

混合模式色谱固定相的研究和应用进展

肖震^{1,2}, 周卫强^{3*}, 郭元亨³, 李非^{1,2}, 张旭^{1*}

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300130;

2. 河北工业大学海水资源高效利用化工技术教育部工程研究中心, 天津 300130;

3. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209)

摘要:混合模式色谱在分离分析过程中具有比单一模式色谱更复杂的保留机理和更高的分离选择性,且便于多维液相色谱的构建。根据色谱固定相的不同化学特性,主流的混合模式色谱以反相/亲水作用色谱、亲水/离子交换作用色谱、反相/离子交换作用色谱 3 种混合模式为主。重点介绍了近年来混合模式色谱固定相的研究及应用进展,并对混合模式色谱及固定相的发展前景进行了展望。

关键词:混合模式色谱;反相/亲水作用色谱;亲水/离子交换混合模式色谱;反相/离子交换混合模式色谱

中图分类号:O657.7+2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)S2-0407-09

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.S2.084

Development and application of stationary phase for mixed-mode chromatography

XIAO Zhen^{1,2}, ZHOU Wei-qiang^{3*}, GUO Yuan-heng³, LI Fei^{1,2}, ZHANG Xu^{1*}

(1.School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

2.Engineering Research Center of Seawater Utilization Technology of Ministry of Education,

Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China; 3.Nutrition and Health Research Institute,

COFCO, Beijing 102209, China)

Abstract: With the development of science and technology, single-mode chromatography technology is limited by itself, which cannot meet the needs of researchers for the separation of complex samples. Instead, mixed-mode chromatography technology has attracted more attention. Compared with single mode chromatography, mixed mode chromatography has more complex retention mechanism and higher separation selectivity, and is convenient for the construction of multidimensional liquid chromatography. According to different chemical characteristics of chromatographic stationary phases, mainstream mixed mode chromatography includes mainly reversed-phase/hydrophilic interaction chromatography, hydrophilic/ion exchange chromatography and reversed-phase/ion exchange chromatography. The research and application progress on stationary phase for mixed mode chromatography in recent years is introduced, and the development prospect of mixed mode chromatography and stationary phase is also given.

Key words: mixed-mode chromatography; reversed-phase/hydrophilic interaction chromatography; hydrophilic interaction/ion exchange mixed-mode chromatography; reversed-phase/ion exchange mixed-mode chromatograph

混合模式色谱(MMC)是一种建立在单一的反相、亲水、离子交换等作用力色谱的基础上,可以在样品分析分离过程中提供多种作用力的色谱技术,主要包括使用具备不同单一作用力的色谱单柱串联组合和使用具有多种不同作用力固定相装填的色谱单柱两种混合模式。近年来,制备具有不同作用力的色谱填料成为研究人员关注的重点。自 1941 年 Matin 和 Syngé 第一次使用硅胶微粒填充的色谱柱

成功分离乙酰化氨基酸混合物后^[1],以硅胶为基底的色谱柱填料历经 80 余年发展,衍生出以酰胺、氨基、二醇基、多肽和氨基酸等基团作为功能配体键合的新型硅胶固定相。并且随着色谱技术的发展,研究重点逐渐从单基团配体转向糖类、两性离子、离子液体以及新型大环分子和聚合物等拥有多种作用力的配体,固定相功能配体的选择更加多样。此外,研究人员提出的“点击化学”、“极性共聚”等方法为硅

收稿日期:2022-01-12;修回日期:2022-04-30

基金项目:河北省自然科学基金项目(E2020202020, B2017202246);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2019048);国家重点研发计划项目(2016YFB0600504);国家重点研发计划课题:水产活性组分高精度分离提取装备与稳态化技术研发(2019YFD0901805)

作者简介:肖震(1996-),男,硕士生,研究方向为分离化学,2598981985@qq.com;周卫强(1987-),男,博士,高级工程师,研究方向为生物基材料,通讯联系人,zhouweiqiang@cofco.com;张旭(1974-),男,博士,博士生导师,教授,研究方向为高分子材料,通讯联系人,xuzhang@hebut.edu.cn。

