

CAPILLARY ELECTROPHORESIS:
EXPERIMENTAL TECHNIQUES

毛细管电泳 实验技术

丁晓静 郭磊 著



科学出版社

毛细管电泳实验技术

Capillary Electrophoresis: Experimental Techniques

丁晓静 郭 磊 著



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书主要针对卫生防疫、检验检疫、食品安全领域的实验技术人员而写。从容易被分析技术人员忽视的实验室基础知识及实验习惯入手,系统分析影响毛细管电泳分析方法重现性及准确性的因素,着重介绍影响毛细管电泳分析方法重现性及准确性的分析天平、酸度计、电导仪和移液器等的正确使用方法、注意事项和良好使用习惯,以及毛细管电泳仪的正确使用和维护。

本书可为分析技术人员控制毛细管电泳分析方法的重现性及准确性提供理论及实验指导,为从事其他专业分析技术的同行提供借鉴,还可供生物技术、生物化学等不同领域中的科学研究人员、教师、研究生、大学生、技术人员及实验员参考。

图书在版编目(CIP)数据

毛细管电泳实验技术=Capillary Electrophoresis: Experimental Techniques/
丁晓静,郭磊著. —北京:科学出版社,2015. 11
ISBN 978-7-03-046224-4

I. ①毛… II. ①丁… ②郭… III. ①毛细管电泳-实验-技术
IV. ①O657. 8-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 264631 号

责任编辑:周巧龙 赵 慧 / 责任校对:张小霞 赵桂芬
责任印制:徐晓晨 / 封面设计:铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 11 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2015 年 11 月第一次印刷 印张:27

字数:540 000

定价:120.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

序

丁晓静博士以极大的热情,书写她从博士毕业时起就投身的毛细管电泳应用研究及其成果,并邀请我为其作序,深感荣幸之至!然几经斟酌,不知如何下笔。今巧出差武汉,参加微流控学术会议,因有所感,遂匆匆而作。不为学术,但求精神,望勿见笑。

我赞赏丁博士的无畏。她之于毛细管电泳,起步不早,仅始于2001年或当微流控芯片风起云涌之际。虽然那时毛细管电泳在人类基因组测序上已贡献甚巨,但却以“DNA自动测序仪”名动天下,纵横至今。它之不以毛细管电泳“立柜”,使其在众多其他领域中的“事业”也因此处处“不重现”,贬抑者兴之,拥护者缄口。研究遂进入“休眠”状态。恰在此刻,丁博士闯来。干的是大家并不怎么重视的实际应用研究。一做十多年!走过泥泞,穿过丛林,来到旷野,看到了另一片蓝天。这岂非是一种启迪?

我好奇她的悟性。她之于毛细管电泳,与其说是学有专长,不如说是出于好奇——至少开始阶段如此。但她可以通过几句对话,数场会议,便领悟了其中的精髓。由此并借助相邻学科领域知识的灵活应用与关联,建立了一系列能解决实际问题的毛细管电泳分析方法,供大家参考。这事情的本身岂非也是一种参考!

我欣赏她的公心和坚持。她做毛细管电泳应用研究,在很大程度上是出于对财产的珍惜。人不用者我用,我可用者公用。毛细管电泳的商机或不如色谱,甚少商家对待毛细管电泳如色谱,伴生的是标准方法少,可靠性低,可扩展性差。这就导致了用户数量萎缩,仪器被闲置,商机随之进一步缩水。丁博士看在眼里,但心不为所动,坚持发展高效可靠的方法,推广经济实用的技术。这岂非标准的学者做派!天下此类人多了,国何愁不国!

是金子总会发光的。一本以实际经验写就的书,虽不是金子,但也是会发光的。故此,我为之序。

陈 义

2014年10月20日于武汉

前 言

我与毛细管电泳结缘始于 2001 年。那一年我博士毕业,进入北京市疾病预防控制中心从事卫生理化检验工作,初识了一台 1999 年购置的毛细管电泳仪——它被绒布罩着不用,颇觉好奇。

经了解,当初购买该仪器的初衷是为了填补高效液相色谱不能测蛋白质及手性物质的空白,然而在使用时发现其标准溶液的分离效果很好,但实际样品分析时重现性差,不能准确定量。此时毛细管电泳仪的生产厂家逐渐减少,人们对毛细管电泳褒贬不一,检验机构的专业技术人员普遍对毛细管电泳的准确定量能力及其重现性持怀疑态度。一些已经购买了毛细管电泳仪者认为不值得为重现性不好的仪器再浪费任何人力、物力及财力,最终导致该仪器受冷落而闲置。

与此同时,毛细管电泳为人类基因组工程测序工作的提前完成做出了重大贡献;全球范围内仍有大批从事毛细管电泳研究的人。鲜明的反差使我产生困惑,于是我进行文献调研,并向北大、清华及中科院一些正在从事毛细管电泳研究的老师请教,询问他们的经验与感受。

2002 年,我科室的老领导康君行研究员极力建议我去上海参加第五届全国毛细管电泳及相关微分离分析学术报告会,我带着怀疑与批判的态度参会。与会期间,针对综述中展望的毛细管电泳非常适合食品分析然而应用文献报道较少的问题,中国科学院大连化学物理研究所的林炳承研究员建议我可以尝试做这方面的研究!

