

高效毛细管电泳的扩散进样

陈 义 竺 安

(中国科学院化学研究所,北京,100080)

[摘要] 本文提出了用扩散作为高效毛细管电泳的进样方法,解释了此法的原理。用扁管区带电泳法研究了扩散进样对电泳效率的影响、歧视问题及其抗样品基质干扰的能力,并与常用的电迁移法和虹吸法进行了比较,指出了扩散进样的缺点。

高效毛细管电泳(HPCE)的效率与很多因素有关^[1],其中进样方法是最重要的因素之一,它决定初始区带的宽度和分布形式,进而影响效率及定性定量结果。目前已用的方法有:微量注射器、进样阀、电分流、电迁移(EM)和虹吸(Siph)等法^[2]。前三法有死体积和泄漏问题。注射器与进样阀只可用于内径100 μm 以上的毛细管,且电泳效率低。EM法与Siph法将样品直接引入毛细管,操作容易,是最常用的方法。但EM法,尤其是Siph法,抗样品基质干扰能力差,EM法还存在严重的样品歧视(见后文)。我们提出的扩散(Diff)进样法,在一定程度上克服了这些问题。本文报告Diff法的原理及用扁管区带电泳(FCZE)^[3]测到的结果。

方法原理

当将装好载体的毛细管插进样品杯时,因管口处存在浓度梯度,样品便扩散进入管中。可用Fick扩散定律描述这种过程:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (1)$$

C和D分别为样品的浓度和扩散系数; t_m 为进样时间;Z轴指向管的深处,原点在管口平面中心上。因HPCE所需的进样量很小,不影响样杯中的浓度 C_0 ,故有:

$$C = \begin{cases} C_0 & Z < 0 \\ 0 & Z \geq 0 \end{cases} \quad (2)$$

此即自由扩散条件。若不计D与C的关系,方程(1)的解为^[4]:

$$C(Z, t_m) = C_0 \int_{Z/\sqrt{2Dt_m}}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-t^2/2} dt = C_0 \Phi\left(\frac{Z}{\sqrt{2Dt_m}}\right) \quad (3)$$

$\Phi(Z/\sqrt{2Dt_m})$ 为正态分布函数。由此可知扩散初始区带具有图1所示的分布形式。其平均浓度为:

$$\bar{C} = \frac{1}{Z \rightarrow \infty} \int_0^{\infty} C dz$$

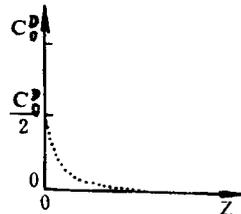


图1 Diff法的初始区带分布

为确定 $Z \rightarrow \infty$,我们略去 $C/C_0 < 5 \times 10^{-6}$ 的部分,由正态分布表查得^[5]:

$$Z \rightarrow \infty / \sqrt{2Dt_m} = 3.895 \quad (4)$$

用梯形近似求和法,即:

$$\bar{C} = C_0 \left[(\Phi_0 + \Phi_n) / 2 + \sum_{i=1}^{n-1} \Phi_i \right] / n$$

其中 Φ 略写了变量,n为求和步数,令 $n=40$,有:

$$\bar{C} = 0.1025045 C_0 \quad (5)$$

对(3)求导可得初始区带的几率函数,进而求得标准方差为:

$$\sigma_b^2 = 2Dt_m \text{ 或 } \sigma_b = \sqrt{2Dt_m} \quad (6)$$

于是有绝对进样量公式

$$Q_b = \bar{C} S_{0 \rightarrow \infty} \approx 400 C_0 S \sqrt{2Dt_m} = 400 C_0 S \sigma_b \quad (7)$$

S为毛细管截面积, C_0 的单位取mol/L,其余用M.S.kg单位。

EM和Siph法的初始区带一般作均匀分布处理亦即^[2,7]:

$$\sigma_{ES}^2 = \Delta L^2 / 12 \text{ 或 } \sigma_{ES} = \Delta L / 2 \sqrt{3} \quad (8)$$

$$Q_{ES} = 10^3 C_0^* S V_{in} t_m = 10^3 C_0^* S \Delta L = 2 \sqrt{3} \times 10^3 C_0^* S \sigma_{ES} \quad (9)$$

