

多次电渗展开在平面电色谱中的应用探索

葛朝晖, 王东援*, 崔永泉, 姜 洋

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 : 尝试建立一种新的平面电色谱展开方式——多次电渗展开。其特征是 : 在第一次电渗展开结束后, 重新湿润薄层板的干燥部位, 再通电展开。这种操作可以重复多次直到斑点分离完全。反复探索发现 : 采用省略封尾步骤的反相 C-18 烧结板可以革除流动相中的缓冲盐, 使多次电渗展开成为可能。

关键词 : 平面电色谱(薄层电色谱); 反相烧结板; 多次电渗展开

中图分类号 : O658 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8713(2009)01-0120-04 栏目类别 : 技术与应用

An attempt of multiple-electro-development on planar electrochromatography

GE Zhaohui, WANG Dongyuan*, CUI Yongquan, JIANG Yang

(College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : A new thin layer plate, the RP-C18 sintered plate, is described. The electroosmotic flow can be produced without any buffer salts by the carefully controlled bonding degree. It is very convenient and saves a lot of time. Some new development modes and skills can be derived. Based on the firmness of the new plate the operator can brush the mobile phase on the plate directly, which is very simple and fast for wetting the plate and saves much reagent. If the plate becomes dry during the process of planar electrochromatography, the operator can re-wet the plate on the local and then develop it again. Such operation can be repeated many times until the spots are separated completely, so it is called multiple-electro-development. The buffer salt in the mobile phase is abolished, which makes the process of multiple-electro-development possible. As the bonding degree descends, the effect of the plate is not as good as before, but the total separation efficiency and the potential increase due to the multiple-electro-development.

Key words : planar electrochromatography (PEC); RP-C18 sintered plate; multiple-electro-development

平面(薄层)电色谱(planar electrochromatography, PEC)技术是一种将电场加到薄层板两端, 利用电渗作用驱动流动相的分离技术。1974年, Pretorius等^[1]首次提出用电渗作用在柱色谱和薄层色谱中驱动流动相, 并率先实现了平面电色谱, 但自 Pretorius等首次报道了采用 PEC 将 4 种甾体化合物的混合物在 4 min 内分离(采用传统薄层色谱需要 60 min)的结果后, 有关平面电色谱的工作 20 年后才再次出现^[2]。在随后不多的报道中, 除了少数报道中薄层板采用普通硅胶板外, 大多采用反相键合板, 其中最具有代表性的工作当推 Nourk 及其合

作者^[3]。平面电色谱的最新展开方式是加压平面电色谱(PPEC)^[4-7], 系用高压将薄层板夹在两块导热好的绝缘材料(氮化铝陶瓷)中间实施电渗展开, 可以获得更快的展开速度; 可惜所用装置皆较复杂, 没有工厂的帮助普通实验室很难实现。

目前, 在 PEC 的研究领域存在 3 个难题: (1) 由于焦耳热的存在, 使得 PEC 的分离水平目前只与普通薄层色谱相当或略好。(2) 电渗展开的速度虽然比普通薄层色谱快十几倍, 但辅助的准备工作似乎还不具备实用水平。(3) 电渗流高速移动且其流速与板长无关这一特性应是进行长距离电渗展开的

* 通讯联系人: 王东援, 教授. Tel: (024)23986288, E-mail: wdy1xsy@hotmail.com.

收稿日期: 2008-08-24

基础,但实际情况是电渗展开速度虽快,但展开距离反而较短。这是因为焦耳热的存在与展速快这两项因素综合作用使得板面局部变干出现断带而使展开过程提前终止。

本实验室通过采用自制的可以反复使用并且能快速湿润的反相烧结板做薄层板^[8,9]开展了 PEC 的应用研究。利用该反相烧结板的特性可以完成一些独特的技术设计:例如 PEC 的多次电渗展开,从而解决展距短的难题。然而,即使在反相烧结板上实施多次电渗展开难度也极大。通常第一次展开时斑点移动明显;一旦重新湿润后再次展开,斑点就不再移动。原因在于反相烧结板(也包括商品薄层板)在电渗展开中对缓冲盐的浓度要求极其严格,残留在薄层板上的缓冲盐会对下一次的电渗展开产生极大的影响,造成电渗流骤减或消失,即使采用纯溶剂重新湿润也是如此。显而易见,解决这一难题的根本途径是彻底革除流动相中的缓冲盐。反复探索的结果使我们发现,只有通过薄层板的改造,才有可能实现这一目标。我们在文献[8]的基础上,将其自制的反相烧结板的“封尾”步骤省略,才获得了突破性的进展。为了区别起见,将这种烧结键合板称

