毛细管电色谱梯度洗脱

施 维 邹汉法 张丽华 张玉奎
(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 毛细管电色谱是近年来发展迅速的一种微柱色谱电分离模式. 这种模式中,流动相依靠电渗流来推动,因此与液相色谱相比电色谱分离可以达到更高柱效,分析速度也大为提高. 复杂样品的分离需要发展相应的梯度电色谱洗脱模式. 文中提出一种简单易行的滴加法梯度洗脱方法,在自制电色谱柱上成功分离了9种醛酮样品和15种取代苯样品. 梯度洗脱与等度洗脱的比较、梯度洗脱的重现性得到了考察.

关键词 **毛细管电色谱 梯度洗脱 醛酮样品**

毛细管电色谱(CEC)是集高效液相色谱和毛细管电泳两者优势为一体的一种新型电分离模式[1, 2],近年来,国际上毛细管电色谱的研究发展迅速[3]. 它不仅具有高效、高选择性、快速分离的优点,而且所耗费流动相极少,代表着分离技术发展的一种新动向. 在毛细管中填充反相液相色谱填料,利用电渗流来推动流动相的流动,这种模式可称为毛细管反相电色谱,用来分离的复杂的样品往往具有很宽的保留因子范围,用等度方式洗脱时,高有机溶剂浓度的分离效果不好,在低有机溶剂浓度时,分析时间太长. 这些缺点要靠梯度冲洗来解决. Behnke 和 Bayer 用压力泵实现了电色谱的梯度冲洗[4],而 Yan 等人用两台高压电源来混合不同浓度流动相,实现梯度冲洗[5]. 在毛细管区带电泳和胶束电动色谱中,Sustacek 等人[6]和 Balchunas[7]等人用滴加法进行梯度洗脱,曾得到满意的结果. 本文提出用滴加法进行毛细管电色谱梯度洗脱,在国际上尚未见报道,并在自行研制的电色谱柱上分离醛酮样品和取代苯等,在极短的时间内得到了很好的分离.

1 实验

(1) 仪器与材料. 用 30 kV 高压电源(北京,中国科学院科学仪器厂)、紫外检测器(BIOTRONIK)、记录仪等组装成毛细管电色谱仪,电色谱柱温为室温. 弹性石英毛细管尺寸:75、100 μm 内径和 365 μm 外径(河北永年光导纤维厂).

(2) 试剂. TRIS、取代苯均为分析纯,乙腈为色谱纯. 醛酮样品经过 2,4-二硝基苯肼(DNPH)衍生. 下文所指醛酮样品均为衍生物. 用硫脲(分析纯)标定死时间.

2 结果与讨论

2.1 毛细管电色谱柱的制备

75 μm 非耦联型电色谱柱制备方法同前文所述[2, 8]1),用匀浆填充法向 75 μm 或 100 μm 内径毛细管中填充 3 μm ODS 固定相,然后在柱中央做封口,再在封口后烧检测窗口.

2.2 有机溶剂浓度对保留行为的影响

大气污染物中的醛酮化合物,因其对人体有很大的危害,已越来越引起人们的重视[9]. 图 1 表示乙腈百分浓度 C 对醛酮样品在毛细管电色谱中的容量因子 k' 的影响,可以用下式表示:

1) 张丽华,邹汉法,张玉奎,等. 高效毛细管电色谱的研究. 第十一次全国色谱报告会,1997年8月,大连

$$\ln k' = a + cC, \qquad (1)$$

式中 a, c 为常数. 此式与反相高效液相色谱(RP_HPLC)中的保留值变化规律关系式相似[10, 11]. 图 1 表明溶质毛细管电色谱中的保留值随流动相中乙腈浓度的升高而迅速下降.

