



毛细管电泳 在药物分析中的应用

刘春叶 著

西北工业大学出版社

毛细管电泳在药物分析中的应用

刘春叶 著

西北工业大学出版社

【内容简介】 本书从毛细管电泳(CE)的基本原理讲起,阐述了毛细管电泳的分离特性、分离模式、仪器结构及使用等基本知识,以此为基础,介绍了其在药物分析方法的建立及评价、药品质量控制中的应用、化学及生物药品分析、中药分析及中药制剂分析、手性药物分离等方面的应用,同时,还对其在临床样品分析中的应用进行了介绍。全书共分七章,两大部分。第一部分包括第1章至第4章,重点介绍毛细管电泳基本理论和技术、分离模式等;第二部分包括第5章至第7章,主要介绍毛细管电泳技术在药物分析中的应用,分别从毛细管电泳在药物分析方法的建立及评价、药品质量控制、手性药物的分离等方面的应用进行了详细论述。

图书在版编目(CIP)数据

毛细管电泳在药物分析中的应用/刘春叶著. —西安:西北工业大学出版社, 2013. 9
ISBN 978-7-5612-3838-7

I. ①毛… II. ①刘… III. ①毛细管—电泳—应用—药物分析—研究 IV. ①R917

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 227914 号

出版发行:西北工业大学出版社

通信地址:西安市友谊西路 127 号 邮编:710072

电 话:(029)88493844 88491757

网 址:www.nwpup.com

印 刷 者:陕西宝石兰印务有限责任公司

开 本:787 mm×960 mm 1/16

印 张:13

字 数:281 千字

版 次:2013 年 10 月第 1 版 2013 年 10 月第 1 次印刷

定 价:35.00 元

前 言

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 又称高效毛细管电泳 (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE), 是 20 世纪 80 年代后期迅速发展起来的一项分离分析技术, 被誉为 20 世纪 90 年代最重要的分离分析方法之一。CE 是经典电泳技术与现代微柱分离技术完美结合的产物, 是分析科学领域继高效液相色谱之后的又一重大进展, 使分析科学得以从微升水平进入纳升水平, 继而向单细胞, 乃至单分子分析挺进。

CE 是色谱分析的主要方向之一, 具有速度快、效率高、实验成本低、样品需求小、操作模式多样化、自动化程度高等特点, 特别适用于药物质量控制和稳定性监控等研究。自从 1987 年 CE 首次用于药物分析以来, 其在药物分析中的应用得到迅速发展, 1996 年 CE 成为了美国药典标准物理检测方法。目前, CE 在药物分析中的研究范围涉及: 药物质量控制、中药与天然药物分析、药物代谢分析、法医毒物分析、兴奋剂检测和药物制剂分析、创新药物研究, 以及药品上市后的评价等多个方面, 包含了从药物的筛选、开发到质量控制的各个环节。CE 分析的对象不仅包括化学及生物药物产品, 如抗菌消炎药、维生素、生物制品等, 而且广泛应用于天然药物产品, 如中药、中成药的成分分析及筛选, 并且在手性药物分离中也显示出了突出的优势。无论药品的剂型是注射剂、水剂、乳剂、片剂或胶囊等, 还是来源于人体体液或组织等的临床样品, 均可利用 CE 进行分析。

目前, 国内系统介绍毛细管电泳与药物分析的书籍还未见出版, 迫切需要一本较系统、较完整地论述毛细管电泳与药物分析的书籍。基于这种设想, 笔者根据自己近年来在教学和科研工作中的体会及经验, 广泛查阅国内外文献资料, 编写了本书。希望对毛细管电泳技术在药物分析领域的发展能有所促进。当然, 毛细管电泳在药物分析中的应用还处于不断的探索和发展中, 本书亦或存在挂一漏万之处, 敬请广大读者评论并提出宝贵意见, 使其能够发展完善。同时, 感谢国家自然科学基金(81202492)、陕西省科技厅自然科学基金(2012JQ4002)、陕西省教育厅自然科学基金(12JK0708)等基金项目的支持!

