

谨以此文庆贺张玉奎院士七十华诞

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00830

“一锅法”制备C18-硅胶杂化毛细管整体柱及其应用

张振宾^{1,2}, 欧俊杰^{1*}, 董靖¹, 王方军¹, 吴明火¹, 林辉^{1,2}, 邹汉法^{1*}

(1. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 辽宁大连 116023; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:发展了一种“一锅法”制备有机-无机杂化毛细管整体柱的方法。首先将四甲氧基硅烷、乙烯基三甲氧基硅烷在弱酸条件下水解,然后加入有机单体(甲基丙烯酸-N,N-二甲基十八烷基溴化铵乙酯)及自由基聚合引发剂,同步原位完成硅羟基间的缩聚反应及双键间的自由基聚合反应,从而制成C18-硅胶杂化整体柱;同时用毛细管电色谱(CEC)和毛细管液相色谱(CLC)对其柱效和分离能力进行了初步评价,并将其应用到微柱液相色谱-串联质谱对牛血清白蛋白酶解液的分离分析。结果表明,该C18-硅胶杂化整体柱具有较高的柱效和较好的重现性,在分离分析复杂生物样品方面具有较大的应用前景。此外,本文所发展的方法在制备杂化整体柱的过程中不借助相应的硅烷试剂,为杂化整体柱的制备提供了一种新的思路。

关键词:整体材料;有机-无机杂化;一锅法;毛细管电色谱;毛细管液相色谱;蛋白质组分析

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)09-0830-07

Preparation of C18-silica hybrid monolithic capillary column by “one-pot” process and its application

ZHANG Zhenbin^{1,2}, OU Junjie^{1*}, DONG Jing¹, WANG Fangjun¹,
WU Minghuo¹, LIN Hui^{1,2}, ZOU Hanfa^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, National Chromatographic R.&A. Center, Dalian 116023, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: A “one-pot” process for the preparation of organic-silica hybrid capillary monolithic column by concurrently using tetramethoxysilane (TMOS), vinyltrimethoxysilane (VTMS) and the organic monomer, N-(2-(methacryloyloxy) ethyl) dimethyl-octadecylammonium bromide (MDOAB), is described. The polycondensation of alkoxy silanes and the copolymerization of MDOAB and VTMS were subsequently carried out within the confines of a capillary under the proper reaction conditions. The performance of the C18-silica hybrid monolithic column was investigated by capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography. In addition, the C18-silica hybrid capillary monolithic column was also applied in the analysis of tryptic digests of bovine serum albumin by capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry (CLC-MS/MS) for demonstrating its potential in proteome analysis. This *in situ* process of incorporating functional groups into silica monolith provides a new way for the preparation of the organic-silica hybrid monolithic column.

Key words: monolith; organic-inorganic hybrid; one-pot; capillary electrochromatography (CEC); capillary liquid chromatography (CLC); proteome analysis

* 通讯联系人: 邹汉法, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物分离分析新材料与新技术等相关研究工作. Tel: (0411)84379610, E-mail: hanfazou@dicp.ac.cn.

欧俊杰, 博士, 副研究员, 主要从事整体材料的制备及应用研究工作. E-mail: junjieou@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20735004, 20975101)和国家自然科学基金创新研究群体项目(21021004).

收稿日期: 2011-08-03

毛细管整体柱采用原位聚合的方式在毛细管内形成均一、多孔结构的整体式固定相。它不仅避免了填充毛细管柱制备过程中柱塞烧制和颗粒装填等繁琐步骤,还具有比填充柱更好的通透性,可实现快速分离^[1,2]。由于固定相的孔结构和表面化学性质容易控制,毛细管整体柱成为微柱分离技术发展的重要方向之一。按照制备单体的不同,毛细管整体柱可以分为三类:有机聚合物整体柱^[3,4]、硅胶整体柱^[5-7]和杂化整体柱^[8,9]。不同类型的整体柱具有各自的优缺点。由于杂化整体柱在一定程度上结合了有机整体柱和硅胶整体柱的优点(如制备简单、pH 稳定性好、机械强度高),自从 Malik 等^[10]首次通过溶胶-凝胶法制备杂化整体柱后,杂化整体柱的制备及应用日益引起了人们的重视。杂化整体柱的制备方法主要有一步法和两步法:一步法是在合适的酸碱条件下,硅烷试剂的水解和缩聚同时进行,最后形成多孔结构;而两步法则先让硅烷试剂在酸性条件下完全水解,然后加入碱性催化剂,使其发生缩聚反应并形成多孔结构。到目前为止,已经制备得到辛基^[11]、苯基^[9,12]、氨基^[13]、烯丙基^[14]、巯基^[15]等多种类型的杂化整体柱。然而,可用于制备杂化整体柱的硅烷试剂有限而且很多具有特定官能团的硅烷试剂制备困难或价格昂贵。

