

毛细管电色谱行为的初步考察^{*}

芮建中¹ 邹汉法² 施 维 张丽华 朱 军

(中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

摘 要 用高压匀浆填充和高温烧结固定相法制备反相和混合型电色谱柱, 初步考察了改变不同条件, 包括电压、电解质种类、电解质浓度、有机试剂比例、样品溶剂组成和进样条件等, 对电流、电渗流和柱效等反相电色谱行为的影响。电解质为磷酸二氢钠的流动相, 电流值较大, 且随电压变化明显, 电流与电压之间存在较好的线性关系。当电解质浓度上升电渗流略呈下降趋势, 柱效增大。乙腈浓度增加, 硫脲的保留时间缩短。随着进样量的增大, 柱效逐渐下降; 以去离子水或以乙腈-水(90:10, v/v)为溶剂的样品, 其柱效较高, 而以乙腈-水(50:50, v/v)为溶剂的样品, 其柱效相对其它样品较低。另外, 心血管药物普罗帕酮及其代谢物 5-羟基普罗帕酮和硫脲能在混合型电色谱柱上 4 min 内达到快速分离。

关键词 毛细管电色谱; 电渗流; 柱效; 硫脲; 普罗帕酮; 5-羟基普罗帕酮

毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)是近十年来融合了现代最新分离技术高效液相色谱法(HPLC)和毛细管电泳(CE)的优势而迅速兴起的电分离微柱液相色谱技术, 是一种以样品与固定相间的相互作用为主要分离机制的电泳过程, 即以高压电源(或加一定压力)代替高压泵, 用电渗流(electroosmotic flow, EOF)驱动流动相, 溶质依据它们在流动相与固定相中分配系数的不同和自身电泳淌度的差异得到分离, 既能分离中性物质又能分析带电组分。CEC 是 HPLC 和 CE 的有机结合, 它克服了 CE 选择性差和分离中性物质的困难, 同时提高了 HPLC 的分离效率。近年来, 国内外有关 CEC 的分离机制、柱制备、应用研究, 以及全面的综述文章快速增长, 并于 1997 年 8 月在美国加州召开了第一届 CEC 会议, CEC 已成为分析领域中新的研究热点^[1~3]。本文简要介绍 CEC 柱的匀浆填充制备法; 反相 CEC 中电流、电渗流、柱效等, 与电压、电解质种类、电解质浓度、有机改性剂浓度、样品溶剂组成和进样条件的关系, 以及在混合柱上心血管药物普罗帕酮(propafenone, PPF)及其代谢物 5-羟基普罗帕酮(5-hydroxypropafenone, 5-OH-PPF)快速分离中的应用。

1 实验材料和方法

1.1 仪 器

所用毛细管的管径为 365 μm (o. d.) \times 75 μm (i. d.), 河北永年光纤厂生产; 用 Waters 510 型 HPLC 泵(美国 Waters 公司)制备 CEC 填充柱; 样品分析用 PACE 5010 型电泳仪(美国 Beckman 公司); 仪器操作和数据采集均用 System Gold 软件在微机上进行, CEC 填充柱长/总柱长为 20/27 cm, 柱温控制于 20 $^{\circ}\text{C}$, UV 检测波长 230 nm。

1.2 试 剂

硫脲(Thiourea, TU)、氢氧化钠、磷酸二氢钠和三羟甲基氨基甲烷(Tris)为分析纯, 乙腈为色谱纯, PPF 和 5-OH-PPF 购自 Sigma 公司, 去离子水为蒸馏水经 milli-Q[®]处理而得。配制含磷酸二氢钠分别为 2 mmol/L 和 5 mmol/L 的乙腈-水(80:20, v/v)流动相。另配制含 Tris 分别为 3 mmol/L、5 mmol/L 和 10 mmol/L 的乙腈-水(80:20, v/v)流动相, 其中电解质浓度为 5 mmol/L 的流动相, 其有机试剂的体积分数又分别配制为 0.6、0.7 和 0.9; 流动相的 pH 值均调至 9.50。实验中每次更换流动相后, 先用新流动相将 CEC 柱在 10 kV 电压下预平衡 30 min。

