

一种聚甲基丙烯酸酯类亲水作用毛细管 电色谱整体柱的制备与评价

黄桂华¹, 陈思谨², 林旭聪^{2*}, 谢增鸿²

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108 ;

2. 福州大学食品安全与环境监测技术研究所, 福建 福州 350108)

摘要 :以 2-羟基乙基甲基丙烯酸酯(HEMA)为单体 ,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂 ,制备了亲水分离模式的聚 HEMA-co-EDMA 新型毛细管电色谱(CEC)整体柱。考察了整体柱的结构特征及其 CEC 性能 ,研究了极性物质的保留行为 ,并对其可能的保留机理进行了探讨。所制备的整体柱稳定性好 ,固定相表面带有极性羟基功能团 ,不仅能提供亲水相互作用位点 ,且能吸附流动相中的阴离子产生阳极电渗流(EOF)。在流动相中乙腈含量较高(>62% ,体积分数)的条件下 ,整体柱表现出典型的亲水作用 ,实现了对核苷、碱基和苯胺类带有碱性的强极性化合物的高效分离 ,并成功分离了苯酚类、苯甲酸类等中性或酸性的极性化合物。

关键词 :毛细管电色谱 ;亲水作用 ;聚合整体柱

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)12-1173-06

Preparation and evaluation of a polymethacrylate based monolithic column for hydrophilic interaction capillary electrochromatography

HUANG Guihua¹, CHEN Sijin², LIN Xucong^{2*}, XIE Zenghong²

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China ;

2. Institute of Food Safety and Environmental Monitoring, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract : A hydrophilic monolithic column was prepared by *in-situ* polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as a cross-linking agent in the fused-silica capillary. The monolithic column was evaluated as a hydrophilic interaction capillary electrochromatography (HI-CEC) stationary phase for polar solutes. The polar sites on the surface of the monolithic stationary phase responsible for hydrophilic interactions were provided from the hydroxy groups on the surface of the monolithic stationary phase. These polar functionalities also attract ions from the mobile phase and impart the monolithic stationary phase with a given zeta potential to generate electro-osmotic flow (EOF). The characterization and the performance of the poly(HEMA-co-EDMA) monolithic column were carried out. The electrochromatographic retention behaviors of polar solutes were investigated and the retention mechanism was also studied. Hydrophilic interaction was observed at high acetonitrile content (> 62% , v/v). The results also show that the monolithic column can effectively separate polar solutes including phenols, benzoic acids, anilines, nucleosides and nucleic acid bases under HI-CEC mode.

Key words : capillary electrochromatography (CEC) ; hydrophilic interaction ; polymer-based monolithic column

* 通讯联系人 : 林旭聪 , 博士 , 副教授 , 研究方向为现代色谱分离 . Tel : (0591) 22866131 , E-mail : xulin@fzu.edu.cn.

基金项目 : 福建省自然科学基金项目(No. 2009J05072).

收稿日期 : 2010-09-03

毛细管电色谱(CEC)结合了高效液相色谱(HPLC)的高选择性和毛细管电泳(CE)的高效性,是当今微分离领域的研究热点^[1]。毛细管色谱柱作为CEC的核心,其新型固定相及分离模式的研究是当前CEC研究的前沿热点。

毛细管整体柱克服了开管柱相比不足的缺点,同时避免了填充柱需制作塞子的步骤,具有制备简单、渗透性好、柱效高等优点^[2-5]。亲水作用毛细管电色谱(HI-CEC)是针对极性化合物分离困难而发展的一种新的分离模式^[6-10]。HI-CEC的分离模式类似于正相色谱,采用极性较强的固定相和有机溶剂含量较高的含水流动相;固定相可有效保留极性物质,解决了分离极性化合物时反相CEC为增加极性物质在非极性疏水固定相的保留而普遍采用有机相含量很低的流动相所导致的极易产生气泡、反相整体固定相容易塌陷等问题^[11]。目前已有HI-CEC硅胶柱^[8,9,12]和有机聚合整体柱^[10,13-17]得到了良好的发展,已成功应用于蛋白质、核苷、低聚寡糖等极性化合物的分离分析,并取得良好的分离效果。发展亲水作用整体柱对极性化合物分离具有重要的意义。

