

分析化学 新方法技术丛书

毛细管电色谱及其应用

邹汉法 刘 震 编著
叶明亮 张玉奎

CH



科学出版社

C65-7-7
Zf4a

“十五”国家重点图书出版规划项目

分析化学 新方法
新技术 丛书

毛细管电色谱及其应用

邹汉法 刘 震 编著
叶明亮 张玉奎

科 学 出 版 社

2 0 0 1

分析化学新方法新技术丛书

编 委 会

顾 问 周同惠 (中国科学院院士,中国医学科学院
药物研究所研究员,博士生导师)

汪尔康 (中国科学院院士,中国科学院长春
应用化学研究所研究员,博士生导师)

主 编 程介克 (武汉大学化学系教授,博士生导师)

副主编 陈洪渊 (南京大学化学系教授,博士生导师)

常文保 (北京大学化学系教授,博士生导师)

邹汉法 (中国科学院大连化学物理研究所研
究员,博士生导师)

前 言

21 世纪将是科学技术迅猛发展的新世纪,被称为“生物工程时代”和“高度信息化时代”。科学技术将成为经济和社会发展的首要动力。“人类有科技就有化学,化学始于分析化学”。

21 世纪分析化学将面临巨大的挑战和机遇。分析化学不断吸取化学、生物、物理和数学等传统学科的最新成就,新兴的纳米技术中微电子学、显微光学及微工程学等微加工技术,正在对分析化学带来巨大的冲击。

21 世纪分析化学将处于广泛的、深刻的、激烈的巨大变革时期,不断向微型化(纳米芯片、生物芯片及芯片上实验室)、仿生化(电子鼻和电子舌等传感器)、自动化(原位及体内实时在线监测)、信息化(临床、环境及生产过程监测的网络化)的方向发展。现代分析化学已成为科学技术和经济发展的重要基础,也是衡量一个国家科学技术发展水平的主要标志之一。

1979 年以来,为了适应我国生产、教学和科学研究的需要,科学出版社已陆续出版了一套比较系统、完整的《分析化学丛书》,深受广大读者喜爱和好评,有力地推动了我国分析化学的发展。

十多年来,科学技术日新月异,分析化学新方法和新技术不断推陈出新,分析化学整个面貌已发生了巨大的变化。为了更好地适应我国生产、教学和科学研究工作的

需要,及时总结国内外的最新成就和研究成果,科学出版社计划组织出版一套《分析化学新方法新技术丛书》.为此,专门成立了编委会,确定了撰写这套丛书的方针和任务;推荐高等院校和科学研究单位的分析化学专家分头撰写,由科学出版社陆续出版.

本丛书突出一个“新”字,旨在反映新方法、新技术、新进展、新应用,鼓励学科之间交叉及渗透,不拘一格,充分体现 21 世纪分析化学的先进性、前沿性、创见性和代表性.力求选题新颖,立论严谨;论据充足,结构合理;兼收并蓄,着意创新;深入浅出,文字通顺;科学性和实用性并重.使生产、教学和科研战线上的广大读者,都能获得新理论、新知识和新技能,对工作有所帮助,以推动我国分析化学的新发展.

由于编者水平所限,经验不足,本丛书各分册中难免有缺点和错误,诚恳欢迎读者批评指正,以使这一套丛书越出越好.

《分析化学新方法新技术丛书》
编委会

序 言

高效液相色谱法在近 20 多年来取得了巨大的进展,并在许多领域中发挥了很大的作用,但由于液体流动相高黏度而限制了更长色谱柱的使用.常规的液相色谱柱长度在 20cm 左右,其柱效为 1 万理论塔板数左右.如何提高分离柱效解决复杂样品的分离分析问题一直成为液相色谱研究的基本课题之一.

20 世纪 80 年代初期,人们试图采用毛细管液相色谱柱来解决这一难题,虽然毛细管液相色谱能大大提高分离柱效,但由于固定相制备、样品柱容量和进样过程的复杂性及相对较低的检测灵敏度等因素的限制,毛细管液相色谱柱在实际工作中没有获得广泛的应用.