著 者

2013 年 6 月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 毛细管电泳的发展简史	1
1.2 毛细管电泳的分离特性	3
1.3 毛细管电泳与药物	4
1.4 毛细管电泳与医学	6
参考文献	7
第 2 章 毛细管电泳的基本原理	9
2.1 基本概念	9
2.2 分离效率	18
2.3 影响分离效率的因素	20
2.4 常用术语小结	28
参考文献	29
第 3 章 毛细管电泳分离模式	31
3.1 毛细管区带电泳	31
3.2 胶束电动毛细管色谱	41
3.3 毛细管电色谱	49
3.4 毛细管凝胶电泳	61
3.5 毛细管无胶筛分电泳	72
3.6 毛细管等电聚焦	87
参考文献	93
第 4 章 毛细管电泳仪器及使用	123
4.1 仪器结构	123
4.2 毛细管电泳新体系	134
4.3 毛细管电泳仪使用中常见问题及解决方法	137
参考文献	140

第5章 毛细管电泳药物分析方法的建立及评价	148
5.1 用于药品质量控制的毛细管电泳方法	148
5.2 毛细管电泳(CE)方法在药品质量控制(QC)中的应用	148
5.3 药品质量控制(QC)中毛细管电泳(CE)方法的建立	149
5.4 方法优化	151
5.5 应用实例	155
参考文献	168
第6章 毛细管电泳用于药品质量控制及药典	170
6.1 药品质量控制方法的相关文件	170
6.2 建立及评价CE方法的关键因素	173
6.3 CE方法对毛细管电泳仪的要求	179
6.4 毛细管电泳在药品杂质分析中的应用	180
参考文献	187
第7章 毛细管电泳用于手性药物的分离	192
7.1 CZE法	192
7.2 MECC法	194
7.3 CEC法	194
7.4 NACE法	197
参考文献	199

第1章 绪论

1.1 毛细管电泳的发展简史

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 又称高效毛细管电泳 (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE), 是 20 世纪 80 年代后期迅速发展起来的一项液相分离分析技术, 被誉为 20 世纪 90 年代最重要的分离分析方法之一^[1]。它是以毛细管柱作为分离通道、以高压直流电场为驱动力的一种电泳分离技术。其原理是利用离子或荷电粒子甚至中性分子在两端施加高压的毛细管中按其淌度或分配系数不同实现快速、高效分离。CE 是经典电泳技术与现代微柱分离技术完美结合的产物, 是分析科学领域继高效液相色谱之后的又一重大进展, 使分析科学得以从微升水平进入纳升水平, 继而向单细胞, 乃至单分子分析挺进。

电泳是电介质中荷电粒子在电场作用下以不同速度向电荷相反方向迁移的现象。1809 年俄国物理学家 Ре́йсе 首次发现电泳现象。他在湿黏土中插上带玻璃管的正负两个电极, 施加电压后发现正极玻璃管中原有的水层变混浊, 即带负电荷的黏土颗粒向正极移动, 这就是电泳现象。利用电泳现象对化学或生物化学组分进行分离分析的技术称为电泳技术。它是生物大分子分离中最有效、应用最广泛的三大方法(电泳、色谱法、离心法)之一, 在生物化学进展中发挥了重要作用。电泳技术有很多种, 以电泳支持物的形状或位置不同, 可分为 U 形电泳、柱状电泳、平面电泳等。电泳技术具有悠久的历史, 早在 19 世纪中叶就有人对其进行研究^[2]。Tiselius^[3]在 19 世纪 30~40 年代, 使移动界面电泳成为研究生物发分子的准确方法, 并成功分离了人血清, 得到血清白蛋白和 α -, β -, 及 γ -球蛋白, 并于 1948 年获得诺贝尔化学奖。从 CE 的发展角度来看, 最早利用窄孔径管进行电泳分离的报告可追溯到 1942 年 Martin^[4]的工作, 他用称为置换电泳(类似于置换色谱, 后来称为等速电泳)的方法分离了 4 种有机酸。20 年后, Konstantinov 等人^[5]继 Tiselius 工作之后, 描述了一个基于移动界面分离, 用照相机测定的方法。与此同时, 等速电泳的权威 Everaerts 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。从此, 科学家们在毛细管电泳领域的研究就此展开, 并进行了广泛、深入的研究。1967 年, 瑞典科学家 Hjerten^[6]首次在一篇讨论仪器的论文中提出利用直径为 3mm 的石英管在高压电场下进行自由溶液电泳, 采用 UV 检测, 成功分离了小到核苷酸, 大到蛋白质的多种物质。由此毛细管电泳的雏形诞生了, 但它没有完全克服传统电泳的弊端。1970 年, Everaerts^[7]报道了在等速电泳系统上得到区带电泳结果, 使等速电泳也可在高电场下分离和在线检测。随后, Virtanen^[8]使用内径更小的(200~500 μm)的柱子进行电泳分离以加快焦耳热的散热系数, 从而在更大程度上消除了对流对分离