交流会无疑使我收获颇丰,毛细管电泳的前景并不暗淡,值得去尝试。交流会归来,我又特意去中国科学院化学研究所陈义研究员的实验室向他的博士生郭磊取经,她无私分享给我一本自己翻译的毛细管电泳分析蛋白质的技术资料。其后她又继续从事毛细管电泳方向研究多年,在生物分析相关研究方面取得了较深造诣(本书第 5 和 6 章均由她撰写)。取经归来,我便从较简单的消毒产品入手,相继开发了复方化学消毒剂中苯扎溴铵和化妆品中四种防腐剂同时分析的方法,并均与液相色谱进行方法比对,二者结果吻合很好,初步给了我用毛细管电泳准确定量的信心。

2004 年 12 月我特意参加北京色谱年会,聆听中国科学院化学研究所陈义研究员的“手性毛细管电泳方法研究”报告,受益匪浅。他的“毛细管电泳是新瓶装老酒”、“毛细管电泳不能定量,并不是毛细管电泳本身的问题,而是所开发的方法不正确”的观点,给我留下很深的印象。同年 10 月底,我邀请中国科学院生态环境研究中心的黄骏雄研究员讲授《高效液相色谱基础》,他讲授的配制缓冲流动相的方法,使我悟出做好毛细管电泳特别需要关注分离缓冲溶液的缓冲范围这一关键要素。

对生物大分子分析,毛细管电泳是天赐之物[Laura Defrauces Co, Capillary electrophoresis: Finding a niche, where HPLC struggles, CE thrives. Anal Chem, 2001, 73(17): 497A-499A]。我终于找到了下一个目标——开发毛细管电泳测定保健食品中免疫球蛋白 G (IgG) 的方法,结合自己在中国科学院生态环境研究中心师从牟世芬研究员做离子色谱应用研究的经验,成功开辟了用裸管分离实际样品中蛋白质分析的一条通路。而为弥补 2004 年发生阜阳婴儿大头娃娃奶粉事件时因能力所限无法检测问题奶粉中的蛋白质而一直心存的遗憾,我于 2006 年开始分析牛奶蛋白,解决了乳品中乳铁蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的准确定量问题。

我单位作为检验机构,日常工作任务是给委托企业出具检测报告,因此对送检样品定量结果的准确性有很高的要求。故从决定做毛细管电泳应用研究的时刻起,我一直秉承我的硕士生导师傅承光先生建议的用液相色谱证明毛细管电泳定量能力的原则,从而达到肯定毛细管电泳的目的。我们于 2008 年做的三聚氰胺盲样考核、2013 年甜蜜素能力验证及 2014 年 FAPAS[®] 能力验证的结果,均有力地证明了毛细管电泳丝毫不逊色于液相色谱! 毛细管电泳完全能够胜任准确定量工作!

2010 年我开始在贝克曼毛细管电泳用户交流会上介绍自己做毛细管电泳应用研究的经验,即“如何增加毛细管电泳分析方法的重现性”。每次讲完后都有同行鼓励我能够写成一本书。受此启发,我将多次的讲稿进行整理、扩充,成为一本实用的实验技术用书,适合初学者及高级研发者参考。

鉴于毛细管电泳应用的领域非常广泛,加之作者的学识有限,本书不可能囊括所有的应用领域,仅针对各应用领域的共性问题进行讨论,希望有助于推动该绿色、环保、非常符合我国国情的分析技术在相关领域应用的进一步发展。

在本书成稿之际,我与本书另一位作者,中国人民解放军军事医学科学院的郭磊副研究员,在此特向参与编写提纲讨论并提出宝贵意见或建议及帮助的专家致以衷心的感谢。他们分别是:中国科学院化学研究所的陈义研究员、北京市理化分析测试中心的张经华研究员、北京大学的张新祥教授、中国科学院上海有机化学研究所的康经武研究员、河北农业大学的王志教授、贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司北京分公司的王丰高级工程师。向为本书提供大量图谱的本实验室的硕士生及本科生表示感谢。也要感谢为我提供资料的上海爱博才思分析仪器贸易有限公司(AB Sciex)的陈泓序博士。感谢所有给予我鼓励的同行。还要感谢北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目的资助。最后,感谢理解并支持我的家人。

