

非水介质毛细管电泳^{*}

徐木生 王小如^{**} 杨芑原 贾丽

(厦门大学化学系 国家教委材料和生命过程分析科学开放实验室 厦门 361005)

提要 评述了与水相体系相比,非水体系电泳分离体系对分析对象的扩展、分离度和分离效率的改善、选择性的提高以及质谱检测联用技术等各方面带来的好处,同时还总结了非水介质各种参数对毛细管壁双层电位、电渗流以及分离效率、分离度的影响。

关键词 毛细管电泳,非水介质,评述

分类号 O658

1 前言

毛细管电泳(CE)是近年来得到迅速发展的分离技术。毛细管的小孔径、高电阻、抗对流、大比表面积等特性,使CE分析方法可在高电场和小电流下工作,实现高效、迅速的分析。自1967年 Hjerten 开展开管CE最初的分析工作以来,CE经过30年的迅速发展,已像GC和HPLC一样,通过多种模式操作,在分析的各个领域如无机离子、糖类、氨基酸、药物、手性对映体的分离分析,尤其在生物大分子如多肽、蛋白质、核酸及DNA序列测定中,已成为不可取代的重要分析手段。

但在CE广泛的应用例子中,大多是在水相体系中完成的。为了提高CE的分离度、选择性等,人们把注意力集中在寻找缓冲体系的添加物上而忽略了对水相体系本身的考虑。事实上,很早以来就有非水介质的常规电泳方法的零星报道^[1-3],尤其近年来,CE在非水介质体系中的分离报道正引起分析工作者的注意^[4-7]。非水介质CE(non-aqueous capillary electrophoresis, NACE)已经成功地对药物及其代谢产物^[8]、手性分子^[6,9,10,29,37]、有机长链分子^[7]、弱酸碱^[11]、离子^[12]等进行了分离。这说明NACE分析方法正引起人们的兴趣,值得进一步研究。

2 非水介质毛细管电泳的潜在优点

这里所说的非水介质优点是指在分离上优于水溶液体系的优势。许多文献报道的虽不是完全的非水体系,但其介质中有机成分占60%~70%以上,主要表现出非水体系的性质,在此亦作为非水体系考虑。

NACE有很多优点。(1)增加CE分析对象,拓

宽CE分析领域^[15]。NACE增多了可优化参数的个数,如介质的极性、介电常数、粘性等,使在水溶液中难溶而不能用CE分离的对象,能在有机介质中有较高的溶解度而实现CE分离。在水中难溶的各类化合物,如有机烃类分子、某些药物分子和生物分子的NACE方式分离分析已见报道^[7,8]。(2)对某些水和非水都可溶的分析物,NACE能改善分离度,提高灵敏度和增加选择性^[16-18]。与水体系相比,非水体系可承受更高的操作电压产生的高电场,因而会有更高的分离效率,或者在不增大焦耳热条件下可提高缓冲液的离子强度,因而增大了进样量,能有更好的样品堆积效应,提高检测灵敏度。在非水下,溶质的溶剂化和离子对效应与水相中有很大的不同。此性质使溶质在非水介质毛细管中的保留时间发生改变,甚至完全改变保留顺序,因而可更好地选择测定^[12]。(3)以质谱技术作为CE的检测手段时,非水介质为CE-MS方法提供了更多的优势^[19,21]。Lu等^[20]指出,在以电喷雾为接口的CE-MS中,甲醇、乙腈等溶剂比水的表面张力小,可用更低的电喷雾电压,增加电喷雾的稳定性,提高离子化效率。而且选用比水具有更低沸点的有机介质作为分离体系,可改善质谱的进样口去溶效果,并能降低背景信号,有利于分析信号的检出。

3 非水介质毛细管内壁的物理化学行为及其对分离的影响

完全非水或者有机相占主要成分的体系与水相体系的介质性质的不同,主要是它们在物理化学性质上的差异,如介质沸点、粘度、介电常数、酸碱性和极性等,介质性质会影响分析对象与介质的相互作用,影响介质与毛细管壁的作用。除了不同材料(如

* 国家自然科学基金部分资助课题

** 通讯联系人

本文收稿日期:1997-01-12,修回日期:1997-04-22

Pyrex, Teflon, Glass和 Silica制成的毛细管)决定管壁的特性外,电泳过程中毛细管管壁的氢解离和吸附、分析对象的物理化学行为以及管壁 Y电位的 大小,都受到介质很大的影响.因此介质直接影响着分离的效果.实际操作时,往往通过配制不同比例组成二元或多元的混合体系来达到预想的分离效果.