本文基于原位聚合技术,以2-羟甲基乙甲基丙烯酸酯(HEMA)为单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,制备了一种新型聚甲基丙烯酸酯类的毛细管整体柱——聚HEMA-co-EDMA亲水作用CEC整体柱。所制备的整体固定相表面带有极性羟基功能团,不仅能提供亲水相互作用位点,而且能吸附流动相中的阴离子产生阳极电渗流(EOF)。聚HEMA-co-EDMA亲水作用整体柱可以实现对强极性的核苷、碱基和苯胺类化合物的高效分离,也可以对苯酚类、苯甲酸类等极性化合物进行分离。

1 实验部分

1.1 仪器

TrisepTM-2100GV 加压毛细管电色谱仪(美国Unimicro公司);内径100 μm、外径375 μm的熔融石英毛细管(河北永年锐沓色谱器件有限公司);超级恒温水浴(江苏金坛医疗仪器厂);XL30ESEM电子扫描显微镜(荷兰FEI公司);PHS-3C型精密酸度计(上海大普仪器有限公司);可调式移液器(上海热电仪器有限公司);QL-901旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂)。

1.2 试剂与材料

HEMA、EDMA、甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅

烷(γ -MAPS)均为分析纯(美国ACROS公司);偶氮二异丁腈(AIBN,上海试剂四厂);环己醇、十二醇(均为分析纯,天津市光复精细化工研究所);乙腈(ACN)、甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);1,3,5-三叔丁基苯(纯度99.5%,日本东京化成工业株式会社)。腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷和次黄嘌呤核苷(均为分析纯,美国Sigma公司)。甲苯、苯胺、二苯胺、邻苯二胺、对苯二胺、麝香草酚、苯酚、邻苯二酚、对苯二酚、邻苯三酚、间苯三酚、苯甲酸、3,5-二硝基水杨酸、对羟基苯甲酸、没食子酸均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.3 毛细管整体柱的制备

毛细管内壁的预处理:根据文献[13]的方法,采用具有双官能团的 γ -MAPS试剂,在毛细管内壁键合上一层带烯基官能团的硅烷化试剂。

毛细管整体柱的制备:将功能单体HEMA与交联剂EDMA(4:1, v/v),致孔剂环己醇与十二醇(3:7, v/v)以及引发剂AIBN(占单体与交联剂的质量分数为1%)混合,用涡旋混合器混匀,超声处理15~20 min,用0.22 μm微孔滤膜过滤。将过滤好的填料注入预处理过的毛细管中,控制注入液柱长度约30 cm,将毛细管两端密封,浸于60℃水浴中反应8 h。反应完成后,以甲醇为流动相,冲洗毛细管柱约1 h,去除床层内残留的致孔剂、未反应的单体及低聚合度物质。

在距整体柱一端约25 cm处用加热器除去约2 mm的毛细管外壁聚酰亚胺涂层作为检测窗。毛细管柱总长为55 cm,有效长度为30 cm。

1.4 色谱条件

流动相为乙腈-5 mmol/L磷酸三乙胺(TEAP)缓冲液(pH 7.5)。流动相使用前用0.22 μm微膜过滤,超声脱气20 min。实验前整体柱用流动相平衡30 min。应用电压从0逐渐升到10 kV,然后在10 kV运行。每次更换流动相时先用新的流动相平衡30 min,柱温保持室温。

2 结果与讨论

2.1 制备条件的优化

实验对制备整体柱的单体与交联剂以及致孔剂之间的配比进行了优化。考察了致孔剂环己醇与十二醇的比例在2:8~6:4范围内变化对整体柱通透性和柱效的影响。分别以不保留物质甲苯的出峰时间和丙烯酰胺的有效塔板数来评价整体柱的通透性和柱效。结果显示,随着致孔剂环己醇与十二醇比

例的增大,甲苯的出峰时间逐渐减小,说明整体柱的通透性变好,丙烯酰胺的有效塔板数随着环己醇比例的增大而逐渐减小,说明整体柱的柱效变差。综合二者的结果,实验选择致孔剂环己醇与十二醇的体积比为 3:7。实验还考察了单体与交联剂的体积比从 7:1 变化到 2:1 时,对整体柱通透性、EOF、柱效和固定相极性大小的影响。综合优化结果后选择单体与交联剂比例为 4:1。

