

# 微电渗流毛细管原位柱中流动相组成对电渗流的影响

张凌怡 张维冰 张玉奎\*

(中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

**摘 要** 采用原位聚合的方法合成了一种新型微电渗流毛细管电泳原位柱。考察了不同有机调节剂种类和浓度, pH 对电渗流的影响, 在 pH 值 2.3~ 9.8 范围内, 电渗流小于  $19.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。当有机调节剂浓度从 60% 增加到 90% 时, 电渗流仅从  $6.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  增大到  $48.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。结果表明, 此类微电渗流柱在电色谱分离模式下电渗流保持在较低水平。

**关键词** 原位聚合, 微电渗流毛细管柱, 有机调节剂, pH 值, 电渗流

## 1 引 言

原位柱是近年来发展起来的一种新型分离介质, 已被应用于色谱、毛细管电泳等多种分离模式, 被誉为第 4 代填料<sup>[1]</sup>。原位柱分为聚合物原位柱<sup>[2~4]</sup>和硅胶原位柱<sup>[5,6]</sup>两类, 聚合物原位柱在制备时选材范围广, 可以使分离柱具有不同的选择性, 重复性好, 并且适用的 pH 范围宽, 较传统填充柱和开管柱具有诸多明显的优点。甲基丙烯酸酯类原位柱具有 ODS 的特征, 并可以方便的通过改变致孔剂的配比来控制孔结构<sup>[7~10]</sup>。

微电渗流原位柱是最近才提出的一种新型分离柱。2001 年 Wu 等<sup>[11]</sup>发表了第一篇相关的研究论文, 之后他们也对此作了系列的研究工作<sup>[12]</sup>。我们的研究<sup>[13,14]</sup>表明, 这种柱具有多种功能, 可应用于毛细管区带电泳、毛细管电色谱及毛细管等电聚焦等多种分离模式。

流动相性质包括有机调节剂、pH 值等的变化通过影响填料的物理化学性质及流动相与固定相之间的相互作用对电渗流产生很大影响。除了改变 pH 值以外, 调节缓冲液的有机调节剂浓度也是控制电渗的一种方法。本实验研究了 3 种不同流动相体系下无电渗流柱的电渗流情况, 以及不同有机改性剂浓度下应用不同电渗流标记物标记电渗流大小, 考察了其电渗流的影响。结果表明: 在各种条件下, 此种无电渗流柱的电渗流都能保持在较低水平, 满足各种分离模式的需要。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE System 5010 毛细管电泳仪( Beckman 公司, 美国); 熔融石英毛细管 27 cm(有效长度 20 cm)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  375  $\mu\text{m}$  o. d. (河北永年光导纤维厂)。甲基丙烯酸丁酯(BMA)和乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA);  $\gamma$ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷(MAPS); 正丙醇; 1,4-丁二醇及偶氮二异丁腈(AIBN); 磷酸氢二钠; 磷酸二氢钠; 四氢呋喃(THF); 二甲亚砜(DMSO); 二甲基甲酰胺(DMF); 硫脲; 吡啶; 甲醇; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

### 2.2 电泳条件

电进样(1 kV, 1 s); 温度: 20  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 214 nm; 操作电压: 10 kV; 数据采集频率 16 Hz。

### 2.3 毛细管的预处理

原位柱的一个重要优点是不需要在柱床两端制备柱塞, 并且柱内连续床层稳定, 不移动。因此, 在制备原位柱时, 通常对毛细管内壁进行预烯基化处理, 即在毛细管内壁上键合上一层带烯基官能团的硅烷化试剂<sup>[2]</sup>。通过硅烷化试剂的双官能团将毛细管内壁上的硅羟基和原位柱柱床以化学键间接键合, 达到固定柱床、尽量覆盖管壁上能够产生电渗流的硅羟基的目的。因此, 本实验中制备的微电渗流柱的

2003-04-27 收稿; 2003-12-12 接受

本文系科技部 973(No. 001CB510202) 和国家自然科学基金(No. 20105006) 资助项目

电渗流性质是和毛细管的预处理密切相关的。

将毛细管柱依次用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 冲洗 30 min, 用水洗至中性, 氮气吹干后, 用 30% 的  $\gamma$ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷(丙酮溶液) 充满, 封口, 放置 24 h 后, 用丙酮清洗除去过量的双功能团试剂, 用水清洗后, 再用氮气吹干备用。

