

Lewis 碱改性氧化锆基质色谱固定相的研究进展

胡玉玲¹, 冯钰琦², 达世禄²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275 ; 2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要 综述了 Lewis 碱改性氧化锆(或其复合氧化物)基质高效液相色谱填料的研究进展,涉及的改性剂包括氟离子、磷酸盐、有机膦酸、羧酸、酚类化合物、蛋白质和环糊精衍生物等。简要介绍了 Lewis 碱改性氧化锆固定相在毛细管电色谱中的应用。引用文献 51 篇。

关键词 Lewis 碱;氧化锆;固定相;高效液相色谱;综述

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)03-0234-04

Development of Lewis Base-Modified Zirconia as Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography

HU Yuling¹, FENG Yuqi², DA Shilu²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China ;

2. School of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract : The developments of the Lewis base-modified zirconia and mixed-oxide containing zirconia as stationary phases for high performance liquid chromatography (HPLC) are reviewed. Zirconia supports for HPLC based on modification with fluoride, phosphate, phosphonate, carboxylic acid, phenols, and protein, as well as cyclodextrin derivative, are covered. The application of modified-zirconia in capillary electrochromatography (CEC) is also discussed. Fifty-one references are cited.

Key words : Lewis base ; zirconia ; stationary phase ; high performance liquid chromatography ; review

硅胶是目前应用最为广泛的高效液相色谱填料,它的主要优点是机械强度高、比表面积大,孔结构、孔径和孔容易于控制,通过表面改性可获得各种功能固定相。但硅胶在碱性条件下的不稳定性及对碱性化合物的不可逆吸附作用限制了它在一些重要领域的应用。为此,人们一直在寻找替代硅胶的新材料作为色谱填料的基质。Nawrocki 等^[1,2]对超稳定性金属氧化物色谱固定相进行了详细综述。

氧化锆以其优良的酸碱稳定性、热稳定性和独特的表面化学性质成为其中研究最多的新型色谱填料之一。国外 Unger 等^[3]和 Carr 等^[4]对氧化锆色谱填料的研究工作开展较早,目前,在正相^[5]、反相^[6]、离子交换^[7]及亲和^[8]色谱等方面的研究和应用已取得较大进展。武汉大学率先在国内开展这方面的研究^[9],此外,南开大学^[10]、中国科学院兰州化学物理研究所^[11]、北京化工大学^[12]也有相关的研究工作。

通过硅烷化反应对硅胶表面进行改性是制备得到不同色谱性能硅胶基质固定相的基础。Unger 等^[6]和 Yu 等^[13]曾先后采用类似的方法制备了 C18 键合氧化锆固定相。但由于氧化锆的表面性质与硅胶存在较大差异,针对硅胶基质发展起来的表面修饰方法不能完全适用于氧化锆基质。Carr 小组^[14,15]研究了聚合物涂覆氧化锆固定相,部分已商品化,可在高温或高 pH 值等极端条件下实现快速分离。但正如硅胶基质固定相很难避免对碱性化合物的非特异性吸附作用,以上方法制备的氧化锆固定相对酸性化合物存在不可逆吸附作用。通过 Lewis 酸碱作用对氧化锆表面进行改性是解决这一问题的重要途径。

