



華夏英才基金學術文庫

罗国安 王义明 著
陈令新 梁琼麟

毛细管电色谱及其 在生命科学中的应用



科学出版社

www.sciencep.com



华夏英才基金学术文库

毛细管电色谱及其 在生命科学中的应用

罗国安 王义明 著
陈令新 梁琼麟

科学出版社

北京

内 容 简 介

毛细管电色谱是近年发展起来的一种新型微分离分析技术,它整合了毛细管电泳与微径柱液相色谱的优点,通过在填充微细颗粒液相色谱填料的微径柱色谱柱两端施加直流高压电场,达到其对痕量复杂生物及化学体系样品优越的分离能力。本书是作者及其研究生近年来从事毛细管电色谱领域研究工作的积累和总结,介绍了毛细管电色谱基本原理、分离机理和分离行为,各类毛细管柱的制备方法和性能评价,加压毛细管电色谱仪的研制以及一些应用实例。

本书可供大专院校化学、生物等专业的高年级学生及研究生和科研人员参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

毛细管电色谱及其在生命科学中的应用/罗国安等著. —北京:科学出版社, 2005

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 7-03-016133-5

I. 毛… II. 罗… III. ①毛细管色谱-理论研究②毛细管色谱-应用-生命科学 IV. ①0657.7②Q10

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 091167 号

责任编辑: 黄 海 刘俊来/责任校对: 宋玲玲

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 陈 敬

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>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年9月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2005年9月第一次印刷 印张: 14 1/2

印数: 1—3 000 字数: 268 000

定价: 42.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

前 言

毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 的发展首先是由电色谱开始的。最早可追溯到 20 世纪 50 年代, Mould 和 Synge 将电场应用到薄层色谱, 分离了胶棉中的多糖成分。1974 年 Pretorius 等首次将电场引入到微柱高效液相色谱, 在内径 1 mm 的填充柱上实现电色谱, 显示出以电渗流 (electroosmotic flow, EOF) 作为流动相推动力进行分离的优势。但由于所加电场过低, 致使分离时间偏长, 故未引起足够的关注。直至 1981 年 Jorgenson 等在开创现代毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 的里程碑论文中, 除了提出毛细管区带电泳分离模式外, 还提出了毛细管电色谱分离模式, 即在 $170\ \mu\text{m}$ (i.d.) $\times$ 65 cm 的石英毛细管内, 填充 $10\ \mu\text{m}$ ODS 填料, 在电场作用下成功分离了毛细管区带电泳难于分离的两种中性芳香化合物, 9-甲基蒽和芘, 获得了 31 000 理论塔板数的柱效, 展现了现代毛细管电色谱的高柱效和高选择性。20 世纪 80 年代中, 毛细管电泳其他分离模式发展迅速, 而毛细管电色谱因其填充柱制备上的困难, 发展较慢。直到 20 世纪 90 年代初, 毛细管填充柱制备技术获得突破和大批液相色谱专家介入 CEC 领域, 使毛细管电色谱在 20 世纪 90 年代得到快速增长, 现已成为毛细管电泳中最重要的分离模式之一。

所谓的毛细管电色谱是指在毛细管中填充或在毛细管壁上涂布、键合固定相, 用电渗流驱动的微柱液相色谱技术。它属于电分离方法的一种, 分离是通过溶质在固定相和流动相之间的分配和自身电泳淌度的差异而实现的。毛细管电色谱克服了 CE 分离中性物质选择性差的缺点, 又大大提高了色谱的分离效率, 即把毛细管电泳 (CE) 技术的高柱效和高效液相色谱 (HPLC) 的选择性 (由大量可供选择的固定相) 有机地结合, 形成了一种新的分离技术, 开辟了高效微分离技术的新途径。由于其自身优点, CEC 得到了分离工作者的青睐, 在色谱领域日显重要。