## 2.4 原位柱的制备

将双甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯和致孔剂(正丙醇 1, 4 丁二醇= 56: 44) 按 16%、24%、60% (质量百分比) 混合。由偶氮二异丁腈(0.3%) 引发聚合反应。将反应混合物通氮气 15 min, 或用超声波脱气 10 min, 除去溶解在混合物中的空气。将混合溶液充入经双官能团试剂处理过的毛细管中, 两端用硅橡胶封口后在 60℃ 下反应 20 h。将聚合后的毛细管柱取出后切去两端, 用乙腈冲洗, 洗去柱内致孔剂, 残余的反应试剂和反应产生的低聚合度物质。更换流动相时, 应先用流动相冲洗 30 min, 再用分离电压平衡 10 min 后进行测定。

## 3 结果与讨论

### 3.1 有机调节剂种类与浓度对电渗流的影响

流动相中有机调节剂对电渗流的影响主要由介电常数和粘度 2 种因素决定。此外, 溶质与固定相之间的亲水相互作用也受到有机调节剂的影响。在反相毛细管电色谱中, 除了有机调节剂种类外, 电渗淌度还受有机调节剂浓度的影响。图 1 显示的是 3 种有机调节剂在不同浓度下的电渗流情况。3 种体系测定的结果都表明电渗流随着有机调节剂的浓度增大而呈增大趋势, 但增大幅度较小。在 pH 9.8 时, 有机调节剂浓度从 60% 增加到 90%, 电渗流仅从  $6.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  增大到  $48.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。这是由于加入有机调节剂使流动相离子强度相对降低, 对孔表面双电层产生影响, 导致扩散层变厚, zeta 电势增大, 电渗流也增大。另外, 甲醇和乙腈可使溶液粘度降低, 也使电渗流增大。与乙腈和甲醇相比, THF 粘度较大, 但是强度也较大, 综合作用的结果是使其作为有机调节剂时电渗流较大。但是, 当 THF 浓度较大时, 电渗流变化较小。

### 3.2 使用不同电渗流标记物标记电渗流结果

电渗流速度也是重要的色谱热力学参量之一。只有得到准确的电渗流速度, 才能够得到准确的溶质容量因子的结果。在测定微电渗流柱的电渗流时, 必须选择合适的电渗流标记物。对于有机溶质, 随着疏水性的增加, 其与固定相表面的作用相对增强, 在色谱柱上的保留也相对增大。制备的无电渗流原位柱的分离机理是反相机理, 在反相电色谱中, 宏观电渗流一般采用被认为在固定相表面无保留的中性溶质如 DMSO、DMF、硫脲和吡啶或者不与固定相发生相互作用的溶剂如甲醇和 THF 作为示踪剂进行测定。表 1 是不同电渗流标记物测得的电渗流情况(电渗流标记物测定电渗流的 3 次平行测定结果, 标准偏差小于 5%)。表 1 结果表明: 甲醇和四氢呋喃等色谱中常用溶剂作为电渗流标记物, 因其不与固定相发生相互作用, 能够较为准确的标记电渗流大小, 但缺点是当有机调节剂浓度较低时, 峰较小甚至不出峰。DMSO 和 DMF 是极性非离子型化合物, 作为电渗流标记物可以取得较好的结果。电色谱中常用的硫脲测得的结果也令人满意。但采用吡啶测定的电渗流明显小于其他几种电渗流标记物, 这是由于在使用极性溶质如硫脲作为电渗流标记物时, 极性使其溶剂化的双电层的电荷分布不均匀, 这样溶质分子在流动相中的运动, 将受到溶剂化双电层的影响, 随溶剂化双电层一起发生小的泳动。另一方

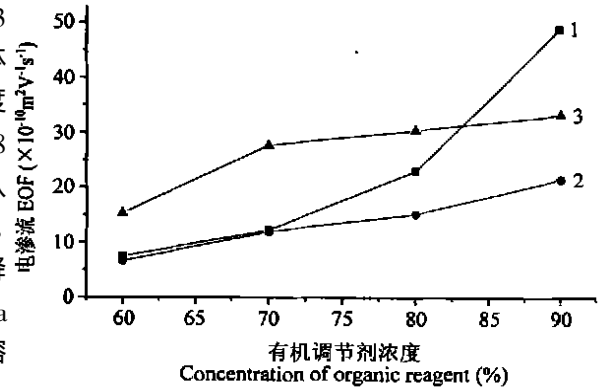


图 1 有机调节剂种类和浓度对电渗流的影响

Fig. 1 The effect of the species and proportion of organic solvent on electroosmotic velocity

