含量相比于 Sil-SA 明显增加, 表明固定相表面存在磺酸基团; Sil-SA 中的 N 元素和 Sil-SAI 中 S 元素的摩尔比接近于 2 : 1, 推测 Sil-SA 中只有一个叔胺基团与 1, 3-丙磺酸内酯反应生成了磺酸甜菜碱, 因此 Sil-SAI 中一个双齿结构上含有一个叔胺基团和一个磺酸甜菜碱基团。形成该不对称结构可能原因为: (1) 两个叔胺基团中间的烷基链产生的空间位阻不足以支持两个叔胺基团同时与 1, 3-丙磺酸内酯反应, 先反应生成的磺酸甜菜碱基团的空间位阻也阻挡了 1, 3-丙磺酸内酯向未反应的叔胺的靠近; (2) 丙酮的低介电常数导致其无法屏蔽已生成的磺酸甜菜碱的偶极作用, 使得相邻未反应的叔胺基团周围电子云密度升高, 产生的强静电排斥作用阻碍了第二个 1, 3-丙磺酸内酯与叔胺的反应。

表1 裸硅胶和Sil-SAI的元素分析结果($n=3$)Table 1 Results of elemental analysis of bare silica and Sil-SAI ($n=3$)

Sample	Average elemental content/%($w, n=3$)				Bonding amount/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$	Bonding density/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2})$
	C	N	H	S		
Bare silica	0.866	0	0.733	0		
Sil-SA	13.208	1.832	2.577		1308.8(N)	
Sil-SAI	15.178	1.682	3.200	2.332	728.9(S)	1.960(S)

2.2 固定相分离性能评价

参考默克公司Sequant ZIC-HILIC柱(不锈钢柱管, 内有PEEK内衬, 规格250 mm×4.6 mm, 填料粒径3 μm)分离山梨醇和甘露醇的应用案例^[24], 在相同条件下使用本文制备的Sil-SAI固定相装填成色谱柱, 利用色谱柱对这两种糖醇的分离性能进行评价, 如图5所示。默克Sequant ZIC-HILIC柱和Sil-SAI柱对两种糖醇类化合物均可实现基线分离, 分离度 R 分别为4.82和4.63。由于商品化ZIC-HILIC柱填料粒径为3 μm , 而本文制备的Sil-SAI色谱柱填料粒径为5 μm , 因此ZIC-HILIC柱具有更高的分离度和柱效。除此之外, 两款色谱柱对糖醇的出峰顺序和分离效果非常相似。

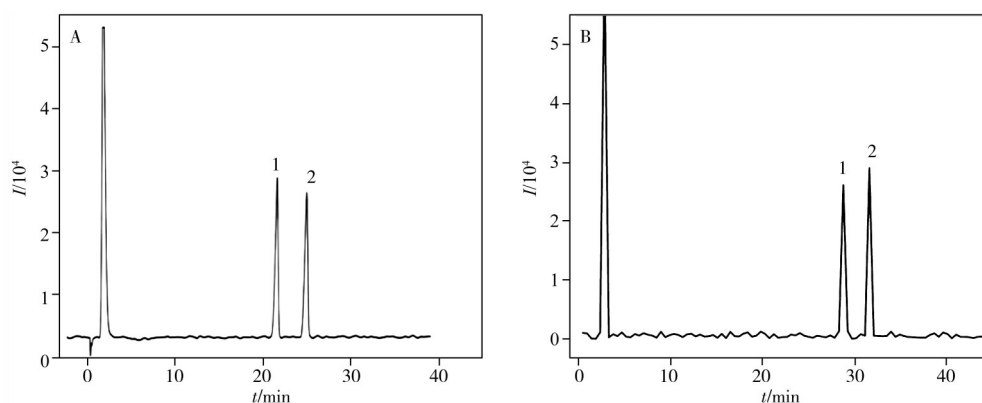


图5 两种色谱柱的分离性能对比

Fig. 5 Comparison of separation performance of two chromatographic columns

A. commercial column; B. Sil-SAI column; 1. sorbitol; 2. mannitol

2.3 固定相HILIC机制考察

常规HILIC固定相利用亲水性能之间的差异进行化合物分离, 而带有两性离子基团的HILIC型固定相在分离带电荷的化合物时, 还可与固定相之间发生静电相互作用^[4]。以尿嘧啶(中性)、尿苷(中性)、胞嘧啶(碱性)、胞苷(碱性)和乳清酸(酸性)5种物质为分子探针, 通过改变流动相中乙腈含量、缓冲盐浓度和缓冲液pH值, 考察探针分子在Sil-SAI-6固定相上的保留行为。