最近我们课题组发展了一种“一锅法”制备杂化整体柱的方法^[16,17]。首先将四甲氧基硅烷、乙烯基三甲氧基硅烷水解后,加入带有双键的有机单体及自由基聚合反应引发剂,在适当的条件下同步原位完成硅羟基之间的缩聚反应及双键之间的自由基聚合反应从而制成杂化整体柱。该方法的优点是在制备杂化整体柱的过程中不依赖相应的硅烷试剂,为制备各种类型的杂化整体柱提供了新的思路。本文以甲基丙烯酸-N,N-二甲基十八烷基溴化铵乙酯(MDOAB)为有机单体,经过系统的优化制备条件,采用“一锅法”成功制备了 C18-硅胶杂化整体柱,用毛细管电色谱(CEC)和毛细管液相色谱(CLC)对其柱效和分离能力进行了初步评价,并将其应用到毛细管液相色谱-串联质谱(CLC-MS/MS)中对牛血清白蛋白酶解液进行了分离分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

电色谱仪 Agilent CE system 购自安捷伦公司(Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany); CLC 系统为实验室自行搭建,包括高效液相色谱(HPLC)泵(Agilent 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn, Ger-

many)、进样阀(Model 7125, Rheodyne)和 Knauer 紫外检测器(K-2501, Knauer),数据采集器(CT-21)及色谱工作站均为北京彩陆科学仪器有限公司产品;LTQ 线性离子阱质谱仪购自美国热电公司(ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 AutoflexTM (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF/MS) 购自布鲁克公司(Bruker Daltonics Autoflex, Germany)。四甲氧基硅烷(tetramethoxysilane, TMOS) 购自武汉大学化工厂;偶氮二异丁腈(azobisisobutyronitrile, AIBN, 分析纯) 购自上海化学试剂厂,用乙醇重结晶后使用;尿素(urea)、二硫苏糖醇(dl-dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA) 购自华美生物工程公司;乙烯基三甲氧基硅烷(vinyltrimethoxysilane, VTMS), 聚乙二醇(PEG, M_r : 10 000), 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、胰蛋白酶购自 Sigma 公司(St. Louis, MO); 甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(2,2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, DEMA) 购自南京康满林化工实业有限公司;溴代十八烷(1-bromooctadecane) 购自北京化工厂;乙腈(ACN) 为色谱纯, 甲醇(MeOH)、氢氧化钠、三氟乙酸(TFA)、醋酸(HAc)、盐酸、甲酸(FA)、碳酸氢铵、乙酸乙酯、正己烷、磷酸二氢钾等试剂均为分析纯, 购自天津市化学试剂二厂。熔融石英毛细管(50 μm i. d. \times 375 μm o. d., 75 μm i. d. \times 375 μm o. d.) 购自河北永年锐沓色谱器件有限公司。所用水均为双蒸水且经过 Milli-Q (Bedford, MA, USA) 处理。

1.2 色谱条件

1.2.1 电色谱条件

电色谱实验中毛细管的温度均设为 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 214 nm。毛细管整体柱先用流动相平衡 30 min。在第一次进样前, 分离电压在 10 min 内缓慢从 0 增至 -13 kV, 然后维持在该电压下至基线稳定。

1.2.2 CLC 色谱条件

CLC 系统进样阀的出口端与 T 型三通相连, 三通的另外两接口分别与分流毛细管(50 μm i. d. \times 375 μm o. d., 长 95 cm) 和毛细管整体柱相连, 分流比控制在 1/500 左右。毛细管整体柱的出口端与一空毛细管相连(50 μm i. d. \times 375 μm o. d.), 在空管上距离毛细管整体柱出口端 6 cm 的位置烧制一个检测窗口, 检测波长为 214 nm。

1.3 BSA 酶解液的制备

将 1.0 mg BSA 溶解于 1 mL 的 8 mol/L 尿素及 100 mmol/L 碳酸氢铵中, 加入 5 μL DTT 溶液(5

mmol/L)后,将该混合物置于 60 °C 放置 1 h 以还原蛋白质中的二硫键。然后加入 1.85 mg IAA (10 mmol/L)并在室温下避光放置 40 min。再用 100 mmol/L 的碳酸氢铵缓冲液(pH 8.2)将该溶液稀释 8 倍,按 1:25 (w/w)的比例加入胰蛋白酶,在 37 °C 水浴中酶解 16 h。酶解完成后,用 10% 的 TFA 将该酶解液的 pH 调至 2.7。用自制的 C18 固相萃取柱对酶解产物进行除盐并富集。将收集后的 BSA 酶解产物分装后于 -20 °C 下保存备用。