书中疏漏与不当之处在所难免,敬请广大读者批评指正。

丁晓静

2014 年 11 月 16 日

目 录

序

前言

| | |
|-------------------|----|
| 第 1 章 概述 | 1 |
| 1.1 毛细管电泳的定义 | 1 |
| 1.2 毛细管电泳的分离模式 | 3 |
| 1.3 毛细管电泳的发展简史 | 4 |
| 1.4 对毛细管电泳的评价 | 8 |
| 1.5 毛细管电泳与液相色谱的对比 | 16 |
| 1.6 毛细管电泳的现状 | 20 |
| 1.7 毛细管电泳的文献 | 22 |
| 1.8 毛细管电泳的发展 | 23 |
| 1.9 结束语 | 25 |
| 参考文献 | 26 |
| 第 2 章 仪器安装与辅助设备 | 29 |
| 2.1 仪器安装前的准备 | 29 |
| 2.2 仪器安装注意事项及维护 | 29 |
| 2.3 毛细管电泳实验室必备 | 33 |
| 2.3.1 毛细管电泳仪 | 34 |
| 2.3.2 分析天平 | 36 |
| 2.3.3 移液器 | 43 |
| 2.3.4 湿度计 | 46 |
| 2.3.5 酸度计 | 47 |
| 2.3.6 电导仪 | 60 |
| 2.3.7 毛细管开窗口器 | 62 |
| 2.3.8 超声波清洗器 | 64 |
| 2.3.9 离心机 | 65 |
| 2.3.10 涡旋混匀器 | 68 |
| 2.4 结束语 | 68 |
| 参考文献 | 68 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| 第 3 章 方法开发 | 71 |
| 3.1 概述 | 71 |
| 3.2 毛细管电泳基本概念 | 72 |
| 3.2.1 电场强度 | 72 |
| 3.2.2 焦耳热 | 75 |
| 3.2.3 淌度及电泳速度 | 76 |
| 3.2.4 分离柱效 | 79 |
| 3.2.5 分离度 | 83 |
| 3.2.6 选择性 | 84 |
| 3.2.7 电渗流 | 85 |
| 3.2.8 检测 | 103 |
| 3.2.9 背景电解质 | 105 |
| 3.3 分析化学基础知识 | 107 |
| 3.3.1 解离常数 | 107 |
| 3.3.2 分布系数 | 108 |
| 3.3.3 缓冲溶液 | 111 |
| 3.3.4 缓冲溶液的缓冲范围 | 114 |
| 3.3.5 缓冲容量 | 126 |
| 3.4 增加毛细管电泳分析方法重现性的基本策略 | 129 |
| 3.4.1 分离缓冲溶液选择的策略 | 130 |
| 3.4.2 样品缓冲溶液选择的基本策略 | 150 |
| 3.4.3 优化毛细管的清洗程序 | 154 |
| 3.4.4 减少分离或样品溶液中有机溶剂的挥发 | 171 |
| 3.5 良好的 CE 实验室规范 | 174 |
| 3.6 如何开发新方法 | 177 |
| 3.7 结束语 | 206 |
| 参考文献 | 207 |
| 第 4 章 定性定量分析 | 218 |
| 4.1 概述 | 218 |
| 4.2 外标法 | 221 |
| 4.3 内标法 | 229 |
| 4.4 单点法 | 230 |
| 4.5 内插法 | 232 |
| 4.6 归一化法 | 232 |
| 参考文献 | 233 |

| | |
|--|-----|
| 第 5 章 方法验证及转移 | 234 |
| 5.1 引言 | 234 |
| 5.2 毛细管电泳方法验证 | 234 |
| 5.2.1 方法验证要素 | 236 |
| 5.2.2 分析方法验证技术指导原则 | 242 |
| 5.3 CE 方法转移 | 245 |
| 5.3.1 前提 | 245 |
| 5.3.2 因素 | 245 |
| 5.3.3 评价 | 246 |
| 5.4 结束语 | 246 |
| 参考文献..... | 247 |
| 第 6 章 常见问题及对策 | 248 |
| 6.1 引言 | 248 |
| 6.2 实例剖析 | 248 |
| 6.2.1 正常电泳谱图 | 248 |
| 6.2.2 问题电泳谱图 | 249 |
| 6.3 结束语 | 260 |
| 第 7 章 应用实例 | 262 |
| 7.1 概述 | 262 |
| 7.2 蛋白质及肽的分析 | 263 |
| 7.2.1 保健食品中的免疫球蛋白 G | 263 |
| 7.2.2 乳及乳品中的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 A 及 β -乳球蛋白 B | 266 |
| 7.2.3 乳及乳制品中蛋白质的去除效果 | 276 |
| 7.2.4 婴儿配方奶粉中的乳铁蛋白 | 283 |
| 7.2.5 酪蛋白糖巨肽 | 289 |
| 7.3 食品添加剂 | 293 |
| 7.3.1 婴儿配方奶粉中 5'-单磷酸核苷酸 | 293 |
| 7.3.2 保健食品中 5'-单磷酸核苷酸 | 299 |
| 7.3.3 酱油中 5'-单磷酸核苷酸..... | 301 |
| 7.3.4 有机酸 | 304 |
| 7.3.5 十种防腐剂 | 309 |
| 7.3.6 十种人工合成色素..... | 316 |
| 7.3.7 十一种添加剂 | 321 |
| 7.3.8 甜蜜素 | 326 |
| 7.4 非食用物质及食物中毒样品分析 | 329 |

