

利用高度结构对称的共聚试剂制备高比表面积의 硼亲和整体柱

刘云春, 刘 震*

(南京大学化学化工学院 生命分析化学国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 硼亲和整体柱是一种能对顺式二羟基化合物进行选择分离的重要色谱介质。然而, 整体柱微结构在制备过程中难以控制。本文以分子结构高度对称的三聚氰胺和三(2,3-环氧基丙基)异氰酸酯(TEPIC)作为共聚试剂, 利用“团队硼亲和”原理, 采用原位聚合的方法制备了一种新型硼亲和整体柱。“团队硼亲和”的作用使该硼亲和整体柱对顺式二羟基化合物的结合 pH 降低至中性范围。结构高度对称的共聚试剂有效地提高了整体柱材料的比表面积, 使其达 $80.3 \text{ m}^2/\text{g}$, 显著高于文献中报道的其它硼亲和整体柱。

关键词: 硼亲和; 整体柱; 制备; 顺式二羟基化合物; 比表面积

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)04-0348-04

Preparation of boronate affinity monolithic column with high specific surface using highly structurally symmetrical copolymerizing reagents

LIU Yunchun, LIU Zhen*

(State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Boronate affinity monolithic column is an important chromatographic medium for the selective isolation of the *cis*-diol containing compounds. However, it is difficult to control the micro-structure of the monolithic capillary during its preparation process. In this article, using melamine and tris(2,3-epoxypropyl) isocyanurate (TEPIC), both are highly symmetrical in molecular structure, as the copolymerizing reagents, a boronate affinity monolithic capillary with high specific surface was prepared by in-situ polymerization according to the “teamed boronate affinity” principle. The pH for binding with *cis*-diol containing compounds of this monolithic capillary was decreased to neutral range due to the teamed boronate affinity. The specific surface area was dramatically increased due to the use of the highly symmetrical copolymerizing reagents, which was $80.3 \text{ m}^2/\text{g}$ and apparently higher than those for other boronate affinity monolithic capillaries reported in references.

Key words: boronate affinity; monolithic column; preparation; *cis*-diol containing compounds; specific surface

毛细管整体柱由于具有传质快、制备简单、重复性好和化学修饰容易等优点而受到广泛的关注^[1,2], 已经在样品富集和分离等应用中发挥着重要的作用^[3,4]。毛细管整体柱的形貌对其分离效果有着显著的影响。然而, 整体柱的制备是一个受多种因素影响的化学反应过程, 反应时间、反应温度、单体和致孔剂的种类以及它们在反应混合物中所占的比例都会引起整体柱形貌的改变。Hoegger 等^[5]

在丙烯酰胺整体柱的制备过程中发现单体浓度、交联剂浓度和易溶离子浓度是影响丙烯酰胺整体柱形貌的重要因素。Bonn 等^[6]发现聚合反应的时间也影响着整体柱的形貌和性能, 他们在 65°C 下在一定范围内改变聚合时间, 实验结果表明, 聚合时间越短, 整体柱柱床中的介孔越多, 制备的整体柱也越适合于对小分子的分离。Jens 等^[7]通过改变功能单体与致孔剂的比例, 也可以得到相类似的效果。Svec

* 通讯联系人. Tel: (025) 83685639, E-mail: zhenliu@nju.edu.cn.

基金项目: 科技部国际合作项目(3545); 江苏省自然科学基金滚动项目(KB2011054)。

收稿日期: 2013-02-27

等^[8]采用水、1-丙醇、1,4-丁二醇为三元致孔剂,通过调节1-丙醇和1,4-丁二醇的比例,对聚甲基丙烯酸酯类整体柱的孔径进行了调节。但通过选择共聚物的结构实现对整体柱的性质进行调节的报道不多。

本文选择分子结构高度对称的三聚氰胺和3-(2,3-环氧基丙基)异丙氰酸酯(TEPIC)作为共聚物,利用共聚物分子结构的高度对称性来调节整体柱的性质,以间氨基苯硼酸为功能单体,利用我们之前提出的“团队硼亲和”原理^[9-11],制备了一种结构均匀、高比表面积的确亲和毛细管整体柱,并将其应用于对腺苷等顺式二羟基小分子化合物的选择性分离。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