1.4 CLC-MS/MS 分析 BSA 酶解液的条件

CLC-MS/MS 实验在 ThermoFinnigan LTQ 上进行。CLC 部分包括自动脱气、Surveyor MS 泵、自动进样器;质谱部分包括电喷雾离子源和线性离子阱质谱。HPLC 泵驱动的流动相经传输毛细管至 PEEK microcross (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA)。在 PEEK microcross 余下的一端接上铂丝,以提供喷雾所需的电压。CLC 所采用的流动相为 A: 0.1%FA 水溶液, B: 含 0.1%FA 的 ACN,分流后有效流速约为 200 nL/min。毛细管温度为 200 °C,喷雾电压为 1.8 kV。MS 和 MS/MS 谱图采集采用数据依赖模式(Data-dependent mode),对 BSA 酶解液进行 m/z 400~2000 全扫描,对强度最高的 6 个离子

进行独立的 MS/MS 扫描。

1.5 质谱数据分析

CLC-MS/MS 所得数据采用基于 SEQUEST 算法的 BioWorks 软件进行检索。检索参数设置: bovine. fasta 数据库,甲硫氨酸残基加 15.99 Da 的可变修饰,半胱氨酸加 57.02 Da 的固定修饰,母离子质量容忍度为 2 Da,碎片离子质量容忍度为 0.8 Da;胰蛋白酶完全酶切,最多允许两个漏切位点;所有鉴定得到的肽段须满足以下条件:单电荷肽段,筛选门槛 $X_{corr} \geq 1.9$;双电荷肽段,筛选门槛 $X_{corr} \geq 2.2$;三电荷肽段,筛选门槛 $X_{corr} \geq 3.75$,筛选门槛 $\Delta C_n \geq 0.1$ 。

1.6 有机单体 MDOAB 的合成

参考本课题组以前的合成方法^[18]。将 9 mL 溴代十八烷(26.5 mmol)溶解于 20 mL 乙醇中,逐滴加入 4 mL DEMA (23.8 mmol),室温下搅拌 10 min 后将温度提高到 55 °C,继续搅拌 36 h。反应完成后减压蒸馏除去溶剂得到黄色液体。加入 40 mL 乙酸乙酯/正己烷(20:80, v/v),在 4 °C 下放置 1 h,过滤并干燥,得到 9.2 g 产品,产率为 95%。用 MALDI-TOF/MS 对产物进行鉴定,相对分子质量为 410.33[M⁺]。合成路线如图 1 所示。

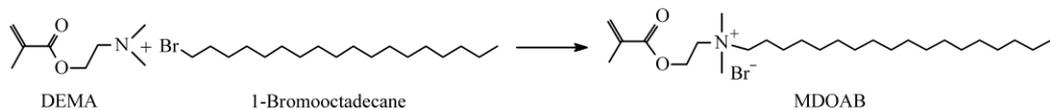


图 1 有机单体 MDOAB 的合成路线

Fig. 1 Scheme for the synthesis of N-(2-(methacryloyloxy)ethyl)dimethyl-octadecylammonium bromide (MDOAB)

1.7 C18-硅胶杂化毛细管整体柱的制备

1.7.1 毛细管预处理

先用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗石英毛细管 2 h,再用去离子水冲洗 30 min;接着用 0.1 mol/L 盐酸溶液冲洗 12 h,然后用去离子水冲至流出液为中性,最后在室温下用氮气吹干备用。

1.7.2 C18-硅胶杂化毛细管整体柱的制备

首先将 713.9 mg PEG、1 015.5 mg 尿素、1.8 mL

TMOS、0.6 mL VTMS 与 5.0 mL 10 mmol/L 醋酸溶液相混合,在冰水浴中搅拌水解 1 h,形成均一的溶液后,取出 0.5 mL 水解液,加入 30 mg 有机单体 MDOAB 和 2 mg 引发剂 AIBN,超声 10 min 后用注射器将预聚液引入毛细管中。再将其两端密封置于 45 °C 水浴锅中反应 12 h,然后置于 60 °C 下继续反应 12 h。最后用水及甲醇依次冲洗毛细管柱,将致孔剂及一些未反应完的残余物冲出。其制备过程见图 2。