3.1 非水下毛细管壁解离行为及 Y电位

在 CE分离中,体系与管壁之间的相互作用是重要的考虑因素之一,这种作用影响到管壁解离、吸附以及表面的电位大小.硅羟基的毛细管壁面是弱酸固体表面,在溶剂作用下硅羟基的氢将解离,同时吸附溶液阳离子,产生管壁双电层.溶剂的性质直接决定毛细管内壁的硅羟基的解离,管壁对溶液组分的吸附以及管壁双电层电位的大小.这种作用可用双电层理论(图 1)进行说明.硅羟基表面与溶剂作用,发生氢解离和吸附两种过程.氢未完全解离时,解离程度是溶液 pH值的函数.管壁氢质子的解离,使毛细管固体界面的电势为负值,同时库仑作用使管壁对溶液中的阳离子进行一层紧密吸附,在距羟基表面 X_0 处形成一正电势的界面,其电势的大小称为 Y电位.作用距离约有十分之几纳米,被称为 stern层.再往管内延伸是溶质扩散层,逐渐到本体溶液.在 stern层范围里,从固体界面到正电势面,电势呈线性变化,从 X_0 界面处到本体,电势呈指数降低.

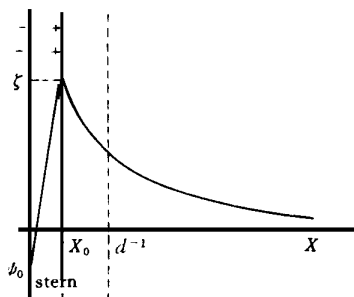


图 1 双电层示意图

Fig 1 Schematic diagram of electric double layer

管壁 Y电位大小取决于毛细管壁的硅羟基解离和表面的吸附.双电层理论表明,在距带电电荷 Q 的固体表面 r 处,电势大小以下式给出:

$$J = \frac{Q}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r} \exp(-dr) \quad (1)$$

其中 ϵ_0 是真空中介电常数, ϵ_r 是管壁处溶液的相对介电常数, d 的倒数是双电层的厚度.

在稀溶液中(CE的缓冲体系属于这种情况),双电层的厚度很宽,即 d^{-1} 很大,将式(1)作一级展开, X_0 处正电荷界面的剪切面与 J 相交处的 Y电位可

视为 Y电位,即在 I_0 处

$$Y = J = \frac{Q}{4\epsilon_0 \epsilon_r} \exp(-dr) r \approx \frac{Q}{4\epsilon_0 \epsilon_r} \cdot \frac{1}{1+dr} \quad (2)$$

其中双层厚度理论值

$$d^{-1} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r k T}{2e^2 I N_A} \quad (3)$$

式中 e 是电子电量, I 是溶液离子强度, N_A 为阿佛加得罗常数, k 为 Boltzman常数, T 是绝对温度, ϵ_r 数值难得,常取本体相对介电常数.

式(2)和(3)说明,介质的介电常数和溶液离子强度直接影响双电层的厚度,从而改变了管壁 Y电位.一般经验是,溶液离子强度增大将抑制 Y电位,这与式(2),(3)一致.式(3)表明,增大离子强度,可降低双电层厚度,从而减小 Y电位,即 Y电位得到抑制.反之则增大.

