

胶束电动毛细管色谱中的双峰及其成因*

陈冠华^{①②} 杨更亮^{①③**} 田益玲^② 陈 义^③

(①河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002; ②河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; ③中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100080)

摘要 研究了以十六烷基三甲基溴化铵(或十二烷基硫酸钠)为准固定相的胶束电动毛细管色谱法中的双峰及其形成原因. 指出在一定的条件下一种组分可以出现 2 个峰. 实验表明, 某一组分相应双峰的相对峰面积取决于该组分与表面活性剂之间的反应时间与温度以及样品中表面活性剂的浓度. 当样品中表面活性剂浓度增加时, 双峰中一个峰的相对峰面积增加, 而另一个减小; 温度可以加速反应的过程. 这意味着被分析物与表面活性剂之间的相互作用是一个慢过程, 这种相互作用可以产生一种稳定的物质, 并导致双峰的形成. 十六烷基三甲基溴化铵与间羟基苯甲酸反应产物的红外与核磁共振光谱证实了这一点.

关键词 双峰 相互作用 胶束电动毛细管色谱 表面活性剂

自从 Terabe 等人于 1984 年建立了胶束电动毛细管色谱法(MECC)以来^[1], 在分离中性化合物方面已经取得了许多重要的进步. 在 MECC 模式中, 当离子表面活性剂的浓度在临界胶束浓度以上时, 离子表面活性剂胶束将会形成所谓的准固定相. 当溶质从样品区带迁移进入缓冲溶液中时, 将有部分溶质分配进入胶束相. 在采用 MECC 模式分离有机阴离子时, 为了使其能够有效地与胶束相相互作用, 经常使用阳离子表面活性剂胶束作为准固定相^[2~5]. 然而, 在我们的实验中却发现, 在某些确定的条件下, 分离有机阴离子时会出现双峰现象. Ermakov 等^[6]指出, 在毛细管区带电泳中, 当同一物质出现带电与不带电的两种形态时, 将会出现双峰现象. Gil 等^[7]在采用 MECC 模式分离甲基黄酮苷时, 发现在某些条件下会出现双峰或三峰现象. Stevenson 等^[8]也报道了在 MECC 模式中可能出现双峰现象. 他们对各自实验中出现的双峰现象的解释是, 组分在缓冲液中出现了沉淀. 在我们的实验中发现, 当样品溶液中混入胶束溶液或含有胶束的缓冲液时, 将会出现显著的双峰现象, 而且其成因与他们的完全不同. 一般认为溶质在十二烷基硫酸钠(SDS)或十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)胶束中的停留时间小于 10^{-4} s^[1], 可以由此推断溶质和胶束之间的相互作用是一个快过程. 如果这个推论是正确的, 那么即使在样品溶液中存在表面活性剂, 样品中的一个组分也只能对应于电泳图中的一个峰. 由此而引出的问题是: 上述溶质和胶束间的快速相互作用机理是惟一的吗? 除分配机理以外, 还存在其他相互作用吗? 溶质有可能与表面活性剂形成稳定的物质吗? 显然, 在实际样品的分析中, 双峰不利于我们正确地识别样品中的组分. 因此, 本文的目的就是要研究双峰出现的

2002-08-02 收稿, 2003-05-05 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 20075005)和河北省自然科学基金(批准号: 200077, 202096)资助项目

** 联系人, E-mail: ygl@hbu.edu.cn

原因.

1 实验部分

1.1 仪器

BioFocus 3000 型毛细管电泳仪(BioRad Inc, 美国), 具有 0~30 kV 高压电源、高速扫描紫外检测器、水冷却系统和 BioFocus 3000 软件系统. 未涂层熔硅毛细管(永年光导纤维厂)总长 50 cm, 有效长度 45.4 cm 内径 50 μm . FTS3000 型 Fourier 变换红外光谱仪(BioRad Inc, 美国), 测定所用波数范围 4000~400 cm^{-1} . Avance 400 型核磁共振仪(Bruker Inc, 瑞士), 具有 9.4T 的超导磁铁, ^1H 的共振频率可达 400 MHz.