本书共分八章, 主要分为四大部分: 第一部分 (第二~四章) 主要介绍毛细管电色谱基本理论 (包括基本原理、保留机理和分离行为等); 第二部分 (第五章) 介绍各类毛细管电色谱柱的制备及其性能评价; 第三部分 (第六章) 介绍了达到国际先进水平的加压毛细管电色谱仪器的设计和研制; 第四部分 (第七~八章) 为毛细管电色谱在生命科学中的应用, 主要介绍 CEC 在蛋白质、DNA 分析, 药物分析和毒物分析等方面的应用。

本书大部分内容为实验室近年来从事毛细管电色谱领域研究工作的积累,

得到了国家自然科学基金重点项目、面上项目和科技部“九五”攻关项目的资助，曾在本实验室攻读博士、硕士学位的魏伟、王清刚、茹钦华、颜流水、姚珈等参加了课题的研究。部分研究工作得到阎超博士的大力合作和支持，在此一并表示感谢。

由于水平有限，书中可能还有不少错误，恳请读者指正，以利于修改提高。

目 录

前言

第一章 引言	1
1.1 毛细管电色谱及毛细管电泳的发展简史	1
1.1.1 毛细管电色谱的发展简史	1
1.1.2 毛细管电泳的发展简史	3
1.2 毛细管电色谱及毛细管电泳在生命科学中的应用	5
1.2.1 毛细管电色谱在生命科学中的应用	5
1.2.2 毛细管电泳在生命科学中的应用	6
1.3 毛细管电色谱及毛细管电泳的发展方向	9
1.3.1 毛细管电色谱中的新技术	9
1.3.2 毛细管电泳的发展方向	11
1.3.3 毛细管电色谱相关新技术	13
1.4 本书主要内容	13
参考文献	13
第二章 毛细管电色谱的基本原理	26
2.1 毛细管电色谱的含义、分类和本质	26
2.1.1 毛细管电色谱的含义	26
2.1.2 毛细管电色谱的分离模式	27
2.1.3 毛细管电色谱法与高效液相色谱法比较	28
2.2 毛细管电色谱的基本原理和特点	29
2.2.1 填充毛细管中电渗流的行为	29
2.2.2 毛细管电色谱保留机理	31
2.2.3 毛细管电色谱区带扩张和柱效评估	31
2.3 毛细管电色谱面临的问题	33
2.3.1 焦耳热效应	33
2.3.2 塞子效应	34
2.3.3 气泡问题	34
2.4 毛细管电色谱实验技术的发展	35
2.4.1 毛细管电色谱质谱联用技术	35
2.4.2 毛细管电色谱梯度洗脱技术	35

2.4.3 毛细管电色谱的富集技术·····	36
2.4.4 毛细管电色谱的其他相关技术·····	36
2.4.5 毛细管电色谱的应用研究·····	36
参考文献·····	37
第三章 毛细管电色谱保留机理 ·····	40
3.1 毛细管电色谱的一般保留方程·····	40
3.2 中性溶质毛细管电色谱的保留机理·····	42
3.2.1 基本原理·····	42
3.2.2 根据流动相的 $E_T(30)$ 值预测保留·····	43
3.2.3 根据溶质的溶剂显色特征参数预测保留·····	44
3.2.4 盐效应对中性溶质保留的影响·····	46
3.3 带电溶质毛细管电色谱的保留机理·····	46
3.3.1 基本原理·····	47
3.3.2 带电溶质的电色谱保留方程实验验证·····	47
3.4 加压毛细管电色谱的分离机理·····	50
3.4.1 加压毛细管电色谱分离机理的实验研究·····	51
3.4.2 正向加压毛细管电色谱中影响分离的决定因素·····	52
3.4.3 反向加压毛细管电色谱中影响分离的决定因素·····	56
3.4.4 正向负压毛细管电色谱中影响分离的决定因素·····	58
3.5 小结·····	60
参考文献·····	61
第四章 毛细管电色谱的分离行为 ·····	63
4.1 毛细管反相电色谱的分离行为·····	63
4.1.1 电渗流与电压的关系·····	64
4.1.2 电渗流与电解质浓度的关系·····	64
4.1.3 流动相的 pH 值对电渗流的影响·····	65
4.1.4 有机改性剂对电渗流的影响·····	66
4.1.5 电渗流与温度的关系·····	67
4.2 毛细管正相电色谱的分离行为·····	69
4.2.1 氰基填料电色谱的分离行为·····	70
4.2.2 硅胶填料电色谱的分离行为·····	74
4.3 毛细管离子交换电色谱的分离行为·····	81
4.3.1 离子交换电色谱分离行为·····	81
4.3.2 柱效·····	84
4.3.3 流动相的 pH 对溶质迁移的影响·····	85