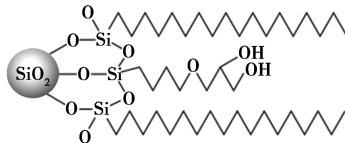
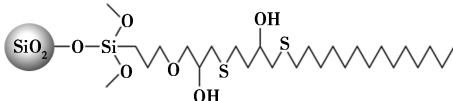
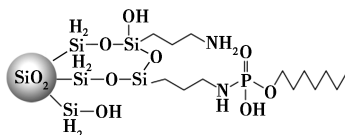
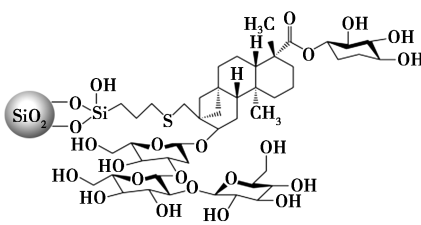
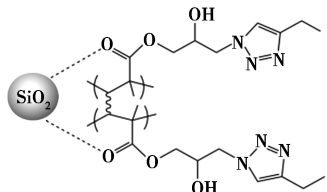
基混合模式色谱固定相的制备提供了高效的键合方法,使得设计多样性和低制备成本成为混合模式色谱固定相的主要优势。面对常见的反相色谱(RPLC)、正相色谱(NPLC)、亲水作用色谱(HILIC)、离子交换作用色谱(IEC)中样品分析范围小和受水溶性限制的问题,混合模式色谱中蕴含的多种作用力可以更好地满足研究人员对于复杂样品的分离需求。在实际分离分析过程中,根据分析物极性和带电荷种类不同,混合模式色谱固定相可以通过调整流动相的梯度变化提供疏水或亲水作用力;也可以根据 pH 或缓冲盐浓度变化提供不同种类和大小的离子作用力;新型功能配体为混合模式色谱固定相带来的 $\pi-\pi$ 相互作用、硼酸亲和作用、手性识别作用等,也可能有利于提高固定相的吸附能力和选择性。目前,混合模式色谱固定相的制备技术还不成熟,新型混合模式色谱固定相的开发和应用对扩大单柱分离能力和现代色谱分离具有重要意义,在制药、生物技术、食品和农业、精细化工、环保检测等领域中的定性定量研究有着广阔的应用前景。

本文对近年来以多孔硅胶为基底的键合固定相进行综述报道,主要从反相/亲水、亲水/离子交换、反相/离子交换 3 个方向介绍混合模式色谱固定相的研究进展及应用前景,并对混合模式色谱固定相的发展进行展望。

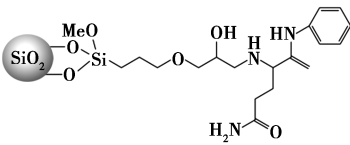
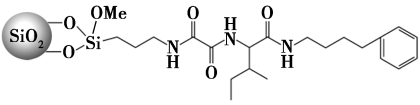
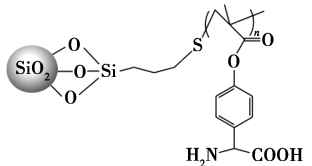
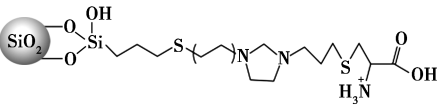
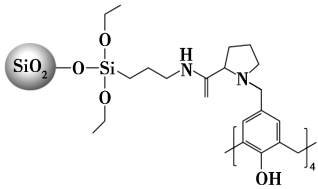
1 反相/亲水混合模式色谱

反相色谱作为研究人员最早接触的色谱技术之一,发展相对成熟,被广泛应用于非极性物质的分离,但对极性化合物的分离并不敏感,限制了反相色谱的应用。亲水作用色谱有效弥补了反相色谱在这方面的不足,目前在蛋白质纯化、糖肽富集、极性化合物分离等领域中发挥重要作用。然而受高比例有机溶液流动相的影响,存在难以分离水不溶性或难溶性物质的缺点。反相/亲水混合模式色谱结合了两种模式色谱的优点,可以有效用于非极性和极性物质的分离,拥有更高的分离选择性。近年来,不同疏水或亲水基团的引入,进一步促进了混合模式色谱固定相的发展,详见表 1。

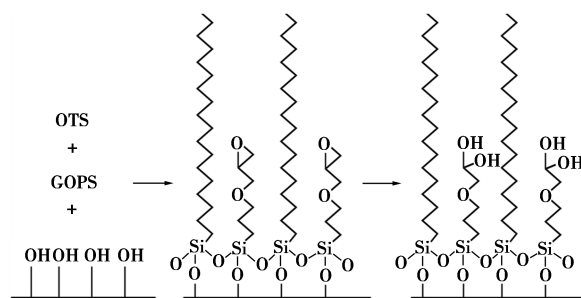
表 1 RPLC/HILIC 混合模式固定相

功能配体	固定相	分析物	表征方法	文献
C ₁₈ 烷基链和二醇基		核苷和碱基、芳香羧酸、生物碱、多环芳烃、十二种 β -阻断剂	FT-IR、EA、TGA	[2]
C ₁₈ 烷基链和二硫苏糖醇		非甾体抗炎药、芳香羧酸、生物碱、多环芳烃和部分碱性化合物	FT-IR、BET、TGA	[4]
C ₁₈ 烷基链和烷基磷酸酯		核苷和碱基、苯同系物	FT-IR、NMR、EA	[5]
甜菊醇糖苷		核苷和碱基、低聚糖、多种皂苷	FT-IR、EA、NMR	[6]
炔丙基麦芽糖和甲基丙烯酸缩水甘油酯		核苷和碱基、多种人参皂苷和人参提取物、苯胺类物质、苯同系物	FT-IR、SEM、TEM、BET	[7]

