

电堆积与等速电泳结合的毛细管电泳进样富集方法的研究

李 敏, 何友昭, 淦五二, 林祥钦, 杨 丽, 瞿其曙

(中国科学技术大学化学系, 安徽 合肥 230026)

摘要 提出电堆积与等速电泳结合的毛细管电泳进样富集方法, 并对电堆积和等速电泳进样富集的最佳条件进行了研究。在 15 kV 电压, 电堆积进样 70 s 和等速电泳富集 40 s 条件下, 对两种结构相近的药物普萘洛尔和美托洛尔用毛细管区带电泳法进行了分离。pH 4.0, 30 mmol/L 醋酸钠-醋酸、30 mmol/L β -丙氨酸-醋酸和 1.5 mmol/L 醋酸钠-醋酸溶液分别作背景(或前导)、尾随和样品缓冲液。与常规电迁移进样方法比较, 信号增强因子约为 250 和 160, 总分析时间与常规法相近。

关键词 毛细管电泳法 电堆积 等速电泳 进样富集

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-8713(2001)02-0176-03

1 前言

目前, 毛细管电泳(CE)已成为分离带电物质的主要分析方法。由于其本身所具有的特点, 进样量一般在 nL 级, 因此浓度检出限较高, 使该方法的应用受到影响。为了改进 CE 的浓度检出限, Chien 等人^[1]采用电堆积进样, 其富集因子一般在 10 ~ 100^[2]。通常采用等速电泳富集时, 先将样品用压力流动方式注入毛细管。该法可增加样品注入量, 但等速电泳时间较长, 最长可达 2.5 h, 不利于方法的实际应用^[3,4]。本文在考察电堆积进样最佳条件的基础上, 将电堆积与瞬间等速电泳结合, 对两种结构相近的药物盐酸普萘洛尔(又称心得安, propranolol hydrochloride)和酒石酸美托洛尔(metoprolol tartrate)进行了分离, 研究了分离富集的条件及这种方法的可行性, 取得了令人满意的结果。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

1229 型高效毛细管电泳仪和 9423 型色谱积分仪(北京新技术应用研究所)。石英毛细管总长 56 cm, 有效长度 40 cm, 内径 75 μ m (河北永年光导纤维厂)。

β -丙氨酸为生化试剂(上海试剂三厂), 盐酸普萘洛尔(江苏武进制药厂), 酒石酸美托洛尔(阿斯特拉制药有限公司), 其他试剂均为分析纯。所用水为去离子水。样品用水溶解, 分别配成质量浓度为 1 g/L 和 2 g/L 的储备液, 避光冷藏。所有试剂和水溶液均用 0.2 μ m 滤膜过滤。

2.2 实验方法

以 30 mmol/L 醋酸钠(NaAc)溶液(用质量分数

为 36% 醋酸(HAc)调至 pH 4.0)为背景缓冲液(又是前导缓冲液)。以 30 mmol/L β -丙氨酸溶液(用质量分数为 36% HAc 调至 pH 4.0)为尾随缓冲液。样品介质为 pH 4.0, 1.5 mmol/L NaAc-HAc 缓冲液。阳极电堆积进样 70 s 后, 换上尾随缓冲液, 等速电泳富集 40 s, 然后再换成背景缓冲液进行毛细管区带电泳分离。各步骤工作电压均为 15 kV, 检测波长 214 nm。毛细管在使用前依次用水、0.1 mol/L NaOH、水、背景缓冲液进行压力冲洗(各 10 min)。两次分离之间用背景缓冲液冲洗 2 min。

3 结果和讨论

3.1 电堆积条件的选择

根据电堆积原理, 将样品溶解在较稀的背景缓冲液或水中, 用电迁移法进样, 样品与缓冲液界面两侧存在的场强差使样品堆积。两侧缓冲液的电导率的比值是影响电堆积效果的主要因素。本文首先作了背景缓冲液酸度(pH 3.5 ~ 5.4)和浓度(10 mmol/L ~ 40 mmol/L)对毛细管区带电泳分离的影响实验。结果表明, pH 对峰高无影响, 随着 pH 增大, 迁移时间缩短, 分离度先增后降。考虑缓冲液的有效缓冲范围和组分的分离度, 选用背景缓冲液的 pH 为 4.0。随醋酸缓冲液浓度的增大, 迁移时间延长, 分离效率有所下降。浓度为 30 mmol/L 时, 峰高最大, 故选择背景缓冲液浓度为 30 mmol/L。在此基础上进行电堆积实验, 选择不同浓度的背景缓冲液配制样品。随着配制样品的缓冲液浓度的降低, 峰高增大, 但重现性变差。综合考虑两种药品的峰高和重现性, 选择用稀释 20 倍的背景缓冲液配制样品。

