

手性整体式毛细管液相色谱柱的制备与应用

杨书雨, 陈令新, 姚波, 罗国安, 王义明

(清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 采用紫外光引发模式制备了甲基丙烯酸酯类毛细管整体柱, 通过控制光照精确地控制了柱床的长度及边界。将环糊精 (β -CD) 共价连接到了高分子聚合物链上作为手性选择剂, 在碱性环境下以液相色谱模式实现了在人体的代谢反应中有着重要作用的 FITC 标记的 *D, L*-苯丙氨酸的分离, 理论柱效 125 000 plates/m, 并分析了流动相性质对分离的影响。

关键词: 整体柱; 原位聚合; β -环糊精; 激光诱导荧光; 甲基丙烯酸酯

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)01-0027-03

Preparation and Application of Chiral Monolithic Column for Capillary Liquid Chromatography

YANG Shu-yu, CHEN Ling-xin, YAO Bo, LUO Guo-an, WANG Yi-ming

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Monolithic capillary columns based on polyacrylamides with UV initiated technology were made, and the length and boundaries of the column bed were made precisely through adjustment of UV radiation. β -cyclodextrin (β -CD) was bonded to the porous polymers of columns which served as chiral selector. FITC labeled chiral amino acids which had important impacts on metabolism in vivo, were separated and detected by laser induced fluorescence (LIF) detection using liquid chromatography mode under an alkaline condition. Theoretical number of the column was about 125 000 plates/m. The influence of the mobile phase on the chromatographic performances was analyzed.

Key words Monolithic column; Situ polymerization; β -Cyclodextrin; Laser induced fluorescence (LIF); Polyacrylamides

毛细管液相色谱 (capillary high performance liquid chromatography, μ -HPLC) 是近年来发展极为迅速的一种高效、快速的新颖微柱分离方法^[1-3]。 μ -HPLC 的固定相可以分为填充式毛细管色谱柱、开管毛细管色谱柱和整体式毛细管色谱柱。整体式毛细管色谱柱是通过在毛细管内原位聚合或固定化的方法, 制成具有均一多孔结构的整体式固定相, 制备过程最为简单, 同时由于聚合单体的选择范围广, 可以得到不同性质的聚合柱, 可以满足不同样品的分析需求, 因而发展十分迅速。整体式毛细管色谱柱同样可以用于毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 研究中。与填充式毛细管色谱柱相比, 整体式毛细管色谱柱有效地避免了填柱、烧塞子等困难的工序 (塞子效应和气泡效应), 而且能有效地避免开管式毛细管色谱柱相比小、柱容量低等的缺点。

本文在室温条件下, 采用紫外光引发的方式制备了甲基丙烯酸酯类 μ -HPLC 手性整体柱^[4], 用环糊精 (β -CD) 对色谱柱进行了修饰, 并成功地对手性苯丙氨酸进行了快速高效的分离。紫外光引发方式可以精确地控制聚合物整体柱柱床长度, 对发展芯片上的液相色谱/电色谱十分重要。

1 实验部分

1.1 手性整体柱的制备

1.1.1 实验试剂 单体: 甲基丙烯酸丁酯 (BMA, Sigma 公司); 交联剂: 三羟甲基丙烷-三甲基丙烯酸

收稿日期: 2005-01-06 修回日期: 2005-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20475031, 202990306); 中国博士后科学基金资助项目 (20040350303)

作者简介: 杨书雨 (1982-), 男, 北京人, 硕士研究生; 罗国安, 联系人, Tel: 010-62781688, E-mail: luoga@mails.tsinghua.edu.cn

酸酯 (TRM, Sigma公司); 致孔剂: 正丙醇 (AR级, 北京化工厂), 甲酰胺 (AR级, 北京化工厂) 和 2-丙烯酰胺-2-甲基丙磺酸 (AMPS, Sigma公司); 引发剂: 偶氮二异丁腈 (AIBN, 北京化工厂); 毛细管预处理试剂: γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷 (z-6030 Dow Coming公司)。

