

新型亲水整体柱的制备及其在毛细管液相色谱和 加压电色谱中的应用

高也, 王彦, 王超然, 谷雪, 阎超*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 以 *N,N*-二甲基-*N*-甲基丙烯酰胺基丙基-*N,N*-二甲基-*N*-丙烷磺酸内盐 (SPP) 为单体, 季戊四醇三丙烯酸酯 (PETA) 为交联剂, 偶氮二异丁腈 (AIBN) 为引发剂及两类不同的致孔剂 (乙醇/乙二醇和甲醇/1,4-丁二醇) 制备了两种新型亲水性整体柱。为了获得理想的柱效、电渗流速度和渗透性, 对制备整体柱的各反应物配比进行了研究和优化。比较了两种整体柱在渗透性和分离样品方面的性能, 结果表明, 以乙醇/乙二醇为致孔剂制备的整体柱在柱效、分离度方面优于以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂制备的整体柱, 但在渗透性方面不及后者。探讨了流动相中盐浓度对核苷类样品保留的影响, 发现当甲酸铵浓度从 10 mmol/L 增加到 70 mmol/L 时, 核苷样品的保留因子呈现先增加后减小的状态。将制备的整体柱用于毛细管液相色谱和加压电色谱分别分离胺类、酚类和核苷类样品, 获得了理想的分离效果。在分离酚类和核苷类混合样品时, 发现加压毛细管电色谱在分离度和分离速度上均优于毛细管液相色谱。

关键词: 亲水整体柱; 制备; 毛细管液相色谱; 加压毛细管电色谱; 胺类化合物; 酚类化合物; 核苷类化合物

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)05-0487-08

Preparation of new hydrophilic monolithic columns and their applications in capillary liquid chromatography and pressurized capillary electrochromatography

GAO Ye, WANG Yan, WANG Chaoran, GU Xue, YAN Chao*

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: New hydrophilic monolithic columns were prepared with { [3-(methacryloylamino)propyl]dimethyl(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide inner salt (SPP) } as monomer, pentaerythritol triacrylate (PETA) as crosslinking agent, azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator with two different porogens consisting of ethanol/ethylene glycol and methanol/1,4-butanediol, separately. In order to obtain monolithic columns with satisfactory efficiency, electroosmotic flow (EOF) velocity and permeability, the contents of the polymerization mixture were investigated and optimized. The performances of the two columns were compared in the permeability and separation performance. It was found that the monolithic column prepared with ethanol/ethylene glycol had a better column efficiency and selectivity than that with methanol/1,4-butanediol, but was inferior to the latter in permeability. The effect of salt concentration (from 10 to 70 mmol/L ammonium formate) on the retention of nucleosides was investigated. It was observed that the retention factors of these nucleosides increased at first and then decreased. The columns were used in capillary liquid chromatography (cLC) and pressurized capillary electrochromatography (pCEC) for the separation of a test mixture of amines, phenols and nucleosides separately, and satisfactory separations for these samples were achieved. The column used in pCEC system showed better separation and higher speed of the mixture consisted

* 通讯联系人: 阎超 教授, 博士生导师. Tel: (021) 34205673, E-mail: chaoyan@unimicrotech.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175092, 21105064) 和国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ150072, 2011YQ15007204, 2011YQ15007207 和 2011YQ15007210).

收稿日期: 2011-12-16

of phenols and nucleosides compared to those used in cLC system.

Key words: hydrophilic monolithic column; preparation; capillary liquid chromatography (cLC); pressurized capillary electrochromatography (pCEC); amines; phenols; nucleosides

1990年由Alpert^[1]提出的亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HIL-IC)由于其相对传统反相液相色谱对极性化合物的分离优势,为微分离技术提供了更多的选择空间,已成功运用在糖类^[2]、蛋白质类^[3-5]和一些小分子极性化合物^[6-8]的分离中。

毛细管整体柱具有分离介质均一和性质稳定等特点,克服了填充柱的柱塞效应,而且通过引入各种功能基团使其具有十分多变的灵活性,是色谱领域的研究热点。

目前,亲水作用毛细管整体柱主要可以分为有机聚合物整体柱和硅胶整体柱两大类。有机聚合物整体柱具有选材范围广、适用pH范围宽、生物兼容性好等特点。Lämmerhofer等^[9]最早采用2-甲基丙烯酸二甲胺乙酯(DMAEMA)、2-甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)和亚乙基二甲基丙烯酸酯(EDMA)共聚获得聚合物毛细管柱,并在毛细管柱内通过硫酸二甲酯的硝基甲烷溶液对柱床进行烷基化,从而获得季胺基团,用来分离茶碱和嘌呤等极性化合物。Wang等^[10]利用2-甲基-2-丙烯酸-2-羟乙基酯磷酸酯(HEMA)和季戊四醇三丙烯酸酯(PETA)制备了poly(PETA-co-HEMA)整体柱,由于其固定相表面含有羟基等极性基团使得该整体柱本身具有一定的亲水性,可以用来分离碱性等极性物质。

整体柱合成中致孔剂对柱的渗透性、柱效和分离度等都有很大的影响。常见的致孔剂分为3种类型:一元致孔剂、二元致孔剂和三元致孔剂。其中,使用最多的是二元致孔剂,例如正丙醇/1,4-丁二醇^[11]、十二烷醇/环己醇^[12]等。

