

脂肪醇聚氧乙烯醚分子量分布的高效液相色谱法分析

倪燕君 薛虹 刘凤琴 汤玉娟(赤峰 024000 赤峰市药品检验所)

摘要 目的: 建立脂肪醇聚氧乙烯醚分子量分布 HPLC 的分析方法。方法: 将自制的十二醇聚氧乙烯醚合成 3,5-二硝基苯甲酸酯, 用 HPLC 法以(10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%) 乙醇的石油醚溶液为流动相, 在氨基柱上, 于 280nm 波长处作梯度洗脱。结果: 脂肪醇聚氧乙烯醚的分子量(EO)符合泊松分布。结论: 该方法简单, 快捷, 灵敏度高, 可用于该品的质量控制。

关键词 高效液相色谱法; 十二醇聚氧乙烯醚; 梯度洗脱

Molecular weight distribution of the polyethenoxy ether of aliphatic alcohol by HPLC

Ni Yanjun, Xue Hong, Liu Fenqin, Tang Yujuan(*Chi Feng Institute for Drug Control, Chi Feng 024000*)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC analysis method for the molecular weight distribution of the polyethenoxy ether of aliphatic alcohol. **METHOD:** The 3,5-dinitric benzoate derivatives are synthesized using polyethenoxy ether of lauryl alcohol, and stepwise ethanol-petroleum solvent(10% ~ 1%) was used on an amino-column with the wavelength detected at 280nm by HPLC analysis. **RESULTS:** The molecular weight distribution of the polyethenoxy ether of aliphatic alcohol followed from Boson distribution. **CONCLUSION:** The method is simple, rapid, sensitive and could be used as the quality control of these products.

KEY WORDS HPLC, polyethenoxy ether of lauryl alcohol, gradient elution

非离子表面活性剂以其良好的润湿、乳化、分散、增溶性能多年来在医药领域得到广泛应用,而这些性能和用途直接取决于其内在结构。运用 HPLC 方法检测脂肪醇聚氧乙烯醚亲水基(EO)的分布,研究其结构与性能的关系,从而控制其质量以利于正确使用。

由于脂肪醇聚氧乙烯醚的紫外吸收很弱,直接采用

HPLC 分析不仅受杂质的干扰大,而且流动相很难选择。而含有苯环的烷基酚聚氧乙烯醚可直接用梯度洗脱法检测亲水基 EO 的分布。将脂肪醇聚氧乙烯醚衍生化合合成含有苯环的脂肪醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯,利用紫外标记物在紫外 280nm 处有强吸收的特点,以无水乙醇、石油醚的混合溶液作流动相,在 NH₂- 柱上用 HPLC 梯度洗脱法测定

亲水基 EO 的分子量分布。

2 仪器、试剂

LC-4A 型 HPLC 仪(日本岛津), SPD-2AS 型紫外检测器(日本岛津), RID-2AS 示差检测器, NH₂-柱(10 μ m, 5 \times 25cm), RP-C₁₈柱(10 μ m, 4.6 \times 25cm), SIL-1A 进样器, C-R3A 记录仪, 恒温箱 CTO-2AS, 制备液相色谱仪(300mm \times 20mm, YWGO DS(50 μ m)), SZ-01 示差检测器。

3,5-二硝基苯甲酰氯(AR, 进口分装); 吡啶(AR, 北京化工厂); 石油醚, (bp60~90 $^{\circ}$ C 北京 52952 化工厂); 氯仿(AR, 北京化工厂); 无水乙醇(AR, 沈阳试剂一厂); 95% 乙醇(AR, 北京化工厂), 丁酮(AR, 北京化工助剂研究所); 碘(AR, 北京化工厂); 氢氧化钠(A. R. 北京化工厂); 羟甲基纤维素钠盐; 十二醇聚氧乙烯醚(自制)