甲基丙烯酸- β -环糊精酯为实验室合成, 合成方法如下: 由甲基丙烯酸 (AR级, 北京化工厂) 与亚硫酸酐 (AR级, 北京化工厂) 制备甲基丙烯酰酐^[5], 所得产物进一步与间硝基苯酚 (AR级, 北京化工厂) 反应制得甲基丙烯酸间硝基苯基酯, 再与 β -环糊精 (广州市嘉伟达化工有限公司, 提纯) 在 pH 11 的缓冲液中反应。经层析柱分离, 真空旋蒸浓缩干燥后即得到烯基化的 β -环糊精。该烯基化的 β -环糊精便会在自由基引发的高分子聚合反应中随机共价连接到聚合物链上。

1.1.2 手性整体柱的制备 毛细管预处理: 以 45% (v) 的冰醋酸, 50% (v) 水及 5% (v) z-6030 充于毛细管内过夜, 然后将上述混合液冲出, 处理后的毛细管用于下面的实验。

手性整体柱的制备: 以 Casting solvent 为溶剂即 20% (v) 乙醇, 20% (v) 磷酸盐 (5 mmol/L, pH 7.5) 和 60% (v) 乙腈的混合液, 配制含 AMPS 为 0.6% (w) 和 AIBN 为 5% (w) 混合溶液。取 200 μ L 上述混合溶液, 加入 70 μ L BMA、25 μ L TRM、55 μ L 正丙醇、45 μ L 甲酰胺、20 μ L z-6030 和 5 mg 甲基丙烯酸 β -环糊精酯, 混合振荡均匀制得反应混合溶液。再将此反应混合溶液充入上述预处理过的毛细管内, 在 365 nm 紫外光下反应约 1 h, 为了控制柱床长度, 预先将部分毛细管用 0.5 mm I.D. 氟塑胶管套住以掩蔽紫外光。制备好的毛细管整体柱用 75% (v) 乙腈的水溶液冲洗 1 h 以洗去残留的反应物。

整体柱尺寸 28 cm \times 75 μ m I.D., 柱床有效长度为 10 cm。将制备得到的聚合物整体柱柱床进行扫描电镜及红外光谱的表征。

1.2 手性氨基酸的分离分析

1.2.1 手性氨基酸的荧光标记 实验试剂: *D*, *L* 苯丙氨酸 (Phe) 和 *L*-苯丙氨酸 (Phe, Sigma公司), 荧光素异硫氰酸酯 (FITC, Sigma公司), 硼砂 (AR级, 北京化工厂)。

氨基酸储备液: 称取苯丙氨酸 9.91 mg 加入 3 mL 二次蒸馏水配制 20 mmol/L, 并在 4 $^{\circ}$ C 保存。

样品的荧光标记: 量取上述的储备液 0.25 mL, 加入 1.75 mL 20 mmol/L 硼砂 (pH 9.2) 和 0.2 mL 40 mmol/L FITC 的丙酮溶液, 配制 2.3 mmol/L 的荧光标记混合溶液, 室温暗处过夜, 即可完成氨基酸的荧光标记过程。使用时稀释成 58 μ mol/L 的工作液。

1.2.2 手性氨基酸的分离 实验仪器: 高效毛细管电泳仪 BeckmanP/ACE 550Q 激光诱导荧光检测 (LIF, 488 nm 氩离子激光器); 上述制得的毛细管整体柱。

样品: FITC 标记的氨基酸溶液 (参见 1.2.1)。流动相: 5 mmol/L 磷酸盐 (pH 8.5) - 乙腈 (体积比 30:70), 其中, 乙腈 (色谱纯, Fisher公司), 磷酸二氢钠 (AR级, 北京化工厂); 5.512 \times 10⁵ Pa 压力下进样 5 s, 并在此压力下进行分离。

2 结果与讨论

2.1 整体柱的表征

在上述掩蔽紫外光的管内部分, 聚合反应未进行或反应进行的程度较低, 毛细管内仍为液体状物质, 未出现固体状柱床, 而未掩蔽紫外光的部分则形成连续、均匀的整体柱柱床, 将所制备得的整体柱柱床用扫描电镜分析, 所得的扫描电镜图如图 1。