亲水聚合物整体柱的制备大多采用一种致孔剂制备。例如Lin等^[13]利用环己醇/乙二醇二元致孔剂制备了亲水聚(甲基丙烯酸-3-磺酸丙酯钾盐-季戊四醇三丙烯酸酯)(poly(SPMA-co-PETA))整体柱;Jiang等^[14]利用甲醇/四氢呋喃制备了聚(2-甲基丙烯酸酰氧基乙基磷酸胆碱-乙二醇二甲基丙烯酸酯)(poly(MPA-co-EDMA))亲水整体柱。本研究将利用新型具有两性离子的单体、交联剂和两种不同致孔剂一步制备新型亲水聚(*N,N*-二甲基-*N*-甲基丙烯酰胺基丙基-*N,N*-二甲基-*N*-丙烷磺酸内盐-季戊四醇三丙烯酸酯)(poly(SPP-co-PETA))整体柱,并对聚合反应的反应物配比进行优化,详细讨论

了两种不同的致孔剂对于亲水整体柱合成的影响;同时以毛细管液相色谱(cLC)和加压电色谱(pCEC)为分析平台,实现了对包括胺类、酚类和核苷类亲水物质的分离分析。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

乙腈(ACN)、甲醇(MeOH)为色谱纯(美国Tedia公司);二甲基甲酰胺(DMF)、甲酰胺、对苯二酚、甲酸铵、甲酸、硫脲、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(*N,N'*-methylenebisacrylamide)、邻苯二酚、丙烯酰胺、1,4-丁二醇和乙二醇均为分析纯(上海国药集团);甲苯为分析纯(上海凌峰化学试剂有限公司);胸腺嘧啶、尿嘧啶、*N,N*-二甲基-*N*-甲基丙烯酰胺基丙基-*N,N*-二甲基-*N*-丙烷磺酸内盐(SPP)、PETA(美国Sigma-Aldrich公司);烟酰胺(上海百泰化学科技有限公司);腺苷、腺嘌呤、次黄嘌呤、尿苷、肌苷(上海伯奥生物技术有限公司);2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid, AMPS)和 γ -(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(3-trimethoxysilyl propyl methacrylate, γ -MAPS)(美国Alfa Aesar公司);氨水和乙醇为分析纯(上海润捷化学试剂有限公司);偶氮二异丁腈(azobisisobutyronitrile, AIBN)(上海试四赫维化工有限公司);Milli Q纯净水;熔融石英毛细管(100 μm i. d. \times 360 μm o. d., 美国Polymicro Technologies公司)。

cLC和pCEC实验都在加压毛细管电色谱Tri-SepTM-2100 CEC系统(美国Unimicro Technologies公司)上进行,系统包括二元梯度流动相输送系统、30 kV双极式高压电源、紫外-可见可变波长检测器和数据采集分析系统。其中,柱的出口端接到电源的负极,进口端接地。进样器定量环为1 μL ,分流比为450:1。将混合样品中甲苯的保留时间视为死时间,甲苯在pCEC和cLC模式下线速度之差即为电渗流速度。KQ2200B型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。NOVA Nano SEM 230低真空超高分辨场发射扫描电子显微镜(SEM)(美国FEI公司)。

1.2 聚合物亲水整体柱的制备

在制备整体柱之前,石英毛细管的内壁要经过

γ -MAPS 的预处理^[15]。称取聚合反应单体(SPP, PETA 和 AMPS),将它们分别溶解在两种致孔剂(乙醇/乙二醇和甲醇/1,4-丁二醇)中,混合均匀后加入引发剂 AIBN。其中以乙醇/乙二醇为致孔剂的整体柱按 20% (m/m) 单体(SPP-PETA(1:1, m/m)) 和 80% 致孔剂(乙醇/乙二醇(70:30, m/m)), AMPS 的质量为单体质量的 0.5%, AIBN 质量为总反应物质量的 0.1% 的配比进行反应制备;以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂的整体柱按 12.5% (m/m) 单体(SPP-PETA(3:2, m/m)) 和 87.5% 致孔剂(甲醇/1,4-丁二醇(35:65, m/m)), AIBN 为单体质量的 0.8% 的配比进行反应制备。混合液超声 10 min,通氮气 1 min 以除去溶解在其中的气体。然后将混合液引入到事先处理好的内径为 100 μm 、有效长度为 25 cm、总长度为 50 cm 的石英毛细管当中。用硅胶密封毛细管柱的两端,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 20 h。反应结束后将毛细管柱接在高压泵上用甲醇进行冲洗以除去未反应的单体和致孔剂。之后在柱填料的末端做标记,利用加热的电阻丝在标记处烧一段 2~3 mm 的窗口,截取 2 cm 长度的毛细管柱以方便做 SEM 实验。

2 结果与讨论

2.1 亲水型 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的基本性质

本实验制备 poly(SPP-co-PETA) 所用到的单体是 SPP、PETA 和 AMPS,结构如图 1 所示。其中, SPP 作为一个既带磺酸根又含季铵根的两性离子化合物具有很强的亲水性; PETA 作为本实验聚合反应的交联剂; AMPS 因为含有磺酸根可以提供一定的电渗流,使合成的整体柱可以在 pCEC 模式下进行色谱分离,同时为色谱分离过程中发生离子交换作用提供了可能。

2.2 制备 poly(SPP-co-PETA) 整体柱致孔剂的选择和优化

选择致孔剂的一个很重要的因素是其对单体的溶解性。本研究中发现乙醇/乙二醇、甲醇/1,4-丁二醇这两种不同的致孔剂都可以很容易地将本实验所用的单体溶解,且能制备得到性能优良的整体柱,故对这两种致孔剂对整体柱合成的影响进行了详细的考察。

