

影响毛细管电泳分析结果精密度的因素及其控制

张慧文,何丽明(广州市药品检验所,广州 510160)

摘要:毛细管电泳(CE)由于具有分离效率高、分析速度快、实验成本低、仪器操作简单、操作模式多等特点,在分析化学、生命科学和药学领域都有广泛的应用,特别是在药物分析和分离方面引起了人们的高度重视和极大的兴趣。但是,由于CE常规分析的精密度的往往不太好,难以普及应用于日常的药物分析中。鉴于CE分析结果的重复性依赖于许多因素,如能对这些因素进行优化和控制,CE也能得到比较理想的结果。笔者就影响CE分析结果精密度的因素进行了探讨,并提出了相应的控制措施。

关键词:毛细管电泳;精密度;定量分析

中图分类号:R917.105

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2007)07-0640-04

毛细管电泳具有高效、高选择性、消耗试剂少、运行成本低、易自动化等特点,已经成为高效液相色谱的重要补充。中国药典2005年版附录中已收录此法,但至今仍未收载用毛细管电泳分析检验的药物品种。这是因为CE分析结果的精密度往往不太理想,用于定性的迁移时间及定量的峰面积重复性较差,有时误差在5%以上^[1],大大限制了其在药品

质量控制中的广泛应用。为了提高CE的重复性,研究人员从仪器理论及操作上进行了大量的研究工作^[2-3],并取得了一定的成果。笔者结合在实际工作中的体会和经验,对影响毛细管电泳分析结果精密度的主要因素及其控制办法探讨如下。

1 毛细管柱温的影响

作者简介:张慧文,女,硕士,副主任药师

Tel: (020) 26282368 - 345

E-mail: zhwpxy@126.com

由于作用于毛细管两端的高电压会引起电解质本身自热,即焦耳热。焦耳热在通过管壁向周围环境散热的过程中,在毛细管内形成径向的温度梯度,管中心温度最高,由中心向管壁温度逐渐下降。它能改变缓冲液的黏度,影响电渗流的线速度,使峰展宽,分离效果变差,迁移时间精密度变坏。为了减少焦耳热,常需:(1)采用温度控制装置,尽快除去热量,使系统尽可能地保持恒温。毛细管的温控方式一般有气体、液体和固体控温三种^[4],其装置的复杂程度依次加大,但控温效果也依次提高,但对于 $5 \sim 7 \text{ W/m}$ 功率的条件而言,用气体进行控温也足够了。(2)采用较低的操作电压:可以使工作电流减小,生成热源减少,因而热效应引起的峰展宽减少,对提高分离效率有利。但是减少电压又会使分离效率下降,故一般控制在 $10 \sim 30 \text{ kV}$,恒压。(3)采用低淌度的物质组成缓冲体系:如 Tris[三(羟甲基)氨基甲烷]、硼酸盐、组氨酸等。因本身淌度小,在相同操作电压下其工作电流比同浓度的其他物质小,因而焦耳热小。(4)采用细内径的毛细管:一可减小电流,因此减少自热;二可增大散热面积(侧面积与截面积之比),因此能加快散热,大大降低管中心和管壁之间的温差,使焦耳热引起的峰展宽变小,但内径过细不利于对吸附的抑制,同时又会带来检测、进样的困难,且易造成柱的堵塞。目前常用的毛细管内径为 $25 \sim 75 \mu\text{m}$ 。

2 进样的影响

CE的进样方式有流体动力学进样和电迁移进样,前者是最常用的进样方法,它主要是压力进样,当用压力进样时,进样体积是样品缓冲液黏度、所用压力及进样时间的函数,进样量与淌度无关,所用压力的变化通过调整进样时间自动补偿。文献^[5]给出了三种进样时间进样重复性的比较,结果表明,进样 8 s 的重复性优于 2 s 及 25 s 。在进样时间太短时,常会使进样精密度变差,特别是在柱子较短、较粗,样品浓度高时更是如此。在进样时间长时,毛细作用引起的自发进样的差异对进样量的影响降低,但进样时间不宜太长,否则会增加样品塞的长度,使柱效和分离度降低。因此,只要检测器能够提供足够大的信号,进样区带宜越小越好。一般进样时间为 5 s 。当用电迁移进样时,通过改变进样电压和时间控制进样量,而且进样量还与淌度有关,因此在电迁移进样中,对被迁移的溶质有一种歧视效应,即对淌度较大的组分进样量会大一些,反之则要小一些,所以在对多组分样品组定量时,必须使所有样品溶液的离子浓度尽可能地保持一致。