| | | |
|-------|------------------------|------------|
| 7.4.1 | 三聚氰胺 | 329 |
| 7.4.2 | 可乐定 | 333 |
| 7.4.3 | 甘蔗中的 3-硝基丙酸 | 335 |
| 7.5 | 消毒剂的有效成分 | 338 |
| 7.5.1 | 苯扎溴铵 | 338 |
| 7.5.2 | 醋酸洗必泰与苯扎氯铵 | 341 |
| 7.5.3 | 邻苯二甲醛、对氯间二甲苯酚、三氯生 | 346 |
| 7.6 | 化妆品 | 352 |
| 7.6.1 | 十一种防腐剂 | 352 |
| 7.6.2 | 巯基乙酸 | 354 |
| 7.7 | 中草药的有效成分 | 359 |
| 7.7.1 | 人参皂苷 | 359 |
| 7.7.2 | 大黄素 | 364 |
| 7.7.3 | 紫杉醇 | 367 |
| 7.7.4 | 柚皮苷 | 370 |
| | 参考文献 | 373 |
| | 附录 | 382 |
| 附录 1 | 毛细管电泳中常用术语及缩写 | 382 |
| 附录 2 | 常见离子在水中的极限摩尔电导值 | 383 |
| 附录 3 | 一些物质的解离常数及相对分子质量 | 386 |
| 附录 4 | 表面活性剂在水溶液中的临界胶束浓度 | 410 |
| 附录 5 | 探针在特定检测波长及 pH 时的摩尔吸光系数 | 412 |
| 附录 6 | 贝克曼毛细管电泳仪常见故障及解决方法 | 414 |
| 附录 7 | 生物缓冲溶液 | 417 |
| | 参考文献 | 419 |

第 1 章 概 述

毛细管电泳自 20 世纪 80 年代初由 Jorgenson 和 Lukacs 创立以来^[1],其理论、分离模式、仪器和应用研究始终为高度活跃的研究领域^[2]。无论在毛细管电泳工作者的人数、发表著作的数量,还是在所分离样品的种类和复杂性以及分离速度和操作方便等方面都在持续地增加和发展。然而,这个增长曲线并非逐年平滑上升,反映了人们对该技术的兴趣起起伏伏:既有许多科学家争论过是否如早期研究者所预期的,提供了足够的分离速度、分离能力、灵敏度、峰容量、耐用性及低成本,也有成千上万的研究者证明了毛细管电泳在许多学科(如法医学^[3]、医学诊断^[4,5]、医药科学^[6]、生物技术^[7]、环境科学^[8]等专业)领域获得了广泛应用。

1.1 毛细管电泳的定义

与以高(低)压泵为驱动力,以色谱柱为分离通道,依据样品中各组分在固定相及流动相中分配行为上的差异而进行分离的高效液相色谱(HPLC)很类似,毛细管电泳(capillary electrophoresis 或 high-performance capillary electrophoresis, CE 或 HPCE)是指样品在高压直流电场的作用下,以电渗流(EOF)为驱动力,以熔融石英毛细管为分离通道,各组分因淌度(mobility, μ)的差异而进行高效、快速分离的新型液相分析技术。

CE 仪器结构简单,主要由熔融石英毛细管、进样系统、高压系统、检测系统和数据收集系统五部分组成,如图 1-1 所示。进样时,样品瓶与分离缓冲溶液瓶位置调换。

为提高仪器性能,还可以增加自动进样器、多种进样装置、样品(或毛细管)的温度控制系统、可程序控制的高压电源、多个检测器、流分收集、计算机控制系统等功能^[9],特别是样品温度控制系统,适合对温度敏感样品的分析。CE 的优势是低至 20 μ L(甚至 10 μ L)的稀少样品溶液仍能够用于多次分析,因为 CE 的进样量一般在 nL 级^[10]。

在 CE 问世之前,分离科学领域占主导地位的主要有薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)及液相色谱(LC)[包括离子色谱(IC)]^[11]。然而,HPLC 中色谱柱填料的巨大表面积易导致待分析物在其表面的吸附,特别是分离实际样品中的蛋白质时,样品中的基体易不可逆地吸附在色谱柱表面,使柱效很快下降。而 CE 在进样端和检测时均没有像 HPLC 那样因管路连接的接头而导致的死体积,分离中也无传