2.2.1 以乙醇/乙二醇为致孔剂制备 poly(SPP-co-PETA) 整体柱

表 1 给出了以乙醇/乙二醇为致孔剂、不同单体配比制备的整体柱的性能。采用的色谱条件: poly

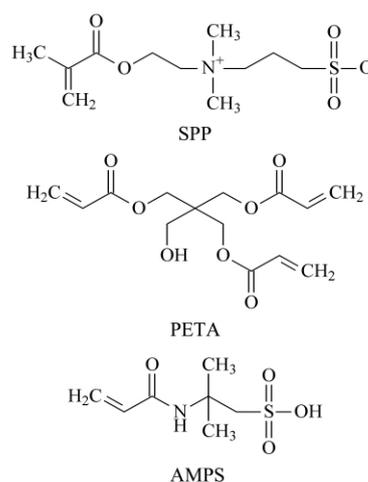


图 1 实验所用单体 SPP、PETA 和 AMPS 的结构式
Fig. 1 Structures of SPP, PETA and AMPS monomers used in the experiment

(SPP-co-PETA) 整体柱规格为 250 mm (总长度 500 mm) \times 100 μm ; 流动相为 ACN/ H_2O (80/20, v/v) (含有 50 mmol/L 甲酸铵); 检测波长为 254 nm; pCEC 实验所加电压为 -10 kV。

考察了 PETA 含量在制备整体柱过程中的影响。将 PETA 在单体中的含量由 40% (柱 A) 增加到 60% (柱 C),致孔剂等其他物质含量保持不变,发现整体柱的柱效先增高后降低,当其含量为 50% (柱 B) 时的柱效最高,其柱效达到 120 000 块/m。

以 cLC 为分离模式计算了甲醇通过整体柱时的渗透率 K 根据公式 $K = \frac{\mu L}{\Delta P} \times \eta$ ^[16] (其中 μ 是溶剂通过整体柱的线性流速, η 是溶剂的动态黏滞度(甲醇在室温下的动态黏滞度数据来自文献^[17]), L 是整体柱的有效长度, ΔP 是溶剂通过柱后的柱压)。PETA 在单体中的含量由 40% (柱 A) 增加到 60% (柱 C) 的过程中,渗透率数据显示整体柱通透性逐渐下降;当 PETA 含量超过 60% 时,柱的渗透性变得很差,用 20 MPa 的压力也无法将柱打通。因此我们在后续实验中 PETA 含量均采用 50%。

同时还考察了 AMPS 的含量对电渗流速度的影响,结果见表 1 中柱 B、D 和 E。其他条件不变,当 AMPS 在单体中的含量从 0 升高到 1% 时,电渗流速度从 0.01 mm/s 逐渐上升到 0.124 mm/s,但整体柱的渗透性却在逐渐变小。综合渗透性和电渗流速度,我们选择 AMPS 为单体质量的 0.5% 作为后续实验用量。

另外,从表 1 中有关 B、F 和 G 柱的柱效数据可以看出, AIBN 为总反应物质量的 0.1% 时整体柱的柱效最佳。

表 1 以乙醇/乙二醇为致孔剂、不同单体配比制备的 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的性能比较
Table 1 Performance of poly(SPP-co-PETA) monolithic columns prepared by polymerization mixtures with different ratio of monomers with ethanol/ethylene glycol as porogen

Column	Monomer ¹⁾ / %		Ethanol ²⁾ / %	AIBN ³⁾ / %	$K_{M,OH}$ / $10^{-15} m^2$	Efficiency ⁴⁾ / (plate/m)	EOF / (mm/s)
	PETA	AMPS					
A	40	0.5	70	0.1	21.62	4800	0.033
B	50	0.5	70	0.1	3.76	120000	0.035
C	60	0.5	70	0.1	1.54	23000	0.037
D	50	0	70	0.1	6.43	65000	0.010
E	50	1	70	0.1	1.17	41000	0.124
F	50	0.5	70	0.05	5.11	29000	0.037
G	50	0.5	70	0.15	2.78	57400	0.037

1) $m(\text{monomers}) : m(\text{porogen}) = 1 : 4$. 2) Content of ethanol in porogen. 3) Content of AIBN in the monomers. 4) Column efficiency determined with thiourea in the cLC mode.

为了进一步考察致孔剂中乙醇含量对聚合反应的影响,我们采用乙醇含量不同(乙醇质量为致孔剂总质量的 68%、69%、70%、71%、74% 和 77%) 的致孔剂制备了 6 批柱,制备过程中其他反应物的含量保持不变。从图 2 可看出,当致孔剂中乙醇含量增加时,色谱柱的理论塔板数先升高后降低,其中当乙醇含量为 70% 时的柱效最高,其理论塔板数可达 120 000 块/m。另一方面,SEM 和 cLC 实验也证实,致孔剂中乙醇含量增加时聚合物中的微孔孔径逐渐减小,这可以增加分析物在柱中的分配次数,从而使柱效增加;但致孔剂中乙醇含量超过 70% 时,整体柱的孔隙开始变得大小很不均匀,导致其柱效下降;当超过 77% 时,整体柱的通透性严重下降,柱已经完全不能被溶剂冲开。综合柱效和渗透率,我们采用致孔剂中乙醇含量为 70% 进行实验。