1 氧化锆的表面化学性质

氧化锆的表面化学性质远比硅胶复杂,在其表面同时存在着 Bronst 酸、Bronst 碱和 Lewis 酸活性

中心。在氧化锆表面 Zr(IV) 表现为 Lewis 酸位点, 具有较强的正电性, 可接受供电性 Lewis 碱的孤对电子形成配位络合物, 对其色谱性能产生重要影响。Blackwell 等^[16,17]对氧化锆表面 Lewis 酸碱化学进行了详细的研究, 发现取代苯甲酸等 Lewis 碱性化合物在氧化锆上吸附很强, 对这一类化合物的分离造成一定困难。从另一个角度考虑, 将这些强 Lewis 碱性化合物作为流动相添加剂或吸附在氧化锆固定相表面, 不仅可以有效掩蔽氧化锆表面的 Lewis 酸性中心, 改性剂本身所具有的分子结构还可为固定相提供新的保留机理和分离选择性。Blackwell 和 Carr 等^[18]以取代苯甲酸为溶质, 建立了流动相为 pH 6.1 时 37 种洗脱剂的洗脱能力系列。结果表明与氧化锆结合能力强的 Lewis 碱如 PO_4^{3-} 及 F^- 的洗脱能力最强, 洗脱能力的强弱顺序与软硬酸碱理论基本一致。他们的研究结果为氧化锆表面改性剂的选择提供了重要的依据。目前, 用于氧化锆表面改性的 Lewis 碱种类主要有: 氟离子、磷酸盐、有机膦酸、羧酸及酚类化合物等。

2 Lewis 碱改性氧化锆基质固定相

2.1 氟离子动态改性氧化锆固定相

Blackwell 等^[19]研究了 F^- 在氧化锆表面的吸附特征, 结果表明溶液 pH 值较低时 F^- 吸附较为牢固, 碱性条件下则容易从氧化锆表面洗脱。在此研究基础上, 他们制备了适合于蛋白质分离的 F^- 动态改性氧化锆固定相^[20]。流动相中 F^- 的存在克服了蛋白质在氧化锆固定相上的不可逆吸附现象, 色谱峰形也有所改善。蛋白质在改性固定相上的保留机理类似于羟基磷灰石, 增加流动相中 F^- 浓度, 蛋白质保留减弱。该固定相能保持蛋白质的生物活性, 回收率高。

2.2 磷酸盐及多磷酸盐改性氧化锆固定相

Schafer 等^[21]采用光谱技术对 PO_4^{3-} 改性氧化锆填料进行了表征。在室温和中性溶液条件下, PO_4^{3-} 仅仅吸附在氧化锆表面; 当 PO_4^{3-} 和氧化锆基质在较高温度下长时间反应后, 从 ^{31}P 核磁共振谱图上可观察到磷酸酯共价键的形成。与羟基磷灰石的混合机制分离模式不同, 磷酸盐改性氧化锆固定相呈现典型的阳离子交换作用, 因此适合于等电点较高的蛋白质的分离^[22]。由于磷酸根有效阻止了阴离子的吸附, 从而保证了蛋白质与酶的回收率与活性。虽然在碱性条件下磷酸根易脱附, 但流动相中保持一定浓度的 PO_4^{3-} 即可弥补这一点。Blackwell 和 Carr 等^[23]还研究了氨基酸在磷酸盐改性氧化锆固定相上的配体交换色谱性能。

在众多氧化锆色谱固定相中, Carr 研究组^[24]对聚丁二烯涂覆氧化锆(PBD-ZrO₂)的研究最为深入, 并取得较大成功。作为与 ODS 固定相分离性能类似的反相色谱固定相, 它的 pH 使用范围为 0~14, 最高使用温度可达到 200 °C。但由于氧化锆表面残余较多的 Lewis 酸性中心, PBD-ZrO₂ 在分离多肽和蛋白质时存在不可逆吸附现象。通过在流动相中添加一定浓度的 PO_4^{3-} 可减少 Lewis 酸碱作用, 增加回收率。此时固定相呈反相和阳离子交换双重保留机理, 依据不同的分离机理, PO_4^{3-} 改性 PBD-ZrO₂ 固定相对中性肽混合物和阳离子型肽都取得了较好效果, 但由于二级平衡过程导致色谱峰展宽^[25]。

