

超支化聚合物化学键合毛细管电泳柱的制备 及其对蛋白质的分离行为

寿崇琦^{1,2}, 张志良², 周长利², 赵春宾², 李关宾¹, 陈立仁¹

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 济南大学化学化工学院, 山东 济南 250022)

摘要: 分别合成了以三羟甲基丙烷和季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯), 并对其进行了红外测定、羟值测定、粘度测定等表征。采用化学键合方法将其涂于毛细管内壁, 并测定涂层柱的电渗流以及对碱性蛋白质的分离能力, 结果表明, 涂层柱能有效地抑制碱性蛋白质在毛细管内壁上的吸附, 大大降低电渗流; 以三羟甲基丙烷为核的超支化聚(胺-酯)涂层柱的塔板数达 $10^5/m$, 而以季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)涂层柱的分离柱效更高, 塔板数达 $10^7/m$ 。实验结果表明这两类涂层柱都具有较好的分离效果和稳定性。

关键词: 毛细管电泳; 蛋白质; 涂层柱; 超支化聚合物; 化学修饰硅胶表面; 电渗流

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2004)03-0273-04

The Preparation of Chemical-Bonded Hyperbranched Polymer Coated Column for Capillary Electrophoresis and Their Application to Separation of Basic Proteins

SHOU Chongqi^{1,2}, ZHANG Zhiliang², ZHOU Changli², ZHAO Chunbin²,
LI Guanbin¹, CHEN Liren¹

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
2. Chemistry and Chemical Engineering Institute, Jinan University, Jinan 250022, China)

Abstract: A series of hyperbranched poly(amine-ester)s were synthesized using one-step and pseudo-step procedure respectively, and their molecular structures were characterized by IR, hydroxyl value and viscosity. These polymers were coated on the inner surface of the fused-silica capillaries in a chemical bonding process. The electroosmotic flow and the separation capability for basic proteins of the coated capillaries were investigated. The results demonstrated that the coating in the capillaries could greatly reduce the electroosmotic flow and effectively suppress protein adsorption in the pH range of 3 - 7. The separation efficiency of the coated capillary of hyperbranched poly(amine-ester)s with trimethylolpropane and pentaerythritol as the core was $10^5/m$ and $10^7/m$, respectively. The separation efficiency and the stability of basic proteins on these coated capillaries were found excellent.

Key words: capillary electrophoresis; protein; polymer coated column; hyperbranched polymer; chemically modified silica surface; electroosmotic flow

毛细管电泳是近年来发展最快的分离分析技术之一, 但由于毛细管内壁表面的硅羟基电离($\text{pH} > 3$)形成带负电的吸附点, 因此在分离蛋白质时, 特别是在分离带正电荷的碱性蛋白质时, 毛细管壁会对蛋白质产生吸附作用^[1-3]。这种吸附严重时会导致分离的失败。采用毛细管电泳涂层柱可有效抑制蛋白质在毛细管壁的吸附。目前, 毛细管电泳柱的涂层材料仅限于传统的聚合物, 通常随着浓度的增大粘度也随之增大, 给制柱造成困难; 而且, 传统聚

合物可供键合的活性端基数目较少, 形成的涂层稳定性较差。由于超支化聚(胺-酯)分子外围具有大量的活性端基, 具有较高的反应活性, 因而很容易与其他带有活性基团的物质反应^[4-6]。本文将端羟基的超支化聚合物用作毛细管电泳柱的涂层材料, 通过硅烷化偶联剂将其涂于毛细管柱内壁, 形成化学键合型涂层柱。所制的涂层柱在酸性条件下能有效地抑制碱性蛋白质在毛细管壁的吸附作用, 并在 $\text{pH} 3 \sim 7$ 时表现了良好的稳定性和重现性。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