的影响。在 20 世纪 70 年代末到 80 年代初的几年时间内,由于 Mikkers, Jorgenson 和 Lukacs 等的工作,现代意义上的毛细管电泳得到了飞快的发展。1979 年, Mikkers 和 Everaerts^[9] 使用 200 μm 的聚四氟乙烯毛细管实现了毛细管区带电泳分离 16 种有机酸,采用电导和 UV 检测,获得了小于 10 μm 板高的高分离效率,同时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,成为毛细管区带电泳发展史上具有开创性的工作。1981 年, Jorgenson 和 Lukacs^[10] 采用 75 μm 玻璃毛细管,用电迁移法窄带进样,采用荧光检测器,在 30 kV 电压下对丹酰化氨基酸实现快速和高效分离,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过的柱效。这一研究成果震动了分离科学界,成为毛细管电泳发展史上的里程碑,而且,简单的计算还表明,区带展宽仅来自样品的分子扩散。他们还进一步推论,如果分子扩散为毛细管区带电泳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。使人们看到高效毛细管电泳这一新技术的广阔应用前景。

在之后几十年时间里,发展出了毛细管电泳的各种分离模式。1981 年, Jorgenson 和 Lukacs^[11] 在 170 μm 内径的毛细管中填充 10 μm 粒径的 Partisil ODS-2 填料,在电场作用下成功地分离了 9-甲基蒽和芘,获得了 31 000/m 理论塔板的柱效,开创了毛细管电泳的重要分支:毛细管电色谱(Capillary Electro Chromatography, CEC);1983 年, Hjerten^[12] 将聚丙烯酰胺凝胶填充在毛细管中用于电泳分离,发展了毛细管凝胶电泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)。在电泳从凝胶板上移到毛细管中以后,发生了奇迹般的变化:分析灵敏度提高到能检测一个碱基的变化,分离效率达百万理论塔板数;分析片段能大能小,小到分辨单个核苷酸的序列,大到分离 Mb 到 DNA;分析时间由原来的以小时计算缩短到以分、秒计算。1984 年, Terabe 等人^[13] 将表面活性剂添加到电解质溶液中,在毛细管中形成离子胶束假固定相,发展了基于组分疏水性差异而实现分离中性粒子的胶束电动毛细管色谱(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC);1985 年, Hjerten^[14] 在 CE 中引进等电聚焦技术,利用蛋白质等电点不同而实现分离的毛细管等电聚焦电泳(Capillary Isoelectric Focusing, CIEF),达到分离等电点相差仅 0.01 pH 单位的高分辨率,同年,分辨率更是提高到分离等电点相差 0.001 pH 单位^[15],成为蛋白质分离中一个强有力的微柱分离分析工具;1987 年, Cohen^[16] 等发表了基于分子大小筛分机制的毛细管凝胶电泳(Capillary Gel Electrophoresis, CGE)技术。

Jorgenson 等人的工作揭开了 CE 发展的序幕,展现出 CE 极其美好的前景。随着高灵敏度监测器、高性能毛细管柱、电子技术的发展以及商品化仪器的出现,毛细管电泳在实际工作中的应用越来越多。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数直线上升,应用范围迅速扩大,毛细管电泳领域的学术交流活动频繁活跃^[17]。笔者以“毛细管电泳”为关键词在中国期刊网中搜索相关文献,发现 2000 年至 2012 年间与毛细管电泳相关的博硕士学位论文共 1137 篇,期刊论文共 3584 篇;以“capillary electrophoresis”为关键词在 ISI web of science 网站搜索相关文献,发现 2000 年至 2012 年的相关论文共 63 355 篇。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年第41届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;我国的毛细管电泳会议自1993年起每两年召开一次。毛细管电泳作为年轻的分离分析技术,在人类基因组计划的完成和蛋白组计划的实现中起着巨大的推动作用,占据着无法替代的地位。

1.2 毛细管电泳的分离特性^[18-19]

CE通常使用内径为25~100 μm 的聚酰亚胺涂层石英管,其容积小(一根50 μm ×100cm管子的容积仅为2.0 μL),侧面积/截面积之值大,散热快,可承受高电场(100~1 000V/cm),具有下述分离特点。

(1)不仅能分析中小型分子样品,而且还能更快速、高效地分离分析大分子样品(如核酸、蛋白质、多肽类药物)。

(2)柱污染小。CE所采用的毛细管柱易于全面清洗,不需考虑样品对柱子造成的污染,只需进行简单的样品前处理或不需进行样品前处理。

(3)分析速度快、分离效率高。由于采用高电场,因而CE分析速度快,通常3~30min甚至几十秒内就能完成分离,在毛细管区带电泳中,柱效一般为 $10^5/\text{m}$ 理论塔板数以上,峰容量高于100(HPLC峰容量约为8)。

(4)实验成本低,消耗少。CE所用毛细管长度仅为40~70cm,内径为20~75 μm ,容积仅有几 μL ,且消耗的大多为价格低廉的无机盐类缓冲溶液(不超过几毫升),试剂消耗可用人民币的“分”来计算。