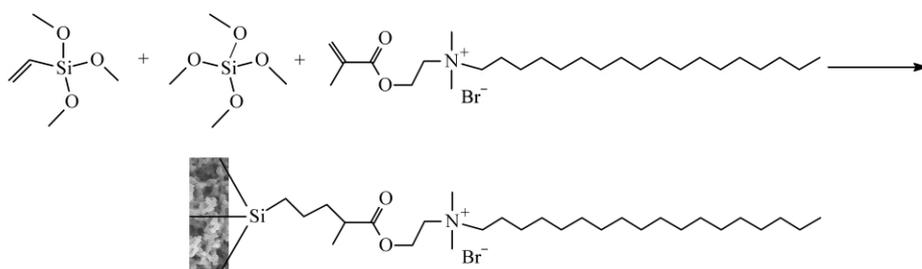


图 2 “一锅法”制备 C18-硅胶杂化整体柱示意图

Fig. 2 Scheme for the preparation of the C18-silica hybrid monolithic column by “one-pot” process

2 结果与讨论

2.1 C18-硅胶杂化毛细管整体柱制备条件的优化

在制备整体柱的过程中发现致孔剂的含量、温度等因素对柱床形貌及色谱性能有较大影响。因此,我们对以上因素进行了考察。

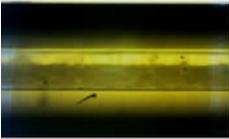
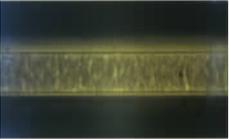
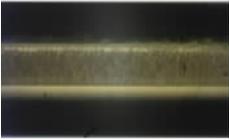
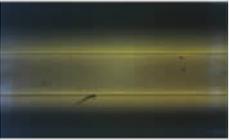
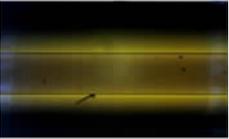
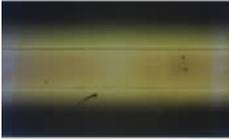
首先,我们考察了致孔剂 PEG 和尿素的含量对柱形貌的影响,结果如表 1 所示。PEG 除了起到致孔作用外还会影响溶胶-凝胶反应过程中的相分离过程^[15]。保持体系中尿素的含量为 699.6 mg 不变,改变 PEG 的含量时发现,当 PEG 的含量小于 607.6 mg 时,形成的整体柱有明显的脱壁现象。这可能是因为 PEG 含量较少时,在溶胶转变为凝胶过程中体积会发生收缩,导致形成的整体材料沉向毛

细管一侧,即发生脱壁现象;随着 PEG 含量增加,体积收缩减小,相分离速度减小,形成的整体柱形貌致密均匀;然而 PEG 的含量太高将导致形成的整体柱通透性变差。

与 PEG 的作用相似,尿素作为致孔剂的同时也会影响溶胶-凝胶反应中相分离的速度。保持体系中 PEG 的含量为 713.9 mg 不变,改变尿素的含量时发现,当尿素的含量小于 603.8 mg 时,形成的整体柱形貌较松散,这可能是因为尿素含量较低时,在溶胶转变为凝胶过程中体积收缩严重,导致形成的整体柱有明显的脱壁现象;随着尿素含量的增加,体积收缩减小,相分离速度也减小,形成的整体柱形貌致密均匀;然而当尿素含量大于 1 015.5 mg 时,形成的整体柱通透性变差。

表 1 C18-硅胶杂化毛细管整体柱制备条件的优化

Table 1 Optimization of preparation conditions for the C18-silica hybrid monolithic column

PEG/mg ¹⁾	Morphology	Urea/mg ²⁾	Morphology	T/°C ³⁾	Morphology
607.6		603.8		35	
713.9		846.8		45	
940.3		1015.9		50	

1) urea content: 699.6 mg; polycondensation temperature: 45 °C. 2) PEG content: 713.9 mg; polycondensation temperature: 45 °C. 3) T: polycondensation temperature; PEG: 713.9 mg; urea: 1015.5 mg. Other conditions: 10 mmol/L HAc, 5 mL; TMOS, 1.8 mL; VTMS, 0.6 mL; MDOAB, 30 mg.

采用“一锅法”制备杂化整体柱的时候,首先在较低的温度下进行缩聚反应形成整体柱骨架,然后进一步升高温度至 60 °C,引发自由基聚合反应,使有机功能单体 MDOAB 经过原位聚合反应共价键合到整体柱骨架表面。实验过程中发现自由基聚合反应温度对整体柱形貌的影响不是很明显,然而,缩聚反应温度对整体柱形貌的影响很大,因此我们分别考察了不同的缩聚温度下(35、45 及 50 °C)形成的整体柱形貌及其通透性,实验结果如表 1 所示。从表 1 中可以得知,在温度偏低(<35 °C)的情况下,形成的整体柱不能填满整个毛细管而沉积在一侧,即出现严重的脱壁现象,这可能是温度较低时溶胶转变为凝胶时体积发生收缩导致的;然而温度偏高(>50 °C)时,形成的整体柱外观有些透明,通透性差,以致流动相都不能通过;由于体系中 PEG 和尿