4.3.4 电压对分离的影响·····	86
4.3.5 有机改性剂对分离的影响·····	87
4.3.6 实验重现性的考察·····	88
4.4 不同类型填充柱电色谱柱效的评价·····	89
4.4.1 电色谱中 Van Deemter 方程·····	89
4.4.2 不同填充色谱柱上柱效的比较·····	90
参考文献·····	92
第五章 毛细管电色谱柱的制备及其性能评价 ·····	95
5.1 毛细管开管柱·····	95
5.2 毛细管具塞式填充柱·····	97
5.2.1 填充材料·····	97
5.2.2 塞子和气泡问题·····	99
5.2.3 电色谱柱的电填充方法及柱性能评价·····	99
5.3 毛细管电色谱无塞式填充柱·····	108
5.3.1 无塞式填充柱的制备方法·····	108
5.3.2 无塞式填充柱性能的表征·····	110
5.4 毛细管电色谱整体柱·····	113
5.4.1 聚合物连续床层毛细管整体柱·····	114
5.4.2 二氧化硅连续床层整体柱·····	116
5.4.3 以填充柱为基础连续床层整体柱·····	116
5.5 毛细管分子印迹整体柱·····	117
5.5.1 影响分子印迹毛细管整体柱分离性能的主要因素·····	118
5.5.2 光聚合整体式咖啡因印迹毛细管柱制备及分离性能·····	120
5.6 毛细管手性色谱柱·····	125
参考文献·····	126
第六章 加压毛细管电色谱仪 ·····	132
6.1 分析仪器现状和电色谱仪的研制背景·····	132
6.1.1 分析仪器发展的现状和方向·····	132
6.1.2 加压毛细管电色谱仪研制意义·····	133
6.1.3 加压/梯度毛细管电色谱仪研制要求·····	135
6.2 总体设计·····	135
6.2.1 设计思路·····	135
6.2.2 系统结构·····	136
6.2.3 控制系统硬件·····	139
6.2.4 控制系统软件·····	142

6.3 进样及分离系统设计	143
6.3.1 毛细管电色谱仪面临的问题	143
6.3.2 进样系统	144
6.3.3 分流器	145
6.3.4 抑制气泡的产生	146
6.3.5 进样及分离系统流路	147
6.4 控制系统硬件	147
6.4.1 单片机系统	147
6.4.2 高压电源	152
6.5 控制系统软件	154
6.5.1 单片机控制软件主程序	154
6.5.2 功能模块的实现	156
6.5.3 PC 机色谱工作站软件的设计	157
6.6 整体加压毛细管电色谱仪指标	159
6.7 梯度毛细管电色谱仪的改进	160
参考文献	161
第七章 毛细管电色谱在生物及医药分析中的应用	163
7.1 加压/梯度毛细管电色谱对十八种氨基酸的定量分析	163
7.1.1 十八种氨基酸分离条件的优化	163
7.1.2 对影响峰展宽因素的控制	169
7.1.3 十八种氨基酸的定量分析方法	172
7.2 毛细管电色谱在 DNA 分析中的应用	177
7.3 毛细管电色谱在药物分析中应用	179
7.3.1 分子印迹毛细管整体柱液相色谱法测定咖啡因	179
7.3.2 毛细管电色谱梯度洗脱分离大黄提取液中五种蒽醌类化合物	181
7.3.3 其他药物分析的应用	187
参考文献	189
第八章 毛细管电色谱在手性分离中的应用	195
8.1 毛细管电色谱用于手性分离	195
8.1.1 硅胶填充柱电色谱手性分离的研究	196
8.1.2 硅胶填充柱电色谱手性分离结果	197
8.1.3 HP- β -CD 的浓度对分离度的影响	199
8.1.4 流动相的 pH 值对分离度的影响	200
8.1.5 流动相的 pH 值对迁移时间的影响	201
8.1.6 离子强度对分离度的影响	201