(5)检测灵敏度高,分析对象多样化。在采用电流检测器时,毛细管电泳的最低检测限可达 10^{-8}mol/L ,即使一般的UV检测器,也能达到 10^{-6}mol/L ,进样量在nl级或 μg 级;CE分析的样品对象也涵盖了从无机离子到整个细胞,具有强大的分析功能和潜力。

(6)操作模式多样化。在同一硬件条件下可提供多种分离模式,根据样品的不同理化特性,选择合适的分离模式,在操作中只需改变毛细管的内部结构或更换电解质溶液的种类、浓度、pH值、添加剂等,就可实现多种分离模式。

(7)自动化程度高。CE是目前自动化程度最高的分离方法。CE的分离效率、分析速度、定量功能、应用范围方面均远远超过平板凝胶电泳,但在操作费用、操作难易及环境污染方面,却远低于平板凝胶电泳。

毛细管电泳和HPLC一样,同属于液相分离技术,但遵循不同的分离机理,各自存在不同的分离模式,因此在很大程度上CE与HPLC可以互相补充,但无论分离效率、分析速度、样品与试剂用量及分析成本方面CE均显示出独特的优势。与HPLC相比,CE的应用范围更宽,柱效更高,峰容量更大,同时,它几乎不消耗溶剂,样品用量也仅为HPLC的几百分之一,CE没有泵输运系统,成本相对更低,可根据不同的分子性质,对极广泛的对象进行分离。相比之

下,为达到相同的目的,HPLC 则要消耗许多价格昂贵的色谱柱和溶剂。当然,与 HPLC 相比 CE 分离还存在一些问题,主要表现在重现性差等方面,CE 分析的重现性受毛细管及其使用时间、内表面的化学性质、使用前的预处理、所加电压、毛细管的柱温和运行缓冲溶液的组成等因素影响。除在操作过程中需要对毛细管进行充分平衡,减小两次运行时毛细管内壁性能如电荷数的差异外,近年来已研究出许多不同方法来提高 CE 的重现性。如迁移指数法和校正迁移指数法、多内标法、电流信号突越辅助下的时间比法、淌度比法和迁移时间比法、对照品校正法、保留指数法等。

相对于传统的电泳技术,毛细管电泳显示出极大的优越性,如高速度、高效率、高分离度、低样品需要量和消耗量以及可以自动化操作等。相对于同样现代化的分离技术,如高效液相色谱,毛细管电泳同样具有相当的优势,如低进样量、低溶剂消耗量、多操作模式以及小的环境危害性等。基于此,自毛细管电泳诞生起,在不长的时间里就被广泛接受并逐步应用于环境分析、药物分析、临床检验和刑事诊断等领域,在生物物质的分析领域,特别是在诸多的分离分析领域占有举足轻重的地位。特别是 2000 年版《中华人民共和国药典》将 CE 作为一种正式的药物分离分析手段,使得其在药物分析和分离方面的应用引起了人们的高度重视和极大兴趣。自 1987 年首次将 CE 用于药物分析以来,它已经成为制药工业中理想的分析手段。

1.3 毛细管电泳与药物^[20]

随着现代医药科技的发展,药物的分离分析对于研究药物的有效组分、药品质量控制、新药物的合成及药物对生物体的作用等有着非常重要的理论和现实意义。药品质量的优劣直接影响到药品的安全性和有效性,关系到用药者的健康与生命安危。因此,必须运用各种有效手段,通过各个环节全面保证、控制与提高药品的质量。

随着分析化学的进步,尤其是近年仪器分析和计算机技术的发展,为药物分析的进展提供了坚实的基础。药物分析学从静态分析发展到动态分析,从体外分析发展到体内分析,从品质分析发展到生物活性分析,从单一技术发展到联用技术,从小样本分析发展到高通量分析,从人工分析发展到计算机辅助分析,使得药物分析从 20 世纪初的一种专业技术,逐步发展成为一门日臻成熟的科学——药物分析学。药物分析学大致可分为两部分,一是原药的定量。原药中杂质的测定、药剂的分析以及稳定性评价和中药材有效成分的分析、中药复方制剂主要活性成分含量的测定等以药品质量管理为目的的测试方法的建立,这些方法均要求有良好的选择性,适当的分析灵敏度和可靠的准确度等。二是对进入人体内的药物或代谢物的吸收、分布、代谢、排泄等体内动态的研究,即临床药物分析。