续表

功能配体	固定相	分析物	表征方法	文献
谷氨酰胺		核苷酸和核苷、植物激素、酚类化合物	FT-IR, EA	[8]
L-异亮氨酸和苯胺		核苷酸和核苷、苯胺类化合物、酚类化合物	FT-IR, EA, SEM, NMR	[9]
4-羟基-D-苯基甘氨酸		核苷和碱基、磺胺类药物、烷基苯混合物、多环芳烃、有机酸	FT-IR, EA, TGA	[10]
咪唑嵌合离子液体和 L-半胱氨酸		核苷和碱基、苯酚类、苯胺类化合物、酰胺类物质、三聚氰胺	FT-IR, EA, TGA	[11]
四脯氨酸修饰的杯[4]芳烃		核苷和核苷酸、胺、单取代苯、手性化合物、酚类化合物	FT-IR, EDS, TGA, NMR	[12]

多羟基结构的色谱固定相具有良好的亲水性和较强的形成氢键的能力,通过环氧-氨基开环、硫醇烯基点击化学方式结合不同硅烷偶联剂接枝的疏水烷基链是构建反相/亲水混合模式色谱固定相的有效方式。2015年, Wang 等^[2-3]将两种不同的硅烷偶联剂作为功能配体,在固定相中引入羟基和碳链(图1),通过反相和亲水两种洗脱模式的切换,先后完成了对包含非极性和极性成分的日本乳杆菌和中药的分析,并建立了以该色谱柱为基础单柱的二液相色谱(2D-LC-1C)。2016年,该课题组又利用C₁₈烷基链结合二硫苏糖醇(DTT)制备了一种以多元醇为功能配体的混合色谱固定相^[4]。在流动相含90%以上乙腈的条件下,该色谱柱可以对非甾体抗炎药和芳香羧酸类分析物进行有效分离。磷酸酯内含羟基并具有良好的亲水性,通过与碳链的结合也可以提供良好的亲水/疏水能力。2017年, Krzemińska 等^[5]发展了基于C₁₈烷基链和烷基磷酸酯共同键合硅胶的混合色谱固定相,实现了对核苷类和核酸类分析物的分离,并在纯水体系中仍保有一定的分离能力,展现出该固定相在以纯水为流动相的“绿色色谱”中的应用潜力。

图1 C₁₈-二醇固定相制备示意图

糖类作为自然界中广泛分布的一种物质,同样富含多个羟基,很早就有研究者将葡萄糖、麦芽糖、环珊瑚精等糖类物质通过炔基叠氮点击化学反应进行固定相的制备。2015年, Liang 等^[6]通过硫醇烯点击化学的方式将一种具有特殊空间构型和空间折叠特征的甜菊醇糖苷固定在多孔二氧化硅表面。在亲水色谱模式下,该色谱柱可实现对部分低聚糖(如壳寡糖、海藻酸钠寡糖)的分离,并实现了8种皂苷在亲水色谱和反相色谱模式下的分离。2018年, Chu 等^[7]在亚铜离子催化炔基叠氮反应的基础上,将炔基化麦芽糖键合在聚合物层包覆的二氧化硅微球外,制备了新型的麦芽糖改性聚合物-二氧

化硅固定相。受益于聚合物层的保护,该新型固定相有更高的机械强度和更好的有机溶剂耐受性,有效地屏蔽了硅胶表面多余硅羟基对分析物的吸附作用,降低了拖尾现象的产生,在反相/亲水混合模式下可以实现对核苷和碱基、各种人参皂甙和人参提取物、苯同系物等物质的分离。

