

高效毛细管电泳分离中焦耳热现象的考察

范国荣 张正行 陈伟¹ 安登魁

(中国药科大学药物分析学研究室, 南京 210009)

摘要 以黄连素及其化学衍生物为分析对象,通过不同操作条件下分离效能、溶质迁移时间、电压电流关系以及电泳运行功率的关系,来考察高效毛细管电泳过程中管内焦耳热现象对样品分离的影响,明确了在综合优化电泳分离条件中限制焦耳热的必要性。

关键词 高效毛细管电泳; 电泳分离; 焦耳热

高效毛细管电泳(HPCE)是在平板电泳基础上发展起来的一种新型的检测技术,广泛地应用于生物大分子、无机离子、光学异构体及有机药物的分离分析。HPCE采用细孔径毛细管(25~100 μm)进行电泳分离,可以有效地减少曾限制传统电泳高压使用的焦耳热效应,使毛细管电泳的高效分离成为现实^[1~3]。但是,HPCE中仍然存在着由于电泳操作条件选择不当所引起的焦耳热过高现象,从而导致毛细管径向不均匀的温度梯度和局部电解质缓冲液浓度的变化,造成电泳区带展宽,最终影响分离效能。本文选择黄连素及其化学衍生物为分析对象,对电泳分离过程中操作因素引起的焦耳热效应进行较为细致的考察,为综合优选电泳条件过程中有效地限制焦耳热的不良影响提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Bio-Rad HPE-100 型高效毛细管电泳仪;日本岛津 C-R6A 色谱数据处理机;上海大华自动平衡记录仪;上海雷磁 pHs-25 型酸度计。

黄连素(B)、四氢黄连素(THB)、对氯苄基四氢黄连素(PTB),由中国药科大学药物

化学研究室提供;实验所用有机溶剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

1.2 操作方法

按要求配制实验所需各类试液,使用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。20 cm×25 μm 毛细管使用前分别用重蒸水和缓冲液清洗 5~10 min。操作缓冲液平衡 5 min 后进样,分析一次冲洗一次。采用电迁移进样:4 kV,6 s;正极进样,负极检测。室温:(15±1)℃。

样品溶液配制:精密称取黄连素及其化学衍生物适量,溶于 0.1 mol/L 盐酸-无水乙醇(1:1,V/V)试液中。分别取等体积的黄连素及其化学衍生物贮备液,加一定量缓冲液稀释至浓度约为 100 μg/ml,混匀后备用。

2 结果与讨论

2.1 工作电压升高对管内焦耳热的影响

根据电泳分离效能的基本表达式^[4]:

$$N = \frac{\mu_e V}{2D}$$

式中 μ_e 为电泳淌度, V 为工作电压, D 为扩散系数。

在 HPCE 分离过程中,升高电压可以提高电泳分离效能、减少分析时间,但同时带来了毛细管内电流的上升并进而引起电泳运行

收稿日期 1995-06-08 ¹1995 年本科毕业生

功率 W (电压与电流乘积 $W = V \cdot I$) 的增加。当运行功率超过毛细管壁热散逸能力时, 焦耳热就会急剧上升, 造成毛细管中心处温度高于管壁温度, 形成径向温度梯度, 即:

$$\Delta T = \frac{0.24W}{4K}, \text{ 其中 } K \text{ 为缓冲液的导热系数}^{[5]}$$

由于缓冲液粘度与温度的关系^[6]:

$$\eta = A \cdot 10^{\beta/T}, \text{ 其中 } A, \beta \text{ 为常数}$$

毛细管内的径向温度分布, 必将引起缓冲液介质在径向产生梯度, 从而影响溶质迁移, 导致电泳区带展宽, 柱效下降。本文考察了工作电压变化对黄连素及其化学衍生物分离效能、溶质迁移时间及电压电流关系的宏观影响, 结果见图 1~3。