2 操作

2.1 十二醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯的制备和纯化

分别取十二醇聚氧乙烯醚 20mg、3,5-二硝基苯甲酰氯 30mg、吡啶 1.0ml 置于具塞的离心管中, 在 65~70 $^{\circ}$ C 温度下反应 35min, 蒸除吡啶, 加 1ml 蒸馏水, 振摇, 然后加 0.2mol/l 氢氧化钠溶液 0.5ml 萃取, 氯仿层用蒸馏水洗 3 次至中性, 浓缩蒸干, 用石油醚保护。

2.2 HPLC 分离——梯度洗脱

用 10% 的乙醇石油醚溶液(A)和石油醚(B)的混合溶液作流动相, 流速 1.5ml/min, 检测波长 280nm, 在 NH₂-柱上依次对聚合度不同的十二醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯作梯度洗脱, 然后加入标准品十二醇五聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯, 再梯度洗脱, 最后确定聚合度 n 。

3 结果与讨论

3.1 十二醇聚氧乙烯醚纯化

根据文献[1]的方法合成产物用温热(50~60 $^{\circ}$ C)的石油醚提取 3 次, 合并提取液并蒸除石油醚。以 75% 的乙醇水溶液为流动相和溶剂, 流速 1.5ml/min, 用 SE-01 示差检测器检测做上述提取物的液相制备色谱分离, 收集主峰并蒸除流动相。再用 80% 的乙醇水溶液为流动相和溶剂, 流速 1.5ml/min, 用 RID-2AS 示差检测器检测, 在 RP-C₁₈柱(柱温 50 $^{\circ}$ C)上进行纯度检查并收集主峰。结果液相制备色谱能有效地分离杂质, 收集得到分析纯的化合物。

3.2 标准品——十二醇五聚氧乙烯醚的制备与纯化

由于无法从梯度洗脱色谱图上确定各个峰的 n 值, 故用一个已知单一 n 值的标准品作对照, 采用添加法确定峰位。用薄层色谱法制备标准品。

3.2.1 展开剂的选择

分别用 100% 饱和丁酮, 1:1, 1:2, 1:3 的饱和丁酮与丁酮的混合溶液, 100% 丁酮作展开剂, 碘作显色剂, 做十二醇聚氧乙烯醚的薄层色谱分离。

实验证明, 降低展开剂的极性, 谱带分离度提高。用 1:3 的饱和丁酮与丁酮的混合溶液作展开剂时, 分离效果好。

3.2.2 制备标准品

在 25cm \times 17cm 玻璃板上, 用 19g 硅胶 19ml 0.3% CMC 溶液和 28.8ml 蒸馏水铺制薄层板, 于 110 $^{\circ}$ C 活化 30min。用 95% 的乙醇水溶液溶解样品(十二醇聚氧乙烯醚)并点样, 以 1:3 的饱和丁酮、丁酮混合溶液作展开剂, 碘作显色剂, 收集板上某一谱带的硅胶, 用氯仿溶解、过滤并挥发掉氯仿, 用 2% 的乙醇石油醚溶液作流动相, 流速 1.5ml/min, 用 RID-2AS 示差检测器检测, 在 NH₂-柱(柱温 50 $^{\circ}$ C)上作纯度检查并收集主峰并蒸掉溶剂得到色谱纯的标准品。

将上述标准品经“场解析质谱 MS”分析确定为十二醇五聚氧乙烯醚。

薄层色谱法简单, 操作方便, 更重要的是能制备纯度很高的样品。

3.3 十二醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯的制备及纯化

十二醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯在碱性溶液中易水解, 所以萃取时先加蒸馏水振摇 2min 使 3,5-二硝基苯甲酰氯水解成酸, 再加氯仿萃取, 使大量 3,5-二硝基苯甲酸留在水相, 然后用少量氢氧化钠溶液中和, 最后用蒸馏水洗有机相至中性并蒸除氯仿。用 80% 的乙醇水溶液作流动相和溶剂, 流速 1.5ml/min, RP-C₁₈柱(柱温 50 $^{\circ}$ C), SPD-2AS 紫外检测器进行纯度检查。说明萃取产物中杂质质量很少, 其对 EO 分布几乎无影响。