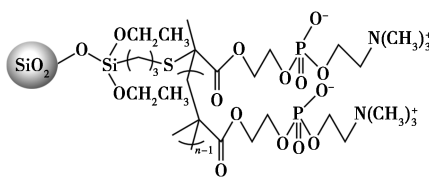
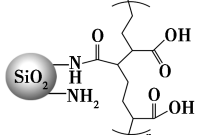
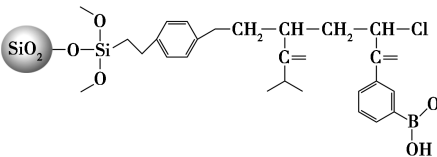
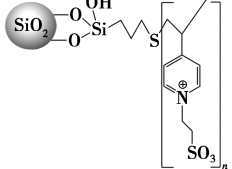
氨基酸作为蛋白质的基本组成单位,具有适宜的极性和优良的亲水性能,其在水溶液中氨基易质子化、羧基易解离,便于通过“点击化学”进一步反应,是制备固定相的良好选择。2015年,Aral等^[8]进行了合成苯胺类氨基酸衍生物类型固定相的研究。该课题组先是以谷氨酰胺为原料,通过氨基和环氧基的开环反应,制备了一种含有多个疏水苯基、烷基基团和亲水酰胺基团的色谱固定相。2017年又以L-异亮氨酸为原料,通过氨基和羰基的缩合反应,制备了以疏水链和一个芳环作为非极性位点、3个酰胺基作为极性位点、疏水和亲水基团呈均匀分布的色谱固定相^[9]。与传统的C₁₈色谱柱和商用亲水作用色谱柱相比,两种新型色谱柱可以分离核苷类混合物、植物激素、酚类和苯胺类化合物,具备反相和亲水两种色谱性能,提高了硅胶填料的色谱选择性和吸附能力。2018年,Peng等^[10]选择了甲基丙烯酸酐改性的4-羟基-D-苯基甘氨酸,通过巯基引发的表面聚合反应将其固定在二氧化硅上。制备

的固定相可能由于 π - π 相互作用的影响,在有机酸和磺胺类药物中取得良好的分离效果。2020年,王胜玉等^[11]利用硫醇烯点击化学反应,将L-半胱氨酸和可以提供 π - π 相互作用的咪唑离子液体结合在一起,制备了一种混合模式色谱固定相。该固定相实现了对奶粉中三聚氰胺的有效检测,有着一定的市场应用潜力。2019年,Zhang等^[12]将四脯氨酸和杯芳烃中常见的杯[4]芳烃结合在一起并键合在多孔二氧化硅表面。该色谱固定相在反相/亲水混合模式下可以用于中等极性和极性化合物的有效分离,在核苷、胺、酰胺的分离上优于Atlantis亲水色谱硅胶柱,这或许可以归功于四脯氨酸和大环芳烃为固定相保留了带来的 π - π 相互作用和 π -电子转移作用。

2 亲水/离子交换混合模式色谱

亲水/离子交换混合模式色谱主要用于离子性强极性化合物的分析分离,需要含有极性基团和不同类别的离子基团共同作用在固定相上。相对于单一的亲水作用或离子作用色谱而言,有效地延伸了色谱固定相的应用范围。根据引入离子的种类不同,主要分为亲水/阳离子、亲水/阴离子和亲水/两性离子3种类型的混合模式色谱。近几年报道的亲水/离子交换混合色谱模式固定相总结于表2。

表 2 HILIC/IEC 混合模式固定相

功能配体	固定相	分析物	表征方法	文献
2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱		核苷和碱基、溶菌酶、大肠杆菌中的部分 rhRNA	EA, XPS	[13]
聚乙烯马来酸酐和氨基硅胶		核苷、单糖、百草枯和敌草快中的季铵盐	EA, NMR, Zeta	[14]
N-异丙基丙烯酰胺和 3-氨基苯基硼酸共聚物		烷基苯、多环芳烃、位置异构体、黄酮类化合物、酸碱化合物	FT-IR, EA, TGA, BET, ESM	[15]
2-溴乙磺酸钠季铵化聚合物的吡啶基侧链		苯甲酸、邻苯二甲酸和羟基苯甲酸等芳香羧酸异构体	FT-IR, EA, TGA, BET, Zeta	[17]

聚(4-乙烯基吡啶)通过(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷偶联剂接枝到硅胶上,制备了一种聚合物固定相。该色谱柱具有良好的稳定性,能在较宽的酸碱范围(pH 3.5~8.5)内实现对芳香羧酸异构体的分离。在核苷和碱基、苯甲酸、邻苯二甲酸、羟基苯甲酸的分析中也表现出优于磺酸甜菜碱制备的两性离子色谱柱的分离效果。2021年, Hosseini 等^[18]通过 Bernthsen 反应制备了两种吡啶衍生物 9-甲基吡啶(9-MC)和 9-十一烷基吡啶(9-UC),借由 3-氯丙基三甲氧基硅烷接枝到硅胶上,用氯三甲基硅烷进行封端处理,制备了由共轭环和疏水烃链改性的混合模式色谱固定相(图 3)。与传统 C18 色谱柱相比,受烃链密度的影响,9-MC 色谱柱上烃链密度较小,具有更强的 $\pi-\pi$ 堆积作用,而 9-UC 色谱柱上烃链密度较大,疏水作用更强,在实践中可根据分析物物理化学性质的不同进一步选择。咪唑作为离子液体中的一种,也是一种良好的阳离子供体。咪唑中 1-位氮原子上的氢易解离,使咪唑经烷基化后易形成带正电的咪唑类衍生物。2016年, Yang 等^[19]以甲基咪唑为功能配体,通过 3-氯丙基三甲氧基硅烷分别将 1-甲基咪唑和 2-甲基咪唑键合到硅胶上,制备了两种新型固定相 Sil-1-MIm 和 Sil-2-MIm。这两种固定相可以用于分离核苷、碱基、水溶性维生素、磺酰胺和糖类以及部分阴离子。但两种固定相对溶质静电引力不同,使得 Sil-2-MIm 表现出比 Sil-1-MIm 更好的色谱分离能力。这是由于 2-甲基咪唑($pK_a = 7.85$)对溶质的静电引力要比 1-甲基咪唑($pK_a = 6.95$)强所致。2018年, Qiao 等^[20]合成了一种酰胺官能团化的咪唑,以此制备的色谱柱与市售的 TSKgel Amide-80 色谱柱相比,在多种黄酮类混合物和人尿中核苷、氨基酸等物质的分离中表现出了更好的分离性能。并且该色谱柱还具有良好