综上所述,以乙醇/乙二醇为致孔剂制备 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的最佳配比为柱 B 的配比。

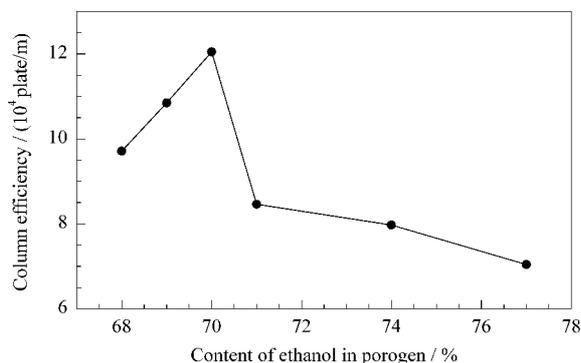


图 2 致孔剂中乙醇含量对制备的整体柱柱效的影响
Fig. 2 Effect of the content of ethanol in porogen on the efficiency of monolithic columns

Other preparation conditions: $m(\text{monomers}) : m(\text{porogen}) = 1 : 4$; $m(\text{SPP}) : m(\text{PETA}) = 1 : 1$; $m(\text{AMPS}) = 0.5\%$ $m(\text{monomers})$; $m(\text{AIBN}) = 0.1\%$ total mass of all reagents.

cLC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μm i. d.; mobile phase, ACN/H₂O (80/20, v/v) containing 5 mmol/L ammonium formate; detection wavelength, 254 nm; sample, thiourea.

2.2.2 以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂制备 poly(SPP-co-PETA) 整体柱

表 2 给出了以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂、不同单体与致孔剂比例及单体中不同 PETA 含量制备的整体柱的性能,采用的色谱条件: poly(SPP-co-PETA) 整体柱规格为 250 mm (总长度 500 mm) \times 100 μm ; 流动相为 ACN/H₂O (80/20, v/v), 含 50 mmol/L 甲酸铵; 检测波长为 254 nm。用柱 H、I、J、K 和 L 考察了单体与致孔剂比例对聚合反应的影响。实验发现,随着单体对致孔剂比例的下降,柱的柱效改变不显著,但渗透性却越来越好,且柱 L 达到最佳效果;继续降低单体比例使单体与致孔剂比例为 1:8 时发现已无法反应制成整体柱。因此确定单体与致孔剂的比例为 1:7。在此基础上,考察了单体中 PETA 含量对制备整体柱的影响(见表 2 中柱 M、N、O 和 P)。SEM 结果显示, PETA 在单体中的含量对聚合物孔径的均匀性有显著的影响,从而对柱效产生直接的影响。当 PETA 含量从 25% 升高到 66.7% 时柱效先增高后降低,且在 40% 时达到最佳,因此将 PETA 在单体中的含量确定为 40%。另外,经一系列实验证实,当 AIBN 为单体含量的 0.8% 时,柱 W 的柱效比柱 R、V 和 X 的柱效高,其理论塔板数达到 98 000 块/m。

致孔剂的含量对整体柱的渗透性和柱效有着显著的影响^[18]。SEM 实验和 cLC 实验证实,当甲醇含量为 30% (柱 Q) 时,柱无法冲开。当致孔剂中甲醇含量从 35% (柱 R) 升高到 60% (柱 U) 时,固定相呈现越来越大的孔隙,渗透性越来越好,但柱的柱效却逐渐减小。综合柱效和渗透率,最终采用致孔剂中甲醇含量为 35% 开展后续实验。

综上所述,以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂制备 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的最佳配比为柱 W 的配比。

表 2 以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂、不同反应物配比下制备的 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的性能比较
Table 2 Performance of poly(SPP-co-PETA) monolithic columns prepared by polymerization with different ratios of reagents with methanol/1,4-butylene glycol as porogen

Column	$m(\text{Monomer}) : m(\text{Porogen})$	PETA ¹⁾ /%	MeOH ²⁾ /%	AIBN ³⁾ /%	$K_{\text{MeOH}}^4) / (10^{-14} \text{ m}^2)$	Efficiency ⁵⁾ / (plate/m)
H	1:3	50	50	0.1	—	
I	1:4	50	50	0.1	—	
J	1:5	50	50	0.1	0.98	20000
K	1:6	50	50	0.1	2.12	17000
L	1:7	50	50	0.1	5.38	20800
M	1:7	25	50	0.1	16.77	10000
N	1:7	33.3	50	0.1	14.98	17000
O	1:7	40	50	0.1	13.86	28000
P	1:7	66.7	50	0.1	0.61	4000
Q	1:7	40	30	0.1	—	
R	1:7	40	35	0.1	7.71	58000
S	1:7	40	40	0.1	10.98	42000
T	1:7	40	45	0.1	12.33	31000
U	1:7	40	60	0.1	27.16	1000
V	1:7	40	35	0.5	5.78	60000
W	1:7	40	35	0.8	4.31	98000
X	1:7	40	35	1.0	—	

1) Content of PETA in the monomers. 2) Content of methanol in the porogen. 3) Content of AIBN in the monomers. 4) “—” stands for it was impossible to pump solvent through the monolith, so the permeability data were not available. 5) Column efficiency determined with thiourea in the cLC mode.