为“免封板”,而将文献[8]中的反相键合板称为“封尾板”。

1 实验部分

1.1 试剂

苏丹Ⅲ、苏丹Ⅱ、对甲氧基偶氮苯、对氨基偶氮苯,北京化学试剂二厂生产;乙腈(分析纯)、甲醇(分析纯)、四氯化碳,天津市大茂化学试剂厂生产;羧甲基纤维素钠(CMC-Na),上海邦成化工有限公司生产;十八烷基三氯硅烷购自 Fluoro 化学有限公司(英国)。

1.2 普通烧结板的制备

将普通窗玻璃切割成 3 cm × 12 cm 长条形玻璃板后按文献[8]的方法烧结,烧结温度为 605 °C。以 0.1% CMC-Na 水溶液代替文献[8]中的蒸馏水制成匀浆。

1.3 展开装置的构造

采用实验室常用的普通近水平展开室(构造示意图见图 1),其中部件 9 是与薄层板等宽的滤纸条,一端用玻璃片压住,另一端紧裹脱脂棉;脱脂棉和滤纸事先用流动相浸湿。薄层板面朝上放置。

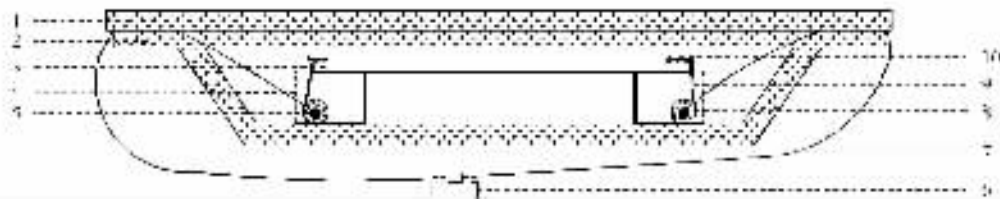


图 1 展开装置(剖视图,未严格依照比例)

Fig. 1 Development apparatus (cutaway view, not drawn to scale)

1. glass cover plate; 2. chamber; 3. RP-18 sintered plate; 4. plastic box; 5. electrode (graphite rod); 6. power supply; 7. lead; 8. a piece of cotton; 9. a strip of filter paper; 10. a piece of glass.

1.4 薄层电色谱展开的一般步骤

使用定量点样管将待分离样品点于薄层板的一端。除了斑点周围,用蘸有流动相的自制棉刷湿润薄层板,然后将板放于展开槽里,用湿润的滤纸将薄层板的两端与电极连接(在此过程中,样品斑点会由于周围流动相的扩散而自然湿润并被压缩成窄带),即可以通电展开。如果薄层板出现断带,则切断电源,将干燥部分用蘸有流动相的棉刷涂刷或轻蘸后可再次通电展开。达到满意的分离效果后,结束实验。用过的薄层板通常可浸泡在乙醇或其他适当的有机试剂中,超声清洗数次,干燥备用。

2 结果与讨论

2.1 烧结薄层板的键合研究

依照文献[8]的键合方法(除了键合时间及试

剂用量有变化外,其他条件无变化)研究键合条件对键合度的影响,进而再研究键合度对分离结果的影响。其中键合度的物理意义是每克烧结物质(硅胶与玻璃微粉的总重量)在键合反应后所增加的重量,我们尝试用它来对板的质量做一个定量描述。

实验表明,键合度既随键合试剂浓度的增加而增大(十八烷基三氯硅烷的浓度最高考察到约 0.051 mol/L,未见增长率有下降趋势),也随键合时间的增加而增大(键合时间最高考察到 9 h,未见增长率有下降趋势;其中升温时间约 5 h 未记入内)。

2.2 流动相组成与电渗电压对不同键合度免封板的直观影响

本实验考察不同浓度的乙腈-水和甲醇-水流动相系统,不加任何缓冲盐;电渗电压为 2 kV 到 8

kV。改变实验条件(不同键合度的免封板,在不同电压下使用不同流动相),免封板的表现可用 W、D、G 三种状态表示。

W(wet)表示湿润状态。这种情况下焦耳热较小,电渗流入大于出,电渗流涌入薄层板直至堆积的现象可用肉眼看到;若键合度较低,电压升至 8 kV 也是 W 状态。斑点在 W 状态虽然也能移动,但扩散严重,实践中不宜采用。