自从 1987 年首次将 CE 用于药物分析^[21]以来,CE 在分离分析上的优势吸引了众多的分析化学者从事这一领域的研究,使其在药物分析中的应用得到迅速发展。从 1996 年开始,CE 就成为了美国药典标准物理检测方法,使 CE 方法在世界范围内被广泛接收,在药学、药理学、生物化学、法医研究、环境分析、食品及饮料的质量控制及化学工业等领域均有应用。CE 在

药物分析中能够排除药物配方中稳定剂或保护剂等高含量杂质基体干扰,对有效成分甚至痕量组分进行检测。同时,良好的时间分辨能力使毛细管电泳还能够胜任药物动力学分析,为药物治疗机理及用药水平提供可靠信息。CE 分析的对象不仅包括化学及生物药物产品,如抗菌消炎药、维生素、生物制品等,而且广泛应用于天然药物产品,如中药、中成药的成分分析,并且在手性分析中 CE 也显示出了突出的优势。无论药品的剂型是注射剂、水剂、乳剂、片剂或胶囊等,还是来源于人体体液或组织等的临床样品,均可利用 CE 进行分析。目前,CE 在药物分析中涉及的研究范围主要包括:药物质量控制、中药与天然药物分析、药物代谢分析、法医毒物分析、兴奋剂检测和药物制剂分析、创新药物研究以及药品上市后的评价等方面,包含了从药物的筛选、开发到质量控制的各个方面。

1. 化学及生物药品分析

化学药品结构简单、清楚,常规分析方法能基本解决定性、定量和纯度控制等问题。但有些结构特异或性质特殊的品种,现代分析手段会遇到一些难点。而 CE 技术的特点、优势,恰恰弥补和解决了某些分析手段的不足。氨基酸、小肽类化合物的分离是 CE 研究领域中的一个活跃的分支。

2. 中药分析

中药有几千年的历史,是中华民族优秀传统文化的重要组成部分,现已成为世界主流医学重要的一部分。如何结合日益更新的各种现代仪器分析手段,更为系统和深入地进行中药基础理论研究,将是未来中药分析的重要任务。目前用于中药成分分析的方法有薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱法(HPLC)等。但是 HPLC 进行中药分析时常遇到分析时间长、分离效率低、色谱柱容易被污染,而且污染后难以清洗,色谱柱又很昂贵等问题。在中药色谱分析中,HPCE 与 HPLC 互为补充,有着潜在的优势。自 1990 年 Kennle 等^[22]将 HPCE 法首次用于熊果中熊果苷等化学成分的分离与测定以来,HPCE 法在中药化学成分分析中的应用得到了迅速开展^[23],已日益广泛地应用于中药生药化学成分的分离和含量测定,分析成分主要包括生物碱、黄酮、苷类、酚类、有机酸、香豆素、木脂素、醌类及其他成分。

此外,CE 在中药材鉴定、中成药分析(包括片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、散剂、注射剂、合剂与口服液、浸膏、栓剂及其他剂型)、中药指纹图谱的建立与中药质量控制等方面均有应用。

3. 手性对映体的分离分析

由于化合物结构中不对称因素的存在,产生了手性分子,该类分子存在对映异构体。而对映异构体分子之间具有不同的光学性能和生物活性。据统计,目前世界上手性药物的比例在新药中已占到 $1/3$ ^[24]。手性药物在体内的运输和代谢方式均与其立体化学有关;手性药物进入人体后,在体内手性微环境如酶、受体、离子通道、蛋白质、载体等的作用下产生手性识别,从而在不同立体异构体之间产生药效学、药物动力学和毒理学方面的立体选择,表现出不同的药效。所以,手性药物对映体的拆分可以提高药物有效成分,增强药效,降低毒副作用,在药物研究及医药工业发展方面具有非常重要的意义^[25]。所以以药物单一光学异构体供药的需求已引起各方面的高度重视。毛细管胶束电动色谱和毛细管电色谱模式常用于手性药物的拆分。

常用的手性选择剂有环糊精(CD)及其衍生物、糖类或苷类化合物、蛋白质、大环抗生素、冠醚、手性金属络合物、手性微乳体系和手性表面活性剂等。

1.4 毛细管电泳与医学

通常,疾病的发生会导致体内相应的某种或多种标志物含量、比例发生变化或缺失,而对这些标志物的及时检测将对临床上疾病的发现、病情的了解以及疾病的治疗和控制具有重大意义。但临床样品如血液、尿液、脑脊髓液和体液等组成复杂,通常待分析样品量少等特点,运用传统的分离分析方法往往不能满足需求。