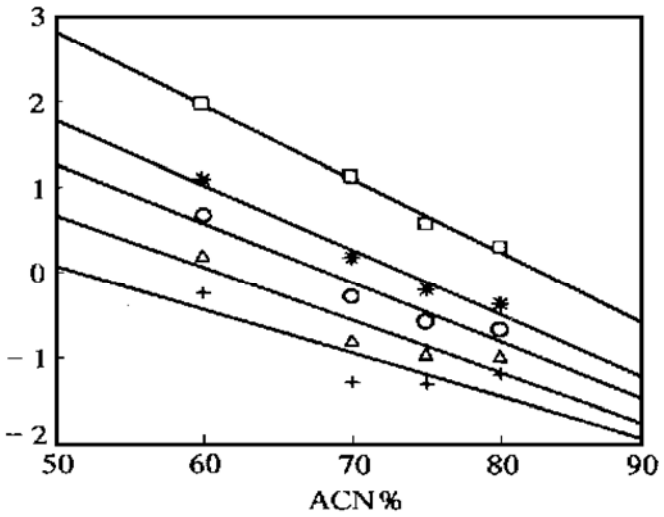


图 1　$\ln k'$_乙腈浓度关系图

填充柱长: 26 cm, 电压 20 kV;
□, ＊, ○, △, ＋ 分别为乙醛, 丙醛, 丁醛, 戊醛, 庚醛

类似于 HPLC, 在高乙腈浓度流动相条件下, 可以实现电色谱快速分离, 图 2 显示了 9 种醛酮样品在 400 s 内的分离谱图, 其中第 4 号峰柱效为 16.9 万理论板/米. 但在高乙腈浓度下分离度有所损失, 例如, 在 90%(图 2)和 80%(图 3)乙腈浓度下, 丙酮和丙醛不能达到完全分离. 根据式(1), 我们就可以通过调节流动相中乙腈浓度来调节样品在电色谱柱中的保留时间, 实现梯度洗脱.

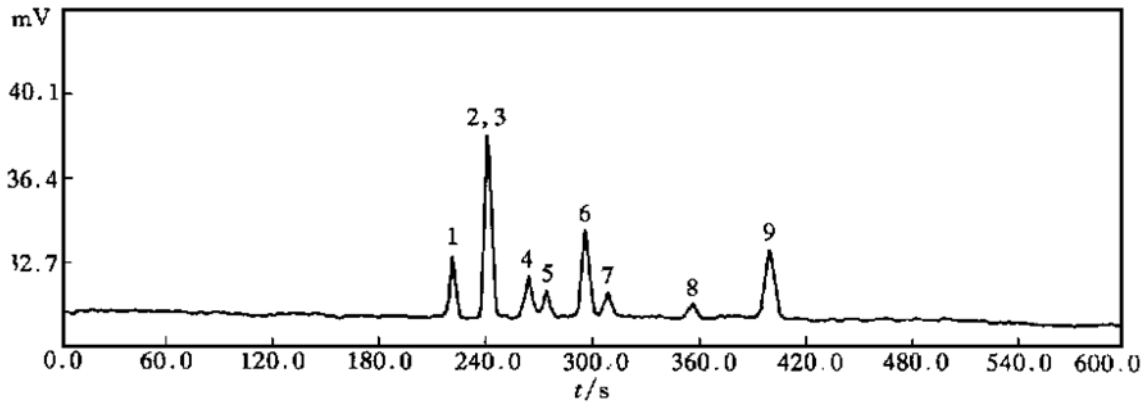


图 2　90% 乙腈浓度下醛酮分离谱图

填充柱长/总长: 15.8/43.5 cm, 内径/外径: 75/365 μm, UV 波长: 360 nm, 电压: 20 kV, 电流: < 1 μA, 4 mmol/L TRIS_乙腈流动相, 进样: 10 kV × 3 s, 样品名称见表 1

2.3　梯度方式的实现

在进样端缓冲液瓶下放置电磁搅拌器, 边搅拌, 边加入不同浓度的缓冲液, 在保持离子强度不变的情况下, 改变流动相组成. 这时 pH 值改变也很小[7], 可以近似认为不变.

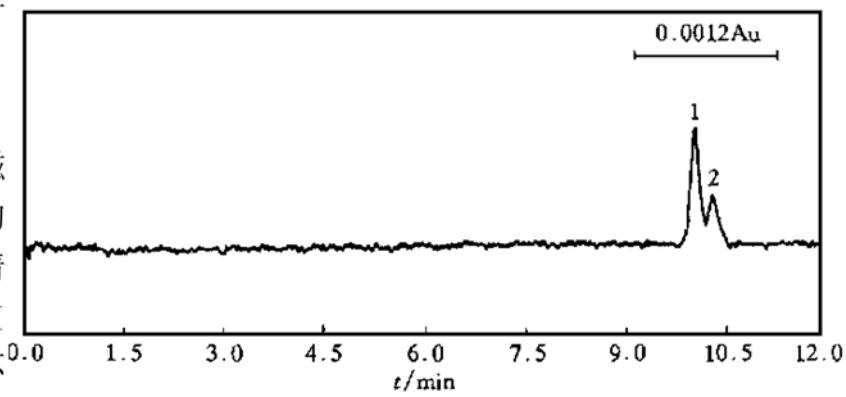


图 3　80% 乙腈浓度下醛酮分离谱图

填充柱长: 26 cm; 进样: 10 kV × 2 s; 1. 丙酮, 2. 丙醛. 其他条件同图 2

图 4 显示了梯度方式和等度方式醛酮样品分离情况比较. 梯度方式在 22 min 内对 9 种醛酮样品进行了完全分离, 分析时间比 60% 乙腈时大大缩短. 在梯度洗

