

文章编号:1671-6833(2007)02-0043-04

壳聚糖衍生物键合固定相的合成与表征

李琳^{1,2}, 毛陆原¹, 赵斌¹, 金小卫¹, 陈晓辉¹, 张书胜²

(1. 郑州大学材料科学与工程学院, 河南郑州450001; 2. 郑州大学分析测试中心, 河南郑州450052)

摘要:壳聚糖(CTS)作为天然高分子材料, 改性后具有一定的分子识别和手性识别功能. 采用香草醛(3,4-二氧亚甲基-苯甲醛)接枝到壳聚糖的链上, 然后通过偶联剂 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷将其与硅胶键合制备出新型液相色谱固定相. 香草醛接枝壳聚糖(VCTS)的制备, 计算了接枝率, 确定了分子量. 然后将香草醛接枝壳聚糖(VCTS)作为反应的原料, 制备键合硅胶固定相(VCTS-KH560-Si), 并用傅立叶变换红外光谱、热分析和质量分析法等手段进行表征, 证明键合产物性质稳定. 研究了其对手性物质的分离性能, 并讨论了分离效果.

关键词:壳聚糖衍生物; 功能材料; 键合硅胶固定相; 高效液相色谱

中图分类号: X 703; O 658 **文献标识码:** A

0 引言

高效液相色谱(HPLC)是广泛应用的分析手段之一, 它不仅能分离复杂成分的混合物, 而且能同时提供定性和定量数据^[1]. 70年代初发展起来的化学键合固定相在HPLC的应用已举足轻重. 这不仅是因为硅胶表面存在着足够的可反应硅羟基, 强度高, 孔结构和表面积易于人为控制, 有较好的化学稳定性, 而且还克服了固定液流失、柱系统稳定性差的弊病. 在应用方面, 这些硅胶键合固定相除用于常见化合物的分离、分析外, 主要应用集中在药物和生物样品的分析领域^[2].

壳聚糖(CTS)和改性壳聚糖作为色谱固定相, 也被广泛用于金属离子、氨基酸及其它有机物的分离. Gao等^[3]以多孔性交联壳聚糖作为填料基质制成分离柱, 定量地吸附以氯化物阴离子或含氧阴离子形式存在的Ti、V、Mo、W、Ga、Bi等元素. 厉留柱等^[4]把壳聚糖-AAM接枝共聚物作为造纸厂废水处理材料. 王俊德等^[5]研制了壳聚糖键合硅胶和壳聚糖涂层交联硅胶填料, 考察了这两种液相色谱填料对小肽有一定的分离能力. Senso等人^[6-7]用壳聚糖衍生物键合烷基硅胶用于HPLC手性分离, 并讨论了手性固定相的制备及性能. 郑大峰等^[8]探讨了香草醛接枝壳聚糖对某些重金属二价离子的吸附容量和吸附速度性

能, 发现该接枝壳聚糖衍生物具有比壳聚糖更优的吸附性能, 可用于废水处理中吸附、回收重金属离子. 本文作者和吴根等^[9-10]分别研究了苯甲醛衍生物修饰壳聚糖功能材料的制备、表征及其对废水的处理性能, 而香草醛接枝壳聚糖键合硅胶作高效液相色谱固定相尚鲜见文献报道. 本文作者研究了香草醛接枝壳聚糖通过偶联剂 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷与硅胶键合作为分离功能材料, 并用傅立叶变换红外吸收光谱、热分析和质量分析法等手段进行表征, 初步讨论了其作为高效液相色谱新型固定相的分离性能.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

液相色谱系统由Waters600高压泵、2996二极管阵列检测器(PAD)和Empower色谱工作站组成(Waters公司, 美国). Bruker Vector 22型红外光谱仪(德国), 装柱机(大连科瑞, 中国)等.

多孔硅胶(粒径5 μm , 孔径90 \AA , 孔径0.66 cm^2/g , 比表面积294 m^2/g); γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH-560, 武汉大学化工厂); 壳聚糖: 生化试剂, 上海聚源生物科技有限公司; 香草醛: 分析纯, 北京化工厂; 其它均为分析纯试剂, 水为二次重蒸水和去离子水, 用前经0.45 μm 滤膜过滤.

收稿日期: 2007-01-06; 修订日期: 2007-03-14

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0211021000); 教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介: 李琳(1971-), 女, 河南郑州人, 郑州大学硕士研究生, 郑州铁路局疾病预防控制中心检验主管技师, 主要从事分离功能材料的应用研究.