8.1.7 有机改性剂对分离度的影响	202
8.1.8 温度对分离的影响	203
8.2 毛细管区带电泳手性分离	204
8.2.1 毛细管区带电泳手性分离 β -氨基醇	205
8.2.2 CD 的类型对分离的影响	207
8.2.3 DM- β -CD 的浓度对分离度的影响	207
8.2.4 流动相的 pH 值对分离度的影响	208
8.2.5 离子强度对分离度的影响	209
8.3 小结	210
参考文献	210
后记	213

第一章 引言

毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 的产生、发展和毛细管电泳的发展密不可分。早在 1981 年, 在 Jorgenson 等开创现代毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 的里程碑论文中, 就提出了毛细管区带电泳分离模式和毛细管电色谱分离模式。目前国内外的相关文献仍然把毛细管电色谱归为电泳的一类模式, 其主要依据是它们都是用电驱动代替压力驱动, 具有很多相似性。电色谱和电泳区别并不大, 以电色谱的两种模式——填充毛细管电色谱 (packed capillary electrochromatography, pCEC) 和开管毛细管电色谱 (open capillary electrochromatography, oCEC) 为例: pCEC 需要在毛细管中填充色谱填料, 利用色谱填料的分配作用和电动流 (电渗流和电泳流) 的共同作用达到分离混合物的目的, 因而具备了毛细管液相色谱的选择性好和高效毛细管电泳的柱效高的特点, 成为一种迅速发展的色谱分离模式; oCEC 一般是通过化学的/物理的方法修饰毛细管壁, 使通道壁可以起到液相色谱填料的作用, 它本质上属于电泳模式。20 世纪 80 年代中, 毛细管电泳其他分离模式发展迅速, 而毛细管电色谱因其填充柱制备上的困难 (这期间主要是 oCEC 模式), 发展较慢。直到 20 世纪 90 年代初, 毛细管填充柱制备技术获得突破和大批液相色谱专家介入 CEC 领域, 使毛细管电色谱得到快速增长, 现已成为毛细管电泳中最重要的分离模式之一。本章主要总结评述了毛细管电色谱及毛细管电泳的发展简史及其在生命科学中的应用。

1.1 毛细管电色谱及毛细管电泳的发展简史

1.1.1 毛细管电色谱的发展简史

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^[1]。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^[2], 但该文章当时并未引起足够的关注。

1981 年, Jorgenson 和 Lukacs 在 170 μm 内径的毛细管中填充了 10 μm 粒径的 Partisil ODS-2, 在电场作用下成功地分离了 9-甲基蒽和芘, 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^[3]。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^[4]。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^[5,6]。

1987年和1988年, Knox 和 Grand 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,还对毛细管电色谱中的双电层现象进行了系统的研究^[7,8]。

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^[9]。

1991年, Knox 和 Grand 从理论上探讨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,对其发展的毛细管电色谱理论进行了完善^[10]。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^[11]。