多数有机溶剂比水有较小的介电常数,能降低双电层厚度,减小 Y电位.但介电常数减小会直接增大 Y电位,如式(2)所示.实际的结果则不然.因为 Y电位还受到由体系 pH值决定的因管壁氢解离带上不同电量 Q 的影响.文献[22~25]的实验证明, Q 在非水介质中的减小是呈指数级的,Y电位也随 Q 呈指数变化;而从式(2)可知 Y电位随介电常数呈倍数级变化,毛细管内表面的硅羟基—SiOH是弱酸,其 pK 值在不同介质中表现出不同大小.文献[22]报道了在水相及水与3种有机质子介质甲醇、乙醇、2丙醇和3种非质子介质乙腈、丙酮、二甲基亚砜分别组成的二元体系中管壁硅羟基 pK 值的变化情况.有机相的加入,会在不同程度上增大 pK 值.硅羟基在水中的 pK 值为5.3,在水中加入高分子有机相时,二甲基亚砜使 pK 值增大最多,达3个单位,使酸度减至1/1000,极大地抑制了管壁氢解离,使表面所带电荷 Q 迅速减小,总的结果是降低了 Y电位.加入乙腈, pK 值增大幅度最小,但使氢解离能力也减弱到1/10以下.因此管壁 Y电位在非水介质中往往很小.

3.2 非水介质参数对迁移时间、电渗流的影响

被分析物质在毛细管中的迁移时间是分析速度的量度.以中性物质在毛细管中迁移时间的倒数可以定性说明毛细管内电渗流的大小,电泳时间短电渗流大,反之则小.电渗流 u_{eo} 是CE分离中的最重要参数之一,它是带电荷的毛细管内壁在外电场作用下对溶液的整体拉动.在水相缓冲液中,电渗流的大小可通过调整体系的 pH值进行调节,甚至可加入阳

离子表面活性剂如 CTAB等使之转向。它与介质粘度 Z 相对介电常数 X 以及 Y 电位之间的关系^[36]为

$$-\infty = X \epsilon_r Y / Z \quad (4)$$

由式(4)说明,电渗流的大小是由介质的介电常数与粘度的比值和 Y 电位决定的。但是 Janini 等人^[27]发现,水与各种有机组成的二元相体系中在有机组分小于 40% 时,电渗流 $-\infty$ 的减小与毛细管壁近处的介质粘度变化呈反比。该结论可由式(4)得到说明。因为在该范围内介质的介电常数和 Y 电位变化较小,可忽略,而粘度的大幅度变化决定了电渗流变化。Schwer 等人^[22]更细致的工作发现,随着有机组分的增大使介电常数不断减小,但粘度呈增大趋势,在有机相为 60% ~ 70% 时达到最大值,随后逐渐减小到有机相单组分的本体粘度, X/Z 比值综合表现为先减小,到 60% ~ 70% 时最小,之后再呈增大趋势。同时考虑上节讨论的非水介质下毛细管壁的 Y 电位减小的趋势,可知在水和高有机组分的二元介质中电渗流一般减小,分析时间增长。这一点与水体系相比, NACE 模式损失了 CE 快速分离分析的优点,这是它的局限性。

对实际样品进行分析时要根据情况选用介质。在水相时, CE 可通过调节 pH 值来改变电渗流,虽然非水也可调体系的 pH 值,但非水介质有更多的可优化参数,通过预先选择溶剂的 X/Z 比值大小确定介质组成,可方便地收到预期的效果。表 1 列出了几种常见的有机介质的介电常数 X 粘度 Z 以及它们的比值 X/Z 预先依据各参数相对大小进行介质选择,使电渗流或大或小,能方便的分析。如介电常数与粘度比值较大的乙腈就是常被选用的介质。

3.3 非水介质参数对分离效率、分离度的影响

分离效率可由谱图的峰形计算。分离效率 N 为谱峰的标准偏差 e 的平方的倒数,即

$$N = 1/e^2 \quad (5)$$

理论上标准偏差 e 是仪器各部分的标准偏差及分离过程的各因素偏差之和,包括检测偏差、进样偏差、温度偏差以及由溶质扩散、pH 值梯度等引起的偏差^[28]。由于毛细管电泳一般是在恒温下 UV 在线检测, $e_{\text{检测}}$, $e_{\text{温度}}$ 等都可忽略,因此对总偏差的贡献主要是由扩散项引起的,于是有