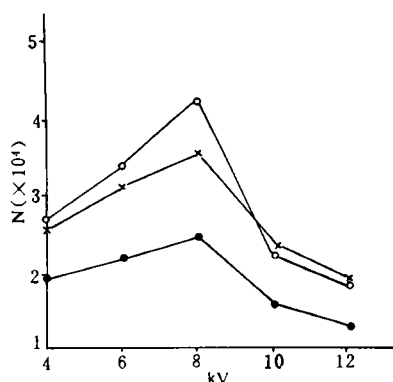


Fig 1. Effects of applied voltage on column efficiency
B2: ●; THB: ○; PTB: ×

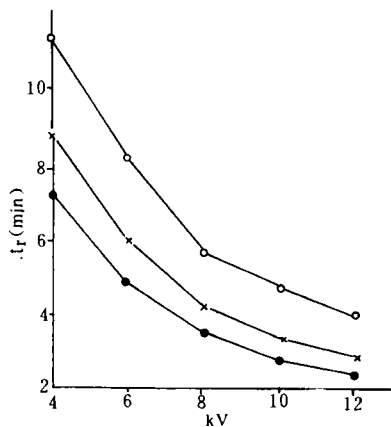


Fig 2. Effects of applied voltage on migration time

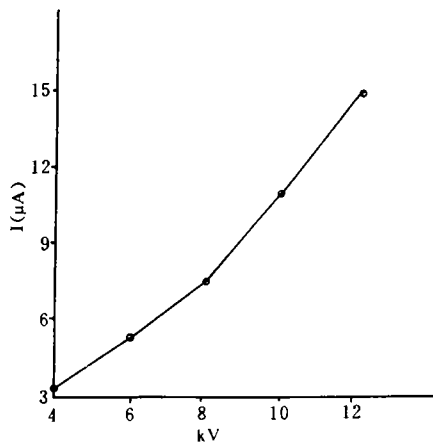


Fig 3. The disproportionate increase in current with voltage

从图 1~3 可以看出, 在 pH 6.5, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液条件下, 随着工作电压升高, 毛细管内焦耳热对电泳分离确实存在影响, 造成了分离效能的降低、溶质迁移的非线性增加及电压电流关系偏离欧姆定律; 同时也为毛细管电泳分离过程考察过热和温度梯度的存在提供了三种相互验证的方法。

2.2 缓冲液体系改变对管内焦耳热的影响

2.2.1 pH 值引起的焦耳热变化 缓冲液

pH 值是影响电泳分离最重要的因素之一。但是, 不同 pH 值的缓冲液, 在改变荷电粒子表面电荷密度的同时, 因缓冲液对组成质与量上的差异, 导致了毛细管内的焦耳热变化。由于毛细管柱温的上升与电泳运行功率 W 有直接关系, 故本文通过电泳运行功率 W 来表征毛细管内的焦耳热效应。图 4 显示了在运行电压 8 kV, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液条件下, pH 2.5~7.5 范围内的焦耳热趋势。在实验过程中, 不同 pH 值的磷酸盐缓冲液系列是以 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液浓度为基准, 采用 0.1 mol/L 盐酸液、0.1 mol/L 氢氧化钠液的调节来配制的。因此, pH 因素引起的焦耳热变化, 实质上就是在 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液中添加的不同数量的盐酸、氢氧化钠所造成的。

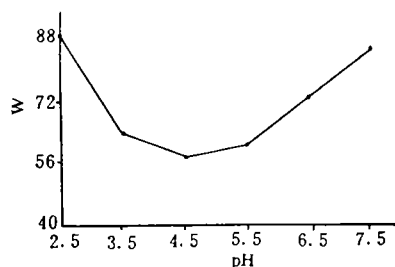


Fig 4. Effects of pH on Joule heat in capillary

2.2.2 缓冲液浓度引起的焦耳热变化 一般来说,随着缓冲液浓度增加,溶质的电迁移速率下降。然而,缓冲液浓度的增加,因导电离子数的增多,明显地引起电流值增大,造成毛细管内的焦耳热升高。图 5 为缓冲液浓度与运行电流的关系(工作电压:8 kV,缓冲液: pH 6.5 磷酸盐缓冲液),从中可见,电流以及相应的焦耳热随着缓冲液浓度的增加而增加($I = 1.44 + 0.174C$, $r = 0.998$)。因此,在毛细管电泳操作过程中,需要考虑在基本不降低分离效能的前提下,选择较低缓冲液浓度来进行电泳分离。

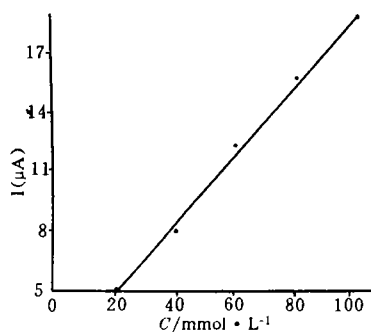


Fig 5. Current as a function of buffer concentration

2.3 添加有机溶剂对管内焦耳热的影响

在操作缓冲液中添加一定量的有机溶剂,在胶束电动毛细管色谱分离模式中得到了广泛的应用,其主要目的是增加所分离样品的溶解度和提高样品分离的选择性^[7]。然而,在 8 kV 工作电压、pH 6.5, 0.05 mol/L