收稿日期 2000-06-27

基金项目 国家自然科学基金资助项目(29975026)

作者简介 李 敏(1957-), 女, 理学学士, 副教授, 现工作单位 滁州师范专科学校化学系。

通讯联系人 何友昭, 电话:(0551)3607072, E-mail: yzhe@ustc.edu.cn

3.2 瞬间等速电泳体系

当背景电解质离子比被测离子的电泳淌度高时,可选择背景电解质离子作为前导离子。本文用 30 mmol/L NaAc-HAc 为前导缓冲液,钠离子起前导作用。尾随电解质的选择参考文献[5],用间接检测法,采用吡啶作为间接检测试剂,样品峰应出现在前导缓冲液和尾随缓冲液的负峰之间,故选择 β -丙氨酸为尾随电解质。通过尾随缓冲液浓度实验, β -丙氨酸浓度为 30 mmol/L 时,峰高和分离效率均佳。

3.3 电堆积时间的影响

在等速电泳条件不变的情况下,做电堆积时间对峰高和分离效率的影响实验,结果如图 1 所示。峰高随电堆积时间的增加而增大,70 s 后峰高基本不变,随电堆积时间延长,分离效率降低严重。这是

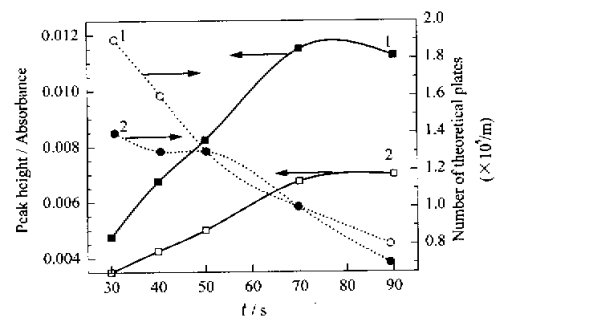


图 1 电堆积时间对峰高和分离效率的影响

Fig.1 Effect of electrostacking time on peak height and separation efficiency

Conditions :voltage, 15 kV ; isotachopheresis time, 30 s ; background and leading buffer solution, 30 mmol/L NaAc-HAc (pH 4.0) ; terminating buffer solution, 30 mmol/L β -alanine-HAc (pH 4.0).

1. 0.2 $\mu\text{g/L}$ propranolol hydrochloride ; 2. 0.8 $\mu\text{g/L}$ metoprolol tartrate.

因为电堆积时间过长,样品区带增长,引起区带展宽。由于用等速电泳压缩,峰高增加近 20 倍,分离效率明显提高。故以峰高为选择依据,选最佳电堆积时间为 70 s。

3.4 等速电泳时间的影响

在电堆积进样 70 s 后,改变等速电泳时间,考察其对峰信号的影响。实验发现,随等速电泳时间延长,峰高增加,峰变窄,出峰时间提前。等速电泳 50 s 时,峰高和分离效率均较高,但分离度较差(见图 2),故等速时间不宜超过 50 s,本文选定等速电泳时间为 40 s。

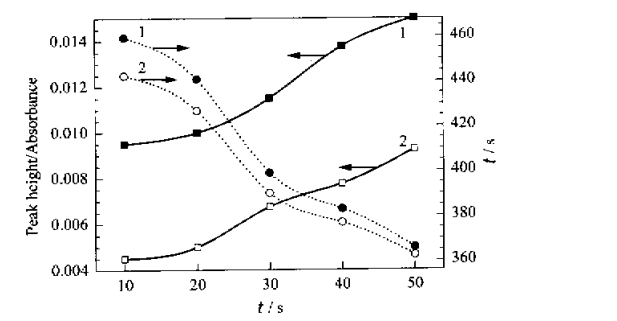


图 2 等速电泳时间对峰高和迁移时间的影响

Fig.2 Effect of isotachopheresis time on peak height and migration time

Conditions :electrostacking time, 70 s ; for other conditions see Fig.1.

1. 0.2 $\mu\text{g/L}$ propranolol hydrochloride ; 2. 0.8 $\mu\text{g/L}$ metoprolol tartrate.