1992年, Mayer 等人首次在毛细管电色谱开管柱上实现了抗感染药物的对映体拆分^[12]。

1993年, Li 等人利用 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^[13]。

1994年, Smith 和 Evans 分别采用 $1.5\ \mu\text{m}$ 和 $3\ \mu\text{m}$ 粒径的 ODS 以及 $3\ \mu\text{m}$ 的 SCX 固定相进行药物分离,获得了 $0.9\sim 2$ 以及 0.04 的折合塔板高度^[14,15]。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^[16]。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,并利用该技术成功地分离了寡聚核苷酸^[17]。Jacobson 等人也于同年制作了第一个毛细管电色谱芯片^[18]。

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^[19]。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^[20]。

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 16 种多环芳烃^[21]。同年, Fujimoto 等人首次制备了连续床层毛细管电色谱柱^[22]。

1997年, Horvath 等人对毛细管电色谱的动力进行了系统的研究,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^[23]。Stahlberg 也对毛细管电色谱中的区带迁移理论进行了研究^[24]。

1998年, 罗国安等人考察了强阳离子交换柱^[25]、正相硅胶柱对不同样品的分离^[26], 并深入地研究了反相电色谱的分离机理^[27]。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^[28]。Bayer等人首次实现了毛细管电色谱与核磁共振的联用^[29]。

1999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^[30]。罗国安等人在硅胶柱上实现了毛细管电色谱的手性拆分^[31]。Pope等人研究了大孔填料在毛细管电色谱填充柱中的性能和应用^[32]。张玉奎和邹汉法等人提出了毛细管电色谱混合填充柱技术和固定相动态吸附技术^[33, 34]。

2000年, Liu等人实现了毛细管电色谱和 ICP-MS 的联用技术, 并应用于金属离子的分析中^[35]。此外, Hjerten等人还制备了连续床层毛细管电色谱的芯片^[36]。

总之, 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有了很大的发展。目前, 已有多篇毛细管电色谱的综述和专题讨论发表^[37~47], 并出现了商业化产品。

1.1.2 毛细管电泳的发展简史

与此同时, 科学家们在毛细管电泳领域也开展了广泛、深入的研究。与毛细管电色谱相同的是, 毛细管电泳也是以在毛细管两端施加高电压来实现对样品的分离, 并进行柱上检测。与毛细管电色谱不同的是, 在毛细管电泳中分离多采用融硅毛细管或涂层毛细管, 而不是采用填充柱。因此, 毛细管电泳分析的范围和分离的原理都与毛细管电色谱有很大不同。

从毛细管电泳的发展角度来看, 最早利用窄孔径管作为电泳分离的报告可追溯到1942年 Martin的工作^[48], 他用称为置换电泳的方法分离了4种有机酸。20年后, Konstantinov等人^[48]继 Tiselius等人的工作, 描述了一个基于移动界面法分离, 用照相法测定的方法。与此同时, 等速电泳权威 Everaerts^[48]在《等速电泳》一书中, 提出了在毛细管中进行电泳分离的基本原则, 描述了分离区带在线检测的方法。

对高效毛细管电泳最具启发性的工作首推 Hjerten 于1967年发表的一篇讨论仪器的论文^[48]。他最早提出用窄孔径管在高电场下进行自由溶液电泳, 并用内壁有甲基纤维素涂层、内径为3 mm的石英玻璃管在慢速旋转下分离, 用紫外检测, 成功地证实了他的设想。此仪器可用于无机和有机离子、多肽、蛋白质、核酸、病毒和细菌的分离, 能高精度测定淌度, 亦可用于等电聚焦和等速电泳, 但操作麻烦。

1970年, Everaerts^[48]在等速电泳系统上得到区带电泳的结果, 操作简便,

但效率差。1974年, Virtenan^[48]用 200~500 μm 毛细管分离、电位滴定法检测, 扩展了 Hjerten 的方法, 但因所用电压太低 ($<5\text{ kV/m}$), 分离效率不高。同年, Pretorius 等人^[48]证实, 电渗可以充作一个泵用于毛细管分离。