Unger 等^[26]采用链长 3 到 100 之间的多磷酸盐改性氧化锆作为核酸和蛋白质的亲和色谱固定相, 实验发现当溶液中没有添加 Mg^{2+} 时, 单链核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)保留较弱; 而当溶液中含有一定量的 Mg^{2+} 或其他二价阳离子时, 它们在固定相上的保留明显增强; 但是无论溶液中是否含有 Mg^{2+} , 双链 DNA 保留都很弱。通过调整流动相的 pH 值和离子强度, 多磷酸盐改性氧化锆固定相适合碱性、中性和酸性蛋白质的分离。该填料在 pH 3~11 时使用 120 h 后稳定性良好, 可用于蛋白质的制备分离。

2.3 有机膦酸改性氧化锆及其复合氧化物固定相

Trammell 等^[27]将乙烯基膦酸单体吸附在 PBD-ZrO₂ 固定相表面, 然后进行交联, 流动相中即使不添加 Lewis 碱改性剂, 也能使儿茶酚和羧酸等强 Lewis 碱化合物完全洗脱, 但色谱峰拖尾现象仍然严重。

Clausen 和 Carr^[28]采用乙二胺-N,N'-四亚甲基膦酸(EDTPA)吸附改性氧化锆固定相(PEZ)分离蛋白质。与 PO_4^{3-} 改性氧化锆填料(ZrPO_4)类似, 固定相表现出阳离子交换作用, 只对等电点高于 6.8 的蛋白质有保留。表面螯合剂功能基使固定相表现出独特的分离选择性, 蛋白质回收率高, 色谱柱效也较高。与磷酸盐改性氧化锆相比, 大分子功能基有效掩蔽了氧化锆表面强 Lewis 酸性吸附中心。分子中氮原子的存在使固定相的电负性降低, 对碱性蛋白质的保留弱于 PO_4^{3-} 改性氧化锆固定相, 但分离选择性更高^[28]。该研究小组将该固定相用于从转铁蛋白和牛血清白蛋白基质中提纯单克隆抗体^[29], 通过一次色谱分离, 回收率可达 92%~98%, 纯度高于 95%。该固定相还可用于细胞培养上层液中单克隆抗体的制备分离^[30], 实验结果表明 EDT-PA 改性氧化锆适用于生物活性物质的分离和提纯。

武汉大学冯钰琦等在氧化锆填料的制备、色谱性能及 Lewis 碱改性氧化锆固定相的研究中做了许多工作。研究过程中发现,氧化锆的孔结构表现为孔体大孔颈小的“墨水瓶状”,作为 HPLC 填料不理想。针对氧化锆填料孔结构的缺陷,冯钰琦等^[31,32]将氧化镁、氧化铈等掺杂到氧化锆中,在分子水平上制备得到镁锆和铈锆等复合氧化物色谱填料。不仅改善了氧化锆的孔结构,增加了比表面积,且填料的表面碱性增强,对酸性化合物的保留更强。利用以上特点,冯钰琦等^[33-37]又制备了烷基膦酸改性镁锆和铈锆复合氧化物疏水性固定相;由于色谱填料基质与配体之间存在很强的 Lewis 酸碱作用和疏水作用,固定相在 pH 2~11 时稳定性较好,不需要在流动相中添加烷基膦酸;用于碱性化合物^[33,36]、稠环芳烃^[33,36]、碱基和核苷^[35]的分离,取得了满意效果。文献[33]给出了 7 种碱性化合物在烷基膦酸改性镁锆复合氧化物固定相上的色谱分离图,色谱峰无拖尾现象,分离效果优于 ODS 固定相,表明了氧化锆基质固定相对碱性化合物的分离比硅胶基质固定相更具优势。

在以上工作的基础上,以磷霉素为间隔基制备了 β -环糊精改性镁锆复合氧化物固定相(CD-ZrO₂-MgO)^[38]。与磷霉素改性镁锆复合氧化物固定相的色谱性能相比,CD-ZrO₂-MgO 对位置异构体表现出独特的分离选择性,环糊精的包容配合作用起了主要作用。最近,又以十二胺-*N,N'*-二亚甲基膦酸(DDPA)为配体,利用 Lewis 酸碱作用吸附改性氧化锆,得到外层疏水性、内层极性的固定相,用于位置异构体的分离,分离过程中存在疏水作用、离子交换作用、偶极作用以及电荷排斥作用等多种保留机理^[39]。