$$e_{\text{总}}^2 = e_{\text{扩散}}^2 \quad (6)$$

依溶质扩散方程则有

$$e_{\text{扩散}}^2 = 2Dt \quad (7)$$

式中 D 为扩散系数, t 为迁移时间。

表 1 非水纯介质的物理化学特性表

Table 1 Physico-chemical properties of pure solvent media

溶剂 Solvent	沸点 B. P. (°C)	X/Z / mPa·s	X/Z
水 H ₂ O	100	80	0.89
乙腈 Acetonitrile	82	37.5	0.34
一甲基甲酰胺 NMF	182	182	1.65
甲醇 Methanol	65	32.7	0.54
二甲基甲酰胺 DMF	153	36.7	0.80
甲酰胺 Fomamide	210	109	3.3
冰乙酸 Glacial acetic acid	118	6.2	1.1

用电渗流 $-\infty$ 和淌度 u_e 表示的迁移时间为

$$t = \frac{L_{\text{eff}}}{(u_e + -\infty)E} \quad (8)$$

式中, L_{eff} 为毛细管的有效长度, E 为外加电场强度。

联合式(4), (7), (8), 将 Stoke-Einstein 关系式^[29] $D = kT / 6\zeta Z$ 和分析对象的电泳淌度 $u_e = q / 6cZ$ 代入式(5)可得:

$$N = \frac{1}{kT} (q + 6\zeta X Y) \frac{E}{L_{\text{eff}}} \quad (9)$$

q 是分析物的电荷。

另外,分离度 R 与分离效率紧密相关,用分离效率表示的两个组分分离度为

$$R = \frac{1}{2} \frac{N}{N} \frac{u_{e1} - u_{e2}}{u_{e1} + u_{e2}} \quad (10)$$

式(9)说明: N 与外加电压呈正比(在毛细管长度一定时),非水介质可承受更高的电压,因而对提高分离效率有利; N 与分离温度呈反比,若采用室温或较低温度,将有助于分离效率的提高;若降低分离温度, $e_{\text{温度}}$ 变小,更接近于式(6)的简化条件,即可忽略 $e_{\text{温度}}^2$,从而将温差造成的粘度差、淌度差、pH 值梯度等减小到很低的水平,由此得出分离效率 N 与体系的粘度基本无关的结论,如式(9)所示。在体系中加入高分子聚合物将会增加粘度,同时也会增加位阻效应。对一些位阻效应对分离有贡献的分析物,可以以损失分析速度为代价,在高的操作电压、低的分离温度和大的介质粘度条件下进行分离,可提高分离效率,获得较高的分离度,如式(10)所示。

4 非水介质的毛细管电泳分离分析示例

NACE 相对于水相体系是一个还没进行广泛研究的方向。但很早就有零星文章报道非水介质在经典电泳方法中的应用。近年来发表了较多的 NACE 文章,说明 NACE 的潜在优势和广泛的实用价值已引起人们的注意,表 2 列出了一些用 NACE 方法进行分析的文献。