素含量保持不变,相分离速度也不变,但随着温度的升高,溶胶转变为凝胶的速度加快^[15],因此形成的整体柱骨架中的孔尺寸逐渐减小,导致形成的整体柱通透性逐渐变差。只有在比较合适的温度条件下(45 °C)才能形成均匀且通透性良好的整体柱。

基于上述考察,实验中预聚液的组成为 PEG 713.9 mg、尿素 1 015.5 mg、10 mmol/L HAc 5 mL、TMOS 1.8 mL、VTMS 0.6 mL、MDOAB 30 mg;缩聚反应温度为 45 °C;自由基聚合温度为 60 °C。

2.2 C18-硅胶杂化毛细管整体柱的表征

图 3 为在优化条件下制备的 C18-硅胶杂化整体柱截面的扫描电镜图。从图 3 中可以看出,多孔骨架分布均匀且与管壁结合紧密。

以 40% 的乙腈为流动相考察了 C18-硅胶杂化整体柱的机械强度。流速(X)由 0.86 μL/min 增加

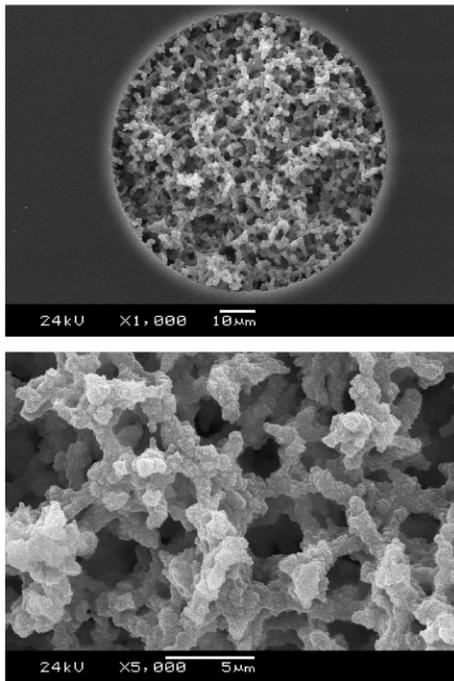


图 3 C18-硅胶杂化整体柱的扫描电镜图
Fig. 3 SEM photographs of the C18-silica hybrid monolith

到 2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时柱压(Y)呈线性增加,线性方程为 $Y=108X$, 相关系数 $r=0.999$ 。表明该 C18-硅胶杂化整体柱具有良好的机械强度。通透性 B_0 的计算根据 Darcy 关系式^[19]: $B_0 = F\eta L / (\pi r^2 \Delta P)$, 式中 F 为流动相的速率, η 为流动相的黏度(0.801 cp), L 是毛细管柱的有效长度, r 是毛细管柱的内半径, ΔP 是对应的柱压降。经计算,该杂化整体柱的通透性为 $1.9 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, 这表明该杂化整体柱具有较好的通透性。

分别用 CLC 和 CEC 方式考察了柱效与流速的 van Deemter 方程曲线, 实验结果如图 4 所示。以硫脲和丁苯为标准样品, 通过改变流速或电色谱两端的分离电压测得。在 CLC 中硫脲和丁苯的最低理论塔板高度分别为 14.9 μm 和 17 μm , 对应的柱效分别为 $6.7 \times 10^4 \text{ N}/\text{m}$ 和 $5.8 \times 10^4 \text{ N}/\text{m}$ 。在 CEC 中硫脲和丁苯的最低理论塔板高度分别为 3.6 μm 和 10 μm , 对应的柱效分别为 $2.8 \times 10^5 \text{ N}/\text{m}$ 和 $1.0 \times 10^5 \text{ N}/\text{m}$ 。CEC 中柱效远远高于 CLC 是因为在 CEC 中采用电渗流来推动流动相, 不仅克服了 CLC 中流速分布不均匀引起的峰扩展, 而且柱内无压降, 使得峰扩展仅与溶质扩散系数有关。

通过测定分析物的保留因子考察了色谱柱的重现性。在 CLC 和 CEC 中, 柱与柱间的相对标准偏差(RSDs)分别小于 3.4% ($n=3$)和小于 4.7% ($n=3$), 批次与批次间的 RSD 分别小于 5.6% ($n=$