3 操作电压的影响

柱长一定时,随着操作电压的增加,迁移时间缩短,在一定的范围内,柱效随电压增大而增高,但随着操作电压的不断升高,柱内的焦耳热增加,柱效反而下降,缓冲液的黏度减小,使操作电压和迁移时间的关系不呈线性,因此常需选择最佳电压。一般说来,偏离线性段的电压,不适宜作为理想的操作电压,因此时相应的电流偏大。最佳操作电压的设置

视系统和组分而异。

4 缓冲液的影响

4.1 缓冲液种类的影响

电泳过程在缓冲液中进行,缓冲液的选择直接影响粒子的迁移和最后的分离。缓冲液的选择通常须遵循下述要求:①在所选择的 pH 范围内有很好的缓冲容量;②在检测波长的吸收低;③自身的淌度低,即分子大而荷电小,以减少电流的产生;④为了达到有效的进样和合适的电泳淌度,缓冲液的 pH 值至少必须比被分析物质的等电点高或低 1 个 pH 单位。⑤只要条件允许就尽可能采用酸性缓冲液,因在低 pH 下,吸附和电渗流值都很小,毛细管涂层的寿命较长。常选择高浓度低电导的硼酸盐、磷酸盐、Tris 缓冲体系。

4.2 缓冲液 pH 的影响

带电粒子在电场作用下的定向迁移过程受缓冲液 pH 的影响较大。它表现在以下几方面:①影响溶质本身的电荷;对于两性电解质来说,在缓冲液的 pH 低于溶质的等电点时,溶质带正电,朝阴极迁移,和电渗同向,因此粒子迁移的总速度较电渗还快。若缓冲液的 pH 高于溶质的等电点时,情况则恰恰相反。②pH 的改变会引起电渗的变化;在高 pH 下,电渗很大,流出次序依次为阳离子、中性分子和阴离子。这时中性分子因为其净电荷数为零而无法分离。对于淌度的绝对值小于电渗淌度的阴离子,将朝阴极迁移,而其余的阴离子将无法流至阴极。③在碱性条件下,改变 pH 值可起到缓解管壁吸附的作用。即如果缓冲液的 pH 高于溶质的等电点时,溶质带负电,与管壁表面硅羟基产生库仑排斥作用,从而避免吸附。

4.3 缓冲液浓度的影响

它主要表现在以下几方面:①对分离度的影响:增加缓冲液浓度,使离子强度增加,因此明显改变缓冲液的容量,减少溶质和管壁间、被分离的粒子和粒子间的相互作用,从而改善分离。②对迁移时间的影响:在大多数情况下,随着缓冲液浓度的增加,电渗流速降低,溶质在毛细管内的迁移速率下降,因此迁移时间延长。③对柱效的影响:对于迁移时间较短的组分,其柱效随浓度的增加而明显增大,对于迁移时间较长的组分,两者则没有明显的相关性。

4.4 缓冲液重复运行的影响

缓冲液的损耗会导致淌度和电渗的变化,从而影响分离和溶质的迁移时间,宜经常更换缓冲液,其频率可根据实验确定。如每运行 $5 \sim 6$ 次,更换一次。

5 添加剂的影响

添加剂是毛细管电泳中的一个十分重要的控制因素,表面活性剂是毛细管电泳中使用最多的一种缓冲液添加剂,如十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基季胺溴(CTAB)、聚氧乙烯基山梨糖醇酐(TWEEN)等。它们可用作疏水溶质的助溶剂、离子对试剂或壁表面改性剂。有机溶剂也被广泛用作添加剂,如甲醇、乙腈、三氟乙酸酐(TFA)等。它们可改变

电渗流速度(通常是使之减少)以及改变选择性。在蛋白质分离时,还将一些盐(如磷酸盐、盐酸盐和硫酸盐)加到缓冲液中以影响蛋白质的构型从而影响分离。这是因为盐的存在会占据一定的管壁吸附点,破坏偶电层,减少蛋白质的吸附,影响电渗,但加盐会使焦耳热上升,也会增加紫外吸收本底,导致检测灵敏度降低,因此必须有所节制,或者采用低场强或细管径毛细管柱予以补偿。在分离手性化合物时,还要使用手性添加剂,如环糊精、冠醚、胆汁盐等,以改善其分离度。在分析体内药物时,还常加入一些线性亲水聚合物,如甲基纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVC)等,可减少电渗流及减少样品的吸附。