其中上、下标ES表示EM和Siph; ΔL 为初始区带宽度; V_{in} 为进样速度,对于EM和Siph法分别为^[2]:

$$[V_{in}]_{EM} = (\mu_m + \mu_{oe}) E_m \quad (10)$$

$$[V_{in}]_{Siph} = K \Delta h \quad (11)$$

μ_m 为样品淌度, μ_{oe} 为电渗率, E_m 为进样电场强度; Δh 为液柱高度,K与毛细管的长度、截面积及管中

载体的粘度、密度有关,在选定系统下是一常数。

实验部分

(一)实验装置 实验装置如图 2 所示。其中扁管是自制的 FEP(聚乙烯丙烯氟化物)管^[6],规格为 0.2×0.65×600/800mm。直流高压电源为美国 Spellman 公司的 RHR40PN 型。检测器为瑞典 LKB 公司的 2238UVCORD S I 型。大孔圆管 7 用于 Siph 进样及开管电泳。

(二)洗涤 毛细管分别用 3ml 三蒸水及 1ml 载体由注射筒推洗,每次电泳后用 1ml 载体冲洗。每 5 次电泳后更换一次电极槽中载体。

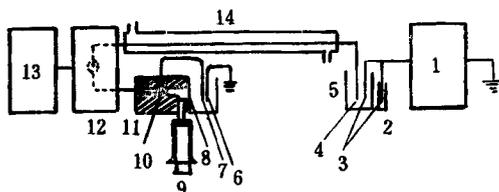


图 2 FCZE 装置示意图

1. 直流高压电源, 2. 样品杯, 3, 6. 铂丝电极, 4. 扁形管及进样口, 5. 高压电极槽, 7. 大孔圆管(1.0mm d.), 8. 半透膜, 9. 注射筒, 10. 三通阀, 11. 多通块与低压电极槽, 12. 检测器, 13. 记录仪, 14. 玻璃冷却套。

(三)进样 旋转阀门 10 连通管 7 与管 4, 调整样品杯高度使其液面与管下游液面严格水平, 将管 4 开口端插入样品杯中, 任其扩散即是 Diff 法; 如加电压则为 EM 法; 若将管 7 取出并降低管口高度便为 Siph 法。一定时间后复原系统, 移走样品杯便能加压电泳。

(四)试剂 MES(吗啡琳乙磺酸)及 MOPS(吗啡琳丙磺酸)为日本同仁化学研究所赠品, HPMC(羟丙基甲基纤维素, I 型)为美国 Sigma 公司产品, Tris 及其他试剂均为 A. R. 级, 成都化学试剂厂出品。所有载体均用三蒸水配制。

结果与讨论

(一)电泳效率 进样方法对电泳效率的影响主要取决于区带的初始方差 σ^2 和样品与载体的浓度比 φ 。 φ 值反映了进样方法的抗区带电场畸变^[6,8]能力, φ 值越小能力越强, 反之亦然。 σ 和 φ 均以近指

数衰减形式影响效率, 但它们的贡献不是并行的, 当 $\sigma\varphi < (\sigma\varphi)_{\max} \approx 2 \times 10^{-7} \text{m}$ 时, φ 的贡献可略, 反之, φ 的作用占主导地位^[6]。由(5)、(7)、(9), 在 $Q_D = Q_{ES}$ 时, 我们有:

$$\sigma_D / \sigma_{ES} = 5 \sqrt{3} C_D^{\text{ES}} / C_D^{\text{S}} \quad (12)$$

$$\bar{\varphi}_D \approx 0.1025 C_D^{\text{S}} / C_{\text{car}} \quad (13)$$

显然, Diff 的 σ_D 可能大于 EM 或 Siph 法, 但 $\bar{\varphi}_D$ 总小于后两法:

$$1. \text{ 当 } C_D^{\text{S}} = C_D^{\text{ES}} \text{ 时, } \sigma_D = 5 \sqrt{3} \sigma_{ES} > \sigma_{ES},$$

$$\bar{\varphi}_D \approx 0.1025 \varphi_{ES} < \varphi_{ES};$$

$$2. \text{ 当 } C_D^{\text{S}} = 5 \sqrt{3} C_D^{\text{ES}} \text{ 时, } \sigma_D = \sigma_{ES}, \bar{\varphi}_D \approx 0.88 \varphi_{ES} < \varphi_{ES}.$$

这说明 Diff 法有很强的抗区带电场畸变能力, 可望获得高效率。实验表明, 在第一种情况下, 若 $\sigma\varphi < (\sigma\varphi)_{\max}$, Diff 法的效率确实不如 EM 或 Siph 法, 但当 $\sigma\varphi > 10^{-6} \text{m}$ 后, Diff 法的效率即可高于 EM 或 Siph 法。