^{*} 收稿日期 1999-03-15 ¹ 现为中国科学院大连化学物理研究所博士后, 固定地址: 南京军区南京总医院临床药理科, 南京 210002;

系通讯联系人。本项目获国家杰出青年基金资助

1.3 CEC 柱制备

采用匀浆高压填充法制备 CEC 柱: 先用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将毛细管活化 1 h, 再用蒸馏水将毛细管冲洗干净, 在毛细管的一端填入少量氧化硅胶, 用电热丝烧制初始进样端封口; 通过逐渐加压的方法将超声后的填料匀浆装入毛细管中, 当达到所需长度时, 用电热丝直接烧结固定相, 制备末端封口, 并将剩余的固定相颗粒反向冲出; 用同样方法重新制备进样端封口, 并切去原封口; 最后在紧靠末端封口处制作检测窗口。本实验使用反相 CEC 柱(填料为 3 μ m 粒径的 Spherisorb ODS, 英国 Phase separation 公司)和混合型 CEC 柱(填料为 3 μ m 粒径的 Spherisorb ODS 与 SCX 按 1:1 混合)。

1.4 反相 CEC 行为

考察反相 CEC 柱上, 在不同电压、电解质种类、电解质浓度、有机改性剂比例、进样条件和样品溶剂组成时, 电流、电渗流及柱效随分析条件变化的情况。

1.5 药物样品分离

考察用电色谱柱快速分离心血管药物 PPF 及其代谢物 5-OH-PPF 的实验条件。

2 实验结果

2.1 电流与电压、电解质浓度及种类的关系

在 5 kV、10 kV、15 kV 和 20 kV 不同电压下, 有机试剂比例乙腈-水(v/v)为 80:20 的不同电解质种类和浓度的流动相产生的电流大小结果见表 1。电解质为磷酸二氢钠的流动相, 其电流值较大, 且随电压增大, 升高较快。电压与电流值之间存在较好的线性关系。在 5 mmol/L 磷酸二氢钠流动相中, 当电压大于 20 kV 时, 电流不稳定, 先快速上升, 随之迅速下降至 0.6 μ A。

Tab 1. The relationship between applied voltage and current in different mobile phases

| Voltage (kV) | Current in different mobile phase(μ A) | | | | |
|-----------------|--|--|------------------|------------------|-------------------|
| | 2 mmol/L NaH ₂ PO ₄ | 5 mmol/L NaH ₂ PO ₄ | 3 mmol/L Tris | 5 mmol/L Tris | 10 mmol/L Tris |
| | | | | | |
| 5 | 0.8 | 1.1 | 0.5 | 0.6 | 0.7 |
| 10 | 1.1 | 1.6 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 15 | 1.4 | 2.1 | 0.7 | 1.0 | 1.3 |
| 20 | 1.7 | 2.6 | 0.8 | 1.2 | 1.6 |

The packed capillary column: 27 m \times 75 μ m (i. d.) (20 cm section packed with 3 μ m Spherisorb ODS particles), Setpoint of column temperature 20 $^{\circ}$ C, Mobile phase contains 80% (v/v) acetonitrile. Detector: UV 230 nm

2.2 电渗流与电压、电解质浓度的关系

考察在 5 kV、10 kV、15 kV 和 20 kV 不同电压下, 有机试剂比例乙腈-水(v/v)为 80:20, Tris 浓度分别为 3 mmol/L、5 mmol/L 和 10 mmol/L 的流动相中电渗流的变化情况。以 TU 作为不保留的物质, 用于死时间的测定, 检测波长为 230 nm; 实验结果见表 2。在 Tris 浓度为 3 mmol/L 和 5 mmol/L 时, 电渗流大小相近, 当电解质浓度上升至 10 mmol/L 时, 电渗流略呈下降趋势。