苯二酚、对苯二酚、间氨基苯硼酸(APBA)及3-氨基丙基三甲氧基硅烷(ATMS)购自Alfa Aesar公司(天津,中国);三聚氰胺(melamine)、TEPIC、腺苷(adenosine)、脱氧腺苷(deoxyadenosine)购自Sigma公司(圣路易斯,美国)。聚乙二醇200(PEG-200,分析纯)、四氢呋喃(THF)购自上海辰华试剂公司。

Tris-2100 pCEC 高效微柱液相色谱仪(Unimicro Technologies, 美国); Hitachi FE-SEM S-4800 扫描电镜(日立公司, 日本); ¹¹B NMR 测定在 Bruker Advance DMX 500 型核磁共振仪(500 MHz)上完成,实际使用频率为160 MHz; 孔径及比表面积仪 ASAP-2020(Micromeritics, Norcross, GA, USA); 实验用水为 Milli-Q 纯化系统(Milford, MA, USA)制备的超纯水; 熔融石英毛细管(内径150 μm, 外径375 μm)购自锐沓色谱器件公司(河北, 中国)。

1.2 整体柱的制备

毛细管管壁预处理: 毛细管依次用1 mol/L NaOH 溶液冲洗30 min、水冲洗至中性、1 mol/L HCl 溶液冲洗30 min、水冲洗至中性和适量甲醇进行冲洗,最后采用氮气过夜吹干。再将ATMS/THF(1:1, v/v)混合溶液注入毛细管中,置于80 °C 水浴中反应过夜,取出后用甲醇将未反应物冲洗除去,用氮气吹干,得到内壁衍生了氨基的毛细管。

硼亲和毛细管整体柱的制备: 将TEPIC 0.032 0 g、APBA 单水合物0.008 2 g、三聚氰胺0.012 6 g溶于0.186 2 g PEG-200中,涡旋振荡并超声5 min。将此混合物注入上述预处理过的毛细管中,在80 °C 水浴中反应12 h; 取出后用甲醇将未反应物冲洗除去,即得poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine))毛细管

整体柱。

1.3 用于孔径表征的整体材料处理方法

将制备上述整体柱的各组分的使用量放大3倍置于离心管中,采用同样的处理方法和反应条件进行聚合,待反应结束后,取出得到的整体材料并将其切成小块,用甲醇在100 °C 下进行索氏提取12 h,将未反应物冲洗除去,然后在100 °C 下真空干燥12 h,得到的材料采用氮吸附-解吸的方法(BET)进行比表面积和孔径分布的测定。

1.4 色谱条件

毛细管整体柱总长度为45 cm,有效长度为40 cm。色谱条件为: 进样体积600 nL; 分流比15:1; 分流前流速0.090 mL/min; 压力16.5 MPa。检测系统为紫外检测器,检测核苷时波长设定为260 nm,其余样品的检测波长设定为214 nm。

1.5 保留容量的测定

采用前沿分析法测定硼亲和整体毛细管柱的保留容量。以1 g/L 邻苯二酚和0.01 g/L 对苯二酚为样品,用100 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.4)对整体柱先平衡30 min,然后将溶解于上样缓冲溶液(100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4))中的样品连续注入整体柱中。分析结束后,用100 mmol/L HAc 溶液将整体柱上结合的组分除去。

2 结果与讨论

2.1 毛细管内的聚合反应

硼亲和整体柱的制备采用文献^[9]提出的“协同共单体开环聚合法”,通过一步反应即可制备得到合适的整体柱。反应路线如图1所示(第一个箭头表示分子间的硼-氮配位是如何形成的,实际制备时所有反应试剂加到一起混匀后即可)。

2.2 单体、交联剂和致孔剂的选择

改变反应单体是提高整体材料比表面积的最直接的方法之一。三聚氰胺呈六元环结构,带有3个氨基,这种构型正好与所选用的环氧试剂TEPIC一样具有高度的对称性。当其与环氧试剂反应时,可以提供更多的氨基进行开环反应;另一方面,当其与苯硼酸在类似的溶剂中混合时,氨基上的孤对电子可以进入硼的空轨道,使硼由平面三角形的结构转变为正四面体的结构,从而降低了苯硼酸与顺式二羟基化合物结合时需要的pH值。