磷酸盐缓冲液体系条件下,比较不同乙醇浓度与焦耳热的对应关系(图 6),明显地看出在操作缓冲液中添加适量的有机溶剂还有一个很大的优点,即通过引起缓冲液粘度增大、介电常数减小来降低毛细管内的焦耳热。

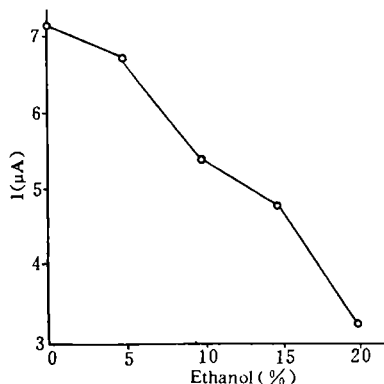


Fig 6. Correlation of current and ethanol content in buffer

2.4 高压运行时间对管内焦耳热的影响

对缺少毛细管冷却系统的毛细管电泳仪而言,高电场长时间操作运行常常会引起管内电流以及相应焦耳热的上升,因而影响迁移时间及分离分析的重现性。图 7 为 8 kV 工作电压及 0.05 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液条件下运行时间与管内电流的相关性;显而易见,为了保证毛细管电泳分离的重现性,每次进样运行后须用操作缓冲液冲洗冷却毛细管,以降低管内焦耳热对下次电泳分离的影响。

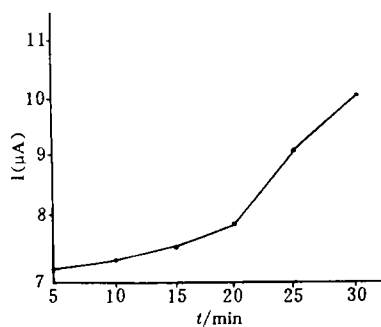


Fig 7. Correlation of current and running time in applied voltage

参考文献

- 1 Kuhr WG. Capillary electrophoresis. *Anal Chem.*, 1990, 62:403R
- 2 Kuhr WG, Monnig CA. Capillary electrophoresis. *Anal Chem.*, 1992, 64:389R
- 3 Monnig CA, Kennedy RT. Capillary electrophoresis. *Anal Chem.*, 1994, 66:280R
- 4 Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem.*, 1981, 53:1298
- 5 林炳承. 高性能毛细管电泳导论. 大连:中科院大连化物所, 1992, 7
- 6 Zhang YK, Chen N, Wang L. The effect of column temperature on the migration time of peptides in free-solution capillary electrophoresis. *J Liq Chromatogr.*, 1993, 16(17): 3689
- 7 傅小芸, 吕建德, 竺安. 乙醇-水混合溶剂体系毛细管胶束电动色谱的研究. *分析化学*, 1990, 18(9):791

Study on Joule Heat in the Separation of High Performance Capillary Electrophoresis

Fan Guorong, Zhang Zhengxing, Chen Wei, An Dengkui

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The effects of Joule heat on the separation in high performance capillary electrophoresis (HPCE) were investigated with berberine and its chemical derivatives as analytical samples. The experimental results were shown by means of the correlation of various electrophoretic parameters with separate efficiency, solute migration time, relation of voltage and current, electrophoretic running power. It was obvious that Joule heat must be controlled in the systematic optimization of HPCE separate conditions.

Key words High performance capillary electrophoresis; Electrophoretic separation; Joule heat

天-苯甜二肽及其制备工艺通过鉴定

天-苯甜二肽(APM)是当前世界上应用最广泛的人工合成二肽甜味剂。中国药科大学吴梧桐教授主持的国家科委“八五”攻关项目研究组,应用选择性化学合成法制备 APM,将特异 L-天冬氨酸活化物与苯丙氨酸甲酯一步反应得到产物,缩合率达 70%,产品质量符合食品级质量标准。该工艺专一性强,工艺简便、稳定,成本较低,是一条独创性的先进工艺路线。该工艺已于 1996 年 2 月通过国家医药管理局组织的科技成果鉴定。