近年来,一种新兴的微柱分离分析技术正在获得广泛的关注,并成为液相色谱研究的热点之一.这一新兴的技术就是毛细管电色谱法.毛细管电色谱是在毛细管中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相,依靠电渗流(EOF)推动流动相,使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率不同而达到分离分析的一种电分离模式.毛细管电色谱相对于常规的液相色谱而言,至少存在以下几方面的优点:(1)采用电渗流驱动流动相,不存在液相色谱法中压力差问题,因此可以使用更小粒度的固定相,更长的色谱柱进行分离分析,从而大大提高分离柱效.另一方面,由于电渗流驱动的塞状流型消除了压力驱动的液相色谱中抛物线流型的径向扩散对柱效的影响,即使采用相同粒度的色谱固定相,毛细管电色谱的柱效也比常规高效液相色谱柱效高 1 至 2 倍以上.(2)毛细管电色谱是微柱分离分析技术,很容易实现与其他分析技术,如质谱、红外光谱和核磁共振的联用.采用电动或压力进样,更适合于微量样品的分

离分析。(3)由于电泳和分配机理的同时作用,非常适合于离子性和中性化合物的分离分析。(4)毛细管电色谱可以采用已有的各种液相色谱固定相,从而大大提高了各种样品的分离选择性。

作者所在的实验室从 1995 年以来开展毛细管电色谱的研究工作,是国内率先从事该领域研究工作的实验室之一。通过 5 年多的艰苦努力和辛勤工作,我们独立掌握了毛细管电色谱的装柱方法,发展出毛细管电色谱的溶剂滴加和溶剂切换台阶梯度洗脱技术;研究了短柱毛细管电色谱快速分离样品的可行性,在 15s 以内分离了 8 种芳香烃化合物,柱效达到 20 万理论塔板数/米。建立了离子交换固定相与反相色谱固定相混合填充柱技术,初步解决了毛细管电色谱在低 pH 值和有机溶剂浓度下难于进行操作的困难。我们还在国际上首次建立了动态吸附固定相毛细管电色谱模式,解决了用常规反相毛细管电色谱难于分离碱性或酸性化合物的问题,并进行一些手性对映体的分离分析。通过对微柱液相色谱和毛细管电色谱分离中性化合物的比较,证明二者具有相似的保留机理,考察了中性化合物在毛细管电色谱中分子结构与保留值的定量关系。这些研究成果已在国内外学术刊物发表学术论文近 50 篇,并应“*Electrophoresis*”杂志主编的邀请撰写有关毛细管电色谱进展的综述性论文,大大提高了我国该研究领域在国际上的学术地位,并为在我国推广这一新技术奠定了良好的基础。

为了更好地推广这一新技术在国内的发展和应用,我们以自己的研究工作成果为基础编写了本书,比较系统、全面地介绍毛细管电色谱微分离分析技术的方法、原理、现状和发展动态。全书共分七章,内容包括:绪论、毛细管电色谱理论基础、毛细管电色谱的仪器装置和检测技术、毛细管电色谱的固定相和流动相及操作参数的影响、毛细管电色谱的应用、毛细管电色谱用于拆分手性化合物等。由于毛细管电色谱微分离分析技术是一个新兴的研究方向,许多技术问题有待于克服和完善,大量的应用工作有待于进一步探索。由于作者的水平和知识面有限,书中难免有许多不妥之处,敬请广大读者批评指正。

书中有关作者的研究成果内容得到了国家基金会杰出青年基金、中国科学院院长基金、辽宁省优秀人材基金和香港求是基金会的资助。在本书的编写过程中,承蒙中国科学院大连化学物理研究所和国家色谱研究分析中心的大力支持,中国科学院科学出版基金和大连市人民政府学术著作出版委员会为本书的出版提供经费资助,卢佩章院士和张玉奎教授对作者的科研工作给予了全心全意的支持与鼓励。在本书出版之际,对于各方面的支持与帮助,谨致以衷心的感谢。