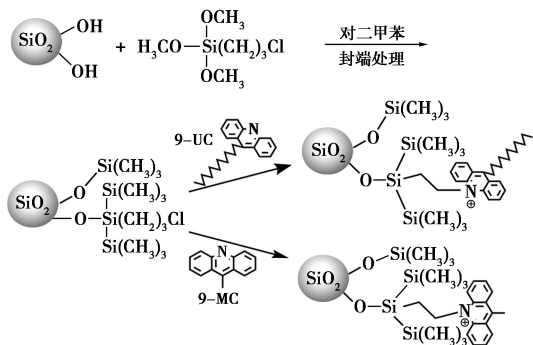


图 3 Silpr-9-MC 和 Silpr-9-UC 固定相制备示意图

的稳定性,标准品的峰形和分辨率在注射 85 次后仍保持基本不变。

在亲水/两性离子固定相制备过程中,基于不同的两性配体,近年出现了通过调整不同阴阳离子的接枝量来改变固定相和分析物间亲水或离子交换作用能力大小的合成方式。2017年, Wang 等^[21]利用原子自由基聚合(ATRP)反应,设计了一种通过控制甲基丙烯酸缩水甘油酯和甲基丙烯酸-2-二甲氨基乙酯两种单体比例,调节固定相表面极性和电荷分布的方法。根据单体比例的调节,可以有效地对 18 种分析物(包括 6 种酸、4 种碱和 8 种中性化合物)进行特异性分离。同年, Bo 等^[22]也利用 ATRP 法,以 4-苯乙烯磺酸钠和甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)为功能配体,结合 4-(氯甲基)苯基三甲氧基硅烷偶联剂共同接枝到硅胶表面(图 4)。其中, DMAEMA 单体比例的改变不仅改变了该固定相的带电荷数量,还带来了特殊的温度敏感性能。在温度升高的条件下, DMAEMA 中延伸的聚合链会在固定相表面逐渐折叠,使得上面的电荷通过压缩而隐藏在聚合物链内部。这种结构取向导致固定相的疏水性逐渐增加,从而降低固定相与极性化合物间的亲水性和与酸性化合物间的静电引力。

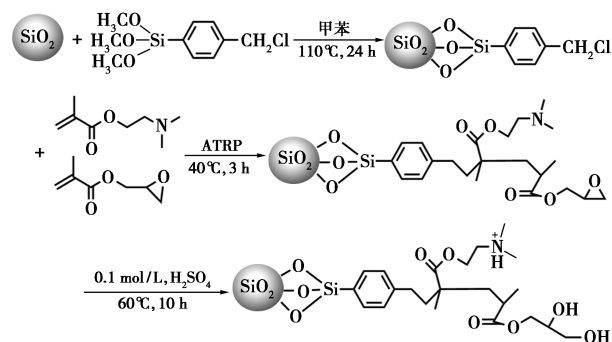
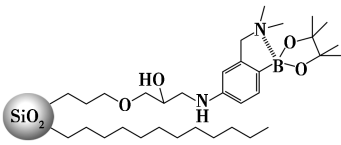
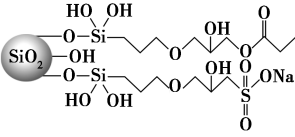
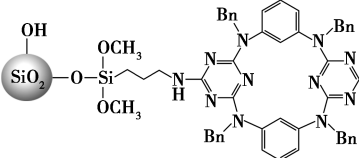
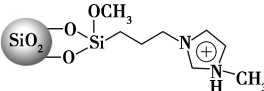
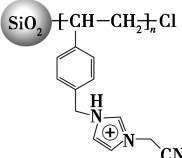
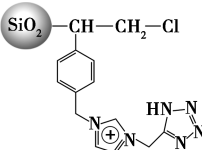
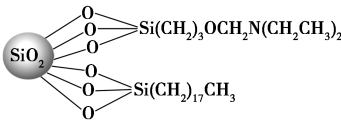
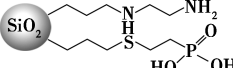