6 冲洗程序的影响

6.1 石英毛细管的清洗

毛细管首次使用或长时间不用后重新使用,应清洗毛细管内壁表面并用稀碱液活化,因为迁移时间的精密度与分析前或分析中毛细管内表面的预处理有关。一般使用浓度为 $0.1 \sim 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸、氢氧化钠溶液和高纯水按一定程序冲洗即可^[6],因为酸液中的 H^+ 对管壁上吸附的阳离子有很强的置换能力,碱液对去污及活化管壁作用显著。

6.2 石英毛细管的冲洗

石英毛细管内壁具有硅羟基,它是构成氢键吸附并使毛细管内电解质产生电渗流的重要原因。电泳分析过程中的管壁吸附现象通常不可避免并具有很大的随机性。当吸附发生时,被吸附的分子影响毛细管的表面性质,使电渗流改变,液流紊乱并影响到组分的峰形,出现谱带展宽、响应及分离度下降、迁移时间改变等现象。冲洗程序可以清除记忆效应,使管壁状态复原。具体的冲洗程序应根据实验情况灵活设计。Ehmann等^[7]系统地研究了不同冲洗技术在多种离子测定中对迁移时间和校正峰面积精密度的影响,结果表明,冲洗操作可稳定和改善迁移时间的重复性。通过选择合适的冲洗措施,毛细管内表面被恢复,吸附的溶质分子被消除,从而提高了迁移时间的重复性。采用 $0.1 \sim 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、甲醇、磷酸溶液或SDS溶液等冲洗毛细管,可以缩短迁移时间,提高峰面积的重复性^[8]。但在大多数分离系统中,除非吸附严重,一般只需用缓冲液冲洗毛细管 $3 \sim 5 \text{ min}$ 即可^[9]。

6.3 石英毛细管的保存

毛细管使用完毕后,应用水充分冲净,约 $5 \sim 10 \text{ min}$ 或至少柱体积5倍以上的水量,然后用高纯氮气吹干后保存,以防止出现水化凝胶层,使毛细管内壁表面状态发生变化。

7 信号处理的影响

对于响应大的组分,峰高受峰形影响大,峰面积定量的重复性优于峰高定量;对于低浓度的窄峰,峰高比峰面积受基线噪声影响小,峰高定量结果优于峰面积定量^[3]。采用相对淌度、相对迁移时间以及保留指数可有效提高毛细管电泳的重复性^[10-11]。采用峰面积与迁移时间之比的校正峰面积

代替峰高或峰面积定量也可以提高重复性^[3,12]。重复性与使用的信号处理软件也有关系^[12],不同软件的积分差异主要体现在对信噪比低、迁移时间跨度大的前沿峰、拖尾峰及当缓冲液浓度低时可观察到的三角峰等的处理上。积分型软件分段积分得到的峰面积精密度较好。确定合适的峰基线并合理判断峰的起点和终点对提高积分软件性能很重要。

