

限进介质烷基-二醇基硅胶(ADS)的制备

喻 昕, 赵 睿, 刘国谏

(中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100080)

摘要 烷基-二醇基硅胶(ADS)系限进介质的一种,可用于含生物大分子的复杂生物样品的直接进样与分析。一种新的、非常经济的方法可用于烷基-二醇基硅胶的制备。首先将 γ -环氧丙基氧丙基三甲氧基硅烷键合至微孔硅胶上(粒度 $5\ \mu\text{m}$,孔径 $6\ \text{nm}$)以制备环氧基硅胶,再令环氧基硅胶与硬脂酸在有机溶液中进行反应以制备酯型十八烷基反相填料。将制得的反相填料填充至色谱柱中,并令含有酯酶的溶液通过色谱柱。通过酶解作用可将硅胶表面的酯基除去,而硅胶的内孔表面仍保持疏水特性不变,这是由于硅胶上的小孔对酶分子具有体积排除作用。色谱评价证实了所制备填料的限进色谱行为。

关键词 液相色谱法,限进介质,烷基-二醇基硅胶,固定相

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2001)02-0152-02

1 前言

在对复杂生物样品,如血液、血清、血浆、尿、奶和唾液等进行高效液相色谱(HPLC)分析时,常用沉淀和萃取的方法进行样品的前处理,以消除体系中的干扰物质。这些前处理方法不仅费时、费力,而且会使样品的回收率降低^[1,2]。因此,一类特殊的色谱填料,即限进固定相^[3],引起了人们的重视与关注^[4,5]。以这类填料填装的色谱柱,可将未经处理或只经简单处理的生物样品直接且重复地注射进色谱系统进行分析。烷基-二醇基硅胶(alkyl-diol silica, ADS)是由 Boos 等^[6]首先提出并制备的一种限进固定相。我们在本文中报道了一种改进了的制备 ADS 的方法。

2 实验部分

2.1 试剂

硅胶(Develosil $60-5\ \mu$,孔径 $6\ \text{nm}$,Nomura Co. 日本), γ -环氧丙基氧丙基三甲氧基硅烷(辽宁营口化工厂),硬脂酸(分析纯,北京化工厂),乙腈(HPLC级,Fisher Chemicals),三氟乙酸(Protein sequencing grade, SIGMA),猪胰脂肪酶(EC 3.1.1.3, SIGMA),甲醇(优级纯,北京化工厂),牛胆酸钠(北京生物制品研究所),牛血清白蛋白(BSA)(Fluka),人血清白蛋白(HSA)(Fluka),肌红蛋白(SIGMA),血红蛋白(中国科学院上海生物化学研究所),免疫球蛋白 G(IgG)(SIGMA),克霉唑和甲硫咪唑(中国药品生物制品检定所)。其他试剂均为分析纯。

2.2 仪器

Beckman 液体输送系统, KARATOS Spectroflow 783 可编程 UV 吸收检测器,记录仪(Hitach

Co. Ltd),气动压力放大装柱系统(Chemco Packer, Japan)。

2.3 ADS 的制备

2.3.1 γ -环氧丙基氧丙基三甲氧基硅烷与 Develosil $60-5\ \mu$ 硅胶的反应 将干燥的硅胶置于 $-250\ \text{mL}$ 圆底三颈烧瓶中,抽真空 $4\ \text{h}$,然后于真空驱动下加入含质量分数为 10% 的 γ -环氧丙基氧丙基三甲氧基硅烷的甲苯溶液,搅拌回流 $6\ \text{h}\sim 8\ \text{h}$ 。键合相过滤,分别以甲苯、丙酮洗涤数次,干燥,得环氧基化硅胶。

2.3.2 C_{18} 酯型反相键合相的制备^[7,8] 将上述环氧基化硅胶于真空下加入含硬脂酸的溶液,于一定温度下反应 $6\ \text{h}\sim 8\ \text{h}$,过滤,依次以甲苯、丙酮洗涤,干燥后即得 C_{18} 酯型反相键合相。

2.3.3 硅胶外表面 C_{18} 酯键的在线酶解 将上述酯键反相填料填入一不锈钢柱($4.0\ \text{mm i. d.} \times 50\ \text{mm}$,装柱压力 $40\ \text{MPa}$),然后以含猪胰脂肪酶(EC 3.1.1.3,质量分数为 0.2%)的水溶液(Tris-HCl buffer, pH 7.5,激活剂为牛胆酸钠和 Ca^{++})作为流动相,小流速冲洗不锈钢柱 $12\ \text{h}$ 进行酶解,再以二次水洗去柱中的酶解液,即得 ADS 柱。

2.4 元素分析和色谱评价

以元素分析仪测定键合硅胶的碳含量。将所制备的填料连接于高效液相色谱系统,在典型反相条件(流动相:V(乙腈):V(水)=75:25,流速 $0.5\ \text{mL}/\text{min}$)下进行反相色谱评价;再以质量分数为 $0\%\sim 5\%$ 的乙腈水溶液作流动相,进行限进性能的评价。