2.3.1 乙腈含量的影响 在HILIC模式中, 流动相中乙腈和水的比例可显著影响分析物的保留行为, 保留时间随乙腈含量上升而增加是亲水固定相的首要特征^[3]。如图6所示, 随着乙腈含量的增加, 5种分析物的保留因子均逐渐增加, 说明Sil-SAI固定相具有HILIC分离机制。

亲水固定相的分离主要由分配机理和吸附机理共同影响。分配机理指分析物在固定相表面的富水层和流动相(高比例乙腈)之间的液-液分配, 吸附机理指被分析物与固定相表面极性基团之间发生的氢键作用、偶极-偶极作用和静电作用等^[25]。为了进一步探究Sil-SAI固定相的分离机制, 使用分配机理模型和吸附机理模型对5种探针分子的保留因子和流动相中水相比例之间的关系进行拟合, 其中分配机理模型和吸附机理模型的模型公式分别为式(3)^[26]、式(4)^[16]:

$$\log k = A + B\phi \quad (3)$$

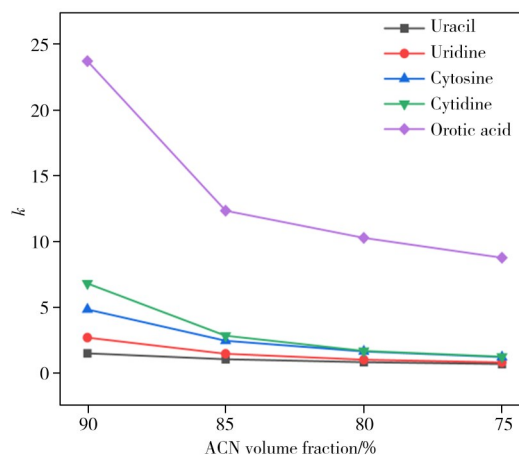


图6 流动相中乙腈含量对探针分子保留因子的影响

Fig. 6 Effect of acetonitrile content in the mobile phase on the molecular retention factor of probes

$$\log k = A_1 - B_1 \log \varphi \quad (4)$$

公式中 k 为保留因子, φ 为流动相中水相的体积分数, 其余均为常数。从表 2 的拟合结果可知, 基于吸附模型的拟合度 r^2 大于分配模型, 表明 SiI-SAI 固定相的吸附机理大于分配机理。

表 2 基于分配与吸附模型的拟合结果

Table 2 Fitting results based on partition and adsorption models

Analyte	Partition model		Adsorption model	
	Fitting formula	r^2	Fitting formula	r^2
Uracil	$\log k = 0.381 - 0.023\varphi$	0.971 1	$\log k = 1.029 - 0.856 \log \varphi$	0.999 7
Uridine	$\log k = 0.730 - 0.034\varphi$	0.953 0	$\log k = 1.735 - 1.318 \log \varphi$	0.993 0
Cytosine	$\log k = 1.027 - 0.038\varphi$	0.959 8	$\log k = 2.159 - 1.487 \log \varphi$	0.995 4
Cytidine	$\log k = 1.152 - 0.048\varphi$	0.942 3	$\log k = 2.682 - 1.871 \log \varphi$	0.988 0
Orotic acid	$\log k = 1.587 - 0.027\varphi$	0.875 9	$\log k = 2.416 - 1.075 \log \varphi$	0.947 1

