

等速电泳-高效液相色谱联用分离复杂样品的研究*

阮源萍 刘文远 胡荣宗 穆纪千 洪少群 张长弓**

(厦门大学化学系 国家教委分析科学开放实验室 厦门 361005)

提 要 将 OCEP-1 型等速电泳仪和 Waters 高效液相色谱仪主要部件联用, 配以自制的接口, 建立高效液相色谱-等速电泳新联用系统, 成功地研究了含蛋白质和一些金属离子的复杂样品的分离分析。

关键词 等速电泳, 高效液相色谱法, 联用方法

分类号 O658

1 前言

等速电泳 (ITP) 具有区带界面的“自校正”效应、浓度的“自浓集”效应和易于定量等特点, 因此已广泛应用于生化、食品、药物、环境、临床等样品的分离分析^[1-4]。ITP 是近年发展速度较快的分离分析方法之一。高效液相色谱法 (HPLC) 也是迅速发展的分离分析方法之一, 已广泛用于工农业生产和科学技术领域^[5-7]。ITP 与 HPLC 联用可分离分析成分很复杂的样品, 例如生命物质等。Hendriks^[8]和 Debets 等^[9]将 ITP 作为一种预处理技术与 HPLC 联用, 进行了 ITP-HPLC 定性分离。本文研究了 HPLC-ITP 联用技术。利用 HPLC 分离复杂样品中的蛋白质, 把 HPLC 在实验条件下不能分离的一些金属离子通过方便的接口引入 ITP 分离系统进行分离分析。结果表明, 我们设计的接口灵活方便, 进样量准确, 分离分析方法可行, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器

OCEP-1 型离子分析仪^[4,10], 即开放式毛细管等速电泳仪, 在田昭武教授指导下研制; HPLC 仪由 Waters M510 泵、Waters U6K 进样器、 μ -Bondapak C₁₈ 反相色谱柱 (4 mm × 200 mm, 10 μ m, 12.5 nm)、Waters 486 紫外-可见分光光度检测器和国产 SSC-992 数据系统组成, 必要时再配用部分国产部件; 自制的联用接口为 IH I-1 型, 易于拆卸连接, 接口由两边的固定部分和中间的转子组成, 改变转子的位置可构成不同系统、不同通道; 微量注射器, 超声波除气装置, HM-20E 型 pH 计。

2.2 试剂

试剂未注明纯度者为 AR 级, 配制试剂的水为重蒸去离子水。前导电解质为 2.5 mmol/L HCl, 配入 30 mmol/L 18-冠醚-6; 尾随电解质为三羟甲基胺基甲烷 (Tris), 5 mmol/L Tris⁺ Cl⁻, 调 pH 6.0;

HCl 溶液用等温扩散法提纯, 用标准 KOH 溶液标定 (得浓度为 3.305 mol/L); 阳离子标准混合液: 用干燥的 NH₄Cl, NaCl, CaCl₂, KCl 配成含 2.00 mmol/L NH₄⁺, Na⁺, K⁺ 和 1.00 mmol/L Ca²⁺ 的标准混合液; 核糖核酸酶 A (RNase A), 生化试剂, 中科院上海生化所东风生化技术公司产品; 溶菌酶 (Lys), 生化试剂, 上海丽珠东方生化技术公司产品; 牛血清蛋白 (BSA), 生化试剂, 中国医学科学院血液研究所产品; (鸡) 白蛋白 (OVA), 上海丽珠东方生化技术公司产品。各蛋白质溶液均在 4 °C 冰箱中保存。HPLC 流动相 A: V (体积分数为 5% 的异丙醇) · V (丁醇) = 2 · 1, 并加入 2.2 mmol/L 的 HCl (pH 2.63); 流动相 B: V (体积分数为 50% 的异丙醇) · V (丁醇) = 2 · 1。

2.3 实验方法

ITP 实验方法 用蒸馏水清洗分离系统, 用前导溶液和尾随溶液清洗相应的电极槽、贮液槽和分离管, 并在两电极槽、贮液槽中分别加入前导电解质和尾随电解质溶液, 排除系统内气泡。打开电源开关, 预热, 清洗分离管。将分离管接通, 先关前导电解质溶液贮液槽出口, 后关尾随电解质溶液贮液槽出口, 使连接液为尾随电解质溶液。加高压, 记录电泳图。在得到正常电泳图后, 清洗分离管, 用进样片进样, 加高压, 调工作电流为 40 μ A 和走纸速度, 记录电泳图。

HPLC 实验方法 HPLC 仪配用 C₁₈ 柱, 进样。先以主泵泵入流动相 A, 然后控制副泵中流动相 B 在 17.5 min 内由 0 变至 70% 进行低压梯度淋洗, 流速为 1.0 mL/min, 在 225 nm 处检测, 绘制色谱图 (室温)。

联机接口操作 将接口代替进样片装入 ITP 分离系统中, 连接 HPLC 的溶液淋出口, 将接口的转子定位于 ITP 清洗和从 HPLC 仪取样状态。清洗

* 国家自然科学基金资助项目

** 抗癌研究中心

本文收稿日期: 1997-10-18, 修回日期: 1997-12-08

分离管,并对 HPLC 仪淋出液取样.转动转子,使 ITP 处于检测状态,并使从 HPLC 仪取来的淋出液与 ITP 分离管内的溶液连接.加高压,调节工作电流和走纸速度,记录电泳图.