作 者

2000年9月于大连

目 录

第一章 绪论	1
第二章 毛细管电色谱的基本原理	7
§ 2.1 毛细管电色谱中的电动现象	8
§ 2.1.1 电双电层	8
§ 2.1.2 电渗	10
§ 2.1.3 电泳	11
§ 2.2 毛细管电色谱保留值的表征和理论处理	12
§ 2.2.1 色谱分配机理	12
§ 2.2.2 中性溶质迁移参数的表征	13
§ 2.2.3 简单离子迁移参数的表征	14
§ 2.2.4 可解离的离子性化合物的迁移参数表征	21
§ 2.3 毛细管电色谱中的焦耳热效应	27
§ 2.4 毛细管电色谱中的谱峰展宽	29
§ 2.4.1 毛细管电色谱中的流动相流型	29
§ 2.4.2 电色谱中的谱带展宽	31
参考文献	48
第三章 毛细管电色谱仪器	51
§ 3.1 毛细管电色谱输液系统	52
§ 3.2 毛细管电色谱柱的制备方法	62
§ 3.2.1 毛细管电色谱填充柱的制备	62
§ 3.2.2 开管毛细管电色谱柱的制备	64
§ 3.2.3 色谱柱制备方法的一些新进展	67
§ 3.3 毛细管电色谱的进样系统	69
§ 3.4 毛细管电色谱信号处理系统	70

参考文献	72
第四章 毛细管电色谱检测技术	76
§ 4.1 UV-可见光吸收检测法	77
§ 4.1.1 光源	77
§ 4.1.2 光路系统	77
§ 4.1.3 信号接收和处理系统	78
§ 4.1.4 UV-可见光吸收检测器的优缺点	78
§ 4.2 光激发荧光检测法	79
§ 4.2.1 概述	79
§ 4.2.2 荧光检测器的激发光源	80
§ 4.2.3 激发和收集光路系统	82
§ 4.3 电化学检测法	87
§ 4.3.1 概述	87
§ 4.3.2 电导和电位检测法	88
§ 4.3.3 安培检测法	92
§ 4.4 质谱检测法	95
§ 4.4.1 CE 和 CEC 与 MS 接口	97
§ 4.5 核磁共振检测器	100
参考文献	103
第五章 毛细管电色谱的固定相、流动相和操作参数的影响	106
§ 5.1 液相色谱固定相的发展过程及其特性	107
§ 5.2 毛细管电色谱固定相	109
§ 5.2.1 毛细管电色谱微球填充固定相	109
§ 5.2.2 毛细管电色谱连续床固定相	120
§ 5.2.3 硅胶基质连续床固定相	127
§ 5.3 CEC 操作参数对分离行为的影响	133
§ 5.3.1 操作参数对电渗流的影响	134
§ 5.3.2 操作参数对保留值的影响	138
参考文献	161

第六章 毛细管电色谱的应用	165
§ 6.1 CEC 在环境分析中的应用	165
§ 6.2 CEC 在生物医学分析中的应用	173
§ 6.3 CEC 在食品分析中的应用	193
§ 6.4 CEC 在石油化工产品分析中的应用	198
参考文献.....	201
第七章 手性对映体的 CEC 拆分	204
§ 7.1 概述	204
§ 7.2 基于包结作用的 CEC 手性药物拆分技术.....	207
§ 7.3 基于亲和作用的手性药物 CEC 拆分技术.....	216
§ 7.4 刷子型固定相手性化合物 CEC 拆分技术.....	222
§ 7.5 基于纤维素衍生物固定相 CEC 技术拆分手性 化合物	226
§ 7.6 基于分子刻印固定相的手性化合物 CEC 拆分 技术	229
参考文献.....	235