1.2 试剂

水杨酸为 Sigma 试剂; 硼酸、氢氧化钠、盐酸和甲醇为优级纯试剂; 对苯二甲酸、间羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、对氨基苯甲酸、1-萘乙酸、1-萘酚、苯甲酸、1-萘胺、萘、CTAB、SDS、乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和重水均为分析纯试剂; 溴化钾为光谱纯试剂; 去离子水产自 Milli-Q Plus 系统, 电阻率为 182 $\text{k}\Omega \cdot \text{m}$.

1.3 运行缓冲液和标准制备

将适量被分析物质溶解于甲醇或 DMF 中可分别制备出 1.0000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的相应标准溶液. 用去离子水制备 400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 和 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 贮备溶液, 使用前用 0.45 μm 滤膜过滤. 混合适当体积的硼酸和 CTAB(或 SDS)贮备溶液, 并用氢氧化钠溶液调至适当 pH 值即可得到运行缓冲液.

1.4 电泳条件

检测波长为 237 nm; 采用 CTAB 胶束时运行电压设置为 -15 kV, 采用 SDS 胶束时为 15 kV; 样品注射压力为 137.8 $\text{kPa} \cdot \text{s}^{-1}$; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$. 在两个样品测定之间分别用去离子水、6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、去离子水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、去离子水各清洗 1 min, 再用运行缓冲液清洗 2 min.

2 结果与讨论

2.1 双峰现象

在任何一种毛细管电泳模式中, 一种组分通常只对应于电泳图中的一个峰. 然而, 在分离由 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸、7.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸和 35% (v/v) 的甲醇组成的样品过程中, 我们发现在它们的主峰(峰 1 和 3)的附近有小峰(峰 2 和 4)存在, 如图 1(a)所示, 并且样品在不更换的条件下被重复注射的次数越多, 峰 2 和 4 就越高. 该样品分离所用缓冲液含有 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐和 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB, pH 用氢氧化钠溶液调为 9.50. 当缓冲液的 pH 低于 8.30 时, 峰 2 和 4 因分离度下降而消失. 由于样品所用苯甲酸和水杨酸的纯度都很高, 所以峰 2 和 4 不能被当作杂质峰. 为了研究这些小峰的起源, 我们首先对仅仅多了 6.25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 的同样样品进行了测试, 令人惊讶的是, 除了样品中含有 CTAB 以外, 在其他完全相同的实验条件下, 每一个组分都出现了 2 个峰, 并且它们的第二个峰(峰 2 和 4)都高于图 1(a)中相应的峰, 如图 2(b)所示.

这种现象是普遍存在的吗? 为证实这个想法, 对其他有机阴离子进行了测试, 结果是肯

定的. 图 2(a)所示为对羟基苯甲酸、对苯二甲酸、间羟基苯甲酸和水杨酸的双峰现象, 样品含有对羟基苯甲酸、对苯二甲酸、间羟基苯甲酸和水杨酸各 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CTAB $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 甲醇 35% (v/v). 分离所用缓冲液含有 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB, pH 为 10.69. 图 2(b)所示为含有 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-萘乙酸、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-萘酚、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 和 35% 甲醇(v/v)样品的双峰现象, 分离所用缓冲液除了含有 10% 乙醇以外, 其余与图 2(a)相同.