1979年, Mikkers 和 Everaerts 等^[49]研究了毛细管区带电泳中的区带与背景电场差异的理论问题, 提出用毛细管来抑制对流并增强散热效果的方案。但该小组在高效区带电泳方面的出色工作并未引起分离科学家的足够兴趣与注意。真正令人兴奋的是 1981年 Jorgenson 和 Lukacs 发表的研究工作^[50]。他们用 75 μm 玻璃毛细管, 用电迁移法窄带进样, 选用丹酰化氨基酸作为样品, 用灵敏的荧光检测, 得到快速和高效分离, 峰形对称, 理论塔板数超过 400 000/m, 这是以前任何分离方法从未达到的柱效。而且, 简单的计算还表明, 区带增宽仅仅来自样品的分子扩散。他们还进一步推论, 如果维持分子扩散为 CZE 中区带增宽的唯一机理, 那么, 生物大分子如蛋白质的分离将会在短时间内获得惊人的效率。正是由于他们十分成功的实验和异常出色的理论工作, 轰动了分离科学界, 激起了人们的巨大反响, 成为高效毛细管电泳划时代的里程碑。因为人们从中看到了这一新技术将会给生物大分子的分离技术带来革命性变化。

1983年, Jorgenson^[51]进一步制备了内涂层毛细管, 减少了对溶质的吸附。Hjerten^[52]首先将聚丙烯酰胺凝胶毛细管用于毛细管电泳分离, 发展了毛细管凝胶电泳 (CGE)。由于 CGE 具有极高的分辨能力, 很快受到人们的青睐。Cohen 等最先用 CGE 分离了蛋白碎片^[53]。CGE 分离和 LIF 检测相结合, 成为 DNA 快速序列分析的优选方案^[54]。

1984年, Terabe^[55]等人在毛细管电泳电解质溶液中加入离子表面活性剂, 在溶液中形成离子胶束作假固定相, 实现了中性分子的分离, 这个模式称为胶束电动色谱 (MEKC)。这一新的色谱与电泳结合的模式, 经过 Terabe 和其他人的多年研究, 又相继发展出环糊精 EKC^[56]、离子交换 EKC^[56]和微乳胶 EKC^[57]等。MEKC 目前已经成为应用非常广泛的电泳模式之一。

1985年, Hjerten 又将等电聚焦 (IEF) 电泳方法引进毛细管电泳分离^[58], 使毛细管等电聚焦技术 (CIEF) 在蛋白质分离中成为一个强有力的微柱分离分析工具, 达到能分辨等电点仅相差 0.01 pH 的高分辨率水平。

1987年, Smith 等^[59]通过电喷射接口将质谱与毛细管电泳联用, 获得有关样品的分子结构信息。进一步采用基体辅助激光解吸电离/质谱法, 得到分子质量高达 190 000 Da 的生物大分子的准确分子量及其结构信息。

1987年, Wallingford 和 Ewing^[60]将电化学方法引入毛细管电泳检测, 并用超微电极进行了单细胞的现场毛细管电泳分离和检测。

20 世纪 80 年代末, 大量的工作集中在对毛细管电泳进样方式的改进上^[61]。随着自动进样装置的研制成功和低浓度进样技术的实现, 毛细管电泳仪器商品

化、全自动化的道路被彻底铺平。

进入 20 世纪 90 年代后, Applied Biosystem, Beckman Inc., Bio-Rad, Colomex, Dionex, Waters 和 Spectra Physics 等各大仪器公司分别推出不同型号、具有不同的检测器的毛细管电泳商品仪器。90 年代初, 伴随着微型制造技术的发展, 微型毛细管电泳芯片^[62, 63]的出现更被认为是毛细管电泳技术上的一大突破。