1.2 香草醛接枝壳聚糖(VCTS)键合硅胶的制备
壳聚糖上的氨基可以与醛酮发生 Schiff 碱反应,生成相应的醛亚胺和酮亚胺多糖.利用 Schiff

碱反应可以把香草醛接枝壳聚糖键合硅胶作固定相的反应路线如图1所示:

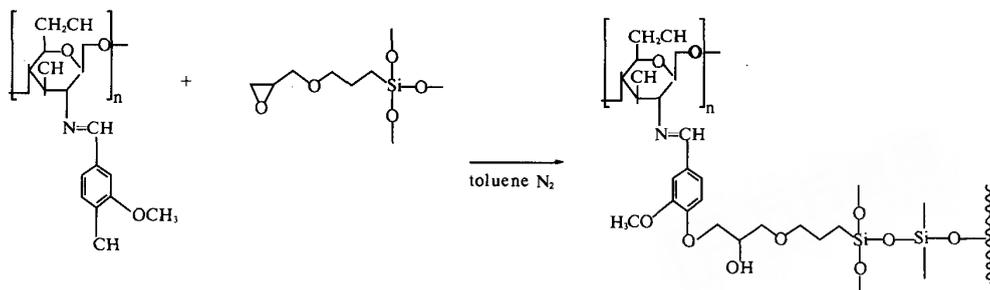


图1 反应路线

Fig.1 Reaction scheme

称取 2.0 g 壳聚糖,用 20 mL 甲醇(分析纯)浸泡溶胀 8 h.过滤清洗,将溶胀的壳聚糖放入反应器内,加入 pH 值为 6 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,升温至反应温度 70 °C 后,加入香草醛,在搅拌下进行反应.反应 6 h 后,将反应产物过滤清洗,再用丙酮萃取,干燥后称重得香草醛接枝壳聚糖(VCTS).

称取 1.0 g 香草醛接枝壳聚糖于三口圆底烧瓶中,加入 120 mL 新蒸的无水甲苯,磁力搅拌加入 8.0 mL 硅烷化试剂 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH-560),滴加 3 滴 HClO_4 .迅速升温至 90 °C,在 N_2 保护下反应 18 h.趁热过滤,用甲苯、丙酮洗涤,将所得产物硅烷化香草醛接枝壳聚糖(VCTS-KH560),烘干,称重.取适量做红外、热分析.

称取 1.2 g 硅烷化香草醛接枝壳聚糖(VCTS-KH560)于三口圆底烧瓶中,加入硅胶,加入 120 mL 新蒸的无水甲苯.迅速升温至 90 °C,在 N_2 保护下反应 24 h.趁热过滤,依次用甲苯、丙酮洗涤,将所得产物香草醛接枝壳聚糖键合硅胶(VCTS-KH560-Si),烘干,称重.取适量做红外、热分析、元素分析.

所制备的固定相用匀浆法装入 150 × 3.6 mm i. d. 的清洗干净的锈钢管柱中,匀浆液是二氧六环 + 四氯化碳,顶替液是甲醇,装柱压力为 50 MPa.

2 结果与讨论

2.1 香草醛改性壳聚糖接枝率的确定

将反应前的壳聚糖和反应后的改性壳聚糖分别干燥称重,求出质量差.用质量的增加率反映接枝率.接枝率可按式计算^[9]:

$$G = [(m_2 - m_1) / m_1] \times 100\% \quad (1)$$

式中: G 为接枝率,%; m_1 为反应前壳聚糖的质量, g ; m_2 为改性壳聚糖的质量, g . V-CTS: 由实验得 m_1 为 2.087 0 g, m_2 为 2.915 8 g, 因此香草醛改性壳聚糖的接枝率为

$$\begin{aligned} G &= [(m_2 - m_1) / m_1] \times 100\% \\ &= (2.915 8 \text{ g} - 2.087 0 \text{ g}) / 2.087 0 \text{ g} \times 100\% \\ &= 26.8\% \end{aligned}$$

2.2 香草醛改性壳聚糖分子量的确定

由反应机理可确定, V-CTS 的相对分子量可根据壳聚糖相对分子质量和接枝率确定, 计算式^[10]为

$$M = M_2 \cdot \frac{M_3}{M_1} \cdot G + M_3 \quad (2)$$

式中: M 为改性壳聚糖的相对分子量; M_1 为一个壳聚糖残基的相对分子量, 161; M_2 为一个改性壳聚糖残基的相对分子量, 295; M_3 为壳聚糖的相对分子量; G 为平均接枝率.

V-CTS: 由实验得 M_1 为 161, M_2 为 295, M_3 为 2.02×10^5 , 平均接枝率为 26.8%, 因此香草醛改性壳聚糖的分子量为 3.50×10^5 .