Xiang 等^[40]采用类似的方法,以葡萄糖-6-磷酸改性氧化锆得到正相色谱固定相,以辛基膦酸和十八烷基膦酸改性氧化锆得到反相色谱固定相,并采用线性自由能关系分别比较了它们与二醇基、C₈和 C₁₈键合硅胶固定相的色谱性能。十八烷基膦酸改性氧化锆比辛基膦酸改性氧化锆在反相色谱条件下的稳定性更好,表明除 Lewis 酸碱作用外,疏水作用对 Lewis 碱改性氧化锆固定相的稳定性也有较大影响。

2.4 硬脂酸改性氧化锆及铈锆复合氧化物固定相

硬脂酸一端为羧酸结构,另一端为长链烷基,分子的总碳数为 18。冯钰琦等^[32,41]以硬脂酸改性氧化锆及铈锆复合氧化物后,得到反相色谱固定相,用于多环芳烃及碱性化合物的分离。硬脂酸改性铈锆复合氧化物固定相^[32]的疏水性能和色谱柱效比硬

脂酸改性的氧化锆固定相^[41]明显提高,对碱性化合物的分离选择性优于 ODS 固定相,洗脱顺序也有差异。

2.5 酚类化合物改性锆基质复合氧化物固定相

富勒烯(C₆₀,C₇₀)的分离纯化一直受到人们的极大关注。目前用于富勒烯分离的固定相主要是键合硅胶固定相,其中,衍生化卟啉键合硅胶固定相有最好的分离选择性^[42],但制备难度大、成本相对较高。作为制备分离用的固定相,必须同时考虑分离选择性和分离成本。冯钰琦等^[43,44]利用锆基质复合氧化物表面的 Lewis 酸性特征,以不同性质的酚类化合物对其表面改性,得到多种电荷转移型色谱固定相,用于 C₆₀,C₇₀的分离分析,并探讨了该类固定相用于 C₆₀,C₇₀制备分离的可能性。文献[43]给出了进样量过载情况下 C₆₀,C₇₀在常规分析柱上的色谱分离图,C₆₀,C₇₀得到了很好的基线分离。由于该固定相制备过程简单、廉价、易于再生,因此对 C₆₀,C₇₀的制备分离有一定的应用前景。

2.6 其他 Lewis 碱改性氧化锆固定相

F⁻和 PO₄³⁻是最强的 Lewis 碱,流动相中添加了这两种配体后,几乎所有蛋白质都能在较短时间内从氧化锆填料上洗脱,流动相强度的可调范围相对较窄。Blackwell 等^[45]研究了 BO₃³⁻、SO₄²⁻、Br⁻等中等或弱 Lewis 碱性添加剂对蛋白质保留的影响,Lewis 碱性较弱的蛋白质的分离效果得到改善,但 Lewis 碱性强的蛋白质不能洗脱。

Park 等^[46]制备了羧甲基 β -环糊精涂覆氧化锆固定相,分离了外消旋 2,4-二硝基苯基氨基酸。此外,该研究小组将牛血清白蛋白(BSA)吸附在氧化锆表面,然后用戊二醛交联(交联对稳定蛋白质的构象和防止蛋白质变性有一定的作用),用于分离樟脑磺酸和降麻黄碱等对映异构体,取得了很好的分离效果^[47]。