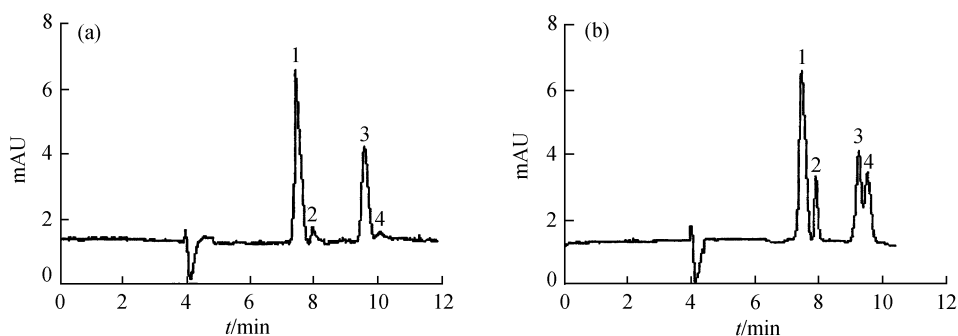


图 1 不含和含有 CTAB 的苯甲酸和水杨酸的电泳图

1, 2 为苯甲酸; 3, 4 为水杨酸

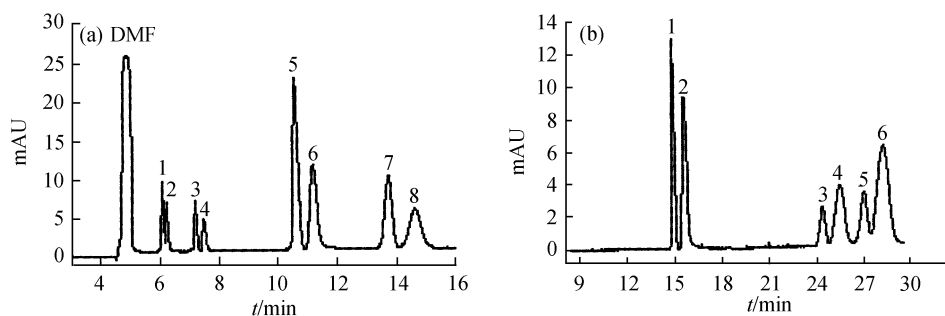


图 2 一些取代芳族化合物的双峰现象

(a) 1, 2 为对羟基苯甲酸; 3, 4 为对苯二甲酸; 5, 6 为间羟基苯甲酸; 7, 8 为水杨酸. (b) 1, 2 为苯甲酸; 3, 4 为 1-萘乙酸; 5, 6 为 1-萘酚

如果将表面活性剂由阳离子型改变为阴离子型(在我们的实验中是由 CTAB 变为 SDS), 还能观察到双峰现象吗? 为此, 我们制备 3 个样品进行了初步实验, 它们分别含有: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对氨基苯甲酸、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 和 35% 甲醇(v/v); $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-萘胺, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 和 35% 甲醇(v/v); $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘, $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 和 35% 甲醇(v/v). 分离用缓冲液含有 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐和 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS, pH 为 10.16. 图 3(a)~(c)证实结果是肯定的.

实验表明, 当样品溶液中存在表面活性剂时, 一种化合物通常可出现 2 个峰, 被分析物质和表面活性剂间的相互作用可能是双峰的起源, 需要用红外光谱或核磁共振谱加以进一步的证明.

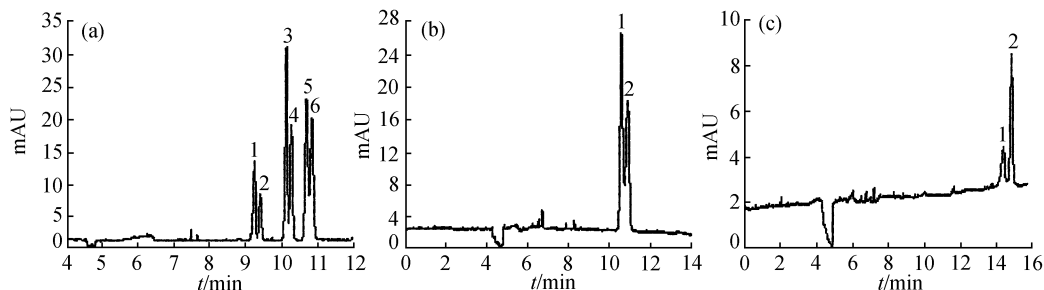


图 3 一些含有 SDS 的芳族样品的双峰现象

(a) 1, 2 为苯甲酸; 3, 4 为对氨基苯甲酸; 5, 6 为水杨酸. (b) 1, 2 为 1-萘胺. (c): 1, 2 为萘

2.2 样品溶液中 CTAB 对相对峰面积的影响

为了研究 CTAB 的影响, 分别对含有 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸、 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸、35% 甲醇 (v/v) 和不同浓度 CTAB 的样品进行了测定. 图 4 给出了苯甲酸和水杨酸双峰的相对峰面积(峰面积/迁移时间)分析结果, 所用缓冲液与图 2(a) 相同. 从该图中可以看出, 这两种物质第一个峰的相对面积随样品溶液中 CTAB 浓度的增加而减小, 第二个峰则正好相反, 每一组分的双峰总面积几乎保持不变. 这个事实再次说明, 第二个峰是产生于组分与 CTAB 相互作用的物质.