具有多官能团的固定相的分离作用力具有多样性, 通常既有吸附机理也有分配机理。尝试用双重机理模型对固定相的分离机制进行模拟, 模型公式见式(5)^[16,27]。

$$\ln k = A_2 + B_2 \ln \varphi + C\varphi \quad (5)$$

其中 k 为保留因子, φ 为流动相中水相体积分数, A_2 与溶质的分子体积以及溶质与固定相和流动相之间的相互作用能有关, B_2 为与溶质和固定相之间的相互作用相关的系数, C 为与溶质与溶剂之间相互作用相关的系数。拟合结果见表 3。

表 3 基于双重机理模型的拟合结果

Table 3 Fitting results based on the multiple interaction model

Analyte	Multiple interaction model	
	Fitting formula	r^2
Uracil	$\ln k = 2.411 - 0.879 \ln \varphi + 0.002\varphi$	0.999 7
Uridine	$\ln k = 5.405 - 2.135 \ln \varphi + 0.050\varphi$	0.999 9
Cytosine	$\ln k = 5.983 - 2.060 \ln \varphi + 0.034\varphi$	0.999 4
Cytidine	$\ln k = 8.369 - 3.141 \ln \varphi + 0.078\varphi$	0.999 9
Orotic acid	$\ln k = 8.553 - 2.808 \ln \varphi + 0.107\varphi$	0.992 2

从表 3 可以得到, 3 种模型公式中的双重机理模型回归系数为 0.992 2~0.999 9, 高于分配机理模型和吸附机理模型, 表明 SiI-SAI 固定相具有亲水作用、静电作用和氢键作用等多重作用力, 表现为双重分离机制。

2.3.2 缓冲盐浓度对探针分子保留行为的影响 亲水固定相在进行分离时, 固定相表面会存在一层富水层, 常使用高比例有机相作为流动相, 当流动相中存在缓冲盐时, 缓冲盐会向固定相表面的富水层中扩散转移, 增加富水层的体积, 从而增大分析物在富水层中的分配系数^[28], 因此在 HILIC 模式下分析物的保留时间会随着缓冲盐浓度的增加而增加。

在流动相为乙腈-水(85:15, 体积比)、甲酸铵缓冲液 pH 值为 6.3 的条件下, 探究了甲酸铵缓冲盐浓度对上述 5 种探针分子在 SiI-SAI 固定相上保留性能的影响。pH 6.3 时, 4 种碱基核苷类呈现中性状态, 随着缓冲盐浓度的增大, 其保留因子逐渐增加, 符合 HILIC 分离机制(如图 7A 所示); 乳酸呈现带负电状态, 保留因子随着缓冲盐浓度的上升而下降, 表明带负电荷的探针分子在 SiI-SAI 固定相上的保留行为由离子间的静电作用主导。

2.3.3 流动相 pH 值对探针分子保留行为的影响 流动相的 pH 值与分析物 pKa 之间的高低会改变分析物的带电情况, 进而影响分析物与固定相的相互作用^[28]。为了考察流动相 pH 值对上述 5 种分子探针保留性能的影响, 保持乙腈含量为 85%, 甲酸铵缓冲盐浓度为 50 mmol/L, 当流动相 pH 值由 1.89 增加至 10.11 时(图 8): (1) 碱性化合物胞嘧啶和胞苷的保留因子逐渐升高, 胞嘧啶和胞苷在流动相 pH < 4.00 时带正电, 而固定相表面叔胺基团也质子化带正电, 分析物与固定相表面具有较强的静电互斥作用, 因此保留因子较小, 随着流动相 pH 值上升, 碱性化合物的带电情况减弱, 当流动相 pH > 5.00 时, 胞嘧啶和胞苷变为中性状态, 与固定相之间的离子互斥作用逐渐减弱, 保留因子逐渐增加, pH > 8.00 时, 固定相表面叔胺基团也趋于中性状态, 因此胞嘧啶和胞苷的保留因子趋于平衡; (2) 中性化合物与固定相之间无静电作用力, 因此保留因子无明显变化; (3) 酸性化合物乳酸的保留因子一直呈下降趋