3 Lewis 碱改性氧化锆基质固定相在毛细管电色谱中的应用

毛细管电色谱(CEC)是近年来发展较快的新型微分离分析方法,柱技术的研究是 CEC 发展的关键因素。目前,CEC 中所用固定相主要为硅胶基质填料。冯钰琦等成功地将氧化锆及其复合氧化物作为 CEC 固定相制备得到了开管柱^[48,49]、填充柱^[50]和整体柱^[51],研究了电渗流的变化和分离性能。在此基础上还制备了烷基膦酸改性镁锆复合氧化物 CEC 开管柱^[52]、填充柱^[50]和整体柱^[51],与未改性镁锆复合氧化物 CEC 柱相比,电渗流有明显变化,适合于分离碱性化合物和多环芳烃化合物。文献

[51]给出了烷基磷酸改性氧化锆毛细管整体柱分离生物碱的谱图,5种生物碱得到了很好的分离。

4 展望

利用 Lewis 酸碱作用对氧化锆表面改性是制备不同分离性能固定相的重要途径。该方法不仅制备过程简便,而且能有效覆盖氧化锆表面的 Lewis 酸性中心,减少吸附。目前这方面的研究工作还不是很多,一个重要的原因是改性所用的 Lewis 碱配体种类有限。因此,根据分离需要设计并合成含不同官能团的 Lewis 碱配体是发展的重要方向。与硅胶基质相比,氧化锆色谱填料的研究相对较少,基质的制备技术还不够成熟,因此发展孔结构合理、孔径可控、比表面积大、适合于 Lewis 碱吸附改性的氧化锆基质具有重要意义。此外,由于配体与基质之间没有化学键合作用,色谱分离过程中需要考察固定相的稳定性。

参考文献:

[1] Nawrocki J, Dunlap C, McCormick A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 2004, 1028(1):1

[2] Nawrocki J, Dunlap C, Li J, Zhao J, McNeff C V, McCormick A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 2004, 1028(1):31

[3] Unger K K, Trüedinger U. *Chem Anal*, 1989, 98:145

[4] Rigney M P, Weber T P, Carr P W. *J Chromatogr*, 1989, 484:273

[5] Grun M, Kurganov A A, Schacht S, Schuth F, Unger K K. *J Chromatogr A*, 1996, 740:1

[6] Trüedinger U, Müller G, Unger K K. *J Chromatogr A*, 1990, 535:111

[7] Hu Y, Carr P W. *Anal Chem*, 1998, 70(9):1934

[8] Glavanovich M H, Carr P W. *Anal Chem*, 1994, 66(15):2584

[9] Zhang Qinghe, Feng Yuqi, Da Shilu. *Chinese Journal of Chromatography*(张庆合,冯钰琦,达世禄.色谱), 1999, 17(3):284

[10] Yang Junjiao, Zuo Yumin. *Chemical Journal of Chinese Universities*(杨俊佼,左育民.高等学校化学学报), 2000, 21(12):1852

[11] Dun Huijuan, Han Xiaoqian, Liu Chunhui, Li Yongmin, Chen Liren. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*(敦惠娟,韩小茜,柳春辉,李永民,陈立仁.分析化学), 2003, 31(8):901

[12] Lei Shulei, Yu Shilin, Li Qianyi, Yang Yi. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*(雷姝蕾,于世林,李倩怡,杨屹.分析化学), 2001, 29(10):1129

[13] Yu J, Ei Rassi Z. *J Chromatogr A*, 1993, 631:91

[14] Li J W, Carr P W. *Anal Chem*, 1997, 69(5):837

[15] Xiang Y Q, Yan B W, Yue B F, McNeff C V, Carr P W, Lee M L. *J Chromatogr A*, 2003, 983:83

[16] Blackwell J A, Carr P W. *J Liq Chromatogr*, 1991, 14(15):2875

[17] Blackwell J A, Carr P W. *Anal Chem*, 1992, 64(8):853

[18] Blackwell J A, Carr P W. *Anal Chem*, 1992, 64(8):863

[19] Blackwell J A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 1991, 549:43

[20] Blackwell J A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 1991, 549:59

[21] Schafer W A, Carr P W, Funkenbusch E F, Parson K A.