图 4 GMA-co-DMAEMA 改性固定相制备示意图

3 反相/离子交换混合模式色谱

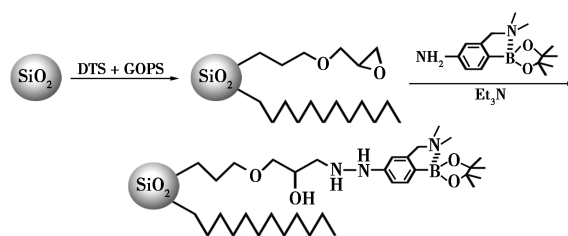
反相/离子作用混合模式色谱用于非极性和离子型化合物的分析分离。在早期以硅胶为基质制备的反相色谱中,未封端的硅羟基和碱性分析物间的作用导致了拖尾现象的产生,影响柱效,使研究人员认识到了两种色谱混合的作用,并加以改良制备了一批以疏水链和离子基团组合而成的反相/离子混合色谱固定相。近几年报道的反相/离子交换混合色谱模式固定相总结于表 3。类似于亲水/离子色

表 3 RPLC/IEC 混合模式固定相

功能配体	固定相	分析物	表征方法	文献
正十二烷基三甲氧基硅烷和 Wulff 型苯基硼酸盐		烷基苯、苯胺类、酚类和磺胺类化合物、无机阴离子	FT-IR、EA	[23]
十八烷基和磺酸酯		核苷和碱基、烷基苯胺、复方甲氧那明胶囊、复方利血平片内部分物质	FT-IR、EA、NMR	[24]
苯基化三嗪类杯芳烃		单取代苯、双取代苯异构体、无机阴离子	FT-IR、EA、TGA	[26]
N-甲基咪唑鎓		部分酸性蛋白质	FT-IR、EA、XPS	[27]
氰基修饰的咪唑鎓聚合链		多环芳烃、有机酸、烷基苯和苯胺类物质、非甾体抗炎药	FT-IR、EA、TGA、Zeta	[28]
四唑基修饰的咪唑鎓聚合链		多环芳烃、有机酸、烷基苯和苯胺类物质、非甾体抗炎药	FT-IR、EA、TGA、Zeta	[28]
硅烷偶联剂和叔铵基团		烷基苯同系物、11 种中性和酸性化合物、无机阴离子	FT-IR、EA、XPS	[29]
硅烷偶联剂和磷酸基团		核苷、水溶性维生素、碱性化合物、苯甲酸	BET、EA	[30]

谱固定相,反相/离子混合色谱模式也可以分为反相/阳离子、反相/阴离子、反相/两性离子 3 种类型。

在阴离子供体选择方面,2017 年, Li 等^[23]利用自制的 Wulff 型碱性硼酸盐与 C₁₂ 烷基链共同键合于硅胶上(图 5),制备了一种具有多种作用力的混合模式色谱固定相。除了可以针对性地在中性条件下捕捉并分离顺势二醇化合物外,还可以实现烷基苯、苯胺、酚类、磺胺类和无机阴离子等多种分析物的分离。2019 年, Zhang 等^[24]合成了一种使用环氧基接枝的二氧化硅,利用十八烷基带来的亲水性能和磺酸酯基带来的阴离子,可有效分离复方利血平片和复方甲氧那明胶囊内部分极性和碱性化合物。

图 5 C₁₂-Wulff-PBA 固定相制备示意图

咪唑作为离子液体中适用于亲水/阴离子混合模式色谱的阳离子供体,碱性强于吡啶,并且其芳香杂环化合物的特性提供了良好的稳定性和疏水性,被广泛应用在反相/阴离子色谱固定相的制备中。Hu 等^[25]设计了一种杯芳烃离子液体改性硅胶,咪

唑鎓的存在为固定相提供了较强的阳离子作用,杯芳烃则加强了固定相的 $\pi-\pi$ 相互作用和氢键接受能力,使得色谱柱成功分离了无机阴离子、烷基苯、多环芳烃、酚类、核苷混合物和人参皂苷混合物。2018 年,Zhao 等^[26]在原有工作的基础上,合成了一种苄基化三嗪杯杂芳烃结合二氧化硅的固定相。与传统的 C₁₈ 柱相比,该柱的疏水性较弱。对比该课题组之前合成的未苄基化的固定相,苄基化固定相带来了新的电子和空间效应,在单取代苯、双取代苯异构体、无机阴离子等分析物的分离方面表现出了更好的效果。同年,Bai 等^[27]利用氯丙基和咪唑鎓基团的反应,设计合成了一种混合模式色谱固定相。该色谱柱对于酸性蛋白有着特异性的选择能力,对碱性蛋白不敏感,可以实现 8 种酸性蛋白的基线分离。2020 年,Wang 等^[28]将聚离子液体(PIL)用于固定相的制备,设计了一种在咪唑阳离子上通过取代反应引入氰基或四唑基的策略,提供了一种制备不同选择性的 PIL 修饰固定相的方法。制备的两种固定相在分离非甾体抗炎药中的物质时,都表现出了比传统 ODS 柱更好的分离效果,证明了所开发的固定相的适用性。