2.3 反应时间对于相对峰面积的影响

采用与上节相同实验条件对保持在室温下达一定时间、含有 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 1-萘乙酸、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 和 35% 甲醇(v/v)的样品溶液进行分析, 结果如图 5 所示. 从分析结果中可以看出, 第一个峰的面积随时间的延长而减小, 同时第二个峰增加, 第一个峰消失大约需要 300 h. 其他化合物也存在着类似的实验现象. 这些结果表明了这样一个事实: 被分析物质与 CTAB 的相互作用是一个慢过程.

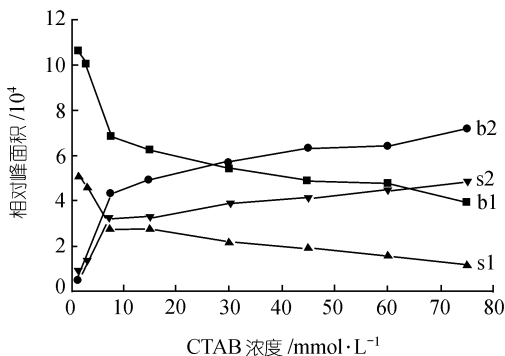


图 4 峰面积随 CTAB 浓度的变化

b1, b2: 苯甲酸的峰 1 和 2; s1, s2: 水杨酸的峰 1 和 2

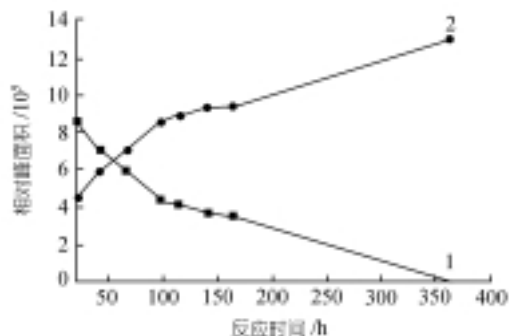


图 5 时间对 1-萘乙酸双峰面积的影响

1 为峰 1; 2 为峰 2

2.4 温度对于相对峰面积的影响

反应温度对于相对峰面积有很大的影响. 图 6 给出了间羟基苯甲酸在温度从室温到 80°C 范围内变化时第一个峰(峰 1)和第二个峰(峰 2)的面积变化. 在室温条件下, 第一个峰的面积等于第二个峰大约需要 90 h, 而在 60°C 时需要 15 h. 当温度为 80°C 时, 第一个峰的面积始终小

于第二个峰, 它的消失仅需要 5 h. 显然, 温度能够加速反应的进程. 温度实验所用样品由 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间羟基苯甲酸、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 和 35% 甲醇(v/v)组成. 萘和 SDS 的相互作用也存在着类似的关系.