三聚氰胺的溶解性差,这给寻找合适的致孔剂带来了不便。我们尝试了多个溶剂,包括水、丙三醇、二甲基亚砜(DMSO)、甲苯、乙二醇、二甘醇、吡啶、异丙醇以及这些溶剂的二元或三元混合液,但都

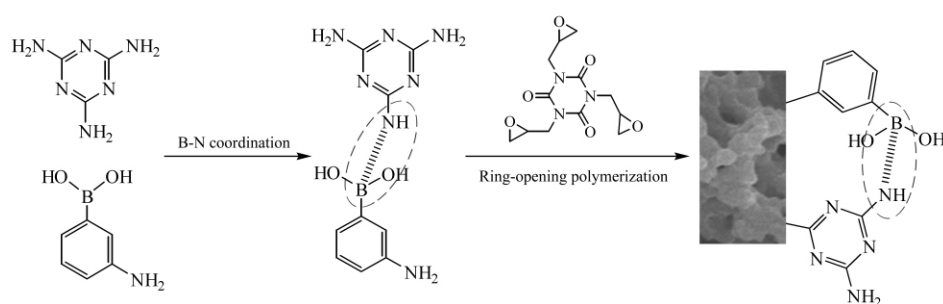


图 1 硼亲和整体柱的制备反应路线图

Fig. 1 Schematic of the polymerization reaction for the preparation of boronate affinity monolithic column

无法很好地将三聚氰胺充分溶解,所得到的整体材料要么不聚合,要么聚合后机械强度差。最后,我们选择了高分子溶液聚乙二醇作为致孔剂。聚乙二醇是一类黏度较大的溶剂。实验结果显示,三聚氰胺可以在其中有较好的溶解。此外,根据我们之前的报道^[11],增加聚乙二醇的相对分子质量,可以降低

这类环氧开环整体柱制备的聚合温度,改变其形貌。

综合三聚氰胺溶解性和整体柱的形貌要求,最终选择了 PEG-200 作为致孔剂,在 80 °C 下聚合,最后成功制备得到结构均匀的大孔整体柱。图 2 为 poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine)) 整体柱横截面的扫描电镜图。由此可见,所得到的硼亲和整体毛细管柱的结构均匀,形貌良好。从图 2 中可以明显地看到,整体聚合材料与毛细管管壁牢固地结合在一起。该整体柱能承受 25 MPa 的压力。

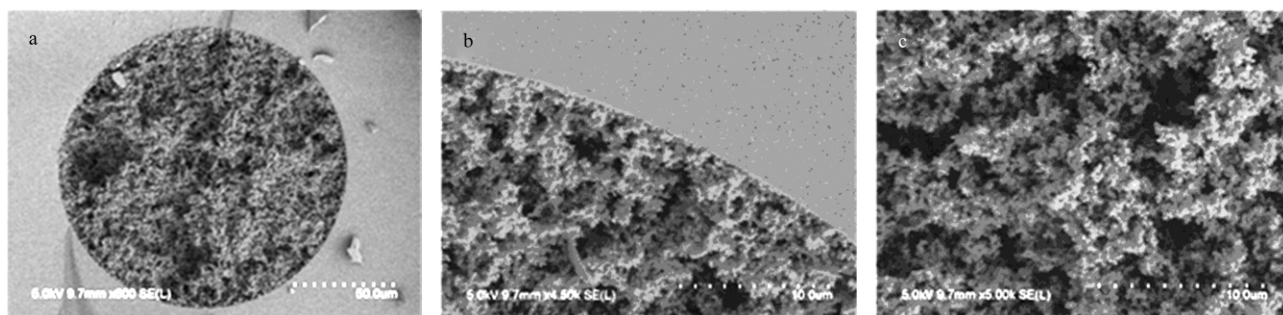


图 2 poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine)) 整体柱横截面在不同放大倍数下的扫描电镜图

Fig. 2 Scanning-electron micrographs of the cross-section of the prepared monolithic capillary at different magnifications
Magnifications: a. 600; b. 4500; c. 5000.