2.2 整体柱特征分析

2.2.1 形态分析

图 1 是制备的聚 HEMA-co-EDMA 整体柱的横截面扫描电镜图。从图 1 中可以看出该聚合物整体柱具有高度交联的多孔结构,聚合物颗粒聚集在一起构成整体,在小颗粒形成的大块之间有不等的大孔,保证整体柱有良好的通透性。所制备的整体柱结构均匀,该聚合物整体柱床与毛细管壁紧密结合,既有小颗粒与“簇”之间形成的中孔,又有小颗粒与小颗粒之间形成的微孔,可以使溶质和固定相充分地相互作用以利于分离。

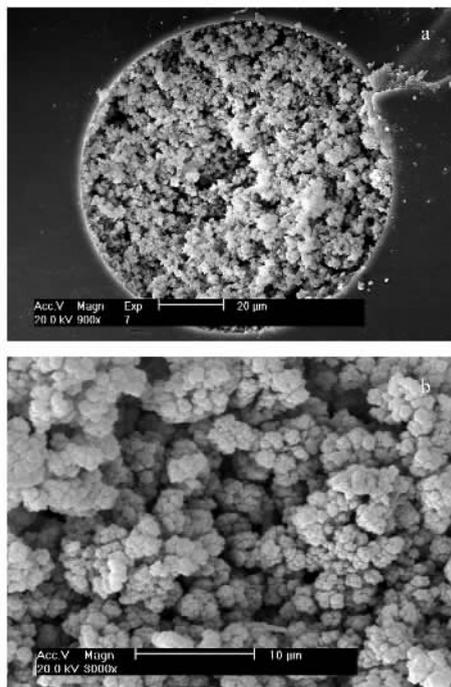


图 1 整体柱的横截面扫描电镜照片

Fig. 1 SEM photographs of the monolith column
Magnification: a: 900 ×; b: 3000 ×.

2.2.2 EOF 与分离模式

考察了流动相 pH 值对 EOF 的影响。如图 2 所示,在 pH 2.8 ~ 9.5 范围内,聚 HEMA-co-EDMA 整体柱的 EOF 速度随 pH 值的增大而逐渐增加。这是由于整体柱固定相表面的极性羟基基团能吸附

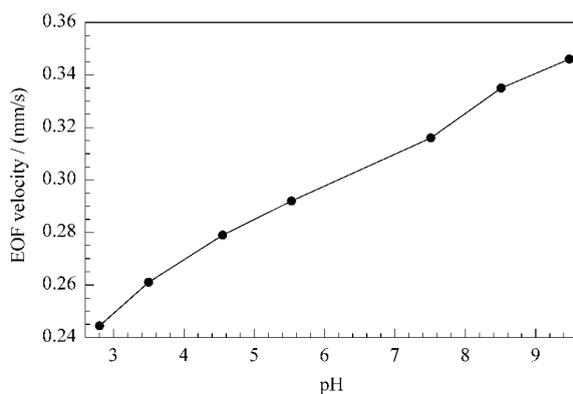


图 2 流动相 pH 值对 EOF 速度的影响

Fig. 2 Effect of mobile phase pH on the EOF velocity

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (90:10, v/v); supplementary pressure, 6.90 MPa; pump flow rate, 0.1 mL/min; applied voltage, 10 kV; detection wavelength, 214 nm.

流动相中的磷酸根离子,形成负的 zeta 电势,聚 HEMA-co-EDMA 整体柱的 EOF 为阳极 EOF;随着 pH 值的增加,磷酸根所带的负电荷数增多,zeta 电势逐渐增大,导致整体柱的 EOF 速度随着 pH 值的增大而逐渐增加。结果表明所制备的中性毛细管整体柱的 EOF 行为符合 Okanda 等^[18]的研究结论。