势, 乳清酸在流动相pH值变化范围(1.45~10.11)内一直为带负电荷状态, 当流动相pH值升至8.00时, 固定相表面叔胺基团的质子化程度逐渐减弱趋于中性, 导致酸性化合物与固定相之间的静电吸附作用力减弱, 因此保留因子逐渐减小, 而当pH>8.00时, 流动相中OH⁻的浓度逐渐增加, 竞争乳清酸中的COO⁻与固定相表面磺酸甜菜碱基团中带正电的季胺基团间的静电吸附作用, 导致保留因子继续减弱。

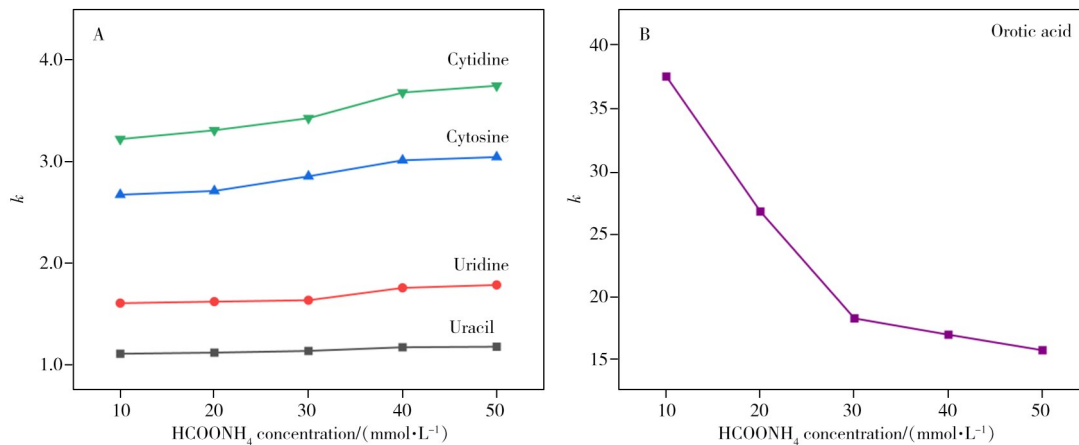


图7 流动相中甲酸铵浓度对5种探针分子保留的影响

Fig. 7 Effect of ammonium formate concentration in mobile phase on the retention of five probes

A. base-nucleoside class probe molecules; B. acidic probe molecules

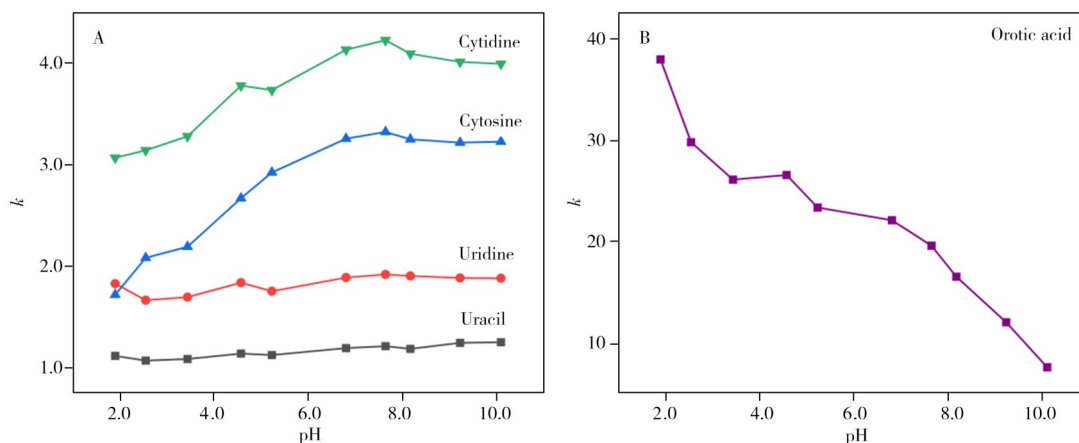


图8 流动相pH值对5种探针分子保留行为的影响

Fig. 8 Effect of mobile phase pH on the retention of five probes

A. base-nucleoside class probe molecules; B. acidic probe molecules

因此, 流动相pH值可以影响SiI-SAI固定相表面叔胺基团的带电情况, 也可以影响碱性或酸性物质的带电情况, 通过影响固定相与碱性或酸性探针分子静电作用力的大小, 使探针分子保留因子发生变化; 而对于中性物质, 由于其本身不带电, 因此保留因子受流动相pH值影响较小。该结果进一步证明, SiI-SAI固定相具有静电作用力。