丙烯酸甲酯、乙二醇胺、三羟甲基丙烷、季戊四醇、对甲苯磺酸和二甲基亚砷均为分析纯, γ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷为工业级, 细胞色素 C 和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 购自美国 Sigma 公司, 溶菌酶购自中科院上海生化所东风生化技术公司。毛细管为 51/35.5 cm \times 75 μ m i. d. 购自河北永年锐沓色谱器件有限公司。

宾达 1229 型毛细管电泳仪(北京新技术应用研究所研制); UV-214 nm 检测器; N2000 双通道色谱工作站。

1.2 超支化聚合物的合成方法

1.2.1 *N,N*-二羟乙基-3-胺基丙酸甲酯单体的制备

在三颈瓶内加入 0.5 mol 丙烯酸甲酯、0.5 mol 乙二醇胺和 50 mL 甲醇, 混合物在 35 $^{\circ}$ C 下反应 4 h, 然后抽真空除去甲醇, 即得 *N,N*-二羟乙基-3-胺基丙酸甲酯单体。

1.2.2 一步法合成超支化聚(胺-酯)

在三颈瓶内加入 87.88 mL *N,N*-二羟乙基-3-胺基丙酸甲酯单体、472.5 mg 对甲苯磺酸和 335.4 mg 三羟甲基丙烷, 升温至回流温度, 反应 4 h, 抽真空除去生成的甲醇, 即得超支化聚(胺-酯)第六代产物(G6)。若加入 166.4 mg 三羟甲基丙烷, 其他条件不变, 在同样条件下反应可得到超支化聚(胺-酯)G7。

1.2.3 准一步法合成超支化聚(胺-酯) 在三颈瓶内加入 670.85 mg 三羟甲基丙烷、45 mg 对甲苯磺

酸和 8.4 mL *N,N*-二羟乙基-3-胺基丙酸甲酯单体, 在回流状态下反应 3 h, 抽真空以除去生成的甲醇, 即得超支化聚(胺-酯)G2; 在该体系中加入 11.16 mL *N,N*-二羟乙基-3-胺基丙酸甲酯单体和 60 mg 对甲苯磺酸, 继续反应 3 h, 抽真空除去甲醇, 即得超支化聚(胺-酯)G3; 按此方法继续反应直到得超支化聚(胺-酯)G7。采用类似方法, 可获得以季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)G7。

1.3 化学键合涂层柱的制备

毛细管柱的预处理: 先用氢氟酸侵蚀毛细管柱内壁约 5 min, 接着用二次蒸馏水和甲醇顺序地清洗各 10 min, 最后用氮气将毛细管柱吹干。毛细管柱的硅烷化处理: 将偶联剂 γ -缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷涂于经预处理过的毛细管柱内, 然后将其置于气相色谱炉内, 从 50 $^{\circ}$ C 开始以 5 $^{\circ}$ C/min 的升温速率程序升温至 150 $^{\circ}$ C, 保持终点温度 3 h 进行热处理。超支化聚合物涂层柱的制备: 将超支化聚(胺-酯)涂于毛细管柱内, 按如上相同的条件进行老化处理。化学键合涂层柱的后处理: 在电泳进样前, 涂层柱用酸性缓冲溶液平衡 24 h。

1.4 试验方法

电渗流(EOF)的测定是以 1%(质量分数)的二甲基亚砷(DMSO)水溶液为中性标记物, 工作电压为 16.0 kV, 缓冲液为 0.04 mol/L 的磷酸盐溶液。碱性蛋白质在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液条件下进行分离, 分离电压 21.0 kV。