J Chromatogr A, 1991, 587(2):137

[22] Schafer W A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 1991, 587(2):149

[23] Blackwell J A, Carr P W. *J Liq Chromatogr*, 1992, 15(5):727

[24] Rigney M P, Weber T P, Carr P W. *J Chromatogr*, 1989, 484:273

[25] Sun L F, Carr P W. *Anal Chem*, 1995, 67(15):2517

[26] Lorenz B, Marme S, Muller W E G, Unger K, Schroeder H C. *Anal Biochem*, 1994, 216(1):118

[27] Trammell B C, Hillmyer M A, Carr P W. *Anal Chem*, 2001, 73(14):3323

[28] Clausen A M, Carr P W. *Anal Chem*, 1998, 70(2):378

[29] Clausen A M, Subramanian A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 1999, 831(1):63

[30] Subramanian A, Carr P W, McNeff C V. *J Chromatogr A*, 2000, 890(1):15

[31] Zhang Q H, Feng Y Q, Da S L. *Chromatographia*, 1999, 50:654

[32] Hu Y L, Feng Y Q, Wan J D, Da S L, Hu L. *Talanta*, 2001, 54(1):79

[33] Feng Y Q, Fu H J, Zhang Q H, Da S L, Zhang Y J. *Chromatographia*, 2000, 52:165

[34] Fu Hongjing, Feng Yuqi, Zhang Qinghe, Da Shilu, Zhang Youjie. *Chinese Journal of Chromatography*(付红靖,冯钰琦,张庆合,达世禄,张友杰.色谱), 2000, 18(3):194

[35] Fu H J, Feng Y Q, Zhang Q H, Da S L, Zhang Y J. *Anal Lett*, 1999, 32(14):2761

[36] Hu Y L, Feng Y Q, Da S L. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2001, 24(7):957

[37] Hu Y L, Feng Y Q, Wan J D, Da S L. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2002, 25(1):83

[38] He H B, Zhang W N, Da S L, Feng Y Q. *Anal Chim Acta*, 2004, 513(2):481

[39] Yao L F, He H B, Feng Y Q, Da S L. *Talanta*, 2004, 64(1):244

[40] Xiang D, Tang L Y, Blackwell J A. *J Chromatogr A*, 2002, 953:67

[41] Zhang Qinghe, Feng Yuqi, Yan Li, Da Shilu. *Chinese Journal of Chromatography*(张庆合,冯钰琦,严俐,达世禄.色谱), 1999, 17(3):229

[42] Coutant D E, Clarke S A, Francis A H, Meyerhoff M E. *J Chromatogr A*, 1998, 824(2):147

[43] Hu Y L, Feng Y Q, Wan J D, Da S L. *Anal Sci*, 2001, 17(Suppl):a321

[44] Wan Jiandi, Feng Yuqi, Hu Yuling, Da Shilu, Wang Zhonghua. *Chemical Journal of Chinese Universities*(万剑砥,冯钰琦,胡玉玲,达世禄,王忠华.高等学校化学学报), 2002, 23(7):1259

[45] Blackwell J A, Carr P W. *J Chromatogr A*, 1992, 596:27

[46] Park S Y, Park J K, Park J H, McNeff C V, Carr P W. *Microchemical Journal*, 2001, 70(3):179

[47] Park J H, Ryu J K, Park J K, McNeff C V, Carr P W. *Chromatographia*, 2001, 53:405

[48] Xie M J, Feng Y Q, Da S L. *J Sep Sci*, 2001, 24(1):62

[49] Xu L, Feng Y Q, Shi Z G, Da S L, Gu J M. *Anal Chim Acta*, 2004, 514(2):179

[50] Xia D S, Feng Y Q, Da S L. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2001, 24(13):1881

[51] Shi Z G, Feng Y Q, Xu L, Zhang M, Da S L. *Talanta*, 2004, 63(3):593

[52] Xie M J, Feng Y Q, Da S L, Meng D Y, Ren L W. *Anal Chim Acta*, 2001, 428(2):255