1. 乙腈(acetonitrile); 2. 甲醇(methanol); 3. 四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)。柱(column): 75  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  20 cm/27 cm; 流动相(mobile phase): 有机调节剂(organic solvent): 水(water) = 80: 20 (V/V), 0.4 mmol/L 磷酸缓冲溶液(phosphate buffer), pH 9.8; 紫外检测波长(UV detection wavelength): 214 nm; 电压(voltage) 10 kV。

表 1 不同电渗流标记物测定电渗流结果

Table 1 The electroosmotic flow (EOF) of various EOF marker

乙腈 ACN (%)	硫脲 Thiourea	吡啶 Pyridine	二甲亚砜 DM SO	二甲基甲酰胺 DMF	甲醇 Methanol	四氢呋喃 THF
90	29.97	27.67	30.11	29.78	30.33	29.77
80	22.78	21.09	22.81	22.55	22.42	21.87
70	20.19	18.52	19.85	20.92	19.62	20.65
60	12.5	11.47	13.06	12.20	12.17	12.61

DMSO, 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide); DMF, 二甲基甲酰胺(dimethyl formamide); THF, 四氢呋喃(tetrahydrofuran); ACN, 乙腈(acetonitrile)

面, 在固定相表面及毛细管内壁表面存在部分极性或解离集团, 可以与极性基团发生作用, 导致在固定相上有所保留<sup>[15]</sup>。2 种因素综合的结果使用硫脲等测得的电渗流与甲醇等测得的结果一致。但是, 吡啶作为有机碱性溶质与管壁表面残余硅羟基上的作用较其他电渗流标记物强, 且其在流动相中的溶剂化作用也同其他非解离溶质存在差异, 因此测得的电渗流较小。

### 3.3 pH 值对电渗流的影响

不同 pH 值下电渗流的情况如图 2 所示。在高 pH 下, 表面硅羟基电离, 负电荷密度大, zeta 电势高。随着 pH 降低, 表面硅羟基电离受到抑制, 负电荷密度减小。在低 pH 值下, 由于硅羟基质子化作用, 负电荷表面被 H<sup>+</sup> 中和, 电渗流进一步减小至趋于零。图 2 表明, 电渗流随着 pH 值的降低而减小, 说明在微电渗流柱中, 微弱的电渗流是由毛细管壁上残留的未键合硅羟基产生的。在较高 pH 值(pH 10)时, 电渗流仍然维持较低水平, 说明作为无电渗流柱, 此种类型电泳柱可以应用于较宽的 pH 范围。

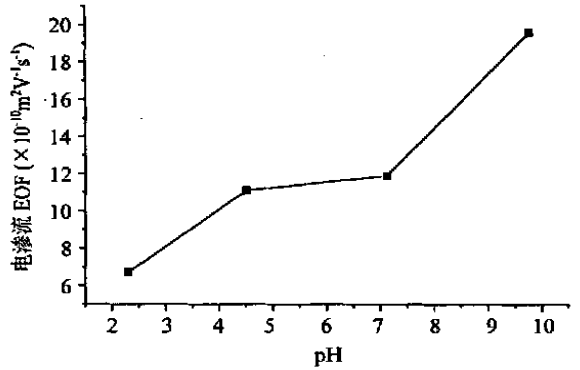


图 2 pH 值对电渗流的影响

Fig. 2 The effect of pH on electroosmotic velocity

柱(column): 75 μm i. d. × 20 cm/27 cm; 流动相(mobile phase): acetonitrile/water(80: 20, V/V) 0.4 mmol/L 磷酸缓冲溶液(phosphate buffer); 紫外检测波长(UV detection wavelength): 214 nm; 电压(voltage) 10 kV。