2 结果与讨论

超支化聚(胺-酯)结构如图 1 所示, 两者均为高

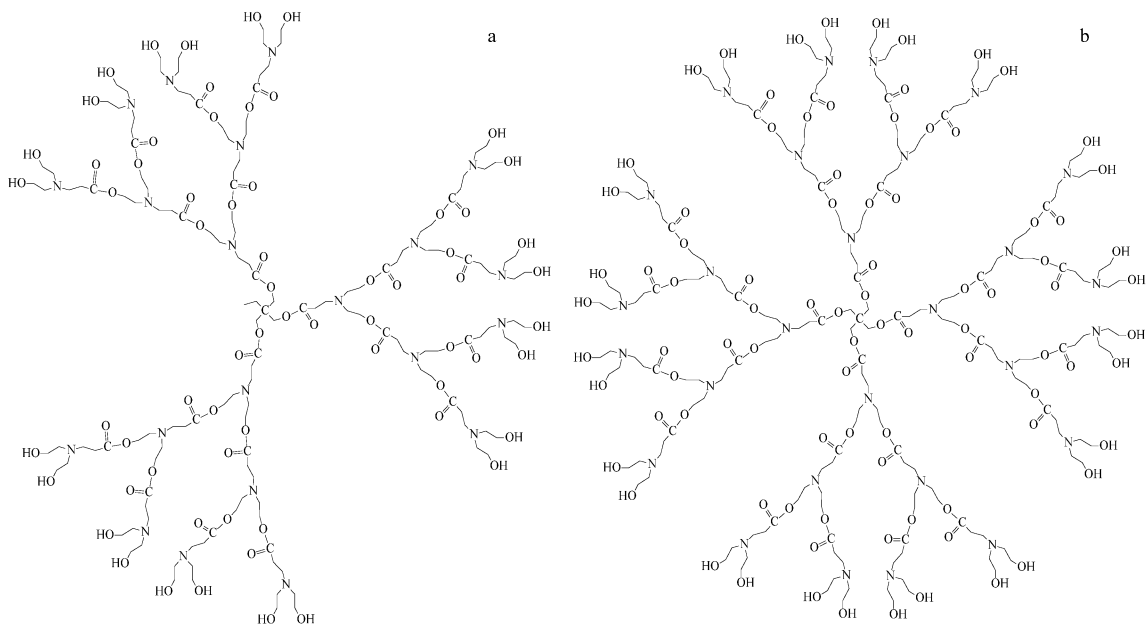


图 1 超支化聚(胺-酯)的结构

Fig. 1 Structures of hyperbranched polymer(amine-ester)s

a. trimethylolpropane as core; b. pentaerythritol as core.

度支化的三维球状结构,末端带有大量的端羟基,具有较好的亲水性和良好的溶解性能;其内部有大量的空穴,相互间链缠绕较少,具有较低的粘度。

2.1 红外谱图表征

由图2可知4种聚合物的红外谱图基本相似,均在 $3\ 250\sim 3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 出现羟基的吸收峰;在 $2\ 830\sim 2\ 950\text{ cm}^{-1}$ 出现 $\text{CH}_2\text{-N}$ 吸收带;在 $1\ 735\text{ cm}^{-1}$ 附近出现酯基上羰基的吸收峰;在 $1\ 620\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了三级胺的特征吸收带,均较强;在 $1\ 035\text{ cm}^{-1}$ 附近出现C—O的伸缩振动吸收峰;在 $1\ 200\text{ cm}^{-1}$ 附近出现C—N的吸收峰;在 874 cm^{-1} 附近出现 OCH_3 的吸收峰,从而基本验证了超支化聚(胺-酯)的结构。

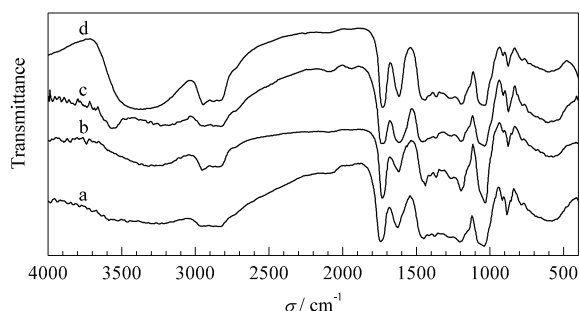


图2 超支化聚(胺-酯)的红外谱图

Fig.2 IR of hyperbranched polymer(amine-ester)s

a. G6 with trimethylolpropane as core (one-step procedure); b. G7 with trimethylolpropane as core (one-step procedure); c. G7 with trimethylolpropane as core (pseudo-step procedure); d. G7 with pentaerythritol as core (pseudo-step procedure).