迄今为止, 毛细管电泳技术无论是在基础理论研究还是在应用范围的拓宽方面都取得了长足的进步, 毛细管电泳领域每年发表的科研论文也成指数上升, 毛细管电泳领域的学术交流活动频繁活跃。国际毛细管电泳大会 (HPCE) 自 1989 年来每年召开一次; 分析化学和应用光谱中规模最大的国际学术会议——匹兹堡会议自 1990 年起也专门开辟了毛细管电泳专题组; 亚太地区的毛细管电泳盛会 APCE 自 1996 年起每两年召开一次; 而我国的毛细管电泳报告会从 1993 年起每两年召开一次。

所有一切都说明, 毛细管电泳及毛细管电色谱技术, 作为年轻的分离分析技术, 正充满活力地飞速发展着。而这个领域的飞速发展在基因组计划的完成和蛋白组计划的实现中占据着无法替代的地位, 起着巨大的推动作用。

1.2 毛细管电色谱及毛细管电泳在生命科学中的应用

1.2.1 毛细管电色谱在生命科学中的应用

毛细管电色谱在生命科学中的应用主要包括药物分析、手性拆分和生物样品分析三个方面, 从而显示出毛细管电色谱在生命科学中的巨大应用前景。

1.2.1.1 毛细管电色谱在药物分析中的应用

药物分析主要包括药物分析和药物及其残质分析。Paterson 等人利用毛细管电色谱和质谱联用技术对血浆中的药物进行了定量分析^[64]。Smith 等人采用离子交换电色谱柱分离了中性和强极性药物, 获得了 8 000 000 塔板数/m 的柱效^[15]。Angus 等人在不同的电色谱填充柱上对极性药物的分离作了比较研究^[65]。他们还采用小粒径的无孔填料实现了药物的快速分析^[66]。Lurie 等人在 C₈ 柱上同时分离了酸性、碱性和中性药物^[67]。Lai 等人采用正相毛细管电色谱分离了咖啡因等违禁药物^[68]。Meyring 等人利用毛细管电色谱研究了镇静剂 R-(+)-thalidomide 的在线生物转化^[69]。Zare 等人采用无孔填料在 2.5 min 内分离了 6 个结构相近的镇静剂, 获得了比毛细管区带电泳和胶束电动色谱都好的分离效果^[70]。Pesek 等人利用开管毛细管电色谱分离了抗生素, 实验结果好于开管液

相色谱^[71]。

Smith 等人采用反相固定相对药物 Fluticasone propionate 和其相关杂质进行了分离^[14]。Hilhorst 等人在反相电色谱中, 通过向流动相中添加胺类化合物分离了碱性药物 Fluvoxamine 及其杂质^[72]。Reilly 等人通过对 Lilly 化合物 ly300164 和其相关杂质的分析, 认为毛细管电色谱完全可以在药物及其杂质分析中成为与高效液相色谱和毛细管电泳互相验证的分析技术^[73]。

1.2.1.2 毛细管电色谱在手性拆分中的应用

手性拆分主要有两种模式: 手性固定相-非手性流动相和手性流动相-非手性固定相。

目前常用的手性固定相有环糊精^[31, 74, 75]、分子印迹固定相^[76, 77]、Chirasil-Dex 涂层或修饰的固定相^[78, 79]、奎宁修饰的手性固定相^[80, 81]、大环抗生素固定相^[82, 83]、聚丙烯酰胺和多糖衍生的手性固定相^[84]、纤维素涂层^[85]、聚合物固定相^[86]、刷型手性固定相^[87]和蛋白质^[13, 88]。

常用的流动相手性添加剂有环糊精^[13, 89, 90]和奎宁氨基甲酸盐^[91]等。

除选择适当的手性固定相或添加剂外, 各类操作参数, 如电压、流动相中有有机相改性剂含量、电解质浓度等都会对对映体的分离度产生影响。因此, 要想获得满意的拆分效果必须对上述因素进行优化。