毛细管电泳作为一种重要的分离分析技术,以其高效、快速、微量、自动化等特点,受到临床医学领域研究者的高度重视,解决和弥补了许多传统方法的不足。CE在临床中的应用十分广泛,所检测样品的来源可分类尿样、血浆血清、唾液、脑脊液、红细胞、其他体液或组织以及实验动物活体试验。尽管在我国,目前CE技术还没有真正成为临床检测的常规手段,但可以预见,在未来的几年中,以此为基础而发展起来的相关技术,有可能取代目前临床上许多常规检测方法。根据分析对象种类,CE在临床分析中的应用主要有下述几方面。

(1)核酸。人类基因组计划的提前完成在很大程度上依赖于CE的应用,基因组中存在着大量的这种数目不同的核苷酸重复序列改变,具有高度的个体特异性,它们在寻找致病基因、进行家系连锁分析、疾病诊断、药物研究和身份鉴定等领域显示出巨大的应用潜力。

(2)蛋白质、肽和氨基酸。氨基酸是构成多肽和蛋白质的基本结构单位,在机体的代谢过程中起着重要的作用。临床上对某些氨基酸进行定性定量分析,可提供与人体有关的代谢状态资料,并有助于遗传性氨基酸代谢疾病的诊断。肽类物质的研究则以肽的鉴别、纯化以及肽谱的分析居多。许多肽类激素对人体的生长、发育,调节机体的新陈代谢方面具有重要的作用。有关蛋白质的研究包括其定性定量分析,及蛋白质与其他分子如药物分子间的相互作用。

(3)药物。CE对药物的分析已涉及临床的药物诊断、药物及其代谢产物分析、治疗监测、药理学、毒理学研究、毒品的检测及新药的研制和开发等生命科学各个不同领域,其中以诊断、治疗、研究为目的的药物监测以及违禁药物和毒品的确定方面的应用特别引人注目。由于新药开发策略的发展,CE技术还表现出在新药筛选方面的应用前景。CE与质谱(MS)技术的联用,可以使化合物的筛选和结构鉴定一步完成。

(4)内源性小分子和离子。离子或某些内源性小分子如酶、糖类、小的生物活性分等,是维持机体生存的重要物质,反映人体的正常新陈代谢情况,它们的变化与机体的生、老、病、死密切相关。而临床上对这些内源性物质的检测通常采用离子色谱、原子吸收光谱、酶法及比色法等,这些方法在灵敏度、选择性及精确性方面存在不足,且耗时、价格昂贵。而CE法在分离离子和小分子方面具有引人注目的特性,并开始用于疾病诊断。

参 考 文 献

- [1] 林炳承. 九十年代中期的毛细管电泳. 分析测试学报, 1997, 16(1): 85 - 93.
- [2] H. Buff, Ann. Chem. Pharm., 1858, 105, 168.
- [3] Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Trans. Faraday Soc., 1937, 33, 524 - 531.
- [4] 邓延倬, 何金兰. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社, 1996, 3 - 4.
- [5] Konstantinov BP, Oskurkova O, Rapid microanalysis of the chemical elements by the moving boundary method, Dokl. Akad. Nauk. SSSR., 1963, 148: 1110 - 1113.
- [6] Hjerten S., Free Zone electrophoresis. Chromatogra. Rev., 1967, 9, 122.
- [7] Everaerts F. M., Hoving-Keulemans, W. M. L. Zone electrophoresis in capillary tubes, Sci. Tools, 1970, 17, 25 - 28.
- [8] Virtanen R. Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection[J]. Acta Polytech. Scand., 1974, 123(2): 1 - 67.
- [9] Mikkers F. E. P., Everaerts F. M., Verheggen Th. P. E. M., High-performance zone electrophoresis. J. Chromatogr., 1979, 169, 11 - 20.
- [10] Jorgenson J. W., Lukacs K. D., Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, Anal. Chem., 1981, 53, 1298 - 1302.
- [11] Jorgenson J. W., Lukacs K. D., High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, J. Chromatogr., 1981, 218: 209 - 216.
- [12] Hjerten JW, Separation of protein with capillary gel electrophoresis, J. Chromatogr., 1983, 217: 1.
- [13] Terabe S., Ozaki H, Otsuka K, Ando T, Electrokinetic chromatography with 2 - o - carboxymethyl - β - cyclodextrin as a moving "stationary" phase. J. Chromatogr., 1985, 332: 211 - 217.
- [14] Hjerten S. High-performance electrophoresis elimination of electroendosmosis and solute adsorption, J. Chromatogr., 1985, 347: 191 - 198.
- [15] Cornell, F. N. and McLachlan, R. Isoelectric focusing in the investigation of gammopathies, in clinical Biochemist Monograph, Australian Association of Clinical Biochemists, 1985, Perth, 31 - 37.
- [16] Cohen A S, Karger B L, High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and protein, J. Chromatogr. A, 1987, 397(26): 409 - 417.
- [17] 罗国安, 王义明, 陈令新, 等. 毛细管电色谱极其在生命科学中的应用, 北京: 2005, 5.