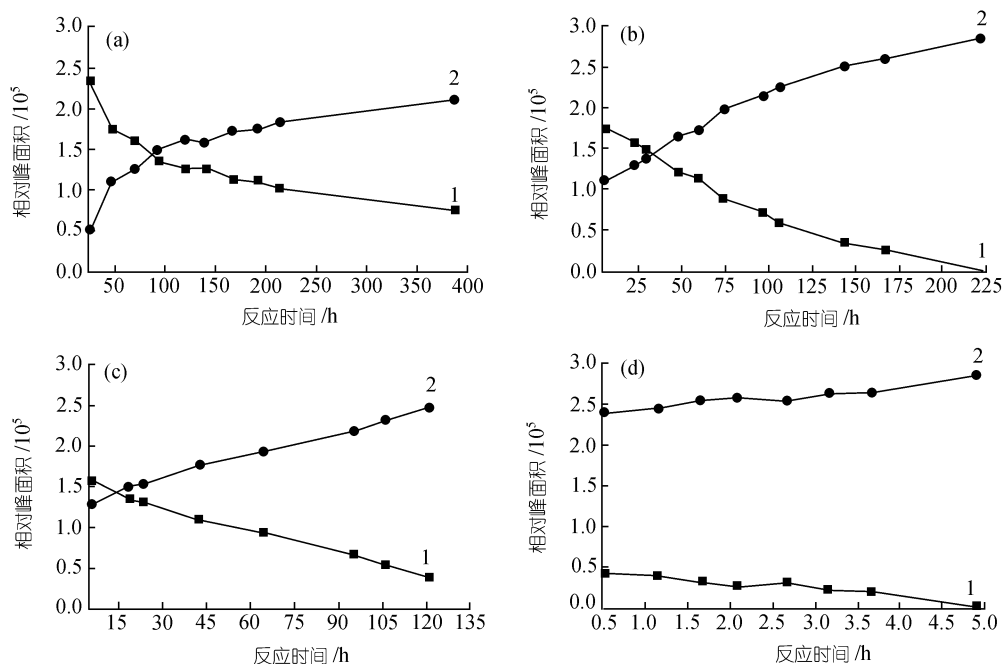


图 6 温度对间羟基苯甲酸双峰相对面积的影响

(a) 室温; (b) 40°C; (c) 60°C; (d) 80°C. 1 为峰 1; 2 为峰 2

2.5 相互作用产物的光谱

为了证实分析物与表面活性剂相互作用产生了稳定的物质, 选择间羟基苯甲酸进行了测定. 制备含有 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 间羟基苯甲酸、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAB 和 35% 甲醇(v/v)的样品溶液, 使其在温度为 40°C 的条件下反应至双峰完全变为峰 2. 然后将该产物的样品溶液减压蒸干, 并置于干燥器中脱水至成为白色粉末. 对间羟基苯甲酸、CTAB 和样品分别测定其红外光谱与核磁共振谱, 将间羟基苯甲酸与 CTAB 按样品反应的比例进行混合后测定其红外光谱. 红外光谱样品是取适当量样品与溴化钾定量混合压片制成, 核磁共振样品是取适当量样品溶于重水中制成. 图 7 是 2 个反应物的混合物与产物的红外光谱, 图 7(a)中 3291 cm^{-1} 处的吸收峰在图 7(b)的相应位置上已经消失, 在 1718 , 1463 和 1269 cm^{-1} 处的吸收峰峰形也存在着显著差异, 在 1394 cm^{-1} 处产物新出现了一个吸收峰, 这些差异表明生成了新的物质. 需要指出的是, 混合物的光谱与两个反应物光谱的迭加谱完全相同. 图 8 是 2 个反应物与产物的 ^1H 核磁共振谱, 从图 8(a)和(c)中我们可以看出, 间羟基苯甲酸苯环上 4 个氢的化学位移在产物中发生了变化, 其中图 8(a)中的 7.285 和 7.041 在图 8(c)中移至 7.075 和 6.850, 位移量达到 0.2, 这也说明确实有新的产物生成. 对于与表面活性剂相互作用形成双峰的其他物质也可通过类似的测定加以证实, 这有待于进一步的深入研究.