第一章 绪 论

色谱是现代分离分析的一个重要方法,也是一门新兴学科,近30年来,色谱学各分支学科,如气相色谱、液相色谱、薄层色谱、凝胶渗透色谱和纸色谱等都得到深入的研究,并广泛地用于许多领域,如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生,乃至空间探索等,无不运用色谱技术以解决各种分析分离问题.各种与色谱有关的联用技术的出现,比如色谱-质谱联用和色谱-红外光谱联用等开辟了复杂混合物分析检测的新天地.新的色谱方法,例如毛细管电泳、毛细管电色谱、分子生物色谱、超临界流体色谱等不断涌现.作为一种简单而有效的技术,色谱还渗入到催化机理、吸附动力学、化学反应动力学、溶液理论研究等方面,揭示了物理化学领域内的某些基本现象和规律的微小差异,色谱法已经成为人们认识客观世界必不可少的分析工具,同时也已成为生物活性物质分离纯化的最重要手段之一.色谱学在不断丰富、提高、发展的实践过程中,已经形成一门独立的学科.国内外都出版了许多有关色谱技术及原理的杂志与专著.

液-固色谱是最先创立的色谱方法,但经典的液相色谱柱多是采用碳酸钙、硅胶、氧化铝填充的玻璃柱管.流动相加在柱管上端,受地球吸引力的作用顺流而下,组分的检测则依靠肉眼的观察或将吸附剂从柱管里取出分析.自 И.И. Бетт 创立液-固色谱以后50多年的时间里,液-固色谱装置并无实质性的改进,其进展比较缓慢.但到20世纪60年代,随着人们在气相色谱方面知识的积累,采用高压输液泵及光学检测器,并制作出多种高效微粒填充剂,大大提高了液相色谱的分析能力,加快了液相色谱的分析速度.70年代又出现了采用自动电导检测器的新型离子交换色谱法,从而

使液相色谱无论是技术上还是在仪器上,都产生了一个新的飞跃.目前,气相色谱与液相色谱并驾齐驱,相辅相成,二者各自都有其驰骋的领域. 80 年代末期,又产生了毛细管电泳分析技术. 这几种分离分析方法已经成为化学家、生物学家分析复杂混合物不可缺少的手段.

色谱作为一种分析方法,其最大特点在于能将一个复杂的混合物分离为各个有关的组成,然后一个个地检测出来,因此它是成分分析和结构测定的重要手段. 那么究竟什么是色谱? 它是一个什么过程? 是什么原因促使不同物质得以分离呢? 一般地讲,色谱是一个分离过程,一个建立在吸附、分配、离子交换、亲和力和分子尺寸等基础上的分离过程,它利用不同组分在相对运动、相互不溶的两相中,其中相对静止的一相称固定相,而另一个相对运动的相称流动相,利用吸附能力、分配系数、离子交换能力、亲和力或分子大小等性质的微小差别,经过连续多次在两相间的质量交换,使不同组分得到分离. 例如利用不同组分间分配系数的差别,用毛细管色谱法可以将含上百个成分的复杂混合物一一分离. 不同组分在性质上的差别是色谱分离的根本,即必要条件;而性质上微小差别的组分之所以能得到分离是因为它们在两相之间进行了上千次甚至上百万次的质量交换,这是色谱分离的充分条件. 我们说色谱法是高效的,是因为它在许多过程中进行了成千上万次的质量交换,使性质上仅有微小差别的组分得以分离;它又是快速的,因为组分在两相的交换速度很快,通常仅千分之几秒,因此一个复杂样品的分析仅需几分钟到几十分钟;另外,色谱法还是很灵敏的,因为它采用近代光学或电子学的各种手段做检测器,一般可直接检测含量为百万分之几或更低的成分. 色谱作为一种分离检测手段,可用于测定分子量很低的常量或痕量气体,又可分离测定分子量上百万的天然或合成物质;可分离性质非常接近的同位素、同分异构体、空间异构体、自旋异构体或光学异构的对映体,也广泛用于大分子或一些生物活性物质,如肽类、核酸、蛋白质以及阴阳离子的测定,它已经成为有机物和一些无机物分离测定的重要手

段,是石油、化工、环保、医药、生化等部门科研和生产中分离检测的一个不可缺少的工具. 色谱的重要性首先在于它使性质上非常接近的物质的分离测定成为可能. 这一点正是近代化学、生物学研究与发展中一个极为重要和不可缺少的手段.