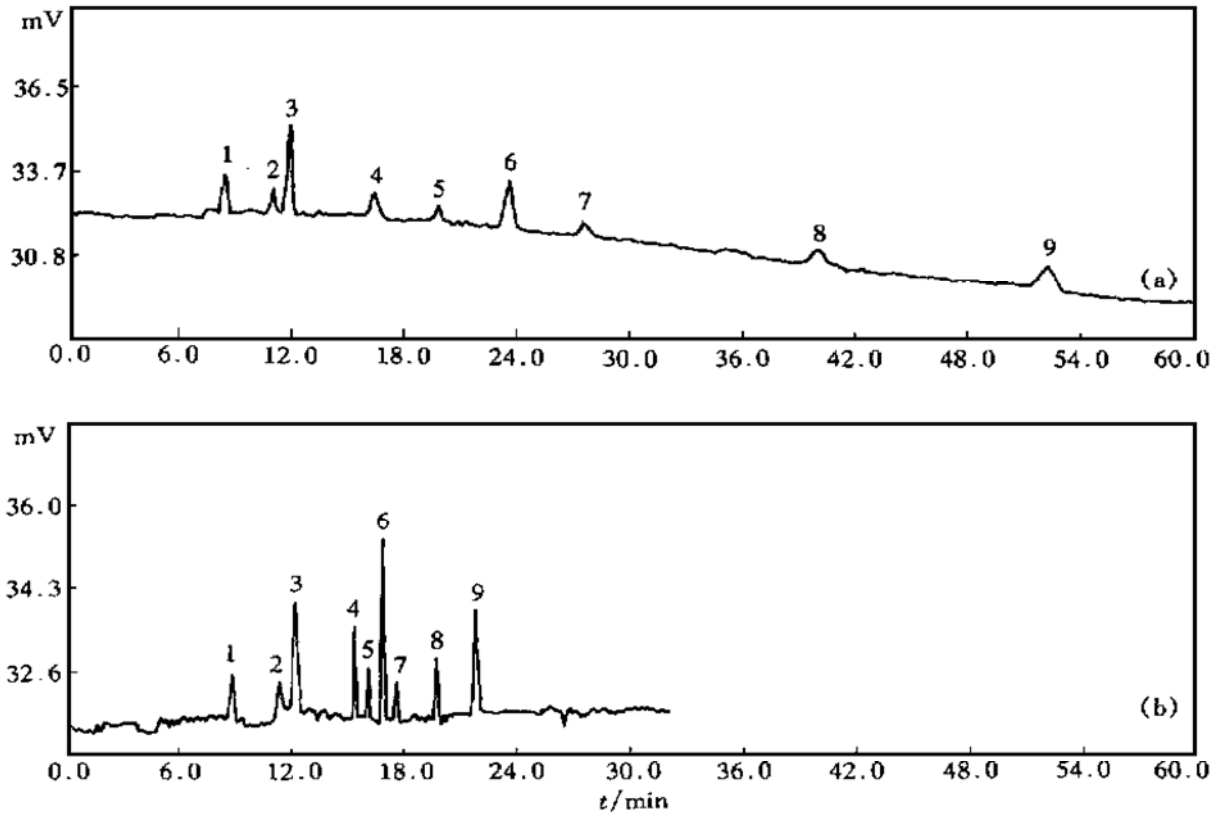


图 4 等度和梯度方式下醛酮样品分离谱图

(a) 60% 乙腈等度洗脱; (b) 梯度洗脱: 0~ 12.83 min, 60% 乙腈, 12.38 min 以后: 80% 乙腈. 其他条件同图 2

脱过程中, 后面的峰非常尖锐. 表 1 为梯度方式下样品保留时间的相对标准偏差数据. 图 5 为等度和梯度方式分离 15 种取代苯等样品的谱图, 其中等度方式第 13 峰柱效为 17.1 万理论板/米.

表 1 梯度 CEC 保留时间重复性[a)]

No.	样品名	平均保留时间/min	相对标准偏差/%	No.	样品名	平均保留时间/min	相对标准偏差/%
1	乙醛	8.04	7.56	6	邻-甲基苯甲醛	16.36	2.22
2	丙酮	10.40	6.85	7	戊醛	16.96	2.49
3	丙醛	11.18	6.82	8	2,5-二甲基苯甲醛	18.95	3.23
4	苯甲醛	14.85	3.30	9	庚醛	20.87	3.74
5	丁醛	15.61	2.03				

a) 表中醛酮均为 DNPH 衍生物, 实验条件同图 3

从上述可见, 本文提出的毛细管电色谱梯度分离模式具有高效快速、结果可靠、极易实现的特点, 并且还可用于 pH 梯度、离子强度梯度等其他梯度操作. 此种梯度方式正好能满足复杂的环境样品分析的要求. 线性梯度洗脱正在研究中.