图2中曲线c在 $1\ 735\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 620\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收带面积比b稍大,说明与一步法相比,准一步法合成的超支化聚合物的结构规整度较大,缺陷较少。其主要原因是超支化聚(胺-酯)的合成是在酸催化下的酯化反应,而酯化反应为平衡反应,在准一步法反应过程中不断排除生成的小分子,促使反应向生成物方向移动,从而提高了产物的规整性。曲线d在 $3\ 390$ 、 $1\ 730$ 以及 $1\ 622\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰面积均比曲线c高,这是因为以季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)的结构更紧密,具有更高的支化度,因而其合成完美结构的难度较大,合成过程中的缺陷较多,使得实际的相对分子质量(M_r)小于理论值,因而相应的各基团的含量较实际值大。

2.2 羟值的测定

采用醋酐/吡啶回流法^[7],测定了超支化聚合物的羟值(以KOH计),图2中a、b、c、d4种聚合物的实验值(括号中为理论值)分别为:365(357)、361(355)、358(355)和362(355)mg/g。实验中所测得的羟值均比理论值稍大,这主要是由于生成的超支化聚合物分子并不是理想的球形结构,其内部

存在着不规整处和缺陷,因而造成实际所得分子质量小于理论值,从而使得理论羟值小于实际羟值。与一步法相比,准一步法合成的超支化聚(胺-酯)的羟值与理论值相差较小,其主要原因是利用准一步法有利于使后加入单体的酯基有更多的机会与主干上的羟基起反应,更大程度上避免单体之间的酯缩合反应,而且中间过程中不断排除生成的副产物,使反应更完全,从而得到的超支化聚(胺-酯)的结构比用一步法合成的更规整,缺陷较少,因而其羟值比用一步法合成的超支化聚合物的羟值与理论值接近。

2.3 粘度的测定

实验测得图2中a、b、c、d4种聚合物的粘度分别为 0.261 、 0.283 、 0.853 、 $0.927\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 。由于超支化聚合物无分子链缠绕,因而粘度比同等 M_r 的线性分子低,线性分子的粘度随着 M_r 的增大迅速增加,而超支化聚合物的粘度变化幅度不大。这是由于超支化聚合物分子具有类似球形的空间分布,随分子质量的增大,其支化度高,无分子链缠绕,所以其流体力学体积变化不大,因而粘度变化不大。由于准一步法合成的超支化聚合物的纯度比一步法的纯度高,缺陷较少,因而其粘度高于一步法合成的聚合物。而对于同样的繁衍代数,以季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)的 M_r 比以三羟甲基丙烷为核的超支化聚(胺-酯)的 M_r 大,因而其粘度也较高。

2.4 化学键合涂层柱的电渗流

由于石英毛细管柱表面的硅羟基较少,所键合的硅烷化试剂数量有限,因此用氢氟酸侵蚀毛细管柱内壁,增加其硅羟基密度,使更多的硅烷化试剂能键合在毛细管内表面,从而较好地引入超支化聚合物。空柱和涂层柱的电渗流可用不同pH的 40 mmol/L 磷酸盐缓冲液来测定。由图3可见,电渗流均随pH的增高而增大,但涂层柱增加的幅度明显地低于未处理柱。与未处理的毛细管电泳柱相比,经偶联剂处理过的毛细管柱的电渗流降低较大,而