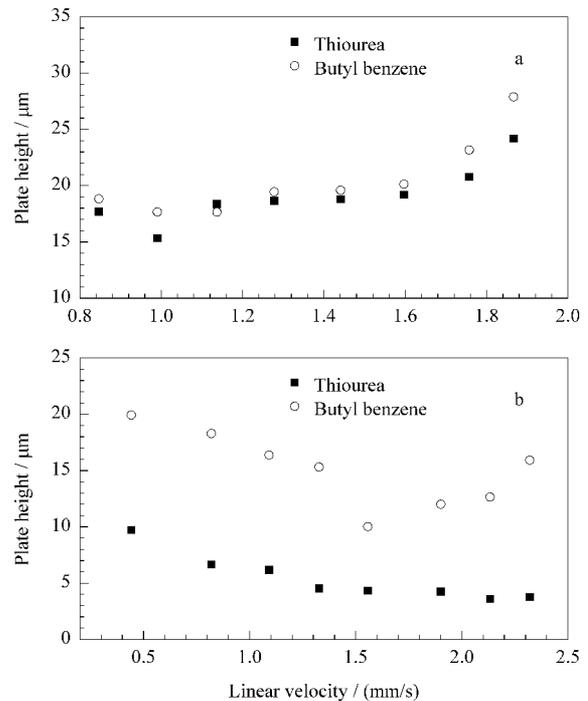


图 4 C18-硅胶杂化整体柱的流速与理论塔板高度的 van Deemter 曲线

Fig. 4 van Deemter plots for the C18-silica hybrid monolithic column

a. CLC; b. CEC.

Conditions: a. monolithic capillary column, 24 cm (effective length) \times 75 μm i. d.; mobile phase, 0.1% FA containing 45% ACN; injection, 2 μL (before split). b. monolithic capillary column, 33 cm (effective length) \times 75 μm i. d.; mobile phase, 10 mmol/L KH_2PO_4 buffer at pH 3.05 containing 50% ACN; injection, -5 kV for 2 s; detection wavelength, 214 nm.

3)和 6.3% ($n=3$); 该结果说明该杂化整体柱具有较好的重现性。

2.3 C18-硅胶杂化毛细管整体柱的应用

2.3.1 在毛细管电色谱中的应用

由于在单体上引入的季铵基团有利于 CEC 中电渗流的产生, 因此首先将制备的 C18-硅胶杂化整体柱应用于 CEC 中。理论上, 当 pH 值为 3.05 时硅羟基的电离被抑制, 电渗流主要依靠季铵基团来产生。实验结果证明了这一点: 当我们采用正向电压进行分离时没有溶质被检测到; 当改为负向电压时溶质则很容易地被检测到。而且当 pH 值增大到 7 时, 电渗流方向依然保持不变, 即由季铵基团产生的反向电渗流依然大于由解离的硅羟基产生的电渗流, 这也进一步表明有较多的功能单体键合到了整体柱表面上。用含有 50% ACN 的磷酸二氢钾缓冲液 (pH=3.05, 浓度为 10 mmol/L) 为流动相, 在 C18-硅胶杂化整体柱上基线分离了苯系物、多环芳烃(PAHs)、苯酚类、苯甲酸类化合物, 实验结果如图 5 所示。