对于第 2 种情况, 测定表明, 只要 $C_D^{\text{S}} > 2.5 C_D^{\text{ES}}$ 就可使 Diff 的效率高于 EM 或 Siph 法。图 3 是在 $C_D^{\text{S}} = 2.80 C_D^{\text{ES}}$ 时测定的 FCZE 结果, Diff 法的效率比 EM 法高 1/2 倍以上。而比 Siph 法高 1 倍以上, $C_D^{\text{S}} / C_D^{\text{ES}}$ 的实测值小于理论值的原因在于: Siph 法和 EM 法的抗样品基质干扰能力差(见后文)。另外, 它们的区带经历了静止—运动(进样)—静止(停止进样)—运动(电泳)的不连续过程, 出现了惯性加宽作用, 使 σ_{ES} 大于理论值。而扩散过程总是存在的, 这种加宽效应很小。

(二)歧视现象与峰的重现性 所谓歧视现象是指混合物在进样时, 因各组分的进样速度不同而引起进样量不同的现象。从(10)式可知, EM 法存在严重的歧视现象。因为不同组分的 μ_m 差别非常大, 极限情况如正、负离子的差别。Siph 法的 V_m 与样品性质无关, 无歧视问题。根据(7)式, diff 也存在组分歧视, 但因 $Q_D \propto \sqrt{D}$, 缩小了组分间的差别, 并且扩散方向与组分的电荷性质无关, 所以歧视程度很小。由图 3 的相对峰高可见, Diff 与 Siph 法很接近, 而 EM 法则大不相同。EM 法这种严重的组分歧视, 容易造成峰的丢失或大滴度组分 φ 值过大, 从而大大降低电泳效率, 并导致保留时间 t_R 难以确定^[9], 即重现性变差。

(上接第 340 页)

研究, 发展毛细管电泳的毛细管柱、生物工程下游处理的径向柱以及新型细内径色谱柱成为讨论的焦点。讨论中, 突出了要加强柱的研制国产化。会议共评出了 15 篇优秀论文(请见《色谱》杂志第 9 卷, 第 4 期第 1~4 篇, 第 6 篇, 第 9~11 篇, 第 13 篇, 第 5 期第 2~6 篇, 最后一篇见八次色谱文集第 401 页)。

会议期间召开了色谱杂志编委会及色谱学会理事会。方树华同志被评为优秀编辑, 张玉奎同志被增补为色谱杂志副

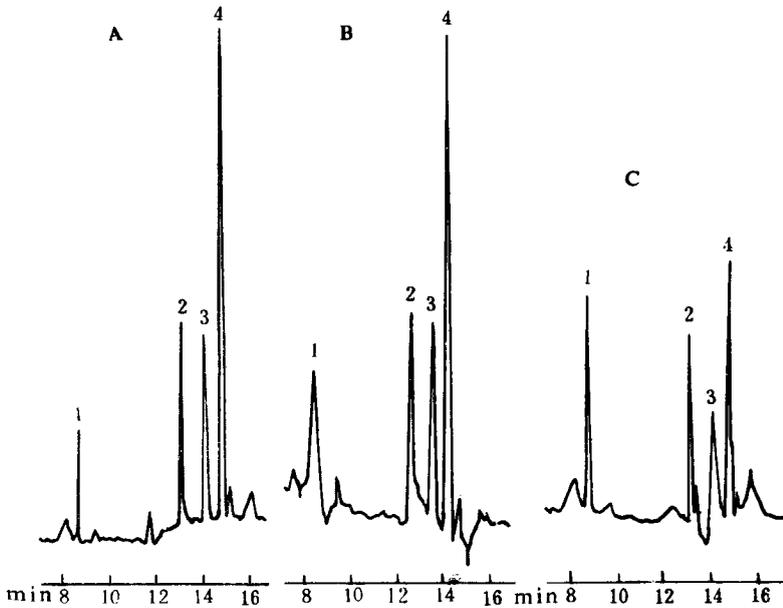


图3 Diff法(A)与Siph(B)及EM法(C)的FCZE结果比较

载体: 10mmol/L MES, 0.5mmol/L HCl, 0.2%(W/V)HPMC/Tris, pH6.80。条件: 19kV, 19°C, 206nm, Q 定值(峰2为准, $\sim 4.87 \times 10^{-13}$ mol)。