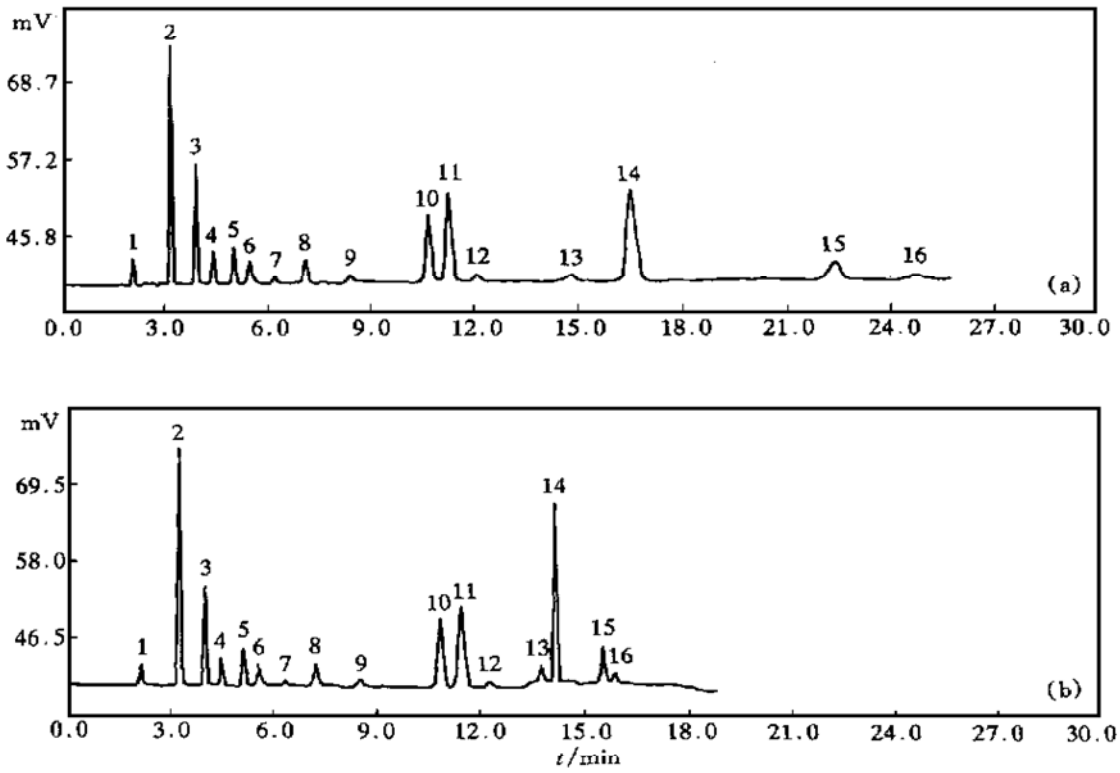


图5 梯度方式分离取代苯

(a) 60% 乙腈等度洗脱; (b) 梯度洗脱: 0~ 12.25 min: 60% 乙腈, 12.25 min 以后: 80% 乙腈. UV 波长: 200 nm, 进样: 5 kV × 5 s, 样品: 1 示硫脲, 2 示苯酚, 3 示苯甲醇, 4 示 2, 3-二甲基苯酚, 5 示硝基苯, 6 示 2, 4-二硝基甲基苯, 7 示苯, 8 示苯甲酸乙酯, 9 示甲苯, 10 示萘, 11 示乙苯, 12 示对二氯苯, 13 示 1, 2, 3-三甲基苯, 14 示正丙苯, 15 示 1, 2, 4, 5-四甲基苯, 16 示正丁苯. 其他条件同图 2

致谢 本工作为中国科学院院长基金和辽宁省自然科学基金会人才基金(批准号: 963006) 资助项目.