2.3.4 固定相水解稳定性测试 相比反相固定相, 亲水固定相表面存在富水层, 在极端pH值流动相条件下对硅胶基质色谱柱的寿命损害更大^[18]。2023年, Waters公司的研究人员^[29]对市售硅胶基质氨基柱、二醇柱、酰胺柱、两性离子柱和BEH(亚乙基桥杂化)两性离子柱进行了高pH值条件下的水解稳定性研究, 结果发现即使采用BEH硅胶为基质的两性离子柱, 在冲洗7 h后柱效下降仍超过70%, 而商品C₁₈柱在类似的测试条件下仅下降了50%左右^[30]。

以尿嘧啶和胞嘧啶分别作为低pH值和高pH值条件下水解稳定性测试的探针分子, 对具有双齿键合结构的SiI-SAI固定相进行水解稳定性测试。低pH值条件下, 分别记录20 d内SiI-SAI色谱柱对尿嘧啶的分离柱效, 以初次柱效为基准, 计算此后每次尿嘧啶分离柱效与第一次分离尿嘧啶柱效的百分比, 以该数值为纵坐标, 时间为横坐标作图(图9A)。高pH值条件下, 以同样的方法记录370 h内SiI-SAI

色谱柱分离胞嘧啶的柱效, 得到图9B。结果表明: 低pH值测试条件下, 使用Sil-SAI色谱柱连续冲洗20 d, 尿嘧啶的柱效无明显下降, 主要原因为Sil-SAI固定相的功能基团被两个三甲氧基硅烷键同时键合到硅胶表面, 提供了比普通单三甲氧基硅烷键更高的键合稳定性^[17], 使其在低pH值环境下拥有更高的使用寿命, 未来可以借助固体核磁共振技术对双齿键合结构进行进一步确认; 高pH值条件下, OH⁻对硅胶基质具有溶解作用, 导致其机械强度下降, 多孔结构出现坍塌, 柱效大幅度降低; 而Sil-SAI色谱柱在连续冲洗363 h后, 探针分子胞嘧啶的柱效才开始明显下降, 主要原因为两性离子基团最外层的磷酸根作为强阴离子基团, 对流动相中的OH⁻有静电排斥作用, 同时双齿键合结构的引入使得硅胶表面形成了交联保护层, 使得OH⁻无法与硅胶进行直接作用, 对硅胶基质进行了有效保护。