Tab 2. The relationship between applied voltage and electroosmotic flow in mobile phase containing different concentrations of electrolyte

| Voltage (kV) | Linear velocity (mm/s) | | |
|-----------------|------------------------|---------------|----------------|
| | 3 mmol/L Tris | 5 mmol/L Tris | 10 mmol/L Tris |
| 5 | 0.259 | 0.266 | 0.243 |
| 10 | 0.491 | 0.505 | 0.462 |
| 15 | 0.687 | 0.706 | 0.646 |
| 20 | 0.993 | 1.013 | 0.924 |

Experimental conditions as in Tab 1.

2.3 电渗流与乙腈比例的关系

考察在 5 kV、10 kV、15 kV 和 20 kV 不同电压下, Tris 浓度为 5 mmol/L, 流动相中有有机改性剂乙腈的比例分别为 0.6、0.7、0.8、0.9 时, 电渗流的变化情况, 结果见表 3。随着乙腈浓度增加, 疏脉的保留时间缩短, 在同一电压下, 电渗流与有机试剂比例呈线性关系。

Tab 3. The relationship between applied voltage and electroosmotic flow in mobile phase containing different concentrations of acetonitrile

| Voltage (kV) | Linear velocity in mobile phase containing different concentrations of acetonitrile (mm/s) | | | |
|-----------------|--|-------|-------|-------|
| | 60% | 70% | 80% | 90% |
| 5 | 0.238 | 0.254 | 0.266 | 0.277 |
| 10 | 0.455 | 0.490 | 0.505 | 0.523 |
| 15 | 0.590 | 0.651 | 0.706 | 0.731 |
| 20 | 0.861 | 0.957 | 1.013 | 1.046 |

The electrolyte concentration of Tris is 5mmol/L. Other experimental conditions as in Tab 1.

2.4 柱效与电压、电解质浓度的关系

考察了在 5 kV、10 kV、15 kV 和 20 kV 不同电压下, 有机试剂比例乙腈-水(v/v)为 80:20, Tris 浓度分别为 3 mmol/L、5 mmol/L 和 10 mmol/L 的流动相中, 疏脉的柱效变化情况, 结果见表 4。从表中可知, 随着电压升高柱效有所下降, 当电解质浓度升高时, 柱效增大, 但电解质浓度升高, 导致焦耳热增加, 也易产生气泡。

Tab 4. The relationship between applied voltage and column efficiency in mobile phases containing different concentrations of electrolyte

| Voltage (kV) | Column efficiency(theoretical plate number/m) | | |
|-----------------|---|---------------|----------------|
| | 3 mmol/L Tris | 5 mmol/L Tris | 10 mmol/L Tris |
| 5 | 209704 | 210850 | 241176 |
| 10 | 202824 | 207045 | 230849 |
| 15 | 193468 | 205318 | 225917 |
| 20 | 188406 | 197320 | 218644 |

Sample: Thiourea concentration; 1.37 mg/ml solvent; acetonitrile-water(80 :20, v/v), injection; 5 kV/1 s. Other experimental conditions as in tab 1.

2.5 柱效与进样条件及样品溶剂组成的关系

考察了 20 kV 电压下, Tris 浓度为 5 mmol/L, 有机改性剂乙腈-水(v/v) 比例为 80 :20 的流动相中, 不同进样条件和溶剂组成对硫脲的柱效的影响, 其中溶剂分别为 90 :10(v/v) 的乙腈-水溶液、50 :50(v/v) 的乙腈-水溶液和去离子水, 实验结果见表 5。从表中可知, 在样品浓度较高时, 随着进样电压和时间的增大, 柱效下降较明显; 以去离子水或以 90 :10(v/v) 的乙腈-水溶液为溶剂的样品, 其柱效较高, 而以 50 :50(v/v) 的乙腈-水溶液为溶剂的样品, 其柱效相对其它样品较低。