3 结果与讨论

3.1 蛋白质对一些阳离子 ITP 分离的干扰

按实验方法以 80.0 μmol/L 阳离子标准混合液进样 20 μL,绘制 ITP 分离图见图 1-a.另以 0.02 g/L 核糖核酸酶 A 和 80.0 μmol/L 阳离子标准混合液的混合物同样进样,绘制 ITP 电泳分离图见图 1-b.由图 1 可见 RNase A 干扰了 NH₄⁺ 的测定.另一些实验显示另 3 个蛋白质的阶高 H_s 相近,也会干扰 NH₄⁺ 的测定.因此,对含有蛋白质和上述阳离子的复杂混合物样品不能用 ITP 直接分离分析,而需先用 HPLC 分离蛋白质,再用 ITP 分离分析阳离子的 HPLC-ITP 的联用技术.

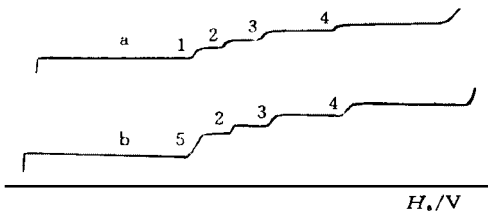


图 1 蛋白质对阳离子分离的干扰

Fig. 1 Interference by protein in the separation of cations

a. 阳离子分离; b. RNase A 和阳离子的分离.

a. separation of cations,

b. separation of RNase and cations.

1. NH₄⁺, 2. Ca²⁺, 3. Na⁺, 4. K⁺, 5. NH₄⁺ + RNase A.

3.2 ITP 分离的精密度

按 ITP 实验方法分离各金属离子,分离良好.以阶长 L_s 对浓度(0~ 80.0 μmol/L)作工作曲线,线性良好且都通过原点,可用于定量分析.由平行实验测得 ITP 分离的精密度数据列于表 1 中.

表 1 ITP 分离的精密度

Table 1 Precision of ITP separation

离子 Ion	阶长 L _s (mm)					平均 mean	SD (mm)	CV (%)
	1	2	3	4	5			
NH ₄ ⁺	9.46	9.02	8.84	9.30	9.34	9.19	0.25	2.7
Ca ²⁺	2.82	2.66	2.74	2.68	2.86	2.75	0.09	3.3
Na ⁺	9.98	9.86	10.28	10.44	10.32	10.18	0.24	2.4
K ⁺	8.56	8.60	9.42	9.80	9.52	9.18	0.57	6.2

3.3 HPLC 流动相 pH 值的选择

在酸度计指示下调节 HPLC 流动相(含金属离子的)的 pH 值为 2.50, 2.63, 2.32, 进样 20 μL, 绘制

ITP 分离图.由分离图看出, pH 值大于 2.60 较好,但从 HPLC 分离蛋白质考虑, pH 值小一点好,所以本文选用 pH 值为 2.63. pH 值太小时,酸度偏大,妨碍 18-冠-6 的络合作用,不利于金属离子的分离.

3.4 接口进样体积的测定

我们设计了一个准确测定接口进样体积的简易方法,即用一个高位瓶(内装 3.305 mol/L 盐酸标准溶液)流出管代替 HPLC 流出管连接于接口,按实验方法转动转子取样,检测.在检测位置上用蒸馏水将 HCl 淋出,流入锥形瓶中,加 1 滴甲基橙指示剂,用 10.0 mmol/L KOH 标准溶液滴定,重复 7 次(分别用 KOH 溶液 2.60, 2.65, 2.63, 2.65, 2.60, 2.65, 2.60 mL),测得接口进样体积 7.96 μL,进样精密度好.

3.5 用接口进行 HPLC-ITP 联机实验

用自制的接口代替 OCEP-1 型毛细管等速电泳仪的开放式进样装置^[10],使接口置于两段 ITP 分离毛细管的中间并连接好.接口的另一通道与 HPLC 仪的淋出液连接,进行联机实验.以 V(0.1 mmol/L 阳离子标准混合液)·V(OVA)·V(BSA)·V(Lys) = 4:2:2:1 的混合溶液进样 50 μL,按实验方法进行 HPLC 分离,得到的蛋白质谱图如图 2 所示.由图 2 可见蛋白质分离良好.

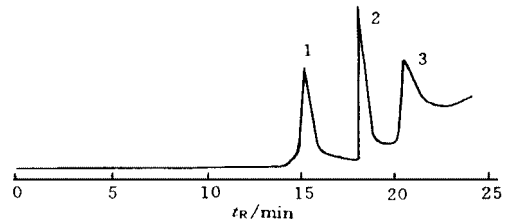


图 2 联用实验在 HPLC 上得到的蛋白质分离图

Fig. 2 Chromatogram of proteins from HPLC in combination experiment

1. Lys, 2. BSA, 3. OVA.

在实验条件下,金属离子在 C₁₈ 柱上保留微弱,先行淋出.按 2.3 节通过控制时间转动接口的转子对 HPLC 淋出液取样的同时对 ITP 进样,绘制 ITP 分离图如图 3 所示.由图可见金属阳离子分离良好.