质阻力的影响,故 EOF 的流形为平流,由其驱动的分流也不发生峰展宽^[12],因此在液相分离技术中 CE 的分离能力最高^[11],理论塔板数一般为 $10^5 \sim 10^6/\text{m}$ 或更高,而 HPLC 分离中存在传质阻力及涡流扩散,泵驱动的流形呈抛物线形,普通色谱柱的理论塔板数一般在 $10^3/\text{m}$ ^[13],不超过 $10\,000/\text{m}$,而不断推出的新型色谱柱的理论塔板数也不超过 $12\,000/\text{m}$,意味着 CE 的分离柱效比 HPLC 的高 2~3 个数量级,故 CE 的峰较 HPLC 的锐^[14],如图 1-2 所示。与平板凝胶电泳(SGE)几小时的分离时间相比,其分离时间一般在几分钟至几十分钟。另外,越来越严格的排污限制,使得废液处理费用增加,而使用大量有机溶剂作为流动相的 HPLC 技术无疑增加了废液处理的成本,迫使科学家寻求产生废液少的分离技术。微量 LC 似乎是个不错的选择,然而在高压设计、低流量输送、填充色谱柱反压等技术方面的问题,阻碍了该技术的商业发展。CE 正是在这种不断增加的分离度、生物药定量的准确度及排污少的需求下应运而生。

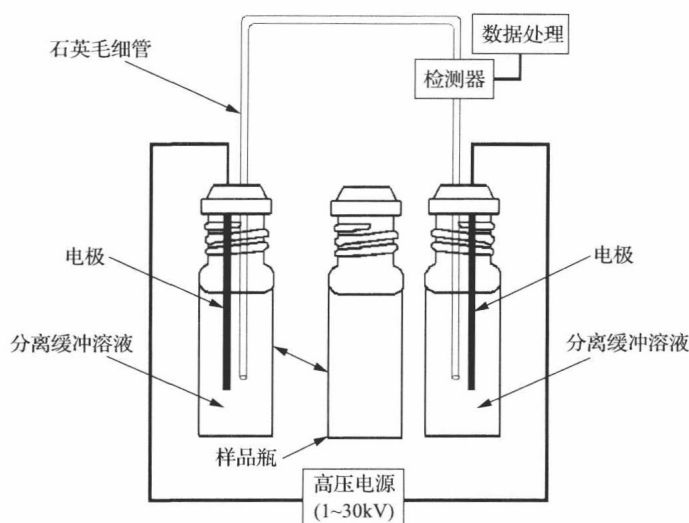


图 1-1 CE 装置示意图

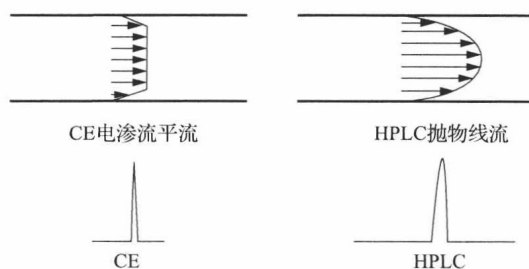


图 1-2 CE 与 HPLC 峰形比较

正是由于较 HPLC 高 2~3 个数量级的分离效率、较 HPLC 少得多的试剂消耗、较 SGE 快的分离时间,CE 于 20 世纪 90 年代初期成为分离科学中一颗耀眼的新星,吸引许多科学家进行研究,试图以此解决分离科学领域中的一些如蛋白质、手性分子及 DNA 分离等难题,被公认为 90 年代在生物分析领域中产生巨大影响的分析技术。CE 提供了快速、准确测定蛋白质、RNA 和 DNA 含量的一种手段,并已在疾病诊断、传染源确证、艾滋病毒检测中发挥重要作用^[15]。

1.2 毛细管电泳的分离模式

CE 的魅力在于其灵活变换的分离模式及检测方式。由于从事 CE 的研究者大部分都有电泳或色谱的背景,所报道的各种术语及缩写常让新手感到困惑,究竟用 CE、HPCE、毛细管区带电泳(CZE)、胶束电动色谱(MEKC)、胶束电动毛细管色谱(MECC)等哪一个称谓比较合适? 其实这些称谓均指同一个对象,即 CE。虽然 CE 是在电泳基础上发展起来的,但是其分离柱效却比电泳高很多,故用 HPCE 代替 CE,这样既与电泳区别,又强调了与 HPLC 的相似性。此处 HPLC 早已不是早期高压液相色谱的概念,而是高效液相色谱的概念^[16]。由此可见,各种分离科学,尤其是电泳及 HPLC 的理论推动了 HPCE 技术的快速发展^[17]。CE 中最常用的术语及缩写见附录 1。由附录 1 可知,MEC、MECC 及 MEKC 均是指胶束电动毛细管电泳。

尽管将 HPCE 归为色谱技术,并借用色谱的柱效 N 及分离度 R_s 来衡量 HPCE 的分离效率及选择性,但 HPCE 与色谱所用术语截然不同,如表 1-1^[18]所示。