2.3 两种不同致孔剂制备的 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的比较

分别选取以乙醇/乙二醇为致孔剂制备的柱 B 和以甲醇/1,4-丁二醇为致孔剂制备的柱 W 作为考察对象,制备这两种柱所用的两性离子化合物单体、

交联剂和引发剂均相同。

2.3.1 渗透性的比较

图 3 显示聚合反应后的整体柱由聚集的球形颗粒和穿梭其中的孔道构成,这也是整体柱的典型结构^[19]。由 SEM 图可以很明显地看到,以乙醇/乙二

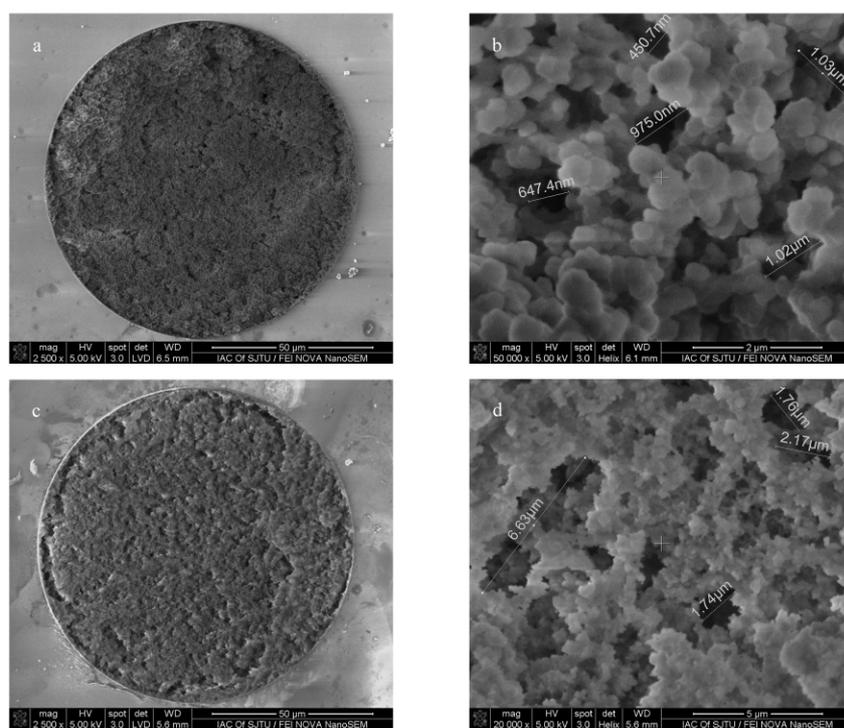


图 3 两种不同致孔剂制备的整体柱的扫描电镜图

Fig. 3 Scanning electron microphotographs of monolithic columns prepared with two different porogens a and b for column B; c and d for column W.

醇制备的柱 B 比以甲醇/1,4-丁二醇制备的柱 W 孔径普遍较小,可以预测柱 W 的渗透性优于柱 B。

然而,SEM 得到的结果仅能作为对固定相孔径直观且初步的认识。为了进一步研究整体柱的孔径对渗透性的影响,以 cLC 为平台计算了甲醇和乙腈两种溶剂通过整体柱时的渗透率 K (甲醇的渗透率数据在表 1 和表 2 中,乙腈在室温下的动态黏滞度

来自文献^[17])。另外,根据公式 $\varepsilon_T = \frac{Ft_R - V_{ex}}{\pi r^2 L}$ ^[20]

可以计算柱 B 和柱 W 的孔隙率。公式中, ε_T 为孔隙率, F 为整体柱的线性流速, t_R 为样品的保留时间, V_{ex} 为柱外死体积, r 为毛细管柱的半径, L 为柱长。如表 3 所示,柱 W 的渗透率是柱 B 渗透率的 10 倍左右,且柱 W 的孔隙率大于柱 B,这也认证了我们当初的预测。

表 3 色谱柱 B 和 W 的渗透率及孔隙率比较

Table 3 Comparison of K and ε_T values

for columns B and W

Column	$K_{ACN} / (10^{-15} m^2)$	ε_T
B	5.86	0.48
W	60.9	0.87

2.3.2 分离性能的比较

在 cLC 模式下,运用相同的流动相 ACN/H₂O (95/5, v/v; 含 5 mmol/L 甲酸铵) 分别在不同流速下对柱 B 和柱 W 做范丁姆特方程曲线(见图 4)。由图 4 可知,在各自最佳流速下,柱 B 的柱效高于柱 W (柱 B 和柱 W 的最佳柱效(理论塔板数)分别为 122 400 块/m 和 100 100 块/m); 但柱 W 的最佳流速比柱 B 高,有利于实现快速分离。

以 cLC 为平台,选用甲苯、丙烯酰胺和硫脲混合样品分别在柱 B 和柱 W 上进行分离以比较两种不同致孔剂所制备的整体柱的分离性能(见图 5)。结果表明,poly(SPP-co-PETA) 整体柱在适当的流动相条件下会呈现一定的亲水性,极性越强的物质(硫脲)出峰时间越晚;柱 B 对甲苯和丙烯酰胺的分离度要比柱 W 大得多(柱 B 的分离度为 3.78,柱 W 的分离度为 1.5),但分离所需的时间较长;硫脲在柱 B 和柱 W 上的理论塔板数分别为 120 000 块/m 和 98 000 块/m,柱 B 的柱效比柱 W 高。