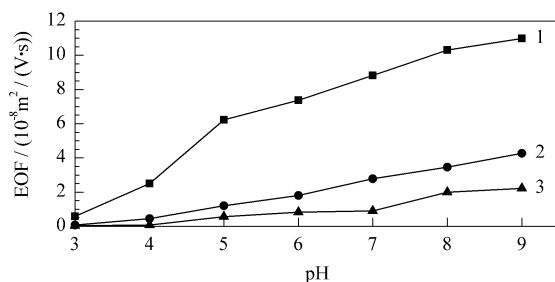


图3 缓冲溶液pH值对电渗流的影响

Fig.3 Effect of the buffer pH on electroosmotic flow

CE conditions: 0.040 mol/L phosphate buffer; capillary column ($51/35.5\text{ cm}\times 75\text{ }\mu\text{m}$ i. d.); hydrodynamic injection 15 s at 10 cm ; applied voltage 16.0 kV .

1. uncoated column; 2. KH-560 coated column; 3. hyperbranched polymer coated column.

用超支化聚(胺-酯)涂布后的化学键合涂层柱,其电渗流进一步降低,并在 pH 3~7 基本保持恒定,说明了端羟基的超支化聚合物能很好地键合于毛细管内壁,阻止了硅羟基的离解,从而大大降低了电渗流。

2.5 化学涂层柱对碱性蛋白质的分离

在 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液中,用涂层柱对细胞色素 C、溶菌酶和 α -胰凝乳蛋白酶原 A 进行了分离,结果见图 4 和表 1。与柱 a 相比,柱 b 的分离柱效和分离度均较高,峰形对称性较好,无明显的拖尾现象,说明柱 b 的分离效果明显好于柱 a。这是由

于随繁衍代数的增大,超支化聚(胺-酯)的 M_r 增大,端羟基数目增多,因此更容易与毛细管内壁官能团发生反应,形成的化学键合涂层柱的稳定性好,从而分离效果增强。与柱 b 相比,柱 c 对蛋白质的分离柱效和分离度均较高,分离时间较长,这说明由准一步法合成的超支化聚(胺-酯)的异构体数目少, M_r 小的聚合物数目较少, M_r 分布相对较窄,因而对毛细管内壁的修饰效果更好,与硅羟基反应比较完全,从而较好地阻止了硅羟基的电离,起到抑制电渗流和蛋白质吸附的目的。

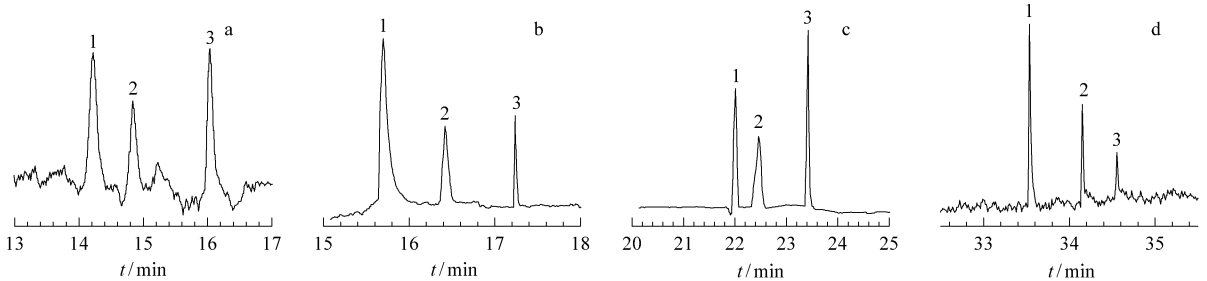


图 4 超支化聚(胺-酯)涂层柱对蛋白质的分离

Fig.4 Electropherograms of basic proteins on coated capillaries

CE conditions : applied voltage 21.0 kV ; other conditions as in Fig. 3. For a , b , c , d columns , see Fig. 2.

1. cytochrome C ; 2. lysozyme ; 3. α -chymotrypsinogen A.