Q 值计算参数: Diff; $t_{in} = 15.5$ min, $C_0 = 8.4 \times 10^{-6}$ mol/L, $D = RT\mu_m / ZF = 6.72 \times 10^{-10}$ m²·s⁻¹; Siph; $t_m = 9$ s, $\Delta h = 3$ cm, $K = 4.63 \times 10^{-3}$ s⁻¹, $C_0 = 3 \times 10^{-6}$ mol/L; EM; $t_m = 37$ s, $E_m = 1250$ V·m⁻¹, $\mu_m = 2.67 \times 10^{-8}$ m²V⁻¹·s⁻¹, $C_0 = 3 \times 10^{-6}$ mol/L; 以上 C_0 均为峰2, 水配样。

N 值的计算: $N = 5.54(t_R / \Delta t_{1/2})^2$, t_R —保留时间, $\Delta t_{1/2}$ —半峰宽。峰: 1. 对苯二甲酸, 2. 对氨基苯磺酸, 3. 对硝基苯甲酸, 4. 对溴苯甲酸。

A—1. $N = 4.9 \times 10^5$ TP, 2. $N = 3.0 \times 10^5$ TP, 4. $N = 3.2 \times 10^5$ TP; B—1. $N = 5 \times 10^4$ TP, 2. $N = 1.3 \times 10^5$ TP, 4. $N = 1.9 \times 10^5$ TP; C—1. $N = 2.8 \times 10^5$ TP, 2. $N = 1.5 \times 10^5$ TP, 4. $N = 3 \times 10^5$ TP。

样品基质的组成及进入毛细管中的量是影响重现性的另一重要因素^[9]。使用 Diff 法时, 不管基质的组成如何, 只有存在浓差的组分才可进入管中, 且进入的量十分有限($\sim 10^{-10}$ mol), 因而 Diff 法有强的抗基质干扰能力。相反, Siph 法要把样品及其基质原样引入管中, 在有电渗流时, EM 法也会大量引入基质, 这就造成了区带与背景的严重差别, 干扰了分离过程。在载体浓度很低或进样体积较大时, 基质的干扰非常突出。

图4是在样品浓度较低、进样体积较大时的 FCZE 实验结果。显然, 样品基质除对 Diff 的峰高有一定影响外, 不改变峰的形状和 t_R , 而对 Siph 或 EM 法的峰高、峰形、 t_R 以及基线都有严重的影响。一般, 只有水配样品才能使 EM 法或 Siph 法得到较理想的结果。这是因为水配样获得的初始区带的电导小于背景载体, 电泳时承受了较高的电场强度, 使样品迅速离开初始环境进入高电导区。在进入高电导区时, 样品前沿因速度下降产生了类似于等速电泳的锐化

效应^[10]。不过, 即使在水配样品条件下, Diff 法因进样时间长、进样误差小亦更容易获得高重现性(见表1), 而 EM 法, 特别是 Siph 法的进样时间以秒计, 易产生大的进样误差。当然自动进样时能减少其误差。

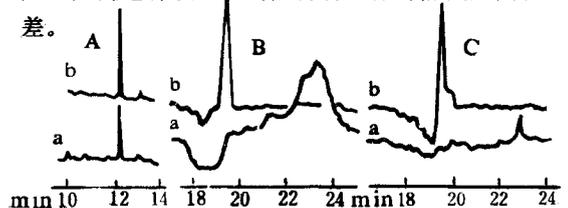


图4 Diff法(A)、Siph(B)、EM法(C)抗样品基质干扰能力的比较

载体—Diff: 10mmol/L MES, 0.3mmol/L KCl, 0.2%HPMC/Tris, pH7.20; Siph、EM: 10mmol/L KH₂PO₄, 0.2%HPMC/Tris, pH5.30。条件—15kV, 19°C, 206nm。样品与基质—样品为对氨基苯磺酸 $C_0 = 10^{-6}$ mol/L; 基质: a. 3mmol/L KH₂PO₄, 3mmol/L MES, 1mmol/L MOPS/Tris, pH6.00, b. 三蒸水; pH5.70。进样—Diff; $t_m = 35$ min; EM; $t_m = 30$ s, $E_m = 6250$ V·m⁻¹; Siph; $t_m = 10$ s, $\Delta h = 14$ cm。

表 1 Diff 法与 EM、Siph 之 FCZE 重现性比较 *

指标	Diff			EM			Siph		
	h_p (mm)	S_p (mm ²)	t_R (min)	h_p (mm)	S_p (mm ²)	t_R (min)	h_p (mm)	S_p (mm ²)	t_R (min)
平均值	19.1	6.73	8.26	37.0	14.8	8.29	23.0	17.3	8.18
变异系数(%)	0.94	1.12	0.44	4.05	2.31	1.51	4.51	3.12	2.18