3 结果与讨论

3.1 元素分析

所得填料元素分析结果如下:第一步所得环氧

基化硅胶中碳的质量分数为 8.4% ,第二步所得 C₁₈ 酯型键合相中碳的质量分数为 16.5% ,酶解后所得 ADS 填料中碳的质量分数为 16.49%。

3.2 键合固定相的反相特性

我们以乙腈-水为流动相,以苯、萘、菲、苯胺、强极性药物克霉唑和甲巯咪唑为测试溶质,对 ADS 柱的反相特性进行了评价,测试结果见图 1。

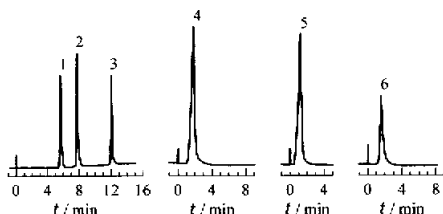


图 1 填料的反相特性测试

Fig. 1 Reversed-phase behavior of the packing

Detection: UV 254 nm, 0.1 AUs; eluent: V(CH₃CN): V(H₂O)=75:25; flow rate 0.5 mL/min.

1. benzene; 2. naphthalene; 3. phanthrene; 4. aniline; 5. methimazole; 6. clotrimazolium.

由图 1 可见,在所选洗脱条件下,苯、萘、菲的洗脱顺序证实了填料的反相色谱行为,其具有明显的反相特性。而且它对碱性溶质(如苯胺)表现了极低的非特异性吸附,其不对称因子接近 1.0。强疏水性溶质克霉唑亦可得到较好的峰形,不对称因子为 1.2。

3.3 固定相外表面的亲水特性

我们以质量分数为 0%~5% 的乙腈水溶液为流动相,以一些蛋白质为测试溶质,对色谱柱进行了评价,结果示于图 2。从图 2 可以看出,以质量分数为 0%~5% 的乙腈水溶液为流动相,相对分子质量从 17 800 到 138 000 的几种蛋白质的保留时间相同。

我们还以 BSA, HSA 为溶质测定了该 ADS 柱的蛋白回收率,按峰面积计算得回收率分别为 97.4% 和 96.7%,说明所得填料的色谱行为完全符合 ADS 填料的特征。

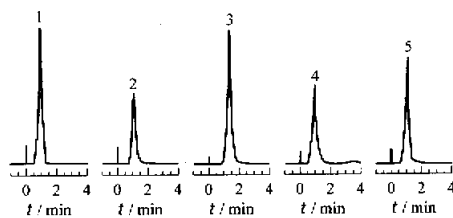


图 2 填料的限进行为测试

Fig. 2 Restricted-access behavior of the packing

Detection: UV 280 nm, 0.1 AUs; eluent: V(CH₃CN): V(H₂O)=2:98; flow rate 0.5 mL/min.

1. IgG; 2. hemoglobin; 3. BSA; 4. HSA; 5. myoglobin, from horse heart.

参考文献:

- [1] Anderson D J. Anal Chem, 1993, 65(12):434R-443R
- [2] SONG Yan-xi, LIU Man-cang, ZHU Peng-ling. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 1999, 27(2):230-236
宋燕西,刘满仓,朱彭龄.分析化学,1999,27(2):230-236
- [3] Boos K S, Wilmers B, Schlimme E, et al. J Chromatogr, 1988, 456:93-104
- [4] Unger K K. Chromatographia, 1991, 31:507-511
- [5] Pinkerton T C. J Chromatogr, 1991, 544:13-23
- [6] Boos K S, Walfort A, Lubda D, et al. Ger Pat, DE 4130475A1, 1991
- [7] LIU Guo-quan, YU Xin, ZHAO Rui. Chinese Patent: 99111257.1, 1999
刘国诠,喻昕,赵睿.中国专利:99111257.1,1999
- [8] YU Xin, ZHAO Rui, LIU Guo-quan. Chinese Journal of Chromatography, 2000, 18(1):25-26
喻昕,赵睿,刘国诠.色谱,2000,18(1):25-26

Preparation of Restricted-Access Media— Alkyl-Diol Silica (ADS) by an Improved Method

YU Xin, ZHAO Rui, LIU Guo-quan

(Center for Molecular Sciences, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Alkyl-diol silica (ADS) is a kind of restricted-access media, which can be used for direct injection and analysis of complex biological samples containing bio-macromolecules. A new economical procedure has been developed to prepare ADS packing. At first γ -glycidoxypropyl group was coupled onto the surface of microporous silica gel (Develosil 60-5 μ) to form epoxy-silica. Prepared epoxy-silica can react with stearic acid in organic solvent to prepare C₁₈ ester-bonded reversed-phase packing. The packing was packed into a column and then the solution of pancreatic lipase was pumped into the column to create enzymolysis reaction. The stearyl groups on the surface of packing can be removed by the enzymolysis to form a hydrophilic surface. At the same time, inner surface of micropore remains hydrophobic nature due to size exclusion effect of micropore to enzyme molecules. Chromatographic evaluations were carried out and the typical ADS behavior was confirmed.

Key words: high performance liquid chromatography; restricted-access media; alkyl-diol silica; solid phase