由图 1 可看出, 所制备的整体柱柱床颗粒均匀, 保证了柱床具有一定的机械强度, 而且由于致孔剂的加入, 在柱床上形成了一定的孔, 保证了柱床的通透性。而且柱床与管壁的连接较紧密, 不会在管壁处漏液。且由于毛细管内径较细, 柱床与空气接触面较小, 放置 6 周后, 柱床也不会开裂, 由此保证了柱床有较高的使用寿命。

将制备得的聚合物整体柱柱床进行红外光谱的表征。其红外光谱吸收曲线如图 2 所示。

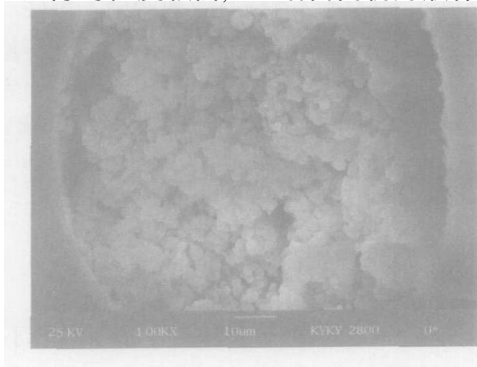


图 1 柱床的扫描电镜图

Fig 1 SEM picture of porous polymers

在图 2 中曲线 1 为聚甲基丙烯酸酯聚合物柱床的红外吸收曲线, 柱制备过程见 1.1.2 节, 在制备时未加入甲基丙烯酸- β -环糊精酯, 曲线 2 为制备时加入甲基丙烯酸- β -环糊精酯后的聚合物柱床的红外吸收曲线。在波数 3440 cm^{-1} 附近, 曲线 2 相比 1 有明显的吸收峰, 经指认为 β -环糊精所带羟基的吸收峰。在进行红外光谱分析前, 柱床固体已分别用 10% 醋酸及乙腈超声洗涤并干燥。图 2 表明, β -环糊精已经通过共价键连接至了聚合物柱床上。

2.2 手性氨基酸的分离

我们采用磷酸盐溶液与乙腈的混合溶液为色谱流动相, 压力 ($5.512 \times 10^5\text{ Pa}$) 进样 5 s , 得到氨基酸样品的色谱图如图 3 所示。实验中我们将 L 氨基酸样品加入 D, L 氨基酸混合样品中, 保证 D 型与 L 型的浓度比为 $2:3$, 由此便可准确无误地对两个峰进行指认。

从图 3 可看出, FITC 标记的 D, L -苯丙氨酸在自行制备的 μ -HPLC 手性整体柱中得到了快速分离, 其分离时间不到 6 min , 图 3 中样品信号后有一微小的倒峰, 它与仪器波动及流动相对样品信号峰的干扰有关, 但该倒峰强度很小, 且与样品信号相互分离, 因此并不影响对正常信号的观测。

本文制备的整体柱是将 β -环糊精通过烯键连接至聚合物整体柱柱床上作为色谱固定相, 提高了 β -环糊精对手性氨基酸分离效果的稳定性。另外我们还考查了流动相 pH 值对分离效果的影响。当流动相 pH 较小 ($\text{pH } 4\sim 7$) 时, 氨基酸样品很难被洗脱, 在 30 min 内都很难出峰, 说明此时氨基酸样品所带电荷与柱床表面的荷电基团发生强烈的静电相互作用, 因而很难被洗脱; 当流动相 pH 较大 ($\text{pH } 10$) 时, 虽然会缩短样品的分析时间, 但会对样品的信号峰产生较强的干扰, 如图 4 图中标记的 L 代表 FITC 标记的 L -苯丙氨酸, 此时倒峰的信号强度与正常信号峰的强度大致相同, 已无法进行分析。由此为保证较高的分离效率和较小的干扰, 我们选定流动相的 pH 为 8.5 较适宜。此外流动相中盐浓度和乙腈的浓度也会对分离效果产生影响, 盐浓度的高低会对样品与固定相间的相互作用产生影响, 而适当的乙腈可以保证流动相与聚合物柱床能很好地浸润, 避免产生气泡。综合考虑, 我们最后得到对手性氨基酸分离最佳的色谱流动相组成为 5 mmol/L 磷酸盐 ($\text{pH } 8.5$) - 70% 乙腈。采用 LF 检测, 能大大提高氨基酸样品的检出限, 本实验中氨基酸样品的检出限为 $1 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$ 。