- [18] 季一冰. 中药毛细管电泳分析技术与应用. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 2.
- [19] 王森. 药物毛细管电泳分离研究[D]. 宁波: 浙江大学, 2003: 1.
- [20] 唐俊. 毛细管电泳在药物分析应用[D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [21] Fujiwara S, Honda S. . Anal. Chem. , 1987, 59: 2773.
- [22] Kenndle E, et al. Capillary electrophoresis. Chromatographia, 1990, 514: 38 - 32.
- [23] Issaq H J. Capillary Electrophoresis: The effect of column length, applied voltage, gel-type, and concentration on the capillary electrophoresis separation of DNA fragments and polymerase hain reaction products. Electrophoresis, 1997, 18 (7): 1153-1158.
- [24] 尤启冬. 药物化学. 北京: 化学工业出版社, 2008: 6.
- [25] 张美, 奚文汇, 字敏, 等. 高效液相色谱的 4 种商品手性柱对 38 种手性化合物的拆分研究. 分析化学, 2010, 38(2): 181-186.

第2章 毛细管电泳的基本原理

从理论上理解毛细管电泳的分离过程对完整深入地掌握这种分离分析技术非常必要,它可以在我们进行具体的 CE 操作时有章可寻,达到事半功倍的效果。本章从毛细管电泳中的基本概念讲起,介绍毛细管电泳高分离效率的理论基础。

2.1 基本概念

一、电泳

在半导电液体中,带电离子在直流电场作用下在一定介质(溶剂)中向与自身相反电性的电极方向泳动的现象叫做电泳(electrophoresis)。当荷电粒子置于电场中时,它受到电场力(F)和溶剂阻力(F')的作用,当两个作用力达到相对平衡时,粒子则以稳定速度(v)作平移运动。

荷电粒子受到的电场力 F 正比于其所带电荷 q ,其受到的溶剂阻力 F' 正比于其运动速度 v ,即

$$F = Eq \quad (2-1)$$

$$F' = fv \quad (2-2)$$

式(2-1)中 E 为电场强度, q 为荷电粒子的有效电荷,式(2-2)中 f 为比例常数,称为平动摩擦系数,与粒子大小和形状有关。由式(2-1)和式(2-2),得

$$v = Eq/f \quad (2-3)$$

对于球形粒子, f 可由 Stokes 定律给出:

$$f = 6\pi\eta r \quad (2-4)$$

式(2-4)中 η 为介质黏度, r 为粒子半径,称为 Stokes 半径。式(2-3)可写成:

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad (2-5)$$

二、双电层和 Zeta 电势

毛细管电泳中介质(溶剂)与毛细管内壁(固体)相接触,根据界面化学,固体与液体接触时,固体表面根据材料性质的不同带有过剩的负电荷或正电荷,为达到电荷平衡,溶液中的相反离子就聚集在固体表面,在固-液界面上形成双电层。在水溶液中,大多数固体表面都带负电荷,这种负电荷可能来自于表面电离(酸碱平衡),也可能是由于在表面的电离离子的吸附。

在 CE 中,通常使用熔融硅毛细管柱,其毛细管内壁大约有 $8.31 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 的硅羟基,其等电点约为 1.5,因此在常用缓冲溶液或弱酸性和碱性($\text{pH} > 2.5$)溶液中,石英表面硅羟基($\text{Si}-\text{OH}$)电离,使其表面带负电荷(SiO^-)。此负电荷表面会吸引溶液中的正离子,形成紧贴石英表面和游离的两部分离子,由这两部分离子组成与表面电荷异号的离子层,称为双电层。按照近代双电层模型,在双电层溶液一侧由两层组成。第一层为吸附层,称为 Stern 层或紧密层(compact layer),该层在电泳过程中不会移动。第二层为扩散层(diffuse layer),由 Stern 层外的剩余离子构成,其电荷密度随着远离表面而逐渐与溶液内部接近,扩散层在电泳过程中会发生迁移。图 2-1 所示为双电层结构模型。