2.3 整体材料孔性质和保留容量表征

采用氮吸附-解吸法对整体材料的孔径分布进行了表征,其孔体积为 0.19 cm³/g,比表面积为 80.3 m²/g,平均孔径为 9.1 nm。此外,采用前沿分析法测得该硼亲和整体材料在 pH 7.0 时的保留容

量为 3.3 mmol/L。

将以上结果与文献中报道的其它以“一锅法”制备的硼酸功能化整体柱的孔性质及在相当条件下的保留容量列于表 1 进行比较。poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine)) 整体柱的比表面积在所有硼亲

表 1 不同方法制备的硼酸功能化整体柱的孔性质及在相当条件下的保留容量对比

Table 1 Comparison of the specific surface areas, average pore diameters and binding capacities of the boronate affinity monolithic columns prepared by different methods

Boronate affinity monolith column	Specific surface area/(m ² /g)	Average pore diameter/nm	Binding capacity/(mmol/L)
Poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine))	80.3	9.1	3.3 (pH 7.0)
Poly(TEPIC-co-(MPBA-BAEO)) ^[11]	13.7	3.9	2.7 (pH 7.5)
Poly(TEPIC-co-(APBA-HMDA)) ^[9]	19.9	9.6	1.6 (pH 7.0)
Poly(BSPBA-co-MBAA) ^[12]	5.0	73.9	2.3 (pH 7.0)
Poly(VPBA-co-MBAA) ^[13]	10.6	11.2	0 (pH 7.0)
Poly(VPBA-co-EDMA) ^[14]	47.7	7.7	0 (pH 7.0)
Poly(AAPBA-co-EDMA) ^[15]	20.0	6.9	—
Poly(AAPBA-co-EDMA) ^[16]	10.9	—	—

和整体柱中最大,为 poly(BSPBA-co-MBAA) 的 16 倍,为 poly(VPBA-co-EDMA) 的 2 倍。由于 poly(TEPIC-co-(APBA-Melamine)) 整体柱的平均孔径并不是最小,而是处于中间水平,说明该整体柱比表面积的增加主要来自孔数量的增加。与同样基于环氧开环反应制备的 poly(TEPIC-co-(MPBA-BAEO)) 整体柱(保留容量 2.72 mmol/L) 和 poly(TEPIC-co-(APBA-HMDA)) 整体材料(保留容量 1.56 mmol/L) 相比,该整体柱的保留容量有明显的提高。和其它类型的硼亲和整体柱相比,该整体柱的优势相当显著:该整体柱能在中性条件下使用,而其它整体柱不能在中性条件下使用(此条件下的保留容量为 0)。

2.4 整体柱硼亲和能力的考察

为了考察该整体柱的硼亲和能力,首先选择了含顺式二羟基的邻苯二酚和不含顺式二羟基的对苯二酚作为被分析物进行了亲和试验。如图 3 所示,在生理 pH 条件下,对苯二酚在死时间即被直接洗脱,而邻苯二酚则可以很好地被保留。这是由于三聚氰胺中的氨基与硼原子间发生了分子间的 B-N 配位作用,有效地降低了硼功能化整体柱结合顺式二羟基化合物时需要的 pH 值,可以在生理 pH 条件下结合邻苯二酚。核苷是核糖核酸的重要组成部分,是一类重要的生物小分子。采用该硼亲和整体柱在生理 pH 条件下可以对腺苷(含顺式二羟基)进行选择性的保留,而不含有顺式二羟基的脱氧腺苷则直接流出色谱柱(见图 4)。另一方面,与之前报道的基于环氧开环的硼亲和整体柱^[9,11]一样,该整体柱具有较强的空间位阻效应,以致其因无法与糖蛋白结合而使其分离。