实验以甲苯、丙烯酰胺、硫脲等为代表,考察了流动相中乙腈含量的改变对 3 种模型化合物保留时间的影响,评价了聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱的性能。如图 3 所示,当流动相中乙腈含量从 62% (体积分数,下同)增加到 90% 时,弱极性的甲苯最先出峰,其次是极性稍大的丙烯酰胺,极性最大的硫脲最后出峰,洗脱顺序与亲水作用色谱分离结果一致。根据文献[19],在亲水作用模式下,分析物与固定相的亲水相互作用随着乙腈含量的增加而增强。结果表明所制备的聚 HEMA-co-EDMA 毛细

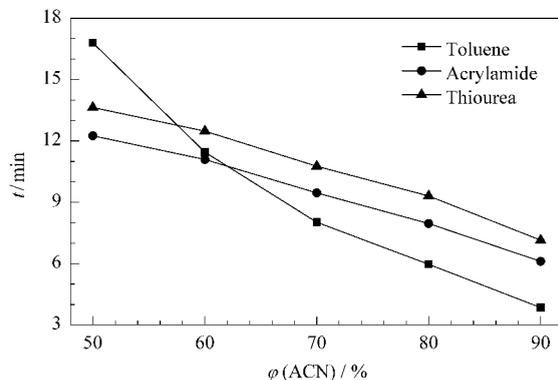


图 3 流动相中乙腈含量对模型化合物保留时间的影响

Fig. 3 Effects of ACN content in mobile phase on the retention times of model compounds

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5); other conditions are the same as in Fig. 2.

管整体柱在流动相中乙腈含量较高(> 62.0%)时, 体现出亲水相互作用的分离机理。当流动相中乙腈含量低于 57.5% 时, 丙烯酰胺最先出峰, 其次是硫脲, 极性最小的甲苯最后出峰, 且随着流动相中乙腈含量的降低, 甲苯的保留时间逐渐增大, 说明整体柱的亲水作用随着流动相中乙腈含量的降低而减弱。

2.2.3 整体柱分离的重现性

实验考察了聚 HEMA-co-EDMA 整体柱的重现性。在流动相为乙腈-5 mmol/L TEAP 缓冲液(pH 7.5)(90:10, v/v)、电压为 10 kV 时, 甲苯、丙烯酰胺和硫脲的柱效分别为 30 200、80 200 和 44 100 塔板/m。以甲苯的保留时间和丙烯酰胺的柱效来评价整体柱的重现性。保留时间的批内、批间相对标准偏差(RSD)分别为 2.9% ($n = 5$) 和 3.6% ($n = 3$), 柱效的批内、批间 RSD 分别为 4.6% ($n = 5$) 和 5.3% ($n = 3$)。

2.3 整体柱性能的考察

2.3.1 核苷、碱基与苯胺类碱性物质的分离

核苷与碱基由于极性较大, 在反相分离模式下很难得到分离。实验选择 5 种核苷和 4 种碱基, 考察了流动相中乙腈含量、pH 值和缓冲液盐浓度变化对核苷保留值的影响, 评价聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱的亲水性能。由图 4 可见, 流动相中乙腈含量的变化对核苷的分离有较大影响。随着乙腈含量的增加, 5 种核苷的保留因子逐渐增大, 且增大的趋势逐渐明显。而流动相的 pH 值在 pH 3.5 ~ 9.5 范围内的变化对核苷保留因子的影响不明显。随着 pH 值的增加, 5 种核苷的保留因子变化很小。同样, 当流动相中 TEAP 缓冲盐浓度从 2.5 mmol/L 增至 20 mmol/L 时, 5 种核苷的保留因子大小也几

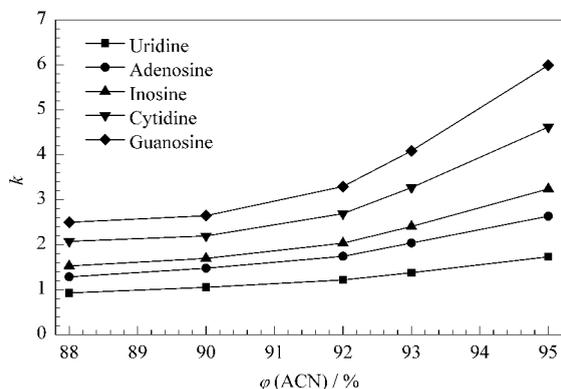


图 4 流动相中乙腈含量对 5 种核苷保留因子的影响

Fig. 4 Effects of ACN content in mobile phase on the retention factors of 5 nucleosides

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5), detection wavelength, 254 nm; other conditions are the same as in Fig. 2.