表 1-1 HPCE 与 HPLC 所用术语的对比^[18]

| HPCE | | HPLC | |
|--------------|---|---------|------------------------|
| 中文 | 英文 | 中文 | 英文 |
| 电泳图 | Electrophorogram | 色谱图 | Chromatogram |
| 施加电压 | Applied potential | 流速 | Flow rate |
| 背景电解质或分离缓冲溶液 | Carrier electrolyte or buffer | 淋洗液或流动相 | Eluent or mobile phase |
| 进样模式(压力或电迁移) | Injection mode(hydrostatic or electromigration) | 进样器 | Injector |
| 迁移时间 | Migration time | 保留时间 | Retention time |
| 电泳淌度 | Electrophoretic mobility | 柱容量因子 | Column capacity factor |
| 速度 | Velocity | — | — |
| 电渗流 | Electroosmotic flow EOF | — | — |
| 高压电源 | High-voltage power supply | 泵 | Pump |
| 毛细管 | Capillary | 柱 | Column |

根据毛细管的种类及所用分离缓冲溶液的不同,将毛细管电泳的分离模式主要分为如下几种:毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)、胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)、毛细管凝胶电泳(capillary gel electrophoresis, CGE)、毛细管等电聚焦电泳(capillary isoelectric focusing, CIEF)、毛细管电色谱(capillary electrochromatography, CEC)、等速电泳(isotachopheresis, ITP)、电动色谱(electrokinetic chromatography, EKC)、非水毛细管电泳(non-aqueous capillary electrophoresis, NACE)和亲和毛细管电泳(affinity capillary electrophoresis, ACE)。这些分离模式的定义及原理在早期的CE论著中均有详细描述,不属本书讨论内容,中文专著可参阅中国科学院大连化学物理研究所林炳承老师的《毛细管电泳导论》^[19]、武汉大学邓延倬及何金兰老师的《高效毛细管电泳》^[20]及中国科学院化学研究所陈义老师的《毛细管电泳技术及应用》^[21]。英文专著可参阅Guzman的*Capillary Electrophoresis Technology*^[22]、Foret等的*Capillary Zone Electrophoresis*^[23]、Altria的*Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*^[24]等。其中最常用的前五种分离模式擅长分析的物质种类如表1-2^[9]所示。

表 1-2 分析各种类型物质所用的分离模式^[9]

| CZE | MEKC | CEC | CIEF | CGE |
|-----|------|-----|------|-----|
| 离子 | 小分子 | 小分子 | 肽 | 核酸 |
| 小分子 | 肽 | 肽 | 蛋白质 | |
| 肽 | | 蛋白质 | | |
| 蛋白质 | | 糖 | | |
| 糖 | | | | |

CZE及MEKC可解决CE中80%的分离问题,故本书着重讨论这两种模式的实验技术。其中CZE是最基本、最简单也是最广泛应用的模式。通常提及的CE仪器装置示意图就是基于CZE模式。用相同的仪器,通过往分离缓冲溶液中添加不同的添加剂就衍生出前面所提及的分离模式,如添加表面活性剂则成为MEKC模式、添加两性电解质则成为CIEF模式、添加筛分介质(线形或交联聚合物)则成为CGE模式^[9]。

1.3 毛细管电泳的发展简史

毛细管电泳是在电泳的基础上发展而来的。电泳被定义为荷电物质(离子)在电场中受吸引或排斥而引起的差速运动。1937年, Tiselius将电泳发展成为一种分离技术:将血清蛋白放到两段缓冲溶液中间,并施加一个外加电场,其中 α -、 β -及

γ -球蛋白将以其电荷和淌度所决定的方向和速度发生迁移而得到分离^[25]。正是因他对分离科学所做的这一贡献, Tiselius 获得了诺贝尔奖。1967年, 瑞典科学家 Hjerten 首先用内径为 3mm 的石英毛细管进行了自由溶液电泳分离^[26], 分离中因需要将毛细管沿纵轴旋转以稳定被分离的区带, 然而该装置复杂不实用。尽管如此, 后来的研究者从他使用的旋转毛细管中获得了电渗及/或温度梯度方面的知识, 这些知识为现代 CE 技术提供了有价值的参考, 至今仍在 CE 实验中发挥重要作用。Virtanen 等详细讨论了毛细管内径进一步减小为 0.2~0.5mm 的分离效率, 并计算了因毛细管内的 EOF 及焦耳热导致的扩散系数, 既从理论又从实验方面证明了区带的浓度剖面图。有人提出 EOF 可作为泵的设想^[12]。1979年, Mikkers 等首先用实验证明了自由区带电泳的浓度分布的非扩散模型, 可使分离效率达到理论值 $10^6/\text{m}$ ^[16]。并用内径为 200 μm 的聚四氟乙烯管, 实现了无机阴离子(如氯离子)的分析^[27], 这项研究成为 CZE 发展史上的第一个重大突破。