2.3 整体柱柱效评价

经计算可得样品的容量因子 $k' = 4.56$, 本文以 L -苯丙氨酸为分析物, 以硫脲作为不保留标记物。计算后得整体柱的有效塔板数为 $125\,000\text{ plates/m}$ 。可看出所制备得的整体柱的柱效很高, 而且由 L -苯丙氨酸较高的容量因子也可以说明所制备的整体柱柱床中所共价连接的手性选择剂 β -CD 的含量很高, 因此能够在短时间内实现对手性氨基酸的分离分析。

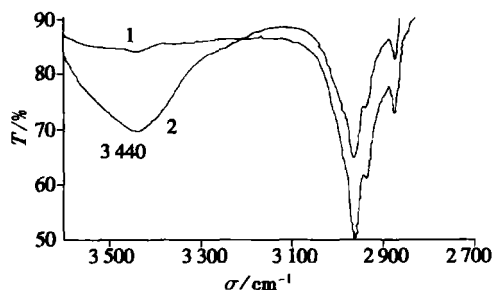


图 2 聚合物柱床的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of porous polymers

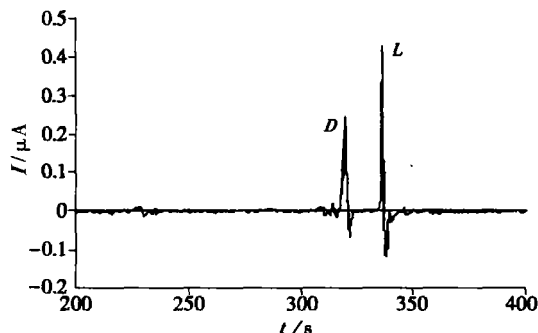


图 3 FITC 标记的 D, L -苯丙氨酸的色谱图

Fig. 3 Chromatography of FITC labeled D, L -Phe mobile phase: 5 mmol/L phosphate ($\text{pH } 8.50$) - acetonitrile ($30:70$ by volume), driving pressure: $5.512 \times 10^5\text{ Pa}$

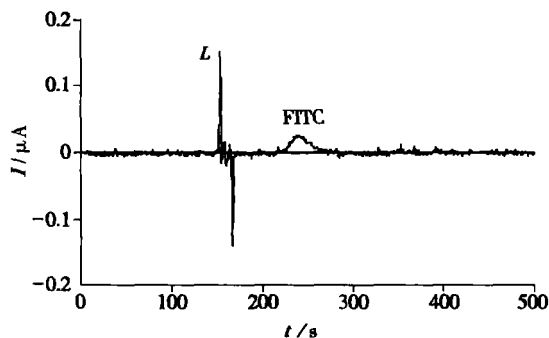


图 4 FITC 标记的 L -苯丙氨酸的色谱图

Fig. 4 Chromatography of FITC labeled D, L -Phe mobile phase: 5 mmol/L phosphate ($\text{pH } 10$) - acetonitrile ($30:70$ by volume), driving pressure: $5.512 \times 10^5\text{ Pa}$

表 2 不同预处理方法的测定结果

Table 2 Determination results obtained by using two different sample pretreatment methods

		Microwave digestion method		Iodine-xylene-HNO ₃ stripping method	
		Cu	Fe	Cu	Fe
Content	9#	0.298	1.410	0.302	1.469
$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	9#	0.431	1.164	0.444	1.195
	9#	0.211	0.908	0.221	0.939
RSD $s_r/\%$	9#	2.08	3.23	2.74	1.14
	9#	1.86	2.78	2.30	1.44
	9#	3.50	2.53	3.85	2.11
Recovery $R/\%$	9#	98~107	92~104	99~107	95~104
	9#	96~106	96~106	94~106	94~106
	9#	93~103	94~106	93~105	94~107