2.3 红外光谱分析

FT-IR 中 1641 cm^{-1} 处出现的 Schiff 碱 C=N 的特征吸收峰, 说明香草醛与壳聚糖通过碳氮双键连接; 在 1517 cm^{-1} 处的苯环的特征吸收峰说明苯环的存在; 而 1432 cm^{-1} 处的吸收峰为 O-CH₃ 的 -CH₃ 吸收峰, 表明 O-CH₃ 的存在. 由图 2 发现 1641.9 cm^{-1} 是苯环和羰基的混合峰; 在 1516.1 cm^{-1} 处的苯环的特征吸收峰说明苯环的存在; 1427.4 cm^{-1} 处的吸收峰为 O-CH₃ 的 -CH₃ 吸收峰, 表明 O-CH₃ 的存在; 而 1113.6 cm^{-1} 为烷基醚的 C-O-C、Si-O-Si 的

伸缩振动强峰,说明香草醛接枝壳聚糖(VCTS)与 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷(KH560)键合上了.由图 3 可知,位于 $1\ 636.24\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 516.16\ \text{cm}^{-1}$ 处峰为苯环骨架 $\text{C}=\text{C}$ 偶合振动吸收峰,说明苯环或芳环存在. $1\ 111.37\ \text{cm}^{-1}$ 为烷基醚的 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 、 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 的伸缩振动强峰. $806\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{Si}-\text{O}-\text{H}$ 振动吸收峰,这说明 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲氧基硅烷键合在了硅胶表面.

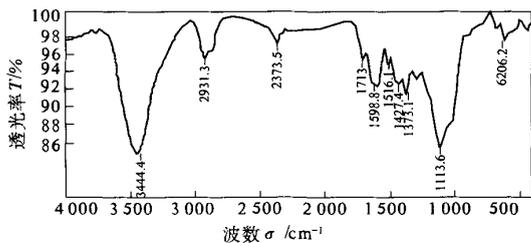


图 2 VCTS-KH560 红外图

Fig. 2 VCTS-KH560 infrared spectrum

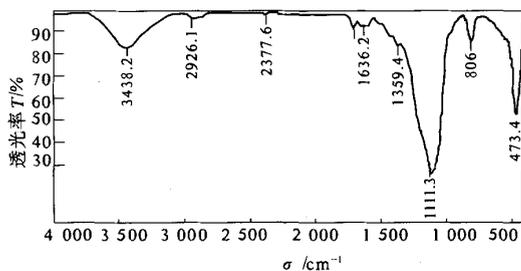


图 3 VCTS-KH560-Si 红外图

Fig. 3 VCTS-KH560Si infrared spectrum

2.4 热分析与元素分析

热分析结果:VCTS 在 $237\ ^\circ\text{C}$ 分解,VCTS - KH560 在 $230\ ^\circ\text{C}$ 分解,VCTS - KH560 - Si 在 $215\ ^\circ\text{C}$ 处分解.VCTS 在 $320\ ^\circ\text{C}$ 有放热峰,VCTS - KH560 在 $318\ ^\circ\text{C}$ 有放热峰,VCTS - KH560 - Si 在 $319\ ^\circ\text{C}$ 有放热峰.热稳定顺序是:VCTS > VCTS - KH560 > VCTS - KH560 - Si.

对硅烷化香草醛接枝壳聚糖(VCTS - KH560)与硅胶反应,得到香草醛接枝壳聚糖键合硅胶(VCTS - KH560 - Si)的反应时间作条件实验,结果表明随着时间的延长,C%、H% 的含量上升,而 24 h 的含量最高,所以此步反应选定时间为 24 h.

2.5 色谱固定相分离性质研究

流动相先用甲醇和水做实验发现,无论是结构不同的物质,位置异构体,还有手性物质,都是一个峰出现.说明反相流动相对此柱不适用,改用正相流动相正己烷和异丙醇后,分离效果明显

改善.

用正相流动相正己烷和异丙醇作流动相,改变二者的比例作了条件实验,对一些手性物质的分离会更有利.分别用 V(正己烷):V(异丙醇) = 98:2,97:3,95:5 的流动相进行实验,结果见图 4、5.从结果来看,尽管色谱峰比较宽,但还是实现了分离.色谱峰比较宽的原因是由于壳聚糖上的存在比较多的活性位点,与分析物质的作用比较复杂引起的.

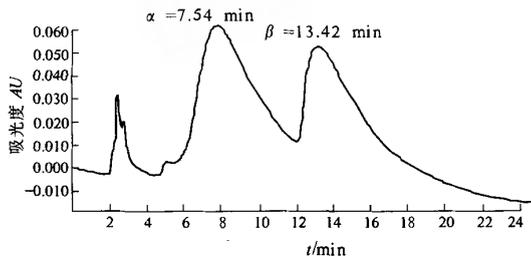


图 4 α 、 β 萘胺的 HPLC 分离

V(正己烷):V(异丙醇) = 97:3

Fig. 4 HPLC separation of α -and β -naphthylamine.