一般认为胺类化合物很难在反相色谱上保留和分离^[10]。本实验以 cLC 为平台,选择 DMF、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺、丙烯酰胺和甲酰胺 4 种胺类物质对整体柱的分离性能进行评价(见图 6)。结果显示 4 个胺类物质在柱 B 和柱 W 上基本上都能实现基线分离;出峰顺序与实际样品的极性相关,且柱 B 对峰 2 和峰 3 化合物的分离度要比柱 W 高很多(柱

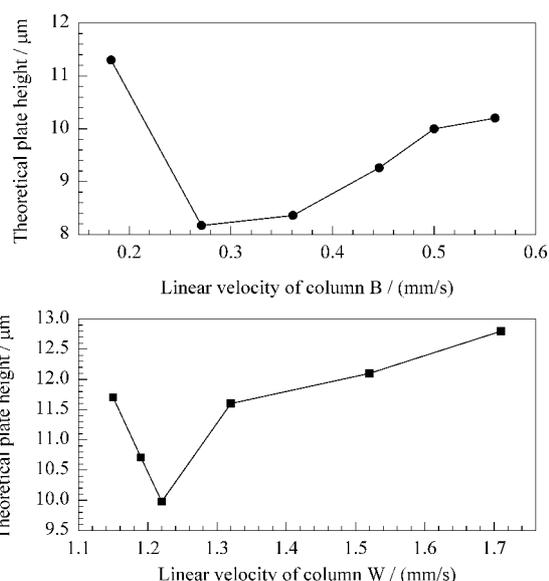


图 4 色谱柱 B 和 W 的范丁姆特方程曲线

Fig. 4 van Deemter's Equations of columns B and W

cLC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) × 100 μm i. d.; mobile phase, ACN/H₂O (80/20, v/v) containing 5 mmol/L ammonium formate; detection wavelength, 254 nm; sample, toluene.

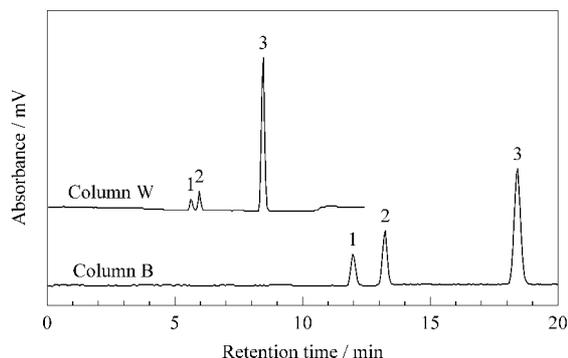


图 5 甲苯、丙烯酰胺和硫脲混合样品分别在色谱柱 B 和 W 上的分离谱图

Fig. 5 Separation of toluene, acrylamide and thiourea on columns B and W

cLC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) × 100 μm i. d.; mobile phase, ACN/H₂O (95/5, v/v) containing 5 mmol/L ammonium formate; linear velocities, column B 0.36 mm/s, column W 0.82 mm/s; backpressures, column B 11.0 MPa, column W 3.8 MPa; detection wavelength, 254 nm.

Peaks: 1. toluene; 2. acrylamide; 3. thiourea.

B 的分离度为 2.64,柱 W 的分离度为 1.33)。另外,由柱效数据可知,柱 B 的柱效比柱 W 的普遍高。原因可能是柱 B 在制备过程中极性单体 SPP 的含量较大(柱 B 的 SPP 含量为 20%,柱 W 的 SPP 含量为 12.5%) 而使其有比较大的亲水性,从而使其对极性化合物的分离有优势。

2.4 新型亲水整体柱的应用

为了进一步验证所制备的 poly(SPP-co-PE-

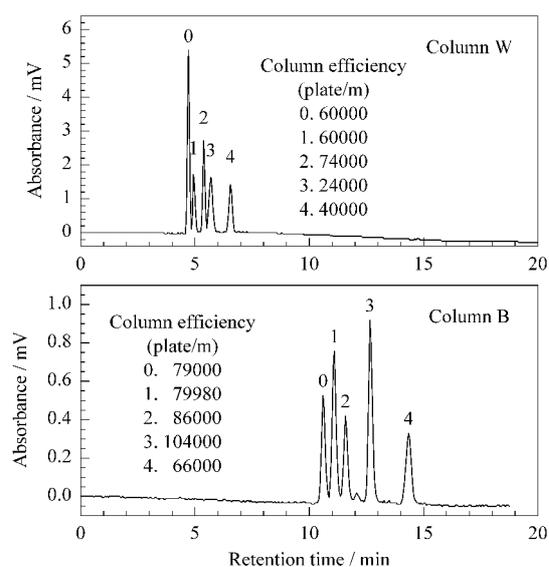


图6 色谱柱B和W对胺类化合物的分离色谱图

Fig. 6 Separation of amides on column B and column W

cLC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μ m i.d.; mobile phase, ACN/H₂O (95/5, v/v) containing 5 mmol/L ammonium formate, pH 3; linear velocities, column B 0.40 mm/s, column W 0.91 mm/s; detection wavelength, 214 nm.

Peaks: 0. toluene; 1. DMF; 2. *N,N*-dimethylenebisacrylamide; 3. acrylamide; 4. formamide.