乎不变。这说明核苷在此整体柱上的保留主要受亲水色谱作用机理控制, 电泳作用和静电相互作用对核苷的保留行为影响不显著。

通过优化, 在流动相为乙腈-5 mmol/L TEAP 缓冲液(pH 7.5)(93:7, v/v)条件下, 5 种核苷得到了成功分离(见图 5)。此时聚合物整体固定相表面静电作用小, 避免了碱性化合物与带负电荷的固定相间较强的静电相互作用而导致的峰拖尾现象, 也避免了在采用产生阴极 EOF 的 CEC 柱时样品分子出峰时间长或根本不出峰的问题。

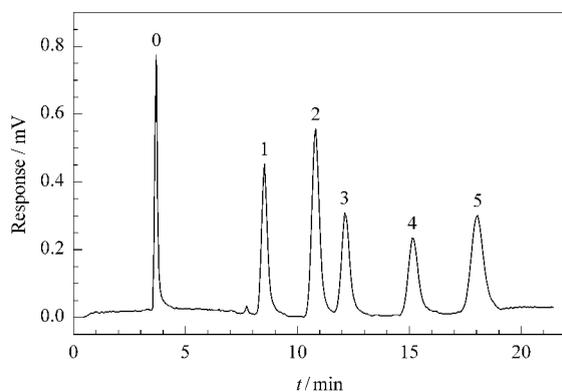


图 5 5 种核苷和甲苯的 CEC 谱图

Fig. 5 Electrochromatogram of 5 nucleosides and toluene

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5) (93:7, v/v); other conditions are the same as in Fig. 4.

Peaks: 0. toluene; 1. uridine; 2. adenosine; 3. inosine; 4. cytosine; 5. guanosine.

4 种碱基和 4 种苯胺类物质在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上也得到很好的分离。4 种碱基按照极性由小到大(尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤)顺序出峰(见图 6), 与亲水作用色谱分离中的

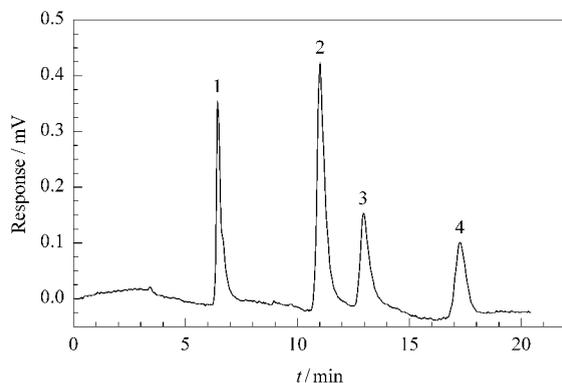


图 6 4 种碱基的 CEC 谱图

Fig. 6 Electrochromatogram of 4 nucleic acid bases

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5) (93:7, v/v); other conditions are the same as in Fig. 4.

Peaks: 1. uracil; 2. adenine; 3. cytosine; 4. guanine.

出峰顺序一致。4 种苯胺类化合物在流动相为乙腈-5 mmol/L 磷酸三乙胺缓冲液(pH 7.5)(90:10, v/v)的条件下,在 10 min 内达到基线分离。按照极性由小到大依次出峰的顺序为二苯胺、苯胺、邻苯二胺、对苯二胺(见图 7)。实验中也考察了流动相中乙腈含量、pH 值和缓冲盐浓度变化对 4 种苯胺类化合物保留值的影响,结果表明苯胺类化合物在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上的 CEC 行为主要受亲水作用机理决定。