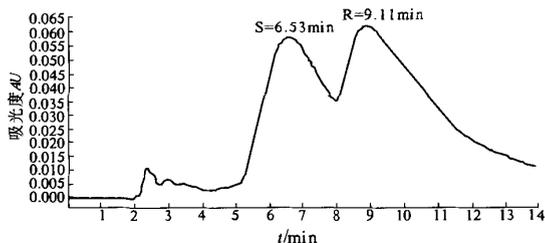


图 5 R、S 联萘酚的 HPLC 分离

V(正己烷):V(异丙醇) = 95:5

Fig. 5 HPLC separation of S-and R-1'-bi-2-naphthol

3 结论

壳聚糖是多聚糖,具有很多羟基和氨基活性位点,可以通过氢键表现出一定的手性识别能力.香草醛接枝壳聚糖键合硅胶固定相(VCTS - KH560 - Si)对手性物质的分离峰形,主要与固定相本身的性质有关.在分离过程中,根据 Dalglish 提出的“三点相互作用”,认为在对映体与 CSP 之间可能存在 $\pi-\pi$ 作用、偶极-偶极作用、氢键-氢键作用及非手性作用(如空间效应)等作用力,这些作用力的综合结果将导致两个对映体与固定相之间形成非对映体络合物的稳定性有差异而得到分离^[12].由于作用力的种类多,可能影响到 CSP 的峰形.通过化学衍生,还可以减少活性作用点的数目,峰形可以得到改善,提高柱效率.

参考文献:

- [1] 张雁冰,李玲,刘宏民. 马桑化学成分研究[J]. 郑州大学学报(理学版),2005,37(1):75-77.
- [2] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2000:2451.
- [3] GAO Y H, LEE K H, OSHIMA M, et al. Adsorption behavior of metal ion on cross-linked chitosan and the determination of oxoanions after pretreatment with a chitosan column[J]. Analytical Sciences, 2000, 16(12): 1303-1308.
- [4] LI Liu-zhu, MAO Lu-yuan, ZHUANG Yin-feng, et al. Synthesis and flocculation property of chitosan-acrylamide graft copolymer[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2004, 20(2):221-224.
- [5] 王俊德,王宇锦,孙朝晖. 新型壳聚糖液相色谱填料及其在生物分子分离中的应用[J]. 色谱, 1994, 12(5): 327-3293.
- [6] PILAR F, SENSO A, CRISTINA M, et al. 3,5-Dimethylphenylcarbamates of amylose, chitosan and cellulose bonded on silica gel comparison of their chiral recognition abilities as high-performance liquid chromatography chiral stationary phases[J]. Chromatography A, 1998, 796: 265-272.
- [7] SENSO A, LAUREANO O, CRISTINA M. Chitosan derivatives as chiral selectors bonded on allyl silica gel: preparation, characterization and study of the resulting high-performance liquid chromatography chiral stationary phases[J]. Chromatography A, 1999, (839): 15-21.
- [8] 郑大锋,葛华才. 香草醛接枝壳聚糖的微波辐射制备及其吸附性能[J]. 华南理工大学学报,2003,31(12): 51-53.
- [9] 毛陆原,李琳,金小卫,等. 3,4-二氧亚甲基-苯甲醛修饰壳聚糖的制备与表征[J]. 郑州大学学报(理学版),2005, 37(4): 70-74.
- [10] 吴根,罗人明. 香草醛改性壳聚糖的制备及其对洗毛废水絮凝处理性能的研究[J]. 精细化工, 2001, 18(8): 464-466.
- [11] 赵继红,梁宇,梁泽斌. 高效液相色谱柱的稀匀浆填充方法[J]. 北方工业大学学报, 2002, 14(1): 31-34.
- [12] 李爱峰,刘道杰. 多糖衍生物类固定相在高效液相色谱手性分离中的应用进展[J]. 理化检验:化学分册, 2005, 41(7): 525-529.

Research on Synthesis and Characterization of Chitosan Derivative Bonded Silica Gel as Stationary Phase

LI Lin^{1,2}, MAO Lu-yuan¹, ZHAO Bin¹, JIN Xiao-wei¹, CHEN Xiao-hui¹, ZHANG Shu-sheng²

(1. College of Material Sciences and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; 2. Center of Analysis and Testing, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: As a natural macromolecular material, chitosan has the function of molecular or chiral recognition. Through Schiff's base reaction with vanillin, chitosan (CTS) was molecular-modified as vanillin-modified-chitosan (VCTS). Using γ -glycidoxypropyl-trimethoxysilane (KH560) as a bridge, VCTS was bonded onto silica gel to produce the bonded stationary phase VCTS-KH560-Si. VCTS-KH560-Si was characterized by means of FTIR, TGA and gravimetric analysis. Its chromatographic characterization was also investigated.

Key words: chitosan derivative; functional material; stationary phase; HPLC