Tab 5. The effect of different injection condition and solvent composition on column efficiency

| Injection | Column efficiency in different solvents (theoretical plate number/m) | | |
|-----------|---|--------|--------|
| | 90%ACN | 50%ACN | Water |
| 5 kV 1s | 197320 | 99340 | 240985 |
| | 129091 | 48578 | 168693 |
| | 121844 | 28810 | 150171 |
| | 115989 | 31957 | 146029 |
| | 94035 | 23367 | 134900 |
| 8 kV 1s | 162343 | 82518 | 147613 |
| | 122556 | 51466 | 145742 |
| | 101093 | 31223 | 143454 |
| | 87471 | 21502 | 118719 |
| | 54716 | 14580 | 136007 |
| 10 kV 1s | 119367 | 58783 | 144310 |
| | 115577 | 16753 | 127008 |
| | 88948 | 15815 | 120783 |
| | 60044 | 15066 | 117513 |
| | 48669 | 10151 | 110513 |

Sample; thiourea concentration; 1.37 mg/ml. Other experimental conditons as in Tab 1.

2.6 药物样品分离

通过以上 CEC 行为的考察, 选择相应的分离条件, 分析分子结构相近的药物样品(心血管药物 PPF 及其代谢物 5-OH-PPF), 考察 CEC 在药物分

离, 特别是药物及其代谢物间的分离效率。在 3 μm ODS 颗粒为填料的电色谱柱上, 以 pH 9.50, 80 :20(v/v) 的乙腈-Tris 缓冲液(5 mmol/L) 为流动相, 运行电压 20 kV, 柱温 20 ℃, 分离 TU、PPF 和 5-OH-PPF 的混合样品时, TU、PPF 和 5-OH-PPF 三者能同时分开, 但 PPF 和 5-OH-PPF 的保留时间太长(达 20 min), 出峰顺序为 TU、5-OH-PPF 和 PPF, 且 PPF 的峰形很差。在反相 CEC 柱上, 改变流动相组成, 分离效果无明显改善。后采用混合型 CEC 柱, 达到良好的分离(见图 1), 大大缩短了分离时间, 出峰顺序为 5-OH-PPF、PPF 和 TU, PPF 峰形较好, PPF 的柱效达到 8.5 万理论塔板数/米, 而 5-OH-PPF 的柱效达近 14 万理论塔板数/米, 分离效果较理想。

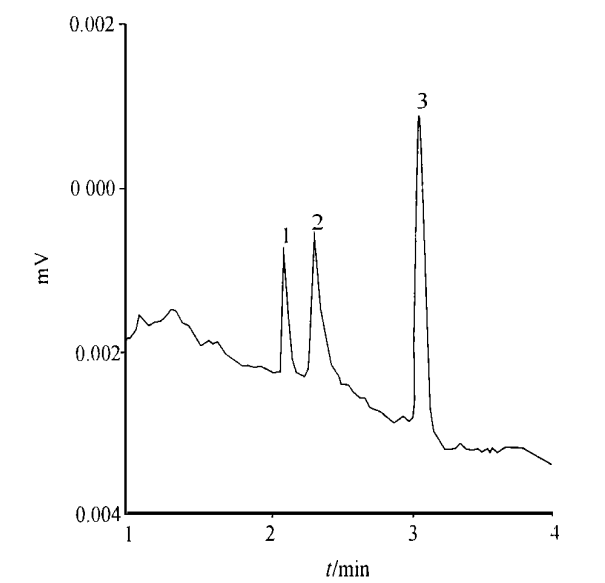


Fig 1. Experimental electrochromatogram of pharmaceutical separation. Column; 27 cm× 75 μm(id), 20 cm section packed with 3 μm ODS-SCX (1:1) Mobile phase: CH3CN-Tris(5 mmol/L)= 80 :20(v/v). Detector; UV 230 nm, column temperature; 20 ℃, Injection; 5 kV/1 s. Peak; 1. 5-OH-PPF(0.22 mg/ml); 2. PPF(0.40 mg/ml); 3. TU(0.70 mg/ml)