1.2.1.3 毛细管电色谱在生物样品分析中的应用

当采用梯度洗脱技术^[92]、与质谱联用技术^[93]、热光吸收检测器^[94]以及无孔 ODS 快速分析^[95]等方法时, 毛细管电色谱可成功地实现氨基酸分析。此外, 毛细管电色谱还被应用于肽^[96~101]、蛋白质^[102~107]、核苷酸^[17]和 DNA 添加剂^[108~111]等的分析中。

尽管毛细管电色谱在生命分析中的应用飞速发展, 但还存在着诸如气泡产生、柱子易断、检测灵敏度低、填料种类有限等问题。最为严重的是, 在分离大分子生物样品中, 如蛋白质、寡聚核苷酸、长链 DNA 时, 还存在着方法匮乏、重现性差等问题。而这恰好是毛细管电泳的强项, 因此两种方法将在很长的一段时间内保持互为补充的关系。

1.2.2 毛细管电泳在生命科学中的应用

毛细管电泳因其自身的分离特点决定它在生命科学中, 尤其是对生物大分子

的分离和分析中起着不可替代的作用。它在生命分析中的应用主要包括对氨基酸、蛋白质、多肽、核酸、对映体和药物的分离。

1.2.2.1 毛细管电泳在氨基酸分析中的应用

对氨基酸的分析主要包括荧光衍生分析、非荧光衍生分析和间接分析三种方法。其中, Dovichi 小组采用四甲基罗丹明异硫氰酸盐 (TRITC) 和四甲基罗丹明硫代氨基甲酰 (TRTC) 衍生氨基酸^[112]后进行荧光检测, 检测限最低可达 1zmol。他们还采用非荧光衍生法对乙内酰苯硫脲 (PTH) 氨基酸衍生物作紫外吸收检测, 检测限约为 100fmol^[112]。氨基酸间接分析避免了对氨基酸进行荧光衍生, 检测限也可达 amol 级^[113]。

1.2.2.2 毛细管电泳在多肽分析中的应用

毛细管电泳分离肽的方法主要包括毛细管区带电泳 (CZE)^[114]、胶束电动色谱 (MECC) 模式^[115]、衍生检测^[116, 117]和质谱检测^[118, 119]等方法。这些工作都围绕着提高灵敏度、改善分辨率的宗旨不断改善多肽分离、分析的方法。

1.2.2.3 毛细管电泳在蛋白质分析中的应用

和氨基酸、多肽分离一样, 在毛细管电泳的蛋白质分离中同样存在着管壁吸附严重干扰分离的问题。针对于此, 大量的涂层材料被用来尝试进行各种毛细管内壁涂层修饰。继 Jorgenson^[51]采用缩合丙氧基和 Hjerten^[58]采用甲基纤维素、聚丙烯酰胺尝试涂层毛细管之后, Poppen^[120, 121]还采用聚乙二醇、麦芽糖和环氧二醇进行涂层。此外还有用聚亚乙基亚胺^[122]、聚醚^[123]进行涂层的报道。但涂层技术始终存在着重现性差、制备复杂等缺点。除此以外, 还有采用动态去活、添加阳离子表面活性剂和采用高离子强度和两性离子等的分离蛋白质的毛细管电泳方法。所谓动态去活就是在缓冲溶液中添加非离子表面活性剂。将聚氧乙烯、聚乙烯醇、TWEEN 和 BRIJ 等非离子表面活性剂添加到缓冲溶液中, 电泳过程中在分离柱表面形成一亲水表层, 从而对生物大分子具有排斥作用^[124, 125]。这种方法获得了较好的分辨率。而添加阳离子表面活性剂是使分离柱表面电荷为正, 适于生理条件下碱性蛋白的分离^[126]。至于采用高离子强度和两性离子, 主要是希望依靠竞争效应抑制蛋白质吸附。但如果盐浓度过高, 势必导致体系电导率增加, 使分离电压受到限制。而选用两性离子时, 还要考虑两性离子存在的酸度范围、所在缓冲体系的溶解度和是否使蛋白质变性等问题。因此到目前为止,