2.4.2 核苷类化合物的分离

核苷类化合物经常被用来评价亲水柱的性能^[22]。本实验中利用 pCEC 平台对胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤、腺苷、次黄嘌呤、尿苷和肌苷组成的核苷类混合物进行分离来考察 poly(SPP-co-PETA) 整体柱的性能。图 8 表明这 8 个化合物在合适的时间内能够完全实现分离。

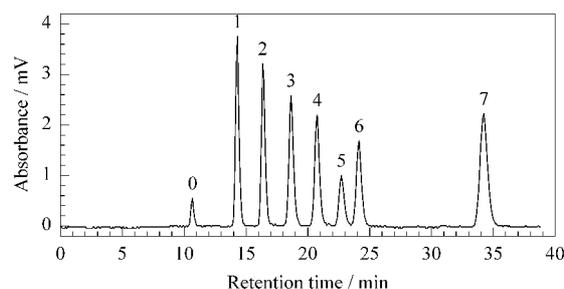


图8 色谱柱B对核苷类化合物的分离谱图

Fig. 8 Chromatogram of nucleosides on column B

pCEC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μ m i.d.; mobile phase, ACN/H₂O (90/10, v/v) containing 10 mmol/L ammonium formate, pH 6.4; linear velocity, 0.42 mm/s; backpressure, 13.0 MPa; applied voltage: -10 kV; detection wavelength, 254 nm.

Peaks: 0. toluene; 1. thymine; 2. uracil; 3. adenine; 4. adenosine; 5. hypoxanthine; 6. uridine; 7. inosine.

TA) 整体柱的亲水作用,选择酚类和核苷类等极性化合物为样品在 cLC 和 pCEC 模式下评价其性能。

2.4.1 酚类化合物的分离

以 ACN/H₂O (93/7, v/v; 含 50 mmol/L 甲酸铵) 为流动相,在 pCEC 模式下分离了一系列酚类化合物,由图 7 可见分离取得了很好的效果,且与文献^[21]的报道一样,化合物的出峰顺序与其极性相关,极性越小越早出峰,极性越大越晚出峰。

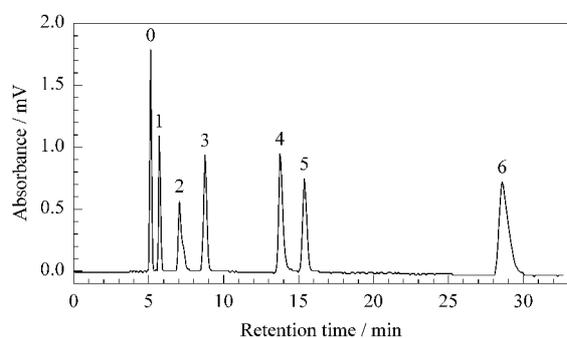


图7 色谱柱B对酚类化合物的分离谱图

Fig. 7 Chromatogram of phenols on column B

pCEC conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μ m i.d.; mobile phase, ACN/H₂O (93/7, v/v) containing 50 mmol/L ammonium formate; linear velocity, 0.88 mm/s; applied voltage: -10 kV; backpressure, 13.0 MPa; detection wavelength, 214 nm.

Peaks: 0. toluene; 1. phenol; 2. catechol; 3. resorcinol; 4. pyrogallol; 5. thiourea; 6. phloroglucinol.

另外,我们还考察了流动相中盐浓度对核苷类化合物保留的影响。试验过程中,将流动相中盐浓度从 10 mmol/L 一直升高到 70 mmol/L,这些化合物在 poly(SPP-co-PETA) 整体柱上的保留先增大后减小(见图 9)。在该流动相 pH 6.4 条件下,所有

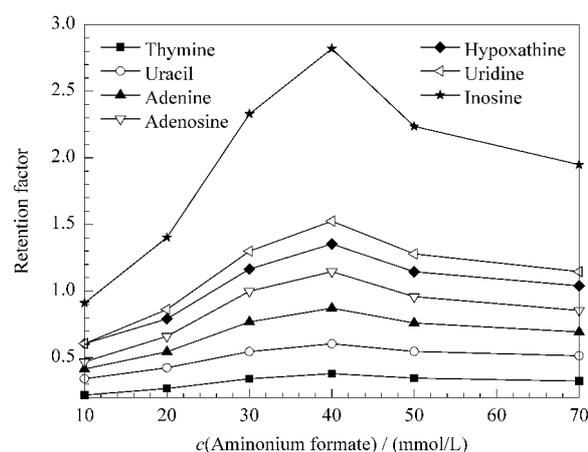


图9 流动相中盐浓度对核苷类化合物在 poly(SPP-co-PETA) 整体柱上保留的影响

Fig. 9 Effect of salt concentration in mobile phase on retention factor of nucleosides on monolithic poly(SPP-co-PETA)

pCEC conditions: column B, 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μ m i.d.; mobile phase, ACN/H₂O (90/10, v/v) containing ammonium formate, pH 6.4; linear velocity, 0.42 mm/s; backpressure, 13.0 MPa.