D(dry)表示干燥状态。这种情况下电渗流入不敷出,短时间内薄层板表面会出现一条很窄的断带。若键合度与流动相适宜,低电压情况下是 W 状态,高电压情况下是 D 状态;若键合度较高,D 状态会在较低电压下提前到来。在 W 与 D 范围内小心地调整电压,可进入 G 状态。

G(good)表示薄层板表面处于一种不干不湿的平衡状态。表面上看 G 状态非常适合于电渗展开,但 G 状态的寻找过程繁冗耗时,总用时远远超过多次电渗展开。

2.3 多次电渗展开的试验例证

将苏丹Ⅲ、苏丹Ⅱ、对氨基偶氮苯、对氨基偶氮苯等 4 种染料各配制成 0.400 g/L 的四氯化碳溶液,取等量混合备用。将上述混合样品 2 μ L 点在一块免封板上,流动相为乙腈-水(体积比为 95:5)溶液,在 8 kV 电压下以多次电渗展开方式分离。通电展开 1 min 后,板上部分薄层变干,展开停止,板上出现 3 个斑点。重新湿润薄层断带,继续通电展开,1 min 后,板上部分薄层再次变干,展开停止,可观察到已经有 4 个斑点出现。再次湿润薄层,继续通电展开,79 s 后薄层变干。由于板上已无进一步展开空间,故试验终止,结果见表 1 和图 2。

表 1 某典型薄层板用于多次电渗展开过程中的斑点位置* 示例
Table 1 Spot position* of a typical plate after multiple-electro-development

| Run No. | Time/s | Spot position* /cm | | | |
|---------|--------|--------------------|---------|---------|---------|
| | | A | B | C | D |
| 1 st | 60 | 0-0.9 | 0-0.9 | 1.3-1.7 | 2.0-2.6 |
| 2 nd | 60 | 0.2-0.8 | 1.0-1.6 | 2.9-3.4 | 4.2-4.6 |
| 3 rd | 79 | 0.6-1.2 | 1.4-2.2 | 4.1-4.8 | 6.1-6.9 |

* Spot position: from origin to back edge of the spot - from origin to front edge of the spot. A: Sudan Red III; B: Sudan Red II; C: 4-methoxyazobenzene; D: 4-aminoazobenzene.

2.4 讨论

2.4.1 相关实验技术

在所有有关烧结板的文献报道中,都是将玻璃粉和硅胶混悬在水中铺板;实践中发现这需要很高的技巧,操作不当会有分层现象产生,降低铺板的成功率。在替代研究中发现完全可以使用 CMC-Na

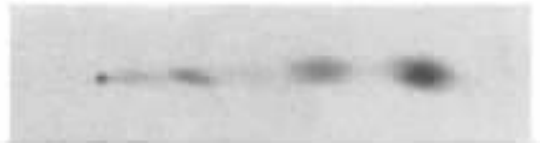


图 2 某典型薄层板用于多次电渗展开的最后结果
Fig. 2 Result of a typical plate after multiple-electro-development

水溶液代替蒸馏水制成匀浆铺板,由于在黏稠溶液中玻璃粉与硅胶不易分层,从而可降低对操作者的技术要求。实践证明,烧结过程中,有机物质的燃烧不会对烧结板造成不良影响。

文献[8]中自制的装置将薄层板面朝下放置,这样湿润速度虽快,但只是整体湿润,不利于多次电渗展开;且该装置湿润时需将整块板浸入流动相中,试剂耗费较多(至少需 50 mL)。本实验自制的装置适合于多次电渗展开;另外,节省流动相,通常只需 5 mL 溶液浸湿脱脂棉。

PEC 具有极高的电渗展开速度,但实际应用时电渗展开是否快速还要在计算时将相应的准备时间包括进去。在实验中,若将薄层板的一端插入流动相,则仅湿润过程所用时间就相当于上行展开,电渗展开再快也无实用意义;若将薄层板的大部分插入流动相(仅保留原点区域在外),则湿润速度虽快,但要浪费大量试剂,实用意义也大打折扣。本实验中采用的刷涂湿润方式是基于烧结板坚固的机械强度,速度快,也很均匀。该湿润方式已达到了实用水平,但普通商品板无法用此湿润方式。