表 2 文献报道的非水介质电泳分离
Table 2 Separation of compounds by NACE in literature

电泳类型和所用介质 Electrophoresis and operation media	支持电解质 Supporting electrolyte	分析对象 Separation compounds	文献 Ref.
纸层电泳,无水乙醇 Paper electrophoresis, absolute ethyl alcohol	硝基甲烷,冰醋酸 nitromethane, glacial acetic acid	染料,胆固醇,棕榈酸,羟基-11脱氢皮质酮激 素 dyes, cholesterol, palmitic acid, hydrox y-11-d ehydrocortico sterone, tes tos- tenone	2
区带电泳,甲酰胺 CZE, formamide	250mmol/L phosphate 20mmol/LNaOH 0.1mol/L boric acid	二肽 dipeptides	4
区带电泳,甲醇:乙腈:乙酸 CZE, methanol: acetonitril : acetic acid(49: 50: 1)	乙酸铵 20mmol/L ammonium acetate	吗啡类,兴奋剂,抗组织胺 morphine ana- logues, stimulants, antihistamines	8
电泳,乙腈:水 CE, acetonitril: H ₂ O (50: 50)	高氯酸四乙基铵 tetraethylammonium perchlorate	芘,萘,甲基萘,萘基化氧,酰胺,高氯酸四己氨 bezo(ghi)perylene, 9-methylanthracene, perylene, naphthalene, mesityl oxides, formain -de, pyrene, tetrahexylammonium perchlorate	9
纸层电泳,乙腈:环砒烷 Paper electrophoresis, ace- tonitril: sulfolane(9: 1)	多氯代氯代乙酸,高氯酸四乙铵 dichloro/trichloro-acetic acid, tetraethyl ammonium perchlorate	蒽,苯并喹啉,菲 anthracene, 5, 6-benzoquino- line, 7, 8-benzoquinoline, 1, 10-phenanthroline	11
电泳,甲醇 甲酰胺 CE, methanol/DMF	正丁基氨 0.01mol/L phosphate, 0.02mol/Ln -BuNH ₂	I ⁻ , SCN ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , N ₃ ⁻ , Cl ⁻ , F ⁻ , C ₂ O ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻	12
电泳,甲酰胺 CE, N -methyl formamide	—	2吡啶羧酸,水杨酸 2-pyridine carboxylic acid, salicylic acid	30
电泳,乙腈 乙腈:水 CE, acetonitril/acetonitril: H ₂ O	高氯酸四乙基胺,盐酸 0.05mol/L tetraethylammon- ium perchlorate, 0.01mol/L hydrochloric acid	喹啉类 quinoline, basic, refined coal	31
薄层电泳,吡啶,冰乙酸 Thin layer electrophoresis, pyridine, acetic acid	agarose & polyacryl-amide 凝胶琼脂,聚丙烯酰胺凝胶	润滑油添加剂,酚盐,烃基苯磺酸盐,水杨酸盐 lubricating oil additives, phenate alkylben- nesulphonate, salicylate	32
纸层电泳,乙腈 Paper electrophoresis, acetonitril	溴化四乙基胺,高氯酸四乙 基胺 tetraethyl ammonium bromide, tetraethyl ammonium perchlorate	蒽,1-萘酚,4硝基酚,苦味酸,苯并喹啉, N -乙 基卞唑,菲 anthracene, 1-naphthol, trinitrophenol, 4-nitro phenol, pyrenebutyric acid, N -ethylcarbazole, 5, 6-benzoquinoline, 1, 10-phenanthroline	33
等速电泳,甲醇 Isotachopheresis, methanol	—	多种阳离子、阴离子: K ⁺ , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , Li ⁺ , F ⁻ , CH ₃ COO ⁻ , HCOO ⁻ , OH ⁻ , NO ₃ ⁻	34
纸层电泳,乙腈,醇类 Paper electrophoresis, acetonitril, alcohol	—	硫酸根,硫代硫酸根,连三硫酸,硫氰酸根 sulphate, thiosulphate, trithionate, tetrathionate, thiocyanate	35
区带电泳,甲酰胺 CZE, formamide	高氯酸四丁基胺 tetra-n -butylammonium perchlorate	芳基胺,氨基酸,氨基醇 primary amino compounds (aromatic amines, amino acid, amino alcohols)	37

5 局限性

低沸点甲醇具有可改善检测限、提高选择性、增大分离度等优点^[20]。但它的低沸点会使体系变得不稳定。另外电渗流的降低延长了分析时间^[36],损失了CE快速分析的优点。一些有机介质(如甲酰胺类)由于自身的吸收,使得在低于240nm的波长背景下吸收太大反而使检测限变坏。甲酰胺在电场下

还会被电解为CO、NH₃、CHCN等^[41],从而影响分离。再者,虽然NACE模式已用于药物Tamofifen及其生理代谢产物的分离检测,但CE的迅速发展主要归因于适应了生物医学和生物化学等分子水平分离的需要。NACE的介质与生物体液性质有很大的差异,这就极大地限制了NACE模式在生物大分子及单细胞检测等分离分析前沿领域的广泛应用。