8 其他

除了上述因素外,还需注意以下事项:①石英毛细管端口状况:毛细管端口应光滑平整,防止电场在入口处扭曲失真从而导致样品带展宽。端口处的聚酰亚胺层应该去除,因为聚酰亚胺会在有机溶剂中膨胀变松,并有可能堵塞进样口,去除毛细管端口聚酰亚胺层还可减少毛细管外侧的样品残留,避免引起基线漂移。采用毛细管专用切割器进行切割将明显改善端口质量。②毛细管一端插入样品溶液,宜立即开始进样操作,并在操作完成后迅速将其从样品槽移至运行缓冲液中,随即开始运行,否则将会产生毛细作用及虹吸现象,引起进样误差并使谱带展宽。③如果电极和毛细管接触,毛细作用可能使某些样品流进间隔,使定量精密度降低,区带展宽,甚至使峰裂分,另外样品储器和缓冲液储器液面的高度不平衡所产生的虹吸现象也会使精密度下降。④样品溶液中的溶剂必须与运行缓冲液互溶,且不会引起后者沉淀,另外前者的离子强度应低于后者的离子强度。⑤样品溶液和缓冲液都有一个蒸发问题,蒸发会使进样的准确度变低,特别是在大批量样品测定中,因此需合适的封闭装置以防止蒸发,通常采用带塞的样品槽和缓冲液槽,并采用冷却自动进样盘装置或引入一个装满水的开口槽,使整个进样盘保持恒定的高湿度。除了蒸发外,离子的电泳也会使缓冲液从一个槽流到另一个槽造成损失,在这个过程中,由于水不断电离,储器中缓冲液pH改变,采用较大体积缓冲液储器或频繁更换缓冲液也有利于解决这一问题^[9]。⑥最好选用内标法。合适的内标可降低进样体积不一致引入的误差,并大大改善定性、定量的精密度和准确度^[13-14]。但必须注意所加内标应与待测组分有相似的淌度,以避免运行中电渗流改变引起的效应。为了增加 S/N 值,减小积分错误,内标应用高浓度,此外,还需注意并非内标法就一定能够改善分析精密度,根据误差传递规律,不合适的内标引入的误差在某些情况下甚至使测定结果更糟^[9]。

9 结论

综上所述,毛细管电泳结果的重复性是受诸多因素影响的。优化操作条件并保持稳定是改善毛细管电泳结果重复性的关键。20多年来,研究人员们在这方面做了大量的研究工作,使得其分析结果的精密度大大提高,因此,就发展趋势来看,CE一定会在新药开发研究、药品质量控制方面得到广泛的应用,并成为药物分析的一种重要工具。

参考文献

[1] FERNANDEZ H, RUPEREZ FJ, BARBAS C. Capillary electrophoresis

- phoresis determination of loratadine and related impurities[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 31: 499-506.
- [2] WATZIG H, DETTE C. Precise quantitative capillary electrophoresis Methodological and instrumental aspects [J]. J Chromatogr, 1993, 636(1): 31-38.
- [3] KUNKEL A, DEGENHARDT M, SCHIRM B, *et al.* Performance of instruments and aspect of methodology and validation in quantitative capillary electrophoresis. An update [J]. J Chromatogr, 1997, 768(1): 17-27.
- [4] ZHU L, XU X, LIN B CH. Temperature effect and temperature gradient technology in capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of Chromatography (色谱), 1999, 17(1): 21-25.
- [5] MAYER B X. How to increase precision in capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 2001, 907: 21-37.
- [6] LIN M, FENG M, ZHANG ZHX, *et al.* Research on the separation behavior of acidic drugs in capillary electrophoresis with reversed direction of electroosmotic flow [J]. Chinese Journal of Chromatography (色谱), 1998, 16(5): 383-385.
- [7] EHMANN T, BACHMANN K, FABRY L, *et al.* Capillary preconditioning for analysis of anions using indirect UV detection in capillary zone electrophoresis systematic investigation of alkaline and acid pre-rinsing techniques by designed experiments [J]. J Chromatogr A, 1998, 816(2): 261-275.
- [8] LLOYD D K, WATZIG H J. Sodium dodecyl sulfate solution is an effective between-run rinse for capillary electrophoresis of samples in biological matrices[J]. J Chromatogr B, 1995, 663: 400-405.
- [9] CAHOURES X, MORIN P H, DREUX M. Quantitative determination of inorganic minor cations in sodium, calcium, magnesium matrix simulated samples by capillary electrophoresis[J]. J Chromatogr A, 1998, 810(1/2): 209-220.
- [10] YANG J, BOSE S, HAGE D S. Improved reproducibility in capillary electrophoresis through the use of mobility and migration time ratios [J]. J Chromatogr A, 1996, 735 (1/2): 209-220.
- [11] MUIJSELAAR P G. Retention indices in micellar electrokinetic chromatography [J]. J Chromatogr A, 1997, 780 (1/2): 117-127.
- [12] FALLER T, ENGELHARDT H. How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1999, 853(1/2): 83-94.
- [13] HAQUE A, STEWART J T. Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital and aspirin by free solution capillary electrophoresis [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1999, 22(8): 1193-1204.
- [14] COORS C, SCHULZ H G, STACHE F. Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of diltiazem and desacetyldiltiazem in plasma by capillary zone electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1995, 717 (1/2): 235-243.

收稿日期: 2006-03-21