### References

- Iberer G, Hahn R, Jungbauer A. *LG GC*, **1999**, 17(11):998~ 1005
- Svec F, Frechet J M J. *Anal. Chem.*, **1992**, 64:820~ 822
- Lammerhofer M, Svec F, Frechet J M J. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 925(1- 2), :265~ 277
- Lammerhofer M, Svec F, Frechet J M J. *J. Microcolumn Sep.*, **2000**, 12(12), 597~ 602
- Minakuchi H, Ishizuka N, Nakanishi K. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 828: 83~ 90
- Tang Q L, Lee M L. *J. High Resol. Chromatogr.*, **2000**, 23(1): 73~ 80
- Peters E C, Petro M, Svec F. *Anal. Chem.*, **1998**, 70:2288~ 2295
- Yu C, Svec F, Frechet J M J. *Electrophoresis*, **2000**, 21:120~ 127
- Rohr T, Yu C, Davey M H. *Electrophoresis*, **2001**, 22(18):3959~ 3967
- Coufal P, Cihak M, Suchankova J. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 946(1- 2):99~ 106
- Wu R, Zou H, Ye M. *Anal. Chem.*, **2001**, 73:4919~ 4923
- Wu Renan(吴仁安), Zou Hanfa(邹汉法), Ye Mingliang(叶明亮), Xiong Bohui(熊博辉), Ni Jianyi(倪坚毅). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), **2001**, 19:193~ 195
- Zhang Yukui(张玉奎), Zhang Lingyi(张凌怡), Ping Guichen(平贵臣). *Chinese Patent*(专利申请), 02109800. X, **2002**
- Zhang L, Ping G, Zhang L, Zhang W, Zhang Y. *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26: 331~ 336
- You Huiyan(尤慧艳), Zhang Weibing(张维冰), Shan Yichu(单亦初). *Scientific Technology and Engineering*(科学技术与工程), **2002**, 3: 9~ 11

# Effect of Composition of Mobile Phase on Electrophoresis Osmotic Flow in Monolithic Capillary Columns with Low Electroosmotic Flow

Zhang Lingyi, Zhang Weibing, Zhang Yukui\*

(National Chromatography Research & Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics,  
Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011)

**Abstract** Monolithic columns with low electroosmotic flow (EOF) in the electric field have been prepared by in situ polymerization of butyl methacrylate and ethylene dimethacrylate in the presence of suitable porogenic solvents. Parameters that might affect EOF, such as the species and proportion of organic solvent, have been studied systematically. In the pH range of 2.3~9.8, steady EOF could be obtained with in  $19.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . When the proportion of organic solvent increased from 60% to 90%, the EOF increased from  $6.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  to  $48.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The results show that this kind of monolithic column could keep low EOF in the mode of CEC.

**Keywords** In situ polymerization, monolithic capillary columns with low electroosmotic flow, organic solvent, electroosmotic flow

(Received 27 April 2003; accepted 12 December 2003)

## “第二届全国微全分析系统学术会议”在杭州举行

由中国化学会、国家自然科学基金委员会化学部主办,浙江大学微分析系统研究所承办的“第二届全国微全分析系统学术会议”,以加强国内外学者的学术交流与合作,促进我国微全分析研究的发展为目的,于2004年4月20~23日在浙江大学隆重举行。中国科学院院士方肇伦、王立鼎、汪尔康、陈洪渊担任会议主席,我国大陆和香港190余名微流控分析领域及交叉学科的专家、学者出席了会议。国家自然科学基金委员会化学部分析化学学科主任庄乾坤、浙江大学倪明江副校长、陈子辰副书记到会祝贺并在开幕式上致辞。

会议共交流论文103篇,汪尔康院士、王立鼎院士、陈洪渊院士、杨梦苏教授、金文睿教授、陈义教授、林金明教授作了大会邀请报告,林炳承教授等应邀作了主题报告21篇,会议上还宣读口头报告24篇。会议报展论文57篇,经大会学术委员会投票评选,中国科学院长春应用化学研究所尹学博、东北大学王世立、中国科学院生态环境研究中心曾湖烈和浙江大学黄艳贞等四篇报展论文获“最佳报展奖”。

与会期间,代表们就包括微流体控制理论及技术、微流控芯片加工技术及材料、微检测系统、微分离方法、微分析系统的进样和试样处理技术、微分析系统在生命科学中的应用等前沿领域进行了广泛交流,对报告内容展开了热烈、深入的讨论。会议内容表明我国在发展简易微加工方法、微流控芯片单细胞分析、微流控芯片电致化学发光及微流控高效纳升进样和前处理和微流控芯片在生物医学中的应用等方面取得了一些突出的进展。会议论文质量和数量较两年前均有显著提高。会议中展示的成果表明我国在微全分析系统领域与美、英、日等先进国家的差距已明显缩小,在某些领域已接近或赶上国际先进水平。我国已从发展初期主要构建技术平台的阶段跨入微全分析系统的创新研究与开发应用阶段。与会代表们一致认为这是一次学术层次高、学术气氛浓厚的多学科交叉会议。会议的胜利召开预示着微全分析系统将在我国生命科学的发展中发挥巨大的作用。会议学术委员会决定“第三届全国微全分析系统学术会议”将于2005年11月由武汉大学主办。

(殷学锋 供稿)