参 考 文 献

1 Jorgenson J W, Lukacs K D. High_resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. J Chromatogr, 1981, 218: 209~ 213
2 施 维, 邹汉法, 张玉奎, 等. 高效细内径毛细管电色谱填充柱的制备. 色谱, 1996, 14: 351~ 353
3 施 维, 邹汉法, 张玉奎, 等. 毛细管电色谱柱性能理论与应用. 色谱, 1997, 15: 388~ 391
4 Behnke B, Bayer E. Pressurized gradient electro_high_performance liquid chromatography. J Chromatogr (A), 1994, 680: 93~ 97
5 Yan C, Dadoo R, Zare R N, et al. Gradient elution in capillary electrochromatography. Anal Chem, 1996, 68: 2 726~ 2 730
6 Sustacek V, Foret F, Bocek P. Simple method for generation of a dynamic pH gradient in capillary zone electrophoresis. J Chromatogr, 1989, 480: 271~ 276
7 Balchunas A T, Sepaniak M J. Gradient elution for micellar electrokinetic capillary chromatography. Anal Chem, 1988, 60: 617~ 621
8 施 维, 邹汉法, 张玉奎, 等. 毛细管电色谱柱重复性考察及实验条件的选择. 色谱, 1997, 15: 201~ 203
9 李瑞江, 邹汉法, 张玉奎. 醛酮化合物的液相色谱保留行为的考察及其多元分离条件的优化. 色谱, 1996, 14: 335~ 339

10 Snyder L R, Dolan J W, Gont J R. Measurement & use of retention data from high_performance gradient elution, contributions from "Non_Ideal" gradient equipment. J Chromatogr, 1984, 285: 1~18

11 Zou Hanfa, Zhang Yukui, Lu Peichang. Quantitative correlation of the parameters logkw' and_s in the retention equation in reversed_phase high_performance liquid chromatographic & solvatochromic parameters. J Chromatogr, 1991, 522: 49~53

(1997-01-16收稿, 1997-10-26收修改稿)

镧离子对 tRNA^{Phe}结构的影响: 亚胺质子 NMR 谱

涂华民 吴亦洁④ 杨燕生* 龚孟濂 张洪杰④

(中山大学化学系, 广州 510275; ④中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022. * 联系人)

摘要 采用^{1}H NMR方法研究了镧离子对酵母tRNA^{Phe}分子结构和构象变化的影响. 结果表明位于扩大二氢尿嘧啶螺旋(D-螺旋)的端梢三级碱基对(G_15)(C_48)明显受加入La^{3+}的影响, 向低场位移0.33; 与三级相互作用相关, 连接D-茎和接受茎起固定L结构转折的(U_8)(A_14)碱基对向高场位移0.20; 另一可能受La^{3+}影响的亚胺质子碱基对为(G_19)(C_56), 由于该碱基对位于高度叠加的12.6和12.2之间, 其归属仅供参考, 该碱基对有助于D-环对T ΨC环的连接.

关键词 **镧离子 转移核糖核酸 NMR**

转移核糖核酸(transfer ribonucleic acid, 简写为tRNA)分子在溶液中结构的确定是一个重要的问题, 因为这些分子在蛋白质生物合成中起着重要的作用且具有许多重要的细胞功能. 除了氢键相互作用, 多价离子在稳定tRNA二级和三级结构方面起着重要的作用. 镁(及一些多胺)常常是稳定天然tRNA结构的代表性多价离子. 已经采用^{25}Mg NMR[1]和^{1}H NMR[2]对镁结合在tRNA^{Phe}(酵母)上的热力学和机理进行了研究.

稀土(Rare Earth, 简写为RE)离子能够取代镁, 已利用稀土离子的荧光光谱性质研究了稀土离子与tRNA的结合部位及结合数等[3]. 研究RE(Ⅲ)对tRNA结构影响的难点在于RE(Ⅲ)像Pb^{2+}一样催化RNA在中性条件下的降解[4], 金属离子对RNA的降解并不仅仅局限于Pb^{2+}和RE(Ⅲ), 甚至Mg^{2+}也降解RNA, 不过该反应的速率比起Pb^{2+}或RE(Ⅲ)来要小得多而且这些金属对RNA的降解作用能够通过降低pH至6.0以下而抑制, 并对它们相互作用的部位无明显影响[5].

我们采用^{1}H NMR谱研究了镧离子对酵母tRNA^{Phe}结构的特殊影响, 由于tRNA低场^{1}H NMR谱包含对应于螺旋茎和三级碱基对氢键合的亚胺质子共振, 每个氢键合的亚胺质子给出一个分离的共振, 其化学位移主要受邻近碱基对环流作用的影响, 因此亚胺质子谱对邻近碱基对间的距离和取向敏感[6]. 我们希望通过稀土对tRNA结构和功能的影响研究, 从分子及亚细胞水平回答稀土对人体是有益还是有害这一普遍关注的问题.

1 材料和方法

酵母tRNA^{Phe}购自Sigma化学公司, 使用前没有进一步处理. 约10 mg酵母tRNA^{Phe}溶于