化合物都或多或少带正电荷(各化合物的 pK_a 值: 胸腺嘧啶 9.9、尿嘧啶 9.5、腺嘌呤 9.8、腺苷 12.5、次黄嘌呤 8.94、尿苷 9.25 和肌苷 8.9) 故它们在整体柱上的保留可能是亲水作用和离子交换共同作用的结果。当盐浓度从 10 mmol/L 升高到 40 mmol/L 时, 核苷类化合物的保留逐渐增大。这种现象可以由 Alpert^[23] 提出的水层机理解释: 在流动相盐浓度逐渐增大的情况下, 越来越多的盐离子进入固定相的水化层, 这相当于增大了固定相的容积, 从而使分析物的保留增多; 继续增加盐浓度到 70 mmol/L 时, 水化层中盐离子数量足够多以至与固定相中的磷酸根离子发生大量离子交换而使分析物与固定相的离子交换减弱, 从而降低了其保留因子。

2.4.3 酚类化合物和核苷类化合物的同时分离

同时在 cLC 和 pCEC 模式下分离盐酸阿米替林、甲苯、苯酚、邻硝基酚、邻苯二酚、胸腺嘧啶、间苯二酚、对苯二酚、尿苷和硫脲混合物。在 cLC 模式下, 化合物 0 和 1, 4 和 5, 6 和 7 都无法实现分离, 但在 pCEC 模式下, 10 个化合物可以基本实现基线分离(见图 10)。这表明加在整体柱出口的负电压使整体柱在压力流的基础上产生同方向的电渗流, 电渗流不但可以提高分离度还可以提高分离速度。

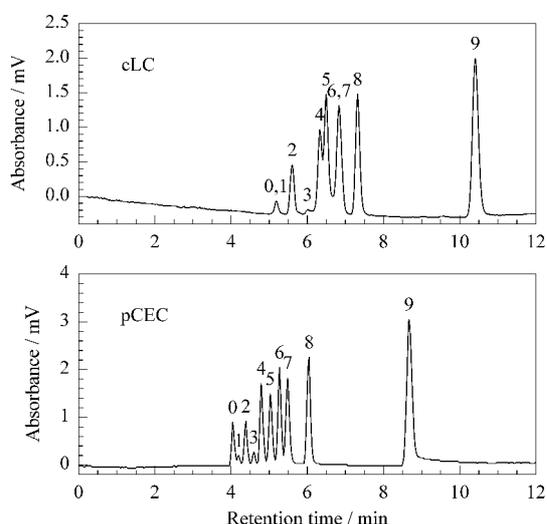


图 10 色谱柱 W 分别在 cLC 和 pCEC 模式下同时分离酚类化合物和核苷类化合物的色谱图

Fig. 10 Chromatograms of a mixture of phenols and nucleosides on column W in cLC and pCEC modes

Conditions: monolithic poly(SPP-co-PETA), 250 mm (total length 500 mm) \times 100 μ m i. d.; mobile phase, ACN/H₂O (93/7, v/v) containing 5 mmol/L ammonium formate; linear velocities, 0.82 mm/s for cLC, 1.02 mm/s for pCEC; detection wavelength, 214 nm; applied voltage, -15 kV for pCEC.

Peaks: 0. amitriptyline hydrochloride; 1. toluene; 2. phenol; 3. nitrodiphenol; 4. catechol; 5. thymine; 6. resorcinol; 7. hydroquinone; 8. uridine; 9. thiourea.

3 结论

以单体(SPP、PETA)和不同的致孔剂制备了两种亲水整体柱, 为了使制备的 poly(SPP-co-PETA) 整体柱获得理想的柱效、电渗流速度和渗透率, 研究了各反应物的配比对其聚合反应的影响并进行了优化。通过考察两类整体柱发现, 它们在渗透性、柱效和分离度方面均有一定的差异。将两类整体柱分别在毛细管液相色谱和加压电色谱模式下对一些亲水的极性化合物进行分离, 结果证实本实验制备的两类整体柱对这些化合物的分离有很好的效果。

参考文献:

- [1] Alpert A J. *J Chromatogr A*, 1990, 499: 177
- [2] Hilder E F, Svec F, Fréchet J M J. *J Chromatogr A*, 2004, 1053: 101
- [3] Calleri E, Temporinia C, Gasparrinib F, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 8937
- [4] Chen Y Z, Wu M H, Wang K Y, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 7982
- [5] Yang G L, Bai L G, Yan C H, et al. *Talanta*, 2011, 85: 2666
- [6] Li Y, Xie X, Lee M L, et al. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 8608
- [7] 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
- [8] Wu Y M, Wu Q Z, Wang X C, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (吴翊民, 吴庆政, 王晓春, 等. 色谱), 2010, 28(3): 247
- [9] Lämmerhofer M, Svec F, Fréchet J M J, et al. *J Chromatogr A*, 2001, 925: 265
- [10] Wang X C, Lin X C, Xie Z H, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 4611
- [11] Peters E C, Petro M, Svec F, et al. *Anal Chem*, 1998, 70: 2296
- [12] Krenkova J, Gargano A, Lacher N A, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 6824
- [13] Lin J, Lin J, Lin X C, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7728
- [14] Jiang Z J, Reilly J, Everatt B, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2439
- [15] Xiong B H, Zhang L H, Zhang Y K, et al. *J High Resolut Chromatogr*, 2000, 23: 67
- [16] Bristow P A, Knox J H. *Chromatographia*, 1977, 10: 279
- [17] Lide D R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 80th ed. Boca Raton: CRC Press, 1999
- [18] Peters E C, Petro M, Svec F, et al. *Anal Chem*, 1997, 69: 3646
- [19] Jiang Z J, Smith N W, Ferguson P D, et al. *Anal Chem*, 2007, 79: 1243
- [20] Huang X J, Wang Q Q, Huang B L. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (黄晓佳, 王秋泉, 黄本立. 分析化学), 2005, 33(4): 467
- [21] Wang X C, Lin X C, Xie Z H. *Electrophoresis*, 2009, 30: 2702
- [22] Olsen B A. *J Chromatogr A*, 2001, 913: 113
- [23] Alpert A J. *Anal Chem*, 2008, 80: 62