参 考 文 献

- 1 Hayek M. J Phys Colloid Chem, 1951, 55 1527-1533
- 2 Paul M H, Durrum E L. J Am Chem Soc. 1952, 74 4721-4723
- 3 Tuckerman M M, Strain H H. Anal Chem, 1960, 32 695-698
- 4 Sahota R S, Khaledi M G. Anal Chem, 1994, 66 1141-1146
- 5 Tjornelund J, Hansen S H. J Chromatogr A, 1996, 737 (2): 291-300
- 6 Wang F, Khaledi M G. Anal Chem, 1996, 68(19): 3460-3467
- 7 Salimimoosavi H, Cassidy R M. Anal Chem, 1996, 68 (2): 293-299
- 8 Leung G N W, Tang H P O, Tso T S C et al. J Chromatogr A, 1996, 738 141-154
- 9 Walbroehl W, Jorgenson J W. Anal Chem, 1986, 58 497-481
- 10 Valko I E, Siren H, Riekkola M L. J Chromatogr A, 1996, 737(2): 263-272
- 11 Parekh N J, Fatmi A A et al. J Chromatogr A, 1984, 314 65-82
- 12 Salimimoosavi H, Cassidy R M. Anal Chem, 1995, 67 1067-1073
- 13 Jorgenson J W, Kukas K D. Anal Chem, 1981, 53 1298-1302
- 14 Jorgenson J W, Kukas K D. Science, 1983, 222 266-272
- 15 Fujiwara S, Horda S. Anal Chem, 1987, 59 487-490
- 16 Balchunas A T, Sepaniak M J. Anal Chem, 1988, 60 617-621
- 17 Johansson I M, Henion J D, Zweienbnum J. J Chromatogr A, 1991, 554 329-338
- 18 Spark A D T, Lisi P, Huynh D T et al. J Chromatogr A, 1991, 542 459-471
- 19 Tomlinson A J, Benson L M, Naylor S. LC GC-Magazine Separation Science, 1994, 12(2): 122
- 20 Lu W Z, Poon G K, Carmichael P L et al. Anal Chem, 1996, 68(4): 668-674
- 21 Tomlinson A J, Benson L M, Naylor S. J HRC, 1994, 17(3): 175-177
- 22 Schwer C, Kenndler E. Anal Chem, 1991, 63 1801-1807
- 23 Reijnga J C, Aben G V A, Verherggen T P E. J Chromatogr A, 1983, 260 241-254
- 24 Kenndler E, Jenner P. J Chromatogr A, 1987, 390 169-183
- 25 Kenndler E, Jenner P. J Chromatogr A, 1989, 470 57-68
- 26 Cohen A S, Paulus A, Karger B L. Chromatographia, 1987, 24 15-24
- 27 Janini G M, Chan K C, Barnes J A et al. Chromatographia, 1991, 35: 497-502
- 28 Huang X, Coleman W F, Zare R N. J Chromatogr A, 1989, 480 95-110
- 29 Jorgensson J W, Lukacs K D. Anal Chem, 1981, 53 1298-1302
- 30 Jansson M, Roeraade J. Chromatographia, 1995, 40 163-169
- 31 Walbroehl Y, Jorgenson J W. J Chromatogr A, 1984, 315 135-143
- 32 Leighton D, Moedy G J, Thomas J D R. Analyst, 1974, 99 442-452
- 33 Tshabalala M A, Schram S B, Grberich F G et al. J Chromatogr A, 1981, 207 353-363
- 34 Beckers J L, Everaerts F M. J Chromatogr A, 1970, 51 339-349
- 35 Kelly D P. J Chromatogr A, 1970, 51 343-345
- 36 Wainmann W, Maier C, Baumei K et al. J Chromatogr A, 1994, 664 271-275
- 37 Mori Y, Ueno K, Umeda T. J Chromatogr A, 1997, 757 328-332

Non-Aqueous Capillary Electrophoresis

Xu Musheng, Wang Xiaoru^{*}, Yang Pengyuan and Jia Li

(The Research Laboratory of SEDC of Analytical Science for Material and Life Chemistry Chemistry Department, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Non-aqueous capillary electrophoresis is a field needed for further investigation. This work summarizes various advantages in extension of analysis range, improvements of resolution, separation efficiency, and selectivity, which are brought about by non-aqueous media. It also reviews the influences of non-aqueous media on the double-layer potential, electroosmosis, resolution and efficiency.

Key words capillary electrophoresis, non-aqueous media, review