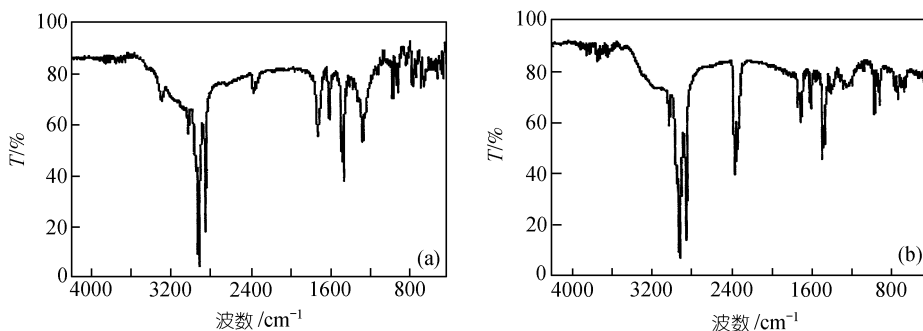


图 7 间羟基苯甲酸与 CTAB 的混合物(a)和它们相互作用产物(b)的红外光谱

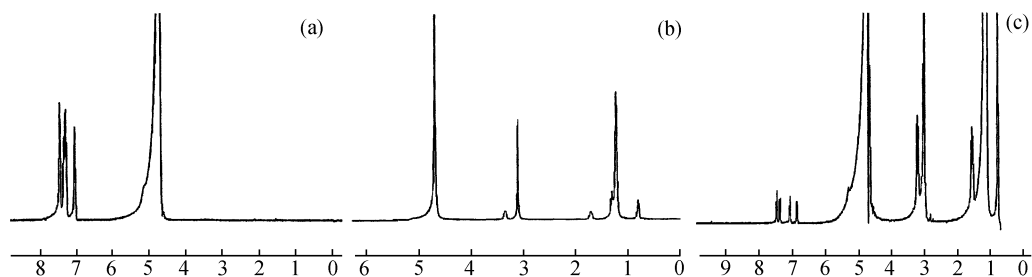


图 8 间羟基苯甲酸(a)、CTAB (b)以及它们相互作用产物(c)的核磁共振谱

3 结论

样品溶液中表面活性剂(CTAB 或 SDS)的存在可能导致某些化合物双峰的出现. 双峰出现的原因可能是这些化合物与 CTAB 相互作用形成了稳定的物质, 它们在电泳图中的保留时间接近于相应的化合物. 组分双峰的相对面积与样品中表面活性剂浓度有关, 随表面活性剂浓度的增加, 双峰中一个峰相对面积增加, 另一个峰同时减少. 当样品中表面活性剂浓度确定时, 组分双峰的相对面积取决于组分与表面活性剂之间反应的温度和时间, 这意味着被分析物质与表面活性剂之间的相互作用是一个慢过程, 温度升高可以加速该过程. 迄今, 关于双峰形成的机理仍然不是很清楚, 还需要对形成的物质进行深入研究. 然而, 在 MECC 分析中应避免双峰现象的出现却是非常清楚的事情, 因为它可能会错误地使我们把双峰中的一个峰误认为是样品中的其他组分. 因此, 建议不要在样品溶液中添加 CTAB 或 SDS.

参 考 文 献

- 1 Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, et al. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem*, 1984, 56(1): 111~113
- 2 Kaneta T, Tanaka S, Taga M, et al. Migration behavior of inorganic anions in micellar electrokinetic capillary chromatography using cationic surfactant. *Anal Chem*, 1992, 64(7): 798~801
- 3 Bjerregaard C, Michaelsen S, Sorensen H. Determination of phenolic carboxylic acids by micellar electrokinetic capillary chromatography and evaluation of factors affecting the method. *J Chromatogr A*, 1992, 608(1-2): 403~411

- 4 Corran P H, Sutcliffe N. Identification of gonadorelin (LHRH) derivatives: Comparison of reversed-phase high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 1993, 636(1): 87~94
- 5 Tobbcuk K, Li Y M, Pizarro N A, et al. Micellar electrokinetic capillary chromatography of macrolide antibiotics: Separation of tylosin, erythromycin and their related substances. *J Chromatogr A*, 1999, 857(1-2): 313~320
- 6 Ermakov S V, Yu M, Zhukov, et al. Experimental and theoretical study of artifactual peak splitting in capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 1994, 66(22): 4034~4042
- 7 Gil M I, Ferreres F, Tomás-Barberán F A. Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylated flavone aglycones. *J Liq Chromatogr*, 1995, 18(15): 3007~3019
- 8 Stevenson R, Weinberger R, Neue U D. Separations solutions: Capillary electrophoresis. *Am Lab*, 1997, 29(22): 24u~24v