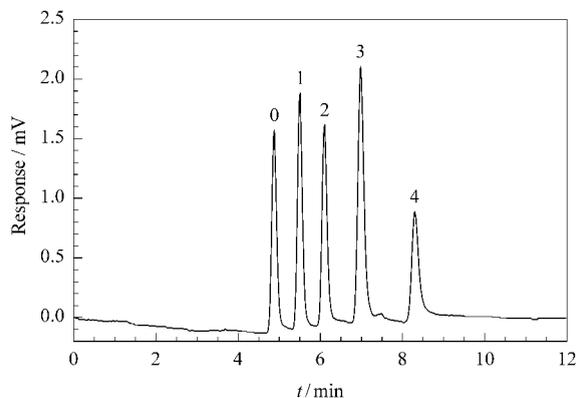


图 7 4 种苯胺类物质和 1,3,5-三叔丁基苯的 CEC 谱图

Fig. 7 Electrochromatogram of 4 anilines and 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5)(90:10, v/v); other conditions are the same as in Fig. 2.

Peaks: 0. 1,3,5-tri-tert-butylbenzene; 1. diphenylamine; 2. aniline; 3. *o*-phenylenediamine; 4. *p*-phenylenediamine.

2.3.2 苯酚类中性化合物的分离

实验同时考察了所制备的整体柱对中性化合物的分离性能。结果表明苯酚类化合物的保留值随着流动相中乙腈含量的增加而增大。在相同条件下,随着苯环上羟基数目的增加,苯酚类化合物的保留时间增大,表明了苯酚类化合物在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上的保留主要基于亲水作用保留机理。通过优化流动相中的乙腈含量、流动相的 pH 值和缓冲盐浓度,在流动相为 5 mmol/L TEAP (pH 7.5)-90% 乙腈条件下,6 种苯酚类极性化合物在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上分离良好(见图 8),洗脱顺序与羟基亲水作用的强弱及酚类化合物的极性大小顺序一致:带 1 个酚羟基的麝香草酚和苯酚极性最小,最先被洗脱出来,接着是带 2 个酚羟基的极性稍强的邻苯二酚和对苯二酚,最后被洗脱出来的是带 3 个酚羟基的极性最强的连苯三酚和间苯三酚。

2.3.3 苯甲酸类酸性化合物的分离

考察了所制备的整体柱对酸性化合物的分离性

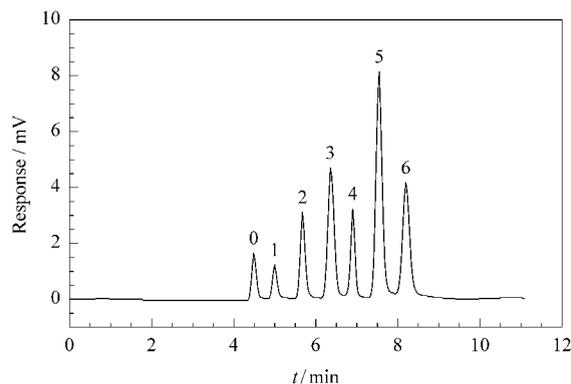


图 8 6 种苯酚类物质和 1,3,5-三叔丁基苯的 CEC 谱图

Fig. 8 Electrochromatogram of 6 phenols and 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 7.5)(90:10, v/v); other conditions are the same as in Fig. 2.

Peaks: 0. 1,3,5-tri-tert-butylbenzene; 1. thymol; 2. phenol; 3. pyrocatechol; 4. hydroquinone; 5. pyrogallol; 6. phloroglucinol.

能,结果表明当流动相中乙腈含量增加时,流动相的极性降低,酸性物质与固定相之间的相互作用增强,4 种苯甲酸类物质的保留因子均逐渐增大。如没食子酸,当乙腈含量从 85% 增加到 95% 时,其保留因子由 0.5 增大到 2.7,说明苯甲酸类化合物在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上的保留主要基于亲水作用机理,且随着乙腈含量的增加,亲水作用逐渐增强。通过优化流动相中的乙腈含量、流动相的 pH 值和缓冲盐浓度,4 种苯甲酸类化合物在聚 HEMA-co-EDMA 毛细管整体柱上得到良好的分离(见图 9),表明该整体柱适用于酸性化合物的分离。