尽管高效液相色谱法近 20 多年来取得了巨大的进展,并在许多领域中发挥了很大的作用,但由于液体流动相高黏度限制了更长色谱柱的使用. 常规的液相色谱柱长度在 20cm 左右,其柱效为 1 万理论塔板数左右. 如何提高分离柱效解决复杂样品的分离分析问题一直成为液相色谱研究的基本课题之一. 20 世纪 80 年代初期,人们试图采用毛细管液相色谱柱来解决这一难题,虽然毛细管液相色谱能大大提高分离柱效. 但由于固定相制备、样品柱容量和进样过程的复杂性及相对较低的检测灵敏度等因素的限制,毛细管液相色谱柱在实际工作中没有获得广泛的应用. 近年来,一种新兴的微柱分离分析技术正在获得广泛的关注,并成为液相色谱研究的热点之一. 这一新兴的技术就是毛细管电色谱法. 毛细管电色谱是在毛细管中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相,依靠电渗流(EOF)推动流动相,使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率的不同而达到分离分析的一种电分离模式. 毛细管电色谱相对于常规的液相色谱而言,至少存在以下几方面的优点:(1) 采用电渗流驱动流动相,不存在液相色谱法中压力差问题,因此可以使用更小粒度的固定相,更长的色谱柱进行分离分析,从而大大提高分离柱效. 另一方面,由于电渗流驱动的塞状流型消除了压力驱动的液相色谱中抛物线流型的径向扩散对柱效的影响,即使采用相同粒度的色谱固定相,毛细管电色谱的柱效也比常规高效液相色谱柱效高 1 至 2 倍以上.(2) 毛细管电色谱是微柱分离分析技术,很容易实现与其他分析技术,如质谱、红外光谱和核磁共振的联用. 采用电动或压力进样,更适合于微量样品的分离分析.(3) 由于电泳和分配机理的同时作用,非常适合于离子性和中性化合物的分离分析.(4) 毛细管电色谱可以采用已有的各种液相

色谱固定相,从而大大提高了各种样品的分离选择性.

毛细管电色谱的发展可以追溯到 20 世纪 50 年代, Mould 和 Synge 将电场应用到薄层液相色谱中进行寡糖分离. 1974 年, Pretorius 等人首次将电场引入到高效液相色谱中, 显示出以电渗流 (electroosmotic flow, 简称 EOF) 作为流动相推动力进行分离的巨大优势, 但他们的文章在当时并未引起足够的关注.

1981 年, Jorgenson 和 Lukacs 在 $170\mu\text{m}$ 内径的毛细管中填充了 $10\mu\text{m}$ 粒径的 Partisil ODS-2, 在电场作用下成功地分离了 9-甲基蒽和茈, 获得了 31 000 理论塔板数的柱效. 他们同时指出, 在以电渗流作为流动相推动力的情况下, 固定相填充的不规则性对样品区带展宽并不重要. 这篇文章被认为是毛细管电色谱发展史上具有里程碑意义的文献. 从此, 毛细管电色谱开始受到了人们的关注. 1982 年, Tsuda 等人首次实现了开管毛细管电色谱, 并对多环芳烃进行了分离. 随后, Martin 等人对开管毛细管电色谱中的轴向扩散和峰展宽进行了研究, 从理论上证实了以电渗流作为流动相推动力的优越性. 1987 年和 1988 年, Knox 和 Grant 对毛细管电色谱的理论进行了研究. 不仅对以压力和电渗流作为流动相推动力的两个体系中的流型、区带展宽、焦耳热效应进行了比较, 同时还对毛细管电色谱中的双电层现象进行了系统的研究.