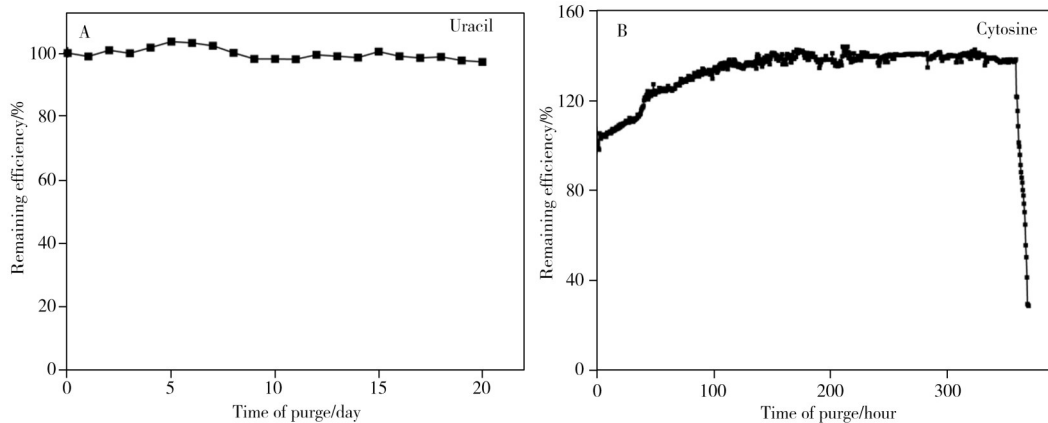


图9 Sil-SAI 色谱柱的水解稳定性测试

Fig. 9 Hydrolytic stability test of Sil-SAI column

A. low pH test result (pH=1.45); B. high pH test result (pH=10.75)

2.4 应用研究

2.4.1 糖类化合物的分离 糖类化合物作为人类最主要的能量来源, 是一种典型的强亲水类化合物^[31], 分离难度大。利用Sil-SAI色谱柱对6种单糖和二糖(木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖)进行分离。结果如图10A所示, Sil-SAI色谱柱可对3种单糖和3种二糖进行分离, 其中木糖和果糖的分离度为1.44, 二糖的保留时间大于单糖。在上述分离条件下, 连续进样5次考察Sil-SAI色谱柱对6种糖类化合物的分离重现性(图10B), 保留时间的相对标准偏差(RSD)为0.090%~0.31%($n=5$)。

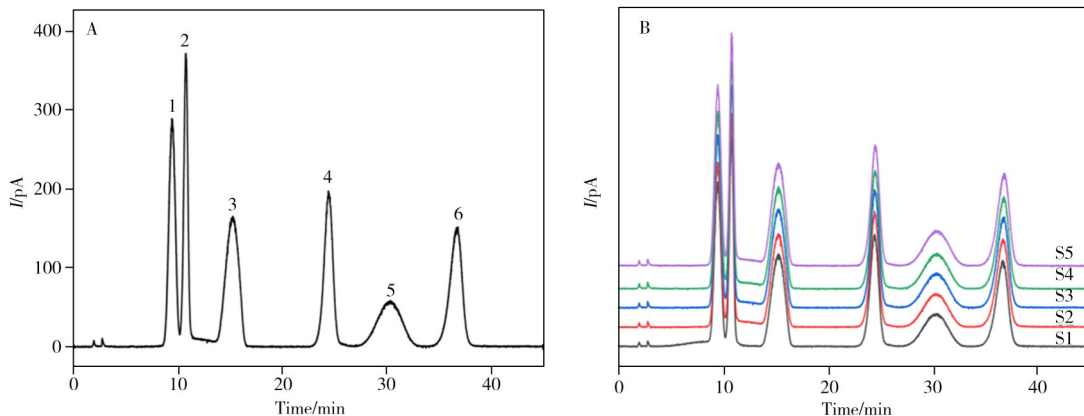


图10 Sil-SAI 色谱柱对6种糖类化合物的分离(A)和分离重现性考察(B)

Fig. 10 Separation of six saccharides on Sil-SAI column(A) and separation reproducibility test(B)

1. xylose; 2. fructose; 3. glucose; 4. sucrose; 5. maltose; 6. alginose

2.4.2 糖醇类化合物的分离 糖醇类化合物因低热量、低升糖、防龋齿、保湿性强等优点, 在食品、医药、化工等领域被广泛应用^[32]。糖醇作为糖类化合物的衍生物, 因其多羟基和结构相似性, 分离存在一定困难^[33]。采用Sil-SAI色谱柱对赤藓糖醇、木糖醇、阿拉伯糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇进行分离。结果如图11A所示, Sil-SAI色谱柱对7种糖醇的分离度均大于1.2。在上述分离

条件下, 连续进样5次考察 SiI-SAI 色谱柱对7种糖醇类化合物的分离重现性(图 11B), 保留时间的 RSD 为 0.080%~0.44%($n=5$)。