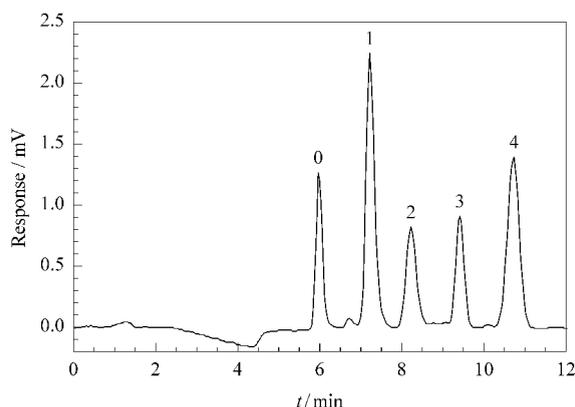


图 9 4 种苯甲酸类物质和 1,3,5-三叔丁基苯的 CEC 谱图

Fig. 9 Electrochromatogram of 4 benzoic acids and 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

Conditions: mobile phase, ACN and 5 mmol/L TEAP buffer (pH 8.5)(90:10, v/v); other conditions are the same as in Fig. 2.

Peaks: 0. 1,3,5-tri-tert-butylbenzene; 1. benzoic acid; 2. 3,5-dinitro benzoic acid; 3. *p*-hydroxybenzoic acid; 4. gallic acid.

3 结论

制备了亲水分离模式的聚 HEMA-co-EDMA 新型 CEC 整体柱。考察了其结构特征及 CEC 性能,分析了流动相中乙腈含量、pH 和缓冲盐浓度对分离过程的影响,探讨了整体柱的分离机理。所制备的整体柱固定相表面含有的羟基基团不仅使整体柱固定相具有较强的极性,同时还可吸引流动相中的磷酸根离子以产生阳极 EOF。所制备的 HI-CEC 整体柱具有高效广泛的分离能力,成功地实现了对在反相色谱中难以分离的强极性物质核苷、碱基和苯胺类化合物的高效分离,也实现了对苯酚类、苯甲酸类极性化合物的分离,效果良好。

参考文献:

- [1] Wu Y, Zhang X H, Wei J, et al. Chinese Journal of Chromatography (吴漪, 张晓晖, 魏娟, 等. 色谱), 2009, 27(5): 609
- [2] Svec F. J Sep Sci, 2005, 28 : 729
- [3] Wu R A, Hu L H, Wang F J, et al. J Chromatogr A, 2008, 1184 : 369
- [4] Yan L J, Zhang Q H, Li T, et al. Chinese Journal of Chromatography (严丽娟, 张庆和, 李彤, 等. 色谱), 2005, 23 (5): 499
- [5] Wu M H, Wu R A, Wang F J, et al. Anal Chem, 2009, 81 : 3529
- [6] Lin X C, Lin J, Wang J B, et al. Chinese Journal of Chromatography (林旭聪, 林霞, 王家斌, 等. 色谱), 2010, 28 (3): 284
- [7] Ou J J, Dong J, Dong X L, et al. Electrophoresis, 2007 : 28, 148
- [8] Ye F G, Xie Z H, Wong K Y, Electrophoresis, 2006, 27 : 3373
- [9] Huang G H, Lian Q Y, Zeng W C, et al. Electrophoresis, 2008, 29 : 3896
- [10] Fu H J, Jin W H, Xiao H, et al. Electrophoresis, 2003, 24, 2084
- [11] Reid T S, Henry R A. Am Lab, 1999, 31(14): 24
- [12] Lin X C, Zeng W C, Wang X C, et al. J Sep Sci, 2009, 32 : 2767
- [13] Lin J, Huang G H, Lin X C, et al. Electrophoresis, 2008, 29 : 4055
- [14] Wang J B, Lü H X, Lin X C, et al. Electrophoresis, 2008, 29 : 928
- [15] Wang X C, Lin X C, Xie Z H, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216 : 4611
- [16] Li X Y, Wang Y, Gu X, et al. Chinese Journal of Chromatography (李新燕, 王彦, 谷雪, 等. 色谱), 2010, 28(3): 231
- [17] Guryčá V, Mechref Y, Palm A K, et al. J Biochem Biophys Methods, 2007, 70 : 3
- [18] Okanda F M, El Rassi Z. Electrophoresis, 2005, 26 : 1988
- [19] Alpert A J. J Chromatogr A, 1990, 499 : 177