3 讨论

CEC 采用电场推动流动相, 即用含有一定电解质浓度的极性溶液作为流动相, pH> 3 时, 毛细管内壁的硅醇离解, 通过静电作用吸附流动相中的正电荷, 在毛细管内壁附近形成双电层, 在毛细管两端施加一定电压便可产生电渗流, 电渗流方向一般指向阴极。对于填充的毛细管, 其电渗流 μ_{eo} 公式^[4] 为:

$$\mu_{\omega} = \frac{E\epsilon\xi}{4\pi\eta} = \frac{U\epsilon\xi}{4L\pi\eta} \quad (1)$$

式中, E 、 U 和 L 分别是电场强度、分离电压和毛细管总长度, ϵ 、 ξ 和 η 分别是溶剂的介电常数、Zeta 电位和流动相的粘度。因此, 电渗流主要与电压、流动相的介电常数、流动相的粘度、柱长以及电解质的浓度等因素有关, 而与柱的直径和填充微粒的大小无关, 因而其线速度不受柱填充不均匀等因素的影响。在常用电压下, 外加电压与电流及电渗流具有良好的线性关系, 为了提高分离效率, 一般采用高电压和高电解质浓度流动相的分离条件。但是, 由于柱内填充颗粒细微的色谱填料以及有机试剂的存在, 易引起局部焦耳热升高和气泡产生, 造成电流骤降和分离失败, 有机电解质 Tris 较无机电解质磷酸盐更能在较高浓度下进行 CEC 分析。从本实验结果可知, 电解质浓度大小对电渗流的影响较小, 而电压和有机试剂乙腈的浓度高低对电渗流的影响较大。

类似于 HPLC, 在 CEC 中柱效是由纵向扩散项、涡流扩大散项和传质阻力项决定, 在 CEC 中传质阻力项对塔板高度的贡献很小, 而 CEC 中填料的粒径通常为 $1.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$, 加上近似于塞式流的线速度, 故涡流扩散项也很小, 所以决定塔板高度的主要是纵向扩散项^[9], 这使 CEC 比 HPLC 有更高的分离能力和柱效。

在药物样品分离中, 不同类型的 CEC 柱对溶

质的分离效果有较大影响。CEC 是在毛细管内填充或在毛细管壁键合固定相, 以电渗流驱动流动相, 使溶质在二相分配, 不同溶质在柱中的保留是与它在两相中分配常数有关的, 因而它是一种色谱行为, 但当被分析物是离子时, 其保留机制又类似于毛细管电泳, 根据电泳淌度的不同得到分离。本文在反相 CEC 中 TU 不保留, 出峰在前, 而 5-OH-PPF 和 PPF 保留强, 峰形较差, 5-OH-PPF 中有酚羟基, 故 5-OH-PPF 和 PPF 依次洗脱。在混合相 CEC 中, 由于加入了极性填料阳离子交换树脂 SCX, 可能是综合机制作用使 TU 的保留增加, 而 5-OH-PPF 和 PPF 的保留大大减少, 最后的出峰顺序依次为 5-OH-PPF、PPF 和 TU, 且 5-OH-PPF 和 PPF 的峰形大为改善。

参考文献

- 1 Crego AL, Gonzalez A, Marina ML. Electrochromatography. *Crit Rev Anal Chem*, 1996 **26**: 261
- 2 Huber CG, Choudhary G, Horvath C. Capillary electrochromatography with gradient elution. *Anal Chem*, 1997, **69**: 4429
- 3 芮建中, 邹汉法. 毛细管电色谱及其在药物分析中的应用. *药物分析杂志*, 1999, **19**: 64
- 4 Pretorius V, Hopkin BJ, Schieke JD, *et al.* Electroosmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1974, **99**: 23
- 5 Yamamoto H, Baumann J, Erni FJ. Electrokinetic reversed-phase chromatography with packed capillaries. *J Chromatogr*, 1992 **593**: 313