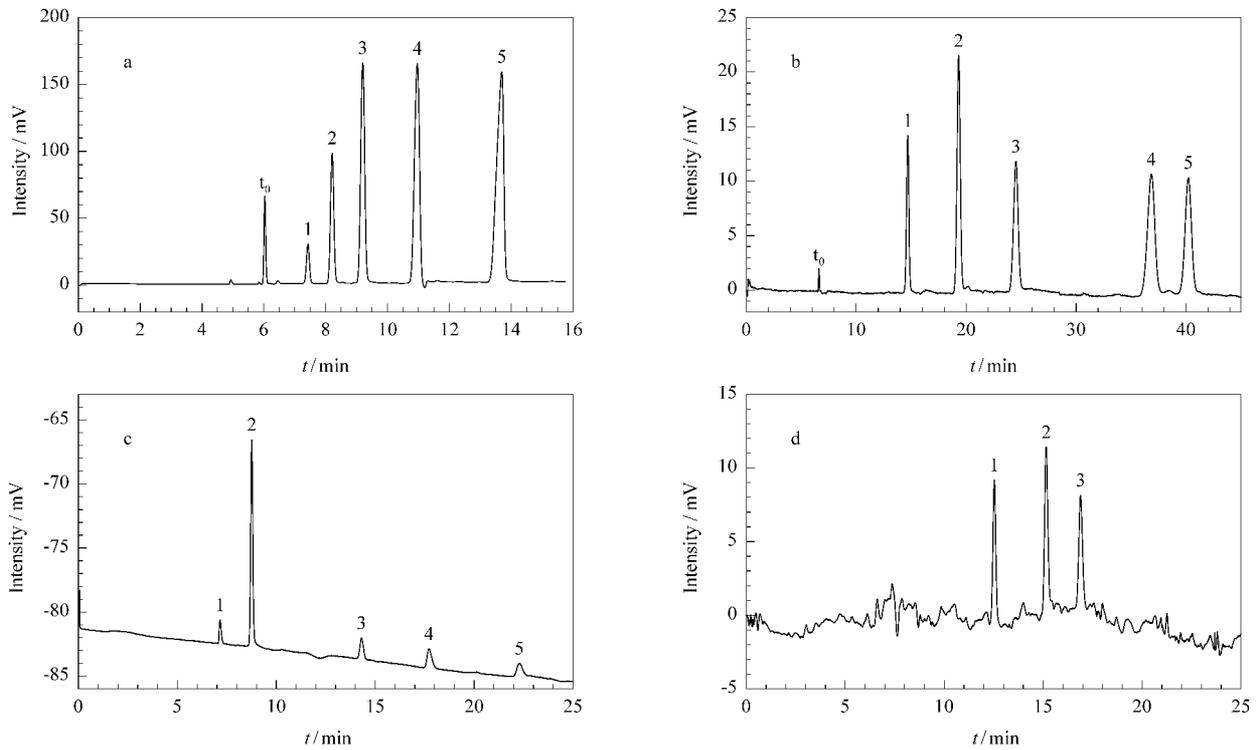


图 5 (a) 苯系物、(b) 多环芳烃、(c) 苯酚类和 (d) 苯甲酸类化合物在 C18-硅胶杂化整体柱上的电色谱分离图
 Fig. 5 Separation of (a) alkylbenzenes, (b) PAHs, (c) phenols and (d) benzoic acid compounds on the C18-silica hybrid monolithic column by CEC

Experimental conditions: C18-silica monolithic capillary column, 24 cm (effective length) × 75 μm i. d.; mobile phase, 10 mmol/L KH₂PO₄ buffer at pH 3.05 containing 50% ACN; applied voltage, -13 kV; injection, -5 kV for 2 s; detection wavelength, 214 nm.

Peak identifications: a. t₀. thiourea; 1. benzene; 2. toluene; 3. ethylbenzene; 4. propylbenzene; 5. butylbenzene. b. t₀. thiourea; 1. naphthalene; 2. acenaphthene; 3. 4,4'-dimethylbiphenyl; 4. pyrene; 5. p-terphenyl. c. 1. phloroglucinol; 2. 4-cresol; 3. 2,4-dichlorophenol; 4. 4-tert-butylphenol; 5. 2,4,5-trichloro phenol. d. 1. p-phthalic acid; 2. benzoic acid; 3. m-nitro benzoic acid.

2.3.2 在 CLC 中的应用

我们用 CLC 进一步评价 C18-硅胶杂化整体柱的分离能力,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出 5 个苯类同系物能在 45% 的乙腈浓度下得到基线分离,并按照疏水性由弱到强的顺序出峰,与 CEC 中

的出峰顺序一致。而且随着流动相中乙腈含量的增加,苯系物在 C18-硅胶杂化整体柱上的保留因子逐渐减小,符合反相色谱保留的规律。

除了分离上述标准样品外,我们也将 C18-硅胶杂化整体柱用于 CLC-MS/MS 分离分析 BSA 酶解

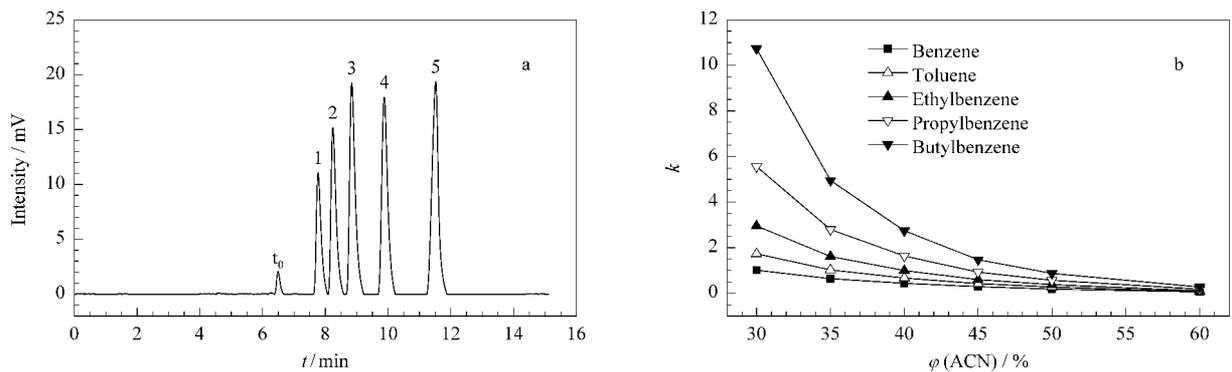


图 6 苯系物在 C18-硅胶杂化整体柱上的毛细管液相色谱分离
 Fig. 6 Separation of alkylbenzenes on C18-silica hybrid monolithic column by CLC

a. chromatogram; b. relationship between retention factors and the contents of ACN in the mobile phase.