参考文献:

- [1] GWKB1-1999 [S]. Hazardous Materials Control Standard for Motor Vehicle Gasoline(车用汽油有害物质控制标准).
- [2] WANG Xi HE Jing YAN Jingjie [J]. Modern Instrument(王霞, 何京, 颜景杰. [J]. 现代仪器), 2003, 1(2): 36-38
- [3] DU Bin WEI Qin [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry(杜滨, 魏琴. [J]. 分析化学), 1994, 22(12): 12-13
- [4] TATIANA D S P, LUCIA F D, D RCE P, *et al* [J]. Spectrochimical Acta Part B, 2002, 57: 1991-2001
- [5] JIN Qinhan, WANG Fendi HEFT JEGM. [J]. Chemical Journal of Chinese Universities(金钦汉, 王芬蒂, HEFT JEGM. [J]. 高等学校化学学报), 1990, 11(12): 1353-1356
- [6] LU Xiaojing YU Amin, ZHANG Hanqi *et al* [J]. Chemical Journal of Chinese Universities(刘晓晶, 于爱民, 张寒琦, 等. [J]. 高等学校化学学报), 1992, 13(3): 307-310
- [7] ZHOU Jianguang, PENG Zenghui XUN Tingfu *et al* [J]. Chemical Journal of Chinese Universities(周建光, 彭增辉, 邹廷富, 等. [J]. 高等学校化学学报), 2002, 23(7): 1273-1276
- [8] ZHANG Jinni Question for Basic Knowledge of Petroleum and Chemical-Technology Analyses[M]. Beijing: Chinese Petroleum and Chemical Technology Press(张金锐. 石油化工分析基础知识问答[M]. 北京: 中国石化出版社), 1995
- [9] American Society for Testing and Materials ASTM D 3116-82[S] (美国材料试验协会标准 D 3116-82[S]).
- [10] YANG Cuiding GU Kanying WU Wenhui Method of Petroleum and Chemical Technology Analysis[M]. Beijing: Science Press(杨翠定, 顾侃英, 吴文辉. 石油化工分析方法[M]. 北京: 科学出版社), 1990
- [11] GB/T 2432-8J Gasoline Determination of Tetraethyl Lead Content Complexometric Titration Method[S] (汽油中四乙基铅含量测定法(络合滴定法)[S]).
- [12] SUN Xiaojuan, FANG Yunni, ZHANG Xi *et al* [J]. Journal of Jiangsu Institute of Petrochemical Technology(孙晓娟, 方云如, 张欣, 等. [J]. 江苏石油化工学院学报), 1999, 11(4): 4-7

(上接第 29 页)

3 结 论

本文通过将甲基丙烯酸- β -环糊精酯作为手性选择性功能单体, 采用室温紫外光引发的方式成功制备了 μ -HPLC 手性整体柱, 并将其用于 FIC 标记的手性苯丙氨酸的快速高效的分离实验。此外, 与传统的热引发方式制备整体柱的方式相比, 光引发制备不仅可以提高整体柱的制备效率, 而且可以精确地控制聚合物整体柱柱床的长度。

参考文献:

- [1] CHEN Lingxin, GUAN Yafeng MA Jiping [J]. Progress in Chemistry(陈令新, 关亚风, 马继平. [J]. 化学进展), 2003, 15(2): 107-116
- [2] CHEN L X, MA J P, GUAN Y F. [J]. J Chromatogr A, 2004, 1028(2): 219-226
- [3] CREGO A L, GONZALEZ A, MARINA M L. [J]. Crit Rev Anal Chem, 1996, 26: 261
- [4] SHU X, CHEN L X, YANG B C, *et al* [J]. J Chromatogr A, 2004, 1052: 205-209
- [5] ZENG Shu, YU Yunfeng LIANG Yao [J]. Paint and Coatings Industry(曾舒, 于云峰, 梁遥. [J]. 涂料工业), 1996, (2): 20