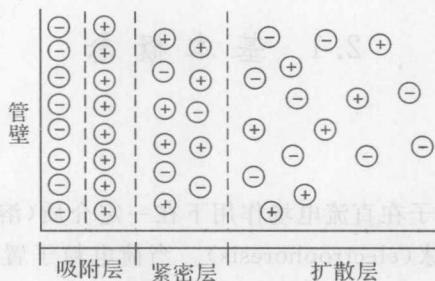


图 2-1 双电层模型

在 Stern 层中,与毛细管固体表面接触的特性吸附离子是部分脱水的,它可以是异号离子,也可以是同号离子。其外面主要是由静电力吸附的水化对离子(counter ion)。Stern 层与扩散层之间形成剪切面(shear plane),剪切面上的电位称为电动电位或 Zeta 电势(ζ),典型值为 $0 \sim 100 \text{ mV}$ 。图 2-2 所示为双电层电势随距离 x 的变化。图中, ψ_0 为表面电势,在 Stern 层中,表面电势线性降低至 ψ_d , ψ_d 是 Stern 面与溶液内部的电势差,由特性吸附离子的性质和数量决定;Zeta 电势(ζ)略低于 ψ_d ,一般认为 ζ 与 ψ_d 相等。但当毛细管内表面吸附了非离子型表面活性剂或大分子后,剪切面外移, ζ 与 ψ_d 差别增大,当表面特性吸附上述物质时, ζ 变化明显,甚至改变符号。

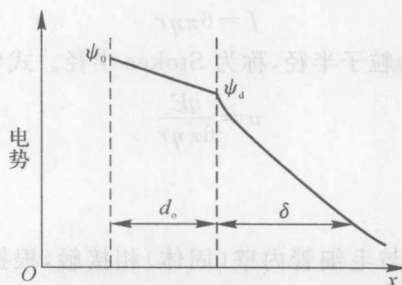


图 2-2 双电层电势随距离的变化

在扩散层内,Zeta 电势随电离表面距离增大而按指数函数衰减。当 ψ_d 衰减到原来的 $1/e$

时,离 Stern 面的距离(或 ζ 衰减一个指数单位所需的距离)称为扩散层厚度 δ 。Zeta 电势与扩散层厚度呈正比,即

$$\zeta = 4\pi\delta e/\epsilon \quad (2-6)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{2cF^2}} \quad (2-7)$$

式(2-6)中 e 为溶液中每单位体积总的过剩电荷, ϵ 为介质的介电常数。式(2-7)中, R 为气体普适常数, T 为绝对温度, c 为电解质的浓度, F 为法拉第常数。由式(2-7)可见,扩散层厚度与电解质溶液浓度 c 有关,或确切地说,与离子强度有关, c 越高, δ 越薄, Zeta 电势越小。在水中,双电层的厚度一般为 $1 \sim 10\mu\text{m}^{[1]}$ 。式(2-6)也表明,熔融硅毛细管表面的 Zeta 电势正比于它表面上的电荷数与对离子层厚度的乘积。所以,毛细管壁的 Zeta 电势又受到对离子性质、缓冲溶液 pH 值、缓冲溶液中阳离子与熔融硅表面间的平衡等因素的影响。毛细管壁的 Zeta 电势是 CE 中的一个重要参数,对控制电渗流,优化分离条件具有实际指导意义。

与固-液界面相似,荷电粒子表面也形成类似的双电层结构。在剪切面,即荷电粒子有效半径所构成的面上存在 Zeta 电势,用 ζ_e 表示, $\zeta_e = q/\epsilon r$, 则球形粒子迁移速度也由式(2-5)演化为

$$v = \frac{\epsilon \zeta_e E}{6\pi\eta} \quad (2-8)$$

对于棒状粒子,迁移速度计算公式为

$$v = \frac{\epsilon \zeta_e E}{4\pi\eta} \quad (2-9)$$

可见,荷电粒子在电场中迁移速度,除与电场强度和溶质介电常数有关外,还和粒子的有效电荷数量及自身形状有关。

固液界面形成双电层的结果是,在靠近管壁的溶液层中形成高出溶液本体的“自由”离子,它们在电泳过程中通过碰撞等作用给溶剂分子施加单向的推力,使之同向运动,从而形成电渗。

三、电渗流

1. 电渗流的定义及影响因素

广义地讲,电渗是一种液体相对于带电的管壁移动的现象。在毛细管中,电渗流(Electro-Osmotic Flow, EOF)指的是管内溶液在外加电场作用下整体朝一个方向运动的现象。

如图 2-3 所示,处于扩散层中的水合阳离子或质子,在带负电荷的管壁表面形成一个圆筒形的阳离子鞘,在外加电场下,以剪切面为分界面,引起管内液体整体朝向阴极与 Stern 层作相对运动,在这些“自由”离子的电泳过程中,通过碰撞等作用给溶剂分子施加单向推动力,并通过黏滞阻力携带着溶剂一起向阴极迁移,形成 EOF。在 CE 分离中,EOF 引起电解质溶液从毛细管的一端向另一端流动。电渗是毛细管电泳中最重要和最有趣的性质之一,是电泳