Preliminary Investigation of Characteristics of Capillary Electrochromatography

Rui Jianzhong, Zou Hanfa, Shi Wei, Zhang Lihua, Zhu Jun

National Chromatography Research Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116011

Abstract Capillary electrochromatography (CEC) couples very high efficiencies associated with capillary electrophoresis (CE) and with high performance liquid chromatography (HPLC). In this paper, some characteristics of reversed-phase CEC, such as running current, linear velocity of electroosmotic flow (EOF) and column efficiencies were studied. The influence of running voltage, electrolyte type, electrolyte concentrations, acetonitrile concentrations, injection conditions and the composition of sample solvent on the property of RP-CEC was investigated. The fused silica capillary column with $75 \mu\text{m}$ inner diameter was packed with $3 \mu\text{m}$ ODS stationary phase to 20 cm by ultrasonic slurry pumped. The total length of capillary column was 27 cm. On-line UV detector was used. A good

linear relationship between the running current and applied voltage was obtained. The currents in phosphatic mobile phase were bigger than in Tris mobile phase. The EOF monitored by using thiourea as a marker will be decreased when the electrolyte concentration increases. The higher the acetonitrile concentration was, the higher the EOF was. The column efficiencies increased as the electrolyte concentrations increasing but decreased as the sample plug increasing. The shape of profile and the column efficiencies in samples which solvents were comprised by 90% acetonitrile and 10% deioned water were better than in samples which solvents were comprised by 50% acetonitrile and 50% deioned water. It is less than 4 min to separate propafenone, 5-hydroxy propafenone and thiourea in mixed packed CEC column using a mobile phase with 5 mmol/L Tris and 80% acetonitrile :deioned water (v/v). The highest efficiencies obtained was 140 000 plate per meter for a retained solute, 5-hydroxy propafenone.

Key words Capillary electrochromatography; Electroosmotic flow; Column efficiency; Thiourea; Propafenone; 5-Hydroxy propafenone

·会议消息·

关于召开《'99 南京一名古屋市药化学术研讨会》 的征文通知(第二轮)

各科研、医疗单位、药品生产、经营企业:

为加强中日药化学术交流,促进我市药化学事业的发展,中国药学会江苏省南京分会和日本名古屋名城大学将于 1999 年 10 月 24 日~27 日在南京市举行《'99 南京一名古屋市药化学术研讨会》。这次会议为国际性药化学术研讨会,请各有关单位积极组织稿件,除论文作者参加会议外,各单位可另安排 2—3 人参加。

一、征文范围:

1. 传统药物与天然药物; 2. 药物制剂; 3. 药理学; 4. 医院药学。

二、征文要求:

1. 论文为未公开发表,须加盖单位公章;

2. 来稿全文不超过 3000 字,并附 800 字以内的中英文摘要(无摘要论文不收载论文集),摘要下方请注明作者简历(姓名、出身年月、单位、现任职务或职称、兼职),来稿请用计算机打印或 400 字方格稿纸抄写清楚。

三、来稿请寄至南京市童家巷 24 号中国药科大学 215 信箱屠锡德教授收,邮编 210009,联系电话 (025)3305996-326。信封上请注明“会议征文”字样。每篇论文请寄处理费 10 元。

四、凡参加会议的药化学人员可授给继续教育一类学分。会务费每人 300 元。

五、各药品生产、经营企业,对本次会议进行赞助者可设产品展台,其研究性论文如被录用亦可在会议交流。

中国药学会江苏省南京分会
一九九九年五月二十日