表 1 涂层柱的分离柱效和分离度

Table 1 The separation efficiency and resolution for coated capillaries

| | Plate number/($10^5/m$) | | | | R_s | | | |
|------------------------------|---------------------------|------|------|-----|-------|-------|-------|-------|
| | a | b | c | d | a | b | c | d |
| Cytochrome C | 0.498 | 3.85 | 7.89 | 185 | 5.978 | 9.758 | 17.89 | 66.55 |
| Lysozyme | 0.666 | 4.30 | 5.76 | 238 | 2.588 | 7.593 | 25.49 | 29.29 |
| α -Chymotrypsinogen A | 0.936 | 5.60 | 8.38 | 218 | 4.275 | 8.072 | 20.19 | 28.46 |

For a , b , c , d columns , see Fig. 2.

对于以三羟甲基丙烷和季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)G7,两者的羟值相差不大,但因后者的 M_r 较大,羟基较多,因而形成的涂层能更好地覆盖毛细管内壁上的硅羟基,更好地抑制蛋白质的吸附作用,因而柱 d 的分离柱效和分离度明显高于柱 c。

2.6 化学涂层柱的迁移时间重现性

表 2 是以季戊四醇为核的超支化聚(胺-酯)G7 涂层柱对碱性蛋白质细胞色素 C、溶菌酶、 α -胰凝乳蛋白酶原 A 迁移时间重现性结果。可以看出,同一天内各次运行之间的迁移时间的相对标准偏差 (RSD) 小于 0.5%, 日间 RSD 小于 1.2%, 柱与柱之间的 RSD 小于 0.8%。将该涂层柱充满 pH 5.0 的

磷酸盐溶液,放置 30 d 后,测其电渗流,其 RSD 小于 3.0%,蛋白质的分离效率只下降 20%;放置 60 d 后,测其电渗流,其 RSD 小于 5.0%,蛋白质的分离效率只下降 30%,说明该涂层柱使用寿命较长。

参考文献 :

[1] Fu Ruonong , Gu Junling. The Modern Chromatography Analysis. Beijing : National Defence Industry Press (傅若农 , 顾峻岭. 近代色谱分析. 北京 : 国防工业出版社), 1998. 280

[2] Kang Jingwu , Ou Qingyu. Chinese Journal of Analytical Chemistry (康经武 , 欧庆瑜. 分析化学), 1996 , 24(2) : 144

[3] Kang Jingwu , Lu Haojie , Liang Bing , Ou Qingyu. Chinese Journal of Analytical Chemistry (康经武 , 陆豪杰 , 梁冰 , 欧庆瑜. 分析化学), 2000 , 28(10) : 1189

[4] Shi Wenfang , Huang Hong. Chemical Journal of Chinese Universities (施文芳 , 黄宏. 高等学校化学学报), 1997 , 18 (8) : 1398

[5] Lu Yu , Lin De , Wei Huanyu , Shi Wenfang. Acta Polymerica Sinica (陆玉 , 林德 , 魏焕郁 , 施文芳. 高分子学报), 2000 , (4) : 411

[6] Stutz H , Iller K H , Mertes J. J Polym Sci : Part B : Polym Phys , 1990 , 28 : 1483

[7] Yu Xiaowei , Hu Qiaoling , Fu Yanbin , Zhu Yongqun. Polyurethane Industry (俞晓薇 , 胡巧玲 , 傅彦彬 , 朱永群. 聚氨酯工业), 1997 , 12(1) : 44

表 2 碱性蛋白质在涂层柱上的迁移时间的重现性

Table 2 Reproducibility of migration time on coated column for basic proteins

| Protein | Reproducibility (RSD/%) | | |
|------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| | run to run (n = 5) | day to day (n = 3) | column to column (n = 3) |
| Cytochrome C | 0.405 | 1.145 | 0.75 |
| Lysozyme | 0.337 | 1.136 | 0.58 |
| α -Chymotrypsinogen A | 0.330 | 1.180 | 0.65 |

Conditions are the same as in Fig. 4.