2.4.2 无缓冲盐流动相的使用

在 PEC 的研究中,使用无缓冲盐的流动相不仅能为实验带来极大的便利,还可藉此实现多次电渗展开或其他新的展开方式,提高分离能力。

本工作最大的改进就是革除了流动相中的缓冲盐,关键举措是省略了反相板的封尾步骤。按照常规,烧结板省略了封尾步骤后,固定相表面会残留更多的硅醇基,在质子性溶剂中似乎更易生成电渗流;但实际情况是免封板在纯乙腈溶液中电渗流相对更大,加了水之后电渗流反而减小;含水量越高,电渗流越小;改用甲醇溶液也是如此。

革除缓冲盐的另一个好处是流动相的电导减小,这大大降低了焦耳热,从而可大幅度地提高电场强度并以最简单的 D 状态实现多次电渗展开。本实验的电场强度为 530 V/cm,远大于封尾板的 77 V/cm^[8]。对封尾板来说,制约电压提高的因素是焦耳热,提高电压会导致展距骤减,得不偿失;对免封板来说,制约因素不是焦耳热,而是烧结板表面可能

出现的放电现象。在常规的 PEC 中出现 W 状态与 G 状态是不可思议的事,因为流动相中有缓冲盐,焦耳热极大,薄层板无一例外都趋向于变干^[8],除非电压低到使斑点不再移动。本文所报道的 G 状态是不可能长时间稳定存在的,随着时间的无限延长,G 状态终归要慢慢地转变为 D 状态或 W 状态,通常只要最前面的斑点走到了薄层板的前端时板面仍不干不湿,就可认定为呈现 G 状态。在本文实验条件下,由于斑点移动速度快,这一过程有时还不到 3 min。对于普通 PEC,操作者要在展开速度和分离效果之间权衡,并为此付出很多精力和实验成本。采用多次电渗展开则可简单地采用高电压以提高单次电渗展开的速度。由于使用本装置重新湿润的速度很快,故多次电渗展开的总时间并不长,3 次电渗展开总耗时还不足 5 min;这比封尾板在最佳条件下单次电渗展开所用的 7 min^[8]要短。然而多次电渗展开的优越性不仅于此,更主要的在于:多次电渗展开所采用的是一种简单且近乎通用的操作模式,在选择和优化实验条件方面可节约大量的劳动。

本实验中试用了乙腈-水和甲醇-水两种流动相体系,二者差别不大。这两种流动相中水的最高浓度只能用到 20%(体积分数),否则薄层板不能被湿润。其他种类的流动相体系在 PEC 中的表现有待考察,这也是今后的一个重要研究方向。不论采用何种流动相,不用缓冲盐是我们的既定方针。

从图 2 的结果看,免封板的板效并不高且低于封尾板的板效^[8],这主要是省略封尾步骤造成的。

但由于展开距离长,分析速度快,即使在板效不高的情况下分离结果也能接受。如何提高板效是下一步研究的重点方向。

3 结论

本文所介绍的实验工作表明,反相烧结薄层板用于 PEC 是可行的,其特殊性能可成就其特殊的使用方法与展开模式。在 PEC 中彻底革除流动相中的缓冲盐也是可能的,在此基础上可以采用多次电渗展开方式以延长展开距离,该探索结果有很强的实用价值。

参考文献:

- [1] Pretorius V, Hopkins B J, Schieke J D. *J Chromatogr*, 1974, 99 :23
- [2] Pukl M, Prosek M, Kaiser R E. *Chromatographia*, 1994, 38 :83
- [3] Nurok D, Koers J M, Carmichael M A. *J Chromatogr A*, 2003, 983 :247
- [4] Nurok D, Koers J M, Novotny A L, et al. *Anal Chem*, 2004, 76 :1690
- [5] Dzido T H, Mroz J, Jozwiak G W. *JPC-J Planar Chromat*, 2004, 17 :404
- [6] Novotny A L, Nurok D, Replogle R W, et al. *Anal Chem*, 2006, 78 :2823
- [7] Dzido T H, Plocharz P W, Slazak P. *Anal Chem*, 2006, 78 :4713
- [8] Wang J, Wang D Y, Zhang H X, et al. *JPC-J Planar Chromat*, 2006, 19 :313
- [9] Okumura T, Kadono T, Nakatani M. *J Chromatogr*, 1972, 74 :73