3.5 样品的富集与分离

图 3 中,图 3-a 的样品是用背景缓冲液配制的,图 3-b,c 的样品是用稀释 20 倍的背景缓冲液配制的。对 0.2 $\mu\text{g/L}$ 盐酸普萘洛尔和 0.8 $\mu\text{g/L}$ 酒石酸

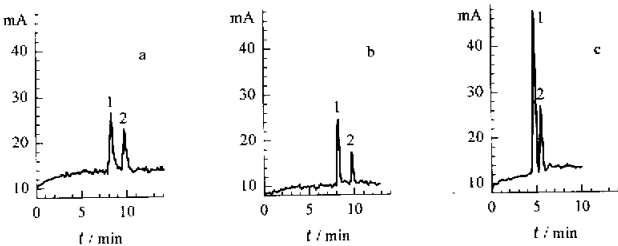


图 3 3 种进样方法的电泳分离谱图

Fig.3 Electropherograms for three injectoin methods

a. conventional electro-migration injection (conditions :voltage,15 kV ; injection time, 5 s) ; b. electrostacking injection (conditions :voltage, 15 kV ; injection time, 5 s) ; c. electrostacking and isotachopheresis injection (conditions :voltage,15 kV ; electrostacking time, 70 s ; isotachopheresis time, 40 s) ; for other conditions see Fig. 1.

Concentration of propranolol hydrochloride and metoprolol tartrate($\mu\text{g/L}$) : a. 25 and 100 ; b. 2.0 and 8.0 ; c. 0.2 and 0.8.

1. propranolol hydrochloride 2. metoprolol tartrate.

美托洛尔的混合溶液在上述选定的条件下进行富集分离,电泳谱图如图 3-c。与常规电迁移进样(图 3-a)及电堆积进样(图 3-b)比较,在保证分离度的情况下,当分离效率相近时,普萘洛尔和美托洛尔的富集倍数(用峰高计算)分别约为 250 和 160。为便于比较,在 15 kV, 5 s 条件下电迁移进样(图 3-a)。但此时的分离效率差于图 3-b 和图 3-c。而图 3-b 和图 3-c 进样量相近,可用于校正计算富集倍数。从图 3 可见,两种药物富集倍数的差异主要由电堆积进样时的歧视效应引起。普萘洛尔和美托洛尔的工作曲线回归方程分别为 $h = 0.0012 + 0.0510C$ 和 $h = 0.0012 + 0.00825C$ (其中: h 为峰高(mA), C 为质量浓度($\mu\text{g/L}$)), 相关系数分别为 0.9997 和 0.9984。普萘洛尔和美托洛尔迁移时间和峰高的相对标准偏差分别为 0.7%, 0.8% ($n = 3$) 和 3.2%, 4.3% ($n = 3$)。

4 结论

实验结果表明,本文采用的毛细管区带电泳的进样富集方法,不需增加设备,操作简单,分析时间短,富集效果好,是一种简便可行的方法。进一步优化电堆积和等速电泳体系,选择适当背景缓冲液和尾随缓冲液将可更好地提高样品的富集效果。

参考文献:

- [1] Chien R L, Burgi D S. Anal Chem, 1992, 64: 489-496
- [2] Veraart J R, Lingeman H, Brinkman U A T. J Chromatogr A, 1999, 856(1-2): 483-514
- [3] Mazereeuw M, Tjaden U R, van der Geef J. J Chromatogr A, 1994, 677: 151-157
- [4] Mazereeuw M, Tjaden U R, Reinhoud N J. J Chromatogr Sci, 1995, 33: 686-697
- [5] Reinhoud N J, Tjaden U R, van der Greef J. J Chromatogr, 1993, 653: 303-312

Study on Sampling Preconcentration Method Combining Electrostacking with Isotachophoresis in Capillary Electrophoresis

LI Min, HE You-zhao, GAN Wu-er, LIN Xiang-qin, YANG Li, QU Qi-shu

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: A sampling preconcentration method combining electrostacking with isotachophoresis is presented in this paper. The optimum conditions for electrostacking and isotachophoresis were investigated. With the preconcentration conditions of 70 s electrostacking and 40 s isotachophoresis, two medicines, propranolol and metoprolol, with similar structures were separated by capillary zone electrophoresis. The working voltage for all the steps was 15 kV. Being adjusted to pH 4.0, 30 mmol/L NaAc-HAc, 30 mmol/L β -alanine-HAc and 1.5 mmol/L NaAc-HAc were employed as the background, viz. leading, terminating and sample buffer solutions respectively. In comparing with the conventional electro-migration injection, the enhancement factors in peak height of the present method were about 250 and 160 for propranolol and metoprolol respectively. Total analysis time was similar to that of the conventional one.

Key words: electrostacking; isotachophoresis; capillary electrophoresis; sampling preconcentration