

摘要

选择毛细管液相色谱/高效电泳微分离方法为本论文的主攻方向。系统深入地探索了毛细管高效液相色谱 (HPLC) - 毛细管电泳 (CE) 二维分离方法, 以及相关的柱制备新技术, 快速胶束电动色谱 (MEKC) 方法。将所发展的新技术和方法应用于中药复杂体系样品和蛋白质等生物样品的分析, 证明了方法的超强分离能力和潜在的应用价值。

论文第一章针对国际上色谱、电泳等分离技术研究微型化、高分离能力的发展趋势, 总结了该领域相关的研究工作。详述了高效微分离方法, 包括毛细管气相色谱、微柱 HPLC、CE 及微芯片分离技术等。介绍了多维分离方法学的研究基础, 并重点评述了 HPLC-CE 二维联用技术。

第二章全面探讨了建立毛细管高效液相色谱-毛细管电泳二维分离系统方法学的研究及相关的柱制备技术、快速胶束电动色谱理论等问题。研制了一步溶胶-凝胶法制备毛细管 HPLC 柱上塞子 (on-column frit) 新方法。首次制备出了耐 500bar 装填压力的塞子, 而且通透性好, 通过 0.1M HCl 和 0.1 M NaOH 的极端 PH 测试, 化学稳定性好。由此制备的毛细管柱塔板高度在 13-20 μm 之间, 发展完善了快速胶束电动色谱 (MEKC) 理论, 建立了单位时间内的柱效 (N/t) 与场强、柱长关系的理论模型。研究表明, 保持一定的柱长, 并提高电压, 是实现快速 MEKC 的最佳途径。在上述基础上, 首次建立了接触式脉冲切换进样二维分离系统。接口以两根毛细管柱的短暂脉冲接触实现进样, 进样频率、进样时间和时序经选择优化后, 进样效率高达 81%, 迁移时间、峰高的相对标准偏差 (RSD%) 平均值为 1.8%、3.0%。

第三章集中探讨了高效微分离方法在中药、蛋白质、核酸等复杂体系样品分离中的应用。第一次用毛细管 HPLC-MEKC 二维联用技术分离了甘草提取物中的 110 种组分, 复方小承气汤中的 250 余种组分。证明了该方法将有重要的学术价值和应用前景。运用毛细管 HPLC 柱对蛋白质样品的分离结果优于常规 HPLC 柱, 为蛋白质组学研究提供了强有力的支持。论文最后还探索了线性聚丙烯酰胺毛细管凝胶电泳 (CGE) 方法, 分离效能高达 $10^6/\text{m}$, 20 次重复进样 RSD% 小于 4%, 初步应用于人工合成的寡聚核苷酸片段分离、纯度鉴定。

ABSTRACT

The thesis aims at developing a comprehensive two-dimensional system in coupling capillary high performance liquid chromatography (HPLC) with capillary electrophoresis (CE). Meanwhile, related methods for capillary column preparations and high speed micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MEKC) were developed. The new methods have been applied to the analysis of complex samples of traditional Chinese medicines and proteins, and prove to be of extremely high efficient resolution capabilities.

The thesis is divided into 3 sections. Since minaturization and high efficiency is a general trend in chromatography sciences, advanced studies in this field have been summarized in the first section of the thesis. Minaturized techniques of capillary gas chromatography, capillary HPLC, CE and microchip separation were discussed in details. The principle of multi-dimensional separation has also been introduced, especially for HPLC-CE techniques.

In the second part of the thesis, studies on 2-D capillary HPLC-CE system, preparation of capillary HPLC column and theoretical modes of high speed MEKC have been intensively explored. As one of the key steps to implement the 2-D separation system, one-step preparation of on-column frit for capillary column using sol-gel technology was developed. The frit is characterized by resisting packing pressure up to 500 bar and extreme pH conditions of 0.1mol/L HCl and NaOH, pocessing good permeability. The theretical plate height of capillary column maintains 13-20 μ m under consecutive years of frequent run. High speed MEKC separations were also investigated. The theoretical aspects on plates per unit time vs. electric strength and column length were studied. The relationship was also derived. It's concluded to maintain certain column length and increase voltage

simultaneously. Based on high speed MEKC and novel capillary HPLC column techniques, the contact pulse interface