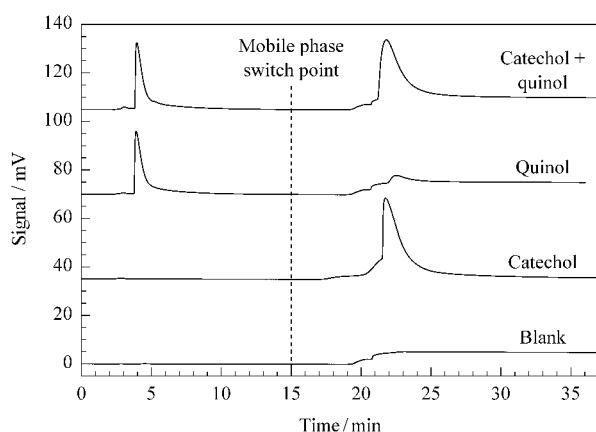


图 3 硼亲和整体柱对邻苯二酚和对苯二酚的分离谱图

Fig. 3 Chromatograms of catechol and quinol on a boronate affinity monolithic column

Mobile phase: 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4), switched to 100 mmol/L HAc solution (pH 2.7) at 15 min.

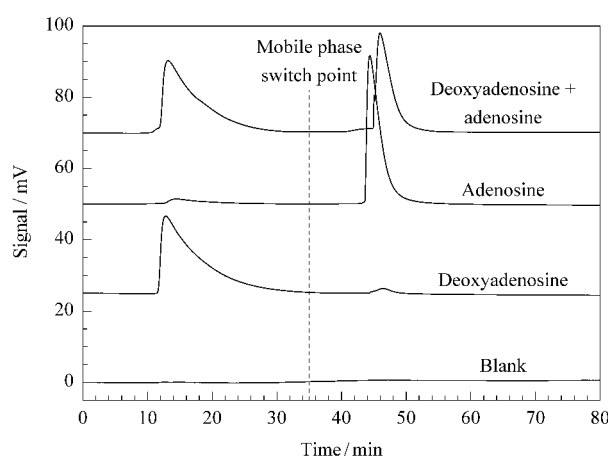


图 4 硼亲和整体柱对腺苷和脱氧腺苷的分离谱图

Fig. 4 Chromatograms of adenosine and deoxyadenosine on a boronate affinity monolithic column

Mobile phase: 100 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4), switched to 100 mmol/L HAc solution (pH 2.7) at 35 min.

3 结论

本文采用分子结构高度对称的三聚氰胺和 TEPIC 为共聚物,以间氨基苯硼酸为功能单体,制备得到了一种高比表面积、结构均匀的团簇硼亲和整体毛细管柱。该整体柱能在中性 pH 条件下用于腺苷等顺式二羟基小分子进行选择性的分离。

参考文献:

- [1] Hosoya K, Hira N, Yamamoto K, et al. Anal Chem, 2006, 78 (16): 5729
- [2] Nguyen A, Irgum K. Chem Materials, 2006, 18(24): 6308
- [3] Saskia R K, Alexander D F, Claudia F, et al. Plant Phys Biochem, 2009, 47(2): 160
- [4] Kakehi K, Kinoshita M, Kawakami D, et al. Anal Chem, 2001, 73(11): 2640
- [5] Hoegger D, Freitag F. J Chromatogr A, 2001, 914(2): 211
- [6] Greiderer A, Trojer L, Huck C W, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 7747
- [7] Jens H M, Remco S, Christian G H. Anal Bioanal Chem, 2011, 400: 2391
- [8] Peters E C, Petro M, Svec F, et al. Anal Chem, 1998, 70: 2288
- [9] Ren L, Liu Z, Liu Y, et al. Angew Chem Int Edit, 2009, 121: 6832
- [10] Liang L, Liu Z. Chem Commun, 2011, 47: 2255
- [11] Liu Y C, Lu Y, Liu Z. Chem Sci, 2012(3): 1467
- [12] Liu Y C, Ren L B, Liu Z. Chem Commun, 2011, 47: 5067
- [13] Ren L B, Liu Y C, Dong M M, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 8421
- [14] Ren L B, Liu Z, Dong M M, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 4768
- [15] Chen M, Lu Y, Ma Q, et al. Analyst, 2009, 134: 2158
- [16] Yanga F, Lind Z, Hea X W, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218 (51): 9194