类似于亲水/离子交换混合作用色谱,反相/离子交换混合模式色谱中也有通过控制官能团比例变化来改变固定相上阴阳离子数量的研究。2019 年,Song 等^[29]以三氯十八烷基硅烷和(3-缩水甘油氧丙基)三甲氧基硅烷(GPS)两种硅烷偶联剂为媒介,通过与二乙胺反应制备了一种含有疏水链和季铵基团的固定相,其中 GPS 的量直接影响季铵基团的数量。该色谱固定相不仅可以基线分离 11 种中性和酸性有机化合物,而且完全分离了 5 种无机阴离子,并在天然水样无机盐的检测中有着良好的分析性能。同年,成晓东等^[30]将含有氨基和巯基官能团的硅烷偶联剂分别键合于硅胶之上,并通过巯基和乙烯基膦酸的反应将膦酸基团接枝到固定相中。控制两种偶联剂的加入量即可控制氨基和膦酸两种阴阳基团的比例,虽然由于合成过程中各步骤不能保证完全反应,无法满足两种基团的定量调配,但足以控制固定相中阳离子交换能力的大小,用以满足不同分析物的分离要求。

4 结论与展望

随着研究人员对于复杂分析物分离需求的增长,新型混合模式色谱固定相的制备和应用得到了

越来越多的关注。在液相色谱填料技术的高速发展推动下,固定相制备也更趋向于新型聚合物、大环分子和新型离子液体的引入,可调控的色谱固定相制备也成为了一个重要的研究方向,混合模式色谱固定相的开发保持着蓬勃的发展趋势。

与单一的反相色谱、亲水作用色谱和离子交换色谱相比,混合模式色谱有着明显的优越性,综合近年来混合模式色谱的发展,主要表现在以下 3 点:一是和单一模式中主要的疏水、亲水和离子交换作用力相比,混合模式下可以实现多种作用力协同参与分析物的保留过程,有益于加强固定相对于分析物的保留;二是混合模式色谱固定相的制备中往往需要多种基团的参与,以满足不同作用力的引入,这为固定相的制备提供了更多的可能,一种官能团的改变或者基团数量的变化就可能促使固定相具有不同的分离选择性;三是混合模式色谱柱有利于单柱二维液相色谱的构建,这在节约色谱分析成本、拓宽色谱分析范围、建立高效快捷的色谱检测方式方面有着很大的应用潜力。

混合模式色谱在极性化合物、离子型化合物、天然产物、多肽和蛋白质的分离和纯化过程中都发挥了重要作用。但就目前而言,混合模式色谱尚未广泛应用于实际的分析过程中。不同功能配体的选择和如何增强多种相互作用力间的协同效果,仍需要进一步的探索和总结,混合模式色谱的发展仍具有相当大的研究空间,相信在不久的将来,混合模式色谱将在色谱分离领域有更重要的地位,成为更高效的色谱分离技术。

参考文献

- [1] Laich A, Neurauter G, Widner B, *et al.* More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC[J]. *Clinical Chemistry*, 2002, 48(3): 579-581.
- [2] Wang Q, Tong L, Yao L, *et al.* Fingerprinting of traditional Chinese medicines on the C18-diol mixed-mode column in online or offline two-dimensional liquid chromatography on the single column modes[J]. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 125: 205-211.
- [3] Wang Q, Ye M, Xu L, *et al.* A reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode C18-diol stationary phase for multiple applications[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 888: 182-190.
- [4] Wang Q, Long Y, Yao L, *et al.* Preparation, characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase[J]. *Talanta*, 2016, 146: 442-451.