1990 年, Tsuda 等人发展了毛细管电色谱连续进样技术, 利用柱系统中同时存在的压力流和电渗流对柱内样品进行了富集和分离. 1991 年 Knox 和 Grant 从理论上讨论了填料粒径大小和流动相中电解质浓度与电渗流速度以及柱效间的关系, 并完善了他们所发展的毛细管电色谱理论. 同年 Pfeffer 和 Yeung 利用毛细管电色谱分离了电迁移行为十分相近的氨基萘磺酸类化合物, 并与毛细管区带电泳和高效液相色谱的分离结果进行了比较, 显示出毛细管电色谱在分离方面的巨大优势. 1992 年 Mayer 等人首次在毛细管电色谱开管柱上实现了抗感染类药物的对映体拆分. Li 等人于 1993 年利用 α -酸性糖蛋白作为固定相在毛细管电色谱填充柱上分离了手性化合物. 1994 年, Smith 和 Evans 分别采用

1.5 μm 和3 μm 粒径的 ODS 以及 3 μm 的 SCX 固定相进行药物分离,获得了 0.9~2 以及 0.04 的折合塔板高度. Rebscher 等人首次提出毛细管电色谱填充柱中区带展宽因素的实验测量方法. 同年, Bayer 等人利用高压液相色谱泵首次实现了毛细管电色谱的梯度洗脱,并应用该技术成功地分离了寡聚核苷酸. Jacobson 等人也于同年制作了第一个毛细管电色谱芯片. 1995 年, Guo 等人首次利用溶胶-凝胶技术制备了开管毛细管电色谱柱. Lord 等人发展了毛细管电色谱与质谱的联用技术,并将其应用于染料分析中, 1996 年, Yan 等人利用双电源实现了电压驱动下的流动相梯度洗脱,成功地分离了 16 种多环芳烃. 同年, Fujimoto 等人首次制备了连续床层毛细管电色谱柱. 1997 年, Horvath 等人对毛细管电色谱的动力学进行了系统的研究,考察毛细管电色谱填充柱中填充床层和开管部分中不同的电渗流和电导. Stahlberg 也对毛细管电色谱中的区带迁移理论进行了研究. 1998 年, Stead 等人发展了毛细管电色谱柱上浓缩技术,并用于血浆中甾类化合物的分析. Bayer 等人首次实现了毛细管电色谱与核磁共振的联用. 次年, Horvath 等人进一步发展了毛细管电色谱的动力学理论,对毛细管电色谱和高效液相色谱中影响柱效的各种参数进行了比较研究. Poppe 等人研究了填料孔结构对毛细管电色谱柱性能的影响.

1995 年以来中国科学院大连化物所国家色谱研究分析中心开展毛细管电色谱的研究工作,是国内率先从事该领域研究工作的单位之一. 我们独立掌握了毛细管电色谱的装柱方法,发展出毛细管电色谱的溶剂滴加和溶剂切换台阶梯度洗脱技术;研究了短柱毛细管电色谱快速分离样品的可行性,在 15s 以内分离了 8 种芳香烃化合物,柱效达到 20 万理论塔板数/米. 建立了离子交换固定相与反相色谱固定相混合填充柱技术,初步解决了毛细管电色谱在低 pH 值和有机溶剂浓度下难于进行操作的困难. 我们还在国际上首次建立了动态吸附固定相毛细管电色谱模式,解决了用常规反相毛细管电色谱难于分离碱性或酸性化合物的问题,并进行一些手性对映体的分离分析. 通过对微柱液相色谱和毛细

管电色谱分离中性化合物的比较,证明二者具有相似的保留机理,考察了中性化合物在毛细管电色谱中分子结构与保留值的定量关系. 这些研究工作大大提高了我国毛细管电色谱研究领域在国际上的学术地位,并为在我国推广这一新技术奠定了良好的基础.

综上所述,尽管毛细管电色谱的发展历史并不很长,但它无论在理论、技术,还是应用方面都取得了很大的发展. 目前,已有多篇毛细管电色谱的综述和专题讨论发表,并出现了商品化的产品和仪器. 我们相信,随着毛细管电色谱理论和柱技术的进一步完善,它必将在更广泛的领域中得到发展和应用.