从 20 世纪 80 年代初开始, Jorgenson 和 Lukacs 使用内径为 75 μm 的耐热玻璃毛细管在 CZE 分离模式下, 用 30kV 电压分离丹磺酰氯(dansyl)衍生的氨基酸时, 每米毛细管的分离效率远超 HPLC 最高的理论塔板数($10^4/\text{m}$), 高达 $4 \times 10^5/\text{m}$ 的理论塔板数, 如图 1-3^[28]所示。HPLC 研究者惊讶于电泳图中尖锐的峰形, 而做

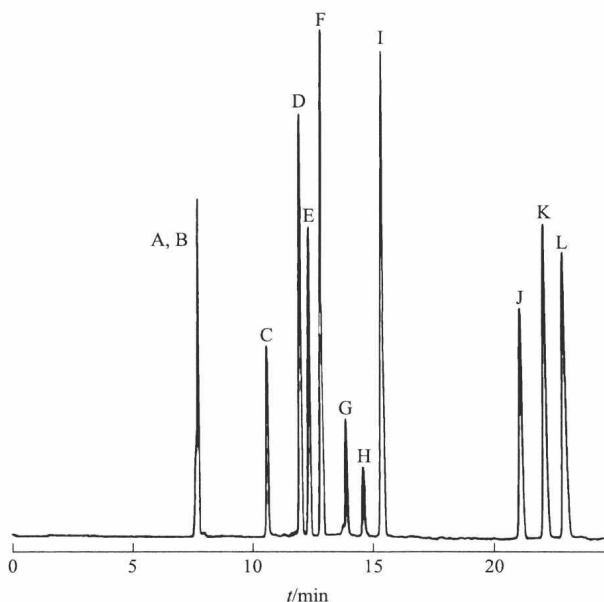


图 1-3 用内径 75 μm 耐热玻璃毛细管 CZE 分离丹磺酰氯(dansyl)衍生的氨基酸电泳图^[28]

电泳条件: 30kV; 工作电流: 100 μA ;

- A. 未知杂质; B. 丹磺酰氯-赖氨酸衍生物; C. 两分子丹磺酰氯-赖氨酸衍生物; D. 亮氨酸; E. 丝氨酸;
F. 甘氨酸; G 和 H. 未知峰; I. 两分子丹磺酰氯-胱氨酸衍生物; J. 谷氨酸; K. 天冬氨酸; L. 半胱氨酸;
每一种衍生物的浓度约为 0.6mmol/L

平板凝胶电泳者则惊讶于仅需短短 30min 即可完成一次分离,这与平板凝胶电泳经常需要几小时的时间相比无疑提高了工作效率^[29]。他们的研究工作开创了一种新型仪器分析技术——毛细管电泳(CE 或 HPCE)^[30]。

1984 年, Terabe 等将胶束引入 CE, 开创了毛细管电泳的重要分支——可实现带电与不带电的中性物质同时分离的胶束电动毛细管色谱(MEKC)^[31]。这不仅标志着 MEKC 模式的诞生,同时也标志着 CE 不能分析中性组分历史的结束^[32]。之后手性试剂环糊精被添加到分离缓冲溶液中,实现了对映体混合物的分离^[11]。1989 年,第一届国际毛细管电泳会议的召开,标志着一门新的分支学科的产生^[12]。

Laucer 采用 $\text{pH} > \text{pI}$ 的碱性载体,在 10min 内实现了标准蛋白质的分离,获得了理论塔板数高达 $10^6/\text{m}$ 的分离柱效,引起了致力于生物大分子分析但又难以找到理想方法的许多色谱界专家的注意^[32]。

为生物大分子分析而生的 CE,提供了一种快速、高效、准确测定蛋白质和核酸的手段,顺应了人类发展生命科学的迫切愿望,随即在世界范围内全面铺开了 CE 的研究,其速度之快,影响之大,足以和 20 世纪 50 年代末的 GC 或 60 年代末的 HPLC 相比^[33]。若放在百年色谱的历史长河中,CE 属于“80 后”。与已经取得巨大成功的“50 后”的 GC 及“60 后”的 HPLC 相比,CE 仍有一些不足之处。例如,利用紫外检测时,若不对样品进行前处理,浓度检测灵敏度不足以满足生物样品中痕量组分的分析^[16];不适合测定 GC 擅长的低相对分子质量且易挥发性的化合物;也不适合测定不带电荷的高分子聚合物等。