- [5] Krzemińska K, Bocian S. The versatility of *N*, *O*-dialkylphosphoramidate stationary phase-separations in HILIC, highly aqueous RP LC conditions and purely aqueous mobile phase [J]. *Analyst*, 2018, 143(5): 1217–1223.
- [6] Liang T, Fu Q, Shen A, *et al.* Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography [J]. *Chromatography A*, 2015, 1388: 110–118.
- [7] Chu Z, Zhang L, Zhang W. Preparation and evaluation of maltose modified polymer-silica composite based on cross-linked poly glycidyl methacrylate as high performance liquid chromatography stationary phase [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1036: 179–186.
- [8] Aral H, Çelik K S, Altındağ R, *et al.* Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography [J]. *Talanta*, 2017, 174: 703–714.
- [9] Aral T, Aral H, Ziyadanoğulları B, *et al.* Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds; HILIC and reversed-phase applications [J]. *Talanta*, 2015, 131: 64–73.
- [10] Peng H, Wang X, Peng J, *et al.* Preparation and evaluation of surface-bonded phenylglycine zwitterionic stationary phase [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(23): 5941–5950.
- [11] 王胜玉, 梁鹏, 段立广, 等. 咪唑嵌合半胱氨酸修饰固定相制备及色谱应用 [J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(1): 18–26.
- [12] Zhang W, Zhang Y, Zhang Y, *et al.* Tetra-proline modified calix[4] arene bonded silica gel: A novel stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2019, 193: 56–63.
- [13] Xiong C, Yuan J, Wang Z, *et al.* Preparation and evaluation of a hydrophilic interaction and cation-exchange chromatography stationary phase modified with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine [J]. *Chromatography A*, 2018, 1546: 56–65.
- [14] 娄旭华, 左慧颖, 王媛, 等. 一种聚合型弱阳离子交换/亲水相互作用色谱固定相的制备及色谱性能 [J]. *色谱*, 2020, 38(4): 430–437.
- [15] Zhou D, Luo Q, Zeng Q, *et al.* Preparation of an aminophenylboronic acid and *N*-isopropyl acrylamide copolymer functionalized stationary phase for mixed-mode chromatography [J]. *Chromatography A*, 2020, 1627: 461423.
- [16] Auler L M L A, Silva C R, Collins K E, *et al.* New stationary phase for anion-exchange chromatography [J]. *Chromatography A*, 2005, 1073(1/2): 147–153.
- [17] Takafuji M, Shahruzzaman M, Sasahara K, *et al.* Preparation and characterization of a novel hydrophilic interaction/ion exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with pyridinium-based zwitterionic polymer-grafted porous silica [J]. *Separation Science*, 2018, 41(21): 3957–3965.
- [18] Hosseini E S, Heydar K T. Silica modification with 9-methylacridine and 9-undecylacridine as mixed-mode stationary phases in HPLC [J]. *Talanta*, 2021, 221. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121445.
- [19] Yang B, Liu H, Chen J, *et al.* Preparation and evaluation of 2-methylimidazolium-functionalized silica as a mixed-mode stationary phase for hydrophilic interaction and anion-exchange chromatography [J]. *Chromatography A*, 2016, 1468: 79–85.
- [20] Qiao L, Lv W, Chang M, *et al.* Surface-bonded amide-functionalized imidazolium ionic liquid as stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *Chromatography A*, 2018, 1559: 141–148.
- [21] Wang X, Bo C, Wang C, *et al.* Controllable preparation of a hydrophilic/ion-exchange mixed-mode stationary phase by surface-initiated atom transfer radical polymerization using a mixture of two functional monomers [J]. *Separation Science*, 2017, 40(9): 1861–1868.
- [22] Bo C, Wang X, Wang C, *et al.* Preparation of hydrophilic interaction/ion-exchange mixed-mode chromatographic stationary phase with adjustable selectivity by controlling different ratios of the co-monomers [J]. *Chromatography A*, 2017, 1487: 201–210.
- [23] Li H, Zhang X, Zhang L, *et al.* Preparation of a silica stationary phase co-functionalized with Wulff-type phenylboronate and C12 for mixed-mode liquid chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 962: 104–113.
- [24] Zhang S, Wan Q H, Li Y. Epoxide-derived mixed-mode chromatographic stationary phases for separation of active substances in fixed-dose combination drugs [J]. *Separation Science*, 2019, 42(17): 2796–2804.
- [25] Hu K, Zhang W, Yang H, *et al.* Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography [J]. *Talanta*, 2016, 152: 392–400.
- [26] Zhao W, Lou X, Guo J, *et al.* Investigation of the chromatographic regulation properties of benzyl groups attached to bridging nitrogen atoms in a calixtriazine-bonded stationary phase [J]. *Separation Science*, 2018, 41(10): 2110–2118.
- [27] Bai Q, Liu Y, Wang Y, *et al.* Protein separation using a novel silica-based RPLC/IEC mixed-mode stationary phase modified with *N*-methylimidazolium ionic liquid [J]. *Talanta*, 2018, 185: 89–97.
- [28] Wang J, Tang Y, Chu H, *et al.* Adjusting the chromatographic properties of poly(ionic liquid)-modified stationary phases by substitution on the imidazolium cation [J]. *Separation Science*, 2020, 43(14): 2766–2772.
- [29] Song Q, Zhao K, Xia H, *et al.* A novel reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode stationary phase based on horizontal polar-copolymerized approach for separation of small organic molecules and inorganic anions [J]. *Talanta*, 2019, 197: 592–598.
- [30] 成晓东, 李云萍, 贺银菊. 一种可控离子比例的两性亲水色谱固定相的制备及性能研究 [J]. *色谱*, 2019, 37(7): 683–691. ■