Experimental conditions: monolithic capillary column, 33 cm (effective length) × 75 μm i. d.; detection wavelength, 214 nm; mobile phase: 0.1% FA containing 45% ACN; solutes are the same as in Fig. 5a.

液。由于柱压降的限制,一般填充毛细管柱的柱长不超过 15 cm,因此能够获得的柱效是有限的。C18-硅胶杂化毛细管整体柱中由于存在较多的通孔结构,其通透性优于 5 μm 的硅胶填料填充的毛细管柱,因此可以通过采用更长的色谱柱来提高分离性能,以适应复杂样品的分离分析要求。我们用 C18-硅胶杂化整体柱(30 cm \times 75 μm i. d.)对 BSA 酶解液进行了 CLC-MS/MS 分离分析,得到的质谱数据采用基于 SEQUEST 算法的 BioWorks 软件进行数据库检索,鉴定到 55 个特征肽段,序列覆盖率为 48.6% (RSD=6.7%, $n=3$)。略优于之前报道的用 C18 填充柱(15 cm \times 75 μm i. d., 1.7 μm)对 BSA 酶解液分析鉴定的结果(22 个特征肽段,序列覆盖率为 37.8%)^[16]。表明 C18-硅胶杂化整体柱在复杂生物样品分离分析方面具有较大的应用前景。

3 结论

本文发展了一种“一锅法”制备有机-无机杂化整体柱的方法。该方法经原位聚合反应直接将功能单体键合到硅胶杂化基质上,制备过程简单,使杂化整体柱制备不再受有机硅烷试剂的限制。制备的 C18-硅胶杂化整体柱机械强度较为稳定,柱效较高,具有较好的重现性;应用于 CEC 中基线分离了多种芳香类化合物;并用于 CLC-MS/MS 分离分析了 BSA 蛋白酶解液,表明 C18-硅胶杂化整体柱在分离分析复杂生物样品方面具有较大的潜力。随着对杂化整体柱制备技术的不断深入研究,它将在生命科学、医药食品、环境安全等众多领域中扮演更重要的角色。

参考文献:

[1] Zou H F, Huang X D, Ye M L, et al. J Chromatogr A, 2002,

954(1/2): 5

- [2] Wu R A, Hu L H, Wang F J, et al. J Chromatogr A, 2008, 1184(1/2): 369
- [3] Svec F. J Sep Sci, 2009, 32(1): 3
- [4] Svobodová A, Krizek T, Sirc J, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(11): 1544
- [5] Xie C H, Ye M L, Jiang X G, et al. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(3): 454
- [6] Miyamoto K, Hara T, Kobayashi H, et al. Anal Chem, 2008, 80(22): 8741
- [7] Yan F C, Chen B. Chinese Journal of Chromatography (严逢川, 陈波. 色谱), 2011, 29(5): 426
- [8] Wu M H, Wu R A, Zhang Z B, et al. Electrophoresis, 2011, 32(1): 105
- [9] Yan L J, Zhang Q H, Li T, et al. Chinese Journal of Chromatography (严丽娟, 张庆合, 李彤, 等. 色谱), 2005, 23(5): 499
- [10] Hayes J D, Malik A. Anal Chem, 2000, 72(17): 4090
- [11] Yan L J, Zhang Q H, Feng Y Q, et al. J Chromatogr A, 2006, 1121(1): 92
- [12] Yan L J, Zhang Q H, Zhang W B, et al. Electrophoresis, 2005, 26(15): 2935
- [13] Yan L J, Zhang Q H, Zhang J, et al. J Chromatogr A, 2004, 1046(1/2): 255
- [14] Colon H, Zhang X, Murphy J K, et al. Chem Commun, 2005: 2826
- [15] Xu L, Lee H K. J Chromatogr A, 2008, 1195(1/2): 78
- [16] Wu M H, Wu R A, Wang F J, et al. Anal Chem, 2009, 81(9): 3529
- [17] Zhang Z B, Wu M H, Wu R A, et al. Anal Chem, 2011, 83(9): 3616
- [18] Wu M H, Wu R A, Li R B, et al. Anal Chem, 2010, 82(13): 5447
- [19] Stanelle R D, Sander L C, Marcus R K. J Chromatogr A, 2005, 1100(1): 68