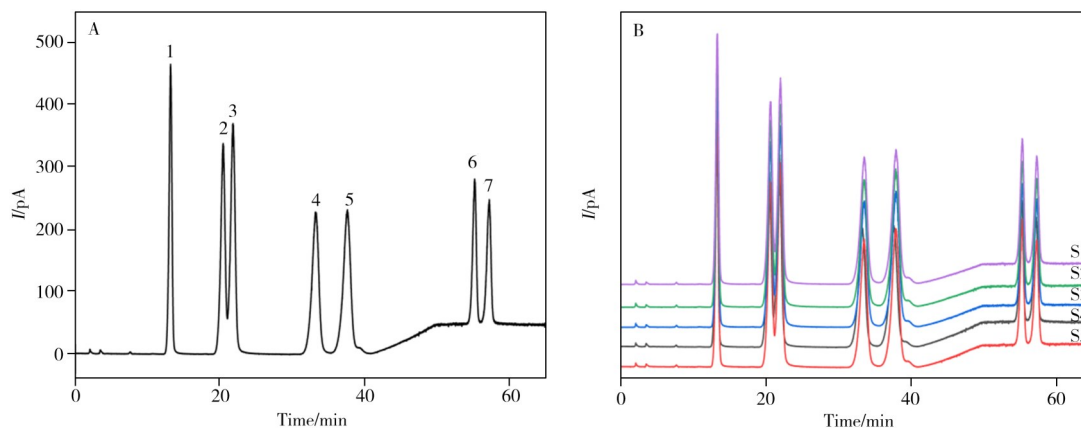


图 11 SiI-SAI 色谱柱对 7 种糖醇类化合物的分离(A)和分离重现性考察(B)

Fig. 11 Separation of seven sugar alcohols on SiI-SAI column(A) and separation reproducibility test(B)

1. erythritol; 2. xylitol; 3. arabitol; 4. sorbitol; 5. mannitol; 6. maltitol; 7. lactitol

3 结 论

本文以硅胶为基质制备的 SiI-SAI 固定相同时具有叔胺基团和磺酸甜菜碱基团, 因此相关探针分子在 SiI-SAI 固定相上的保留受到亲水作用、氢键作用和静电作用等多重作用力的共同影响, 表现为分配和吸附共同存在的双重分离机制。通过考察流动相中缓冲盐浓度和 pH 值对中性、碱性和酸性化合物保留因子的影响, 发现 SiI-SAI 固定相呈现出典型的 HILIC 分离模式; 由于 SiI-SAI 固定相与带电物质间存在静电相互作用, 因此随着流动相中缓冲盐浓度和 pH 值的变化, 中性、酸性和碱性探针分子表现出不同的色谱保留性能。SiI-SAI 固定相表面的功能性基团通过双齿键合方式键合到硅球表面, 这增加了键合的空间位阻和交联度, 从而可更有效地屏蔽硅羟基并保护硅氧键, 使得 SiI-SAI 固定相在高/低 pH 值条件下均具有良好的水解稳定性, 具有更长的使用寿命。将 SiI-SAI 固定相应用于糖和糖醇类强亲水物质的分离, 达到了良好的分离效果和分离重现性。

参考文献:

- [1] Zhang Q C, Luo X L, Li G K, Xiao X H. *Chin. J. Chromatogr.* (张仟春, 罗夏琳, 李攻科, 肖小华. 色谱), **2015**, 33(9): 904-905.
- [2] Tereba-Mamani C J, Ariño-Bueno N, García-Alvarez-Coque M C, Baeza-Baeza J J, Ruiz-Angel M J. *Separations*, **2025**, 12(12): 333.
- [3] Alpert A J. *J. Chromatogr. A*, **1990**, 499: 177-196.
- [4] Wang X Q. *Preparation of Polymer-modified Silica-based Stationary Phases and Their Applications in Hydrophilic Interaction and Mixed-mode Liquid Chromatography*. Hefei: University of Science and Technology of China (王晓庆. 聚合物改性硅基固定相的制备及其在亲水和混合模式液相色谱中的应用. 合肥: 中国科学技术大学), **2023**.
- [5] Liu Z L, Xu M M, Zhang W Q, Miao X Y, Wang P G, Li S W, Yang S. *Anal. Methods*, **2022**, 44(14): 4437-4448.
- [6] Olsen B A. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 913: 113-122.
- [7] Knežević Ratković D, Kukobat R, Kasagić-Vujanović I. *J. Sep. Sci.*, **2024**, 47(9/10): e2300949.
- [8] Greco G, Letzel T. *J. Chromatogr. Sci.*, **2013**, 51(7): 684-693.
- [9] Lai L, Zhang M, Chang Y, Li M, Crommen J, Qu J H, Xu D, Jiang Z. *J. Chromatogr. A*, **2024**, 1734: 465316.
- [10] Qiao L, Shi X, Xu G. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2016**, 81: 23-33.
- [11] Guo Y, Gaiki S. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(35): 5920-5938.
- [12] Intoh A, Kurisaki A, Fukuda H, Asashima M. *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, 23(6): 607-614.
- [13] Rasheed A S, Al-Phalahy B A, Seubert A. *J. Chromatogr. Sci.*, **2017**, 55(1): 52-59.
- [14] Liu X, Jiang Y, Zhang F, Li Z, Yang B. *J. Chromatogr. A*, **2021**, 1649: 462229.
- [15] Yu D, Guo Z, Shen A, Yan J, Dong X, Jin G, Long Z, Liang L, Liang X. *Talanta*, **2016**, 161: 860-866.
- [16] Hu Y, Zhang P, Liu K, Peng B, Zhang W, He L, Zhao W, Zhang S. *J. Chromatogr. A*, **2024**, 1736: 465333.
- [17] Kirkland J J A, Jr van, Straten M A, Claessens H A. *Anal. Chem.*, **1998**, 70: 4344-4352.
- [18] Qian K, Peng Y, Zhang F, Yang B, Liang X. *Talanta*, **2018**, 182: 500-504.

- [19] Qian K, Yang Z, Zhang F, Yang B, Dasgupta P K. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(15): 8750–8755.
- [20] Tang X L. *Research on Novel Polar-modified Chromatographic Stationary Phases and Their Applications in Pharmaceutical Analysis*. Xi'an: Fourth Military Medical University(唐秀玲. 新型极性修饰色谱固定相的研究及其在药物分析中的应用. 西安: 第四军医大学), **2013**.
- [21] Wang Y, Wahab M F, Breitbach Z S, Armstrong D W. *Anal. Methods*, **2016**, 8(31): 6038–6045.
- [22] Kotoni D, D'acuarica I, Ciogli A, Villani C, Capitani D, Gasparrini F. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1232: 196–211.
- [23] Kong L Y, Chen B Y, Guan W N, Yang H Y, Yan X F, Yang Y R, Liu T T, Jin Z. *J. Instrum. Anal.* (孔令毅, 陈贝怡, 观文娜, 杨海燕, 燕晓飞, 杨耀然, 刘婷婷, 靳钊. 分析测试学报), **2026**, 45(1): 21–29.
- [24] Merck. *Separation of Non-UV-absorbing Polar Compounds by ZIC-HILIC: Ideal for Compatibility with Universal Detectors*. Antpedia(默克. ZIC-HILIC 分离无紫外吸收极性化合物: 完美匹配通用型检测器. 分析测试百科网), **2023**. https://www.antpedia.com/news/wx_article/847776.html.
- [25] Hemstrom P, Irgum K. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29(12): 1784–1821.
- [26] Snyder L R. *Review*, **1974**, 46(11): 1384–1393.
- [27] Lu P Z, Lu X M, Li X Z, Zhang Y K. *Sci. Bull.* (卢佩章, 卢小明, 李秀珍, 张玉奎. 科学通报), **1982**, 19: 1175–1177.
- [28] Buszewski B, Noga S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402(1): 231–247.
- [29] Walter T H, Boissel C, Field J A, Lawrence N L. *Separations*, **2023**, 10(3): 156.
- [30] Liu X, Bordunov A V, Pohl C A. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1119(1/2): 128–134.
- [31] Varki A, Kornfeld S. *Historical Background and Overview*. Cold Spring Harbor(NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2022**: 1–10.
- [32] Livesey G. *Nutr. Res. Rev.*, **2003**, 16(2): 163–191.
- [33] Rice T, Zannini E, Arendt E K, Coffey A. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2020**, 60(12): 2034–2051.

(责任编辑: 盛文彦)