* 实验条件见图 3;样品为三蒸水饱和的对苯二甲酸,测定 8 次; h_p —峰高, S_p —峰面积。

(一) 定量效果 用对氨基苯磺酸水溶液进行 FCZE 测定表明,Diff 法的外标校正曲线和线性范围比 EM 法大约 1 个数量级,与 Siph 法相近,且截距趋近原点。EM 法和 Siph 法的截距偏离原点较远,原因还不清楚。在线性范围内,Diff 法关于 C_0-S_p 和 C_0-h_p 的线性相关系数分别是 0.9999 和 0.9998;EM 法分别为 0.9985 和 0.9920;Siph 法分别为 0.9980 和 0.9915。Diff 法明显优于其他两法,特别是 Diff 法的 C_0-h_p 的良好线性关系,给定量工作带来很大的方便。定量曲线的详细情况见图 5。

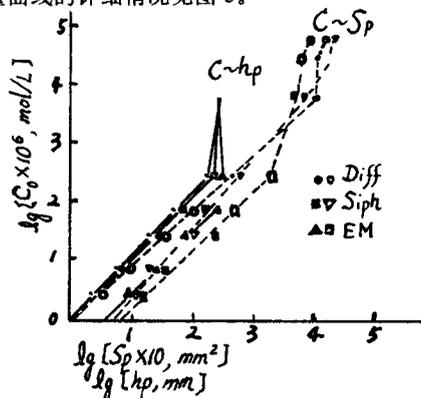


图 5 Diff 法和 Siph、EM 法的外标校正曲线

载体: 10mm MES, 0.4mmol/L HCl, 0.2%HPMC/Tris, pH 7.00。条件: 17kV, 19°C, 206nm。进样—Diff: t_{in} = 25min; Siph: t_{in} = 8s, Δh = 2.5cm; EM: t_{in} = 30s, E_{in} = 1250 V · m⁻¹。样品: 对氨基苯磺酸水溶液。

(四) 注意事项 使用 Diff 法时要严格使样品液面与下游液面水平并且需要比 EM、Siph 法长 2 倍的间歇时间^[11], 以保证管中没有任何液体流动。这种限制, 加上较长的进样时间, 使 Diff 法的分析速度大大降低, 这是一大缺点。

结论

尽管 Diff 法影响分析速度, 但它具有强的抗样品基质干扰和抗区带电场畸变能力、较好的定量特性, 是值得推荐的方法。另外它和 EM 法一样可以用于毛细管凝胶电泳及电色谱^[12]的进样, 而 Siph 法则只能用于有流动性的载体条件。

参考文献

[1] 陈义、竺安, 色谱, 8, 154(1990).
 [2] D. J. Rose et al., Anal. Chem., 60, 642(1988).

[3] 陈义、竺安, 第七届全国色谱学术报告会文集, 613 页, 北京, 1989.
 [4] 北京大学化学系讲义, 《分散体系物化》, 17 页, 1986 年秋.
 [5] G. A. Cohen et al., 《数学手册》(周民强等译), 工人出版社, 北京, 1987.
 [6] 陈义, 中国科学院化学研究所博士论文, 1990.
 [7] X. Huang et al., J. Chromatogr., 480, 95(1989).
 [8] F. E. P. Mikkers et al., J. Chromatogr., 169, 18-11 (1979).
 [9] R. Stevenson, American Lab., Aug., 40 (1990).
 [10] 竺安、陈义, 《电泳》, 何忠效等编, 科学出版社, 北京, 179 页, 1990.
 [11] 陈义、竺安, 生物化学与生物物理进展, 17, 390 (1990).
 [12] J. H. Knox et al., J. Liq. Chromatogr., 12, 2435(1989).
 (收稿日期: 1990 年 11 月 24 日)

Sample Introduction with Diffusion Method in High Performance Electrophoresis (HPCE) Chen Yi and Zhu An, Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing, 100080

Diffusion method was suggested as a sample introduction means in HPCE. The principle of the introduction and the initial distribution of the zone are described, and the quantity of sample introduced, the average concentration in the initial zone and its standard deviation are given. It was found that the sample matrix effects and the zone deformation from the background could be suppressed much greatly when sample was introduced by diffusion rather than by electromigration and/or siphonage in the flat capillary zone electrophoresis (FCZE). With this method, the efficiency the reproducibility of FCZE were improved, and excellent linear calibration plots of concentration vs. peak area were obtained with relative linear coefficients of 0.9999 for sulfanilic acid, etc. However, diffusion caused slightly ununiform loading for the ununiform diffusion coefficients of method. Diffusion method decreases the analysis speed because of its long introduction time.