用蒸除法不能完全除尽杂质, 还需做进一步萃取处理。

3.4 梯度洗脱的定性分析

3.4.1 梯度洗脱条件选择 流动相极性大, 会使所有组分冲洗出来; 极性小时, 所有组分峰保留时间延长, 很难掌握最后一个峰的保留时间; 极性强度相等的流动相又很难将所有组分有效地分离, 因此先从极性大的流动相开始, 将所有峰保留时间缩短, 再降低极性, 使所有组分峰在较短时间内都出现。

本实验从极性最大的流动相(10% 的乙醇石油醚溶液)开始逐渐降低极性(10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%), 时间间隔为 2min。

3.4.2 n 值的确定

取纯化的标准品少量加入到十二醇聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯样品($\bar{n}=3.7, 7.7, 9.8$)中, 做 HPLC 梯度洗脱, 从而确定 n 。

加入标准品, 十二醇五聚氧乙烯 3,5-二硝基苯甲酸酯峰面积增加, 据此可以判断其它色谱峰 n 值。

添加法确定 n 值简单明了, 而且由此可以研究亲水基 EO 的分布。

样品 $\bar{n}=7.7, \bar{n}=9.8$ 的 EO 分布同法研究表明十二醇聚氧乙烯醚的 EO 分布符合泊松分布。

3.5 分子量分布规律的研究:

平均聚合度的计算方法: (1)总峰面积、(2)摩尔百分数、(3)摩尔分数 \times EO 数(n)并求总和、(4)重量百分数。 $\bar{n}=3.7$ 的 EO 分布表详见表 1, 对应的分布图详见图 1。

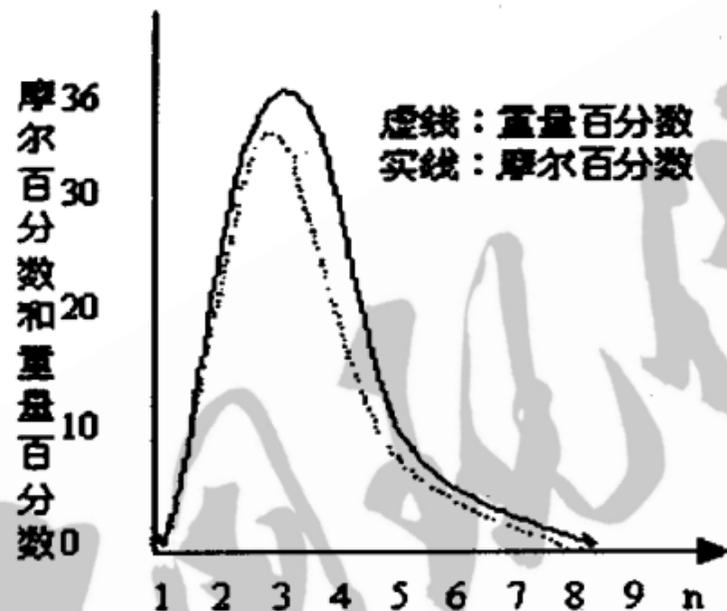


图 1 $C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_{3.7}H$ 的 EO 分布

为证实 HPLC 法确定 EO 平均数 n 的准确性, 用核磁 (NMR) 法确定的 n 值分别为 3.4, 7.4, 10.1。可见,

HPLC 与 NMR 两种方法测定的 EO 平均数基本吻合, 而且与气相色谱法测定的结果 $\bar{n}=3.2$ 的数据亦吻合。

由于时间条件的限制, 本实验只研究了平均聚合度为 10 以内的十二醇聚氧乙烯的分布, 估计聚合度为 10 以上的该类化合物用本法亦能确定 EO 分布, 但需要进一步深入研究。

通过实验, 在合成产物的纯化处理方面做了改进, 用简便的薄层色谱法制备标准物, 并建立了一个新的测定 EO 分布的液相色谱体系。这对于检测该类产品质量及应用提供一种简便快捷的方法。

收稿日期: 2001-03-14