综上所述,利用 ITP 与 HPLC 各自的优点,按照不同的分离原理,联合对含蛋白质和金属离子的复杂样品进行分离分析是可行的.在 ITP 从 HPLC 取样的同时,可对 ITP 分离管进行清洗.在向 ITP 进样时,接口通道与两头的分离管衔接,构成 ITP 分离毛细管进行 ITP 分离检测.在 ITP 检测阳离子的同时,HPLC 继续运行不受阻碍,接口的另一通道

供 HPLC 流出液排入废液瓶, 操作简便, 联用自如。

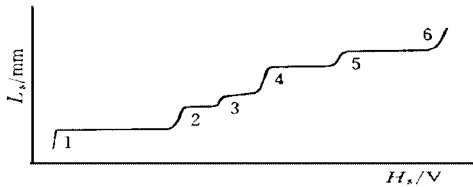


图3 联用实验阳离子 ITP 分离图

Fig. 3 ITP electropherogram of cations in combination experiment

1. H^+ , 2. NH_4^+ , 3. Ca^{2+} , 4. Na^+ , 5. K^+ , 6. $Tris^+$.

致谢 本研究工作得到田昭武教授的指导, 谨致衷心的感谢。

参 考 文 献

- 埃弗雷特斯 F M, 贝克斯 J L, 维尔海琴 Th P E M 等著, 陶宗晋, 方继康译. 等速电泳——理论、仪器和应用. 北京: 科学出版社, 1984
- 刘文远, 郑金键, 胡荣宗等. 等速电泳法分离检测碱金

属、碱土金属及铵离子. 第六届全国电化学会议论文集. 天津, 1991. D07

- 刘文远, 郑金键, 胡荣宗等. 色谱, 1994, 12(4): 241~244
- 穆纪千, 卓向东, 田昭武. 厦门大学学报(自然科学版), 1991, 30(6): 573~575
- 波多野博行监修. 见: 液体クロマトグラフィ—研究会データ集积委员会编. 高速液体クロマトグラフィ—データ集. 东京: アイビシー株式会社, 1983, 22集, 4069~4258
- 刘文远, 黄建化. 色谱, 1986, 4(4): 206~209
- 刘文远, 卓琪, 蓝元英等. 分析化学, 1992, 20: 638~642
- Hendriks P J M, Claessens H A, Noij T H M et al. Chrom atographia, 1992, 33(11-12): 539-545
- Debets A J J, Arabi H E, Hupe K P et al. Analyst, 1992, 117: 1355-1359
- 杨书农, 胡荣宗, 田昭武. 分析测试通报, 1992, 11(1): 31~33

Study on the Combination of Isotachopheresis and High Performance Liquid Chromatography for the Separation of Complex Samples

Ruan Yuanping, Liu Wenyuan, Hu Rongzong, Mu Jiqian,

Hong Shaoqun and Zhang Changgong

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

Abstract A method on the combination of isotachopheresis (ITP) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the separation and analysis of the complex samples containing proteins and metals is proposed. The instrumental system consisted of a self-made Model OCEP-1 isotachopheresis analyser, main parts of Waters high performance liquid chromatograph and a self-made Model IH-I-1 interface. The interface is simple and convenient to use. The injection volume of the interface was determined accurately with a neutralization titration method. In ITP experiment the leading electrolyte was 2.5 mmol/L HCl containing 30 mmol/L of 18-crown-6; the terminating electrolyte was 5 mmol/L $Tris^+Cl^-$ (pH 6.0); ITP current, 40 μA ; detection of metal ions, potential gradient detector. In HPLC experiment the column was a μ -Bondapak C_{18} , reversed-phase column, 4 mm \times 200 mm, 10 μm , 12.5 nm; the mobile phase A, $V(\text{isopropanol with 5\% volume fraction}) \cdot V(\text{butanol}) = 2:1$ containing 2.2 mmol/L HCl (pH 2.63); the mobile phase B, $V(\text{isopropanol with 50\% volume fraction}) \cdot V(\text{butanol}) = 2:1$; low pressure gradient elution, mobile phase B changed from 0 to 70% in 17.5 minutes; flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength 225 nm; temperature, 25 $^{\circ}C$. The experimental results showed that proteins were interfered in the determination of the metals with ITP method. It also showed that HPLC with the use of C_{18} column can separate the proteins but not the metal ions. By using this new combination system, a complex sample of the proteins and metal ions was injected to the HPLC, the proteins Lys, BSA and OVA were well separated in HPLC, while NH_4^+ , K^+ , Na^+ , and Ca^{2+} were less retained and eluted first. Then the latter was introduced into the system of the ITP with the aid of the interface for separation. Satisfactory results were obtained.

Key words isotachopheresis, high performance liquid chromatography, combination method