尽管如此,创立于 20 世纪 80 年代初期的 CE 具有以下优点:广泛的分析对象^[34](从小的无机离子到整个细胞,具有“万能”分析功能或潜力);多样化的分离模式(CZE、MEKC、CGE、CIEF、NACE 等);多种类型的检测系统(包括质谱);高的分离效率(理论塔板数可达上百万);高的灵敏度[用最灵敏的检测器,可使绝对灵敏度低至飞(10^{-15})摩尔,甚至仄(10^{-21})摩尔];可忽略的样品消耗(nL)及每天不过几毫升的溶液消耗;简单的仪器操作及费用低的维护与运行成本;简化到极限的样品制备方法(在某些情况下,简化到仅限于除去可能阻塞毛细管的颗粒物^[35]);标准化的分离柱(聚酰亚胺涂层和熔融硅石英毛细管)。因此 CE 得到迅速发展,在分析化学、药物分析、生化分析及分子生物学等领域获青睐,并从最初的生物大分子分析扩展到无机离子分析,成为 HPLC 及 IC 强有力的竞争者,是分析化学和分析生物化学界公认的前沿,在生命科学的研究中也显示出了独到的优势。例如,始于 1990 年的人类基因组工程的测序工作较原计划的 15 年提前四年完成。高通量、自动化的基于 CGE 原理的基因测序仪功不可没,因为基因测序 80% 的原始数据由基因测序仪完成^[36]。可见,专门用于 DNA 分析的毛细管电泳系统已经取得了巨大成功,并在 DNA 分析中获得广泛应用,允许最著名机构及世界范围内的无数基因研究中心利用基因测序仪提供合法的医学检验^[9]。此部分内容已超出

本书的讨论范围,感兴趣的读者可参考相关文献。

Science 和 *Nature* 也会定期发表关于 CE 的论文:1983 年 *Science* 刊登了 Jorgenson 和 Lukacs 发表的关于 CE 的开创性文章^[37];1988 年 *Nature* 刊登了最早的一篇 CE 与质谱(MS)联用的文章^[38];1989 年 *Nature* 刊登了宣告 CE 技术成熟的一篇论文^[39],此时各个仪器公司纷纷推出商品化的仪器;2002 年 *Science* 刊登了对 CE 技术回顾与展望的论文^[40];2011 年 *Nature* 的一篇文章对 DNA 测序技术进行了回顾与展望^[41]。

在 CE 技术发展的初期,全世界范围内的研究小组均各自搭建 CE 系统,自搭建仪器灵活方便、价格低廉,加之一些研究小组受所在国家政策及经济形势(大幅削减基础学科研究经费)的影响,例如,CE 的崛起正好赶上东欧政治变革,在缺乏购买大量有机溶剂及各种零部件经费的情况下,几乎不可能用 HPLC 进行研究。另外,自己搭建仪器相对容易,利用旧彩色电视机的高压电源及旧 HPLC 的检测器搭成的仪器,就可以做出有一定竞争力的研究工作^[42]。

直至今日,仍有一些研究小组自己搭建仪器进行研究。然而,进样重现性的结果不十分理想^[29],故不建议将自己搭建的仪器用于常规分析。商品化的毛细管电泳仪出现于 20 世纪 80 年代末 90 年代初,因其分离原理与 HPLC 及 GC 截然不同^[43]且对环境友好,故被仪器制造商及使用者寄予很高的期望。其先被定位在与 HPLC 竞争的位置上^[44],在不久的将来取代 HPLC 及 IC 而成为液相分离的基本技术,并被厂商夸大宣传为“万能”仪器。国内外纷纷推出自动化性能指标都较完善的商品化 CE 仪器,以期在市场上抢得先机。Kuhn 和 Hoffstetter-Kuhn 总结了截止到 1993 年,国外市场上出现的 12 个生产厂家的 15 种型号的商用毛细管电泳仪的主要性能及优缺点^[16],如 Bio-Rad 的 Bio Focus 3000,Beckman 的 P/ACE 2010,Agilent 科技(原惠普公司的一部分)HP^{3D},Waters 的 Quanta 4000,Dionex 的 CES-1,ISCO 的 3140 型,LauerLabs 的 Prince、Applied BioSystem 的 270A 等。与国外众多的生产厂家相比,国内生产厂家则显得不多,主要有:北京新技术应用研究所于 1995 年推出我国第一台新型商品化仪器 1229;保定天惠分离科学研究所于 1996 年推出 TH-1000;北京彩陆科学仪器有限公司于 1997 年推出 CL1010、CL2001 型高效毛细管电泳仪;西安瑞迈电子科技有限公司与中国科学院长春应用化学研究所于 2003 年合作研发成功的可用于药物、氨基酸、多肽、蛋白质及核酸等检测分析,以及研究蛋白质与药物、核酸相互作用的 MPI-B 毛细管电泳电化学发光检测仪。

然而,由于购买 CE 后的使用及维护成本低,急于推出 CE 仪器的公司并没有获得所需的维持公司继续发展的利润^[11],并且有些品牌的毛细管电泳仪在温度控制及进样系统等方面考虑不足,以致给使用人员“重现性不好”的印象,解决常规实验室的实际分析问题还未如早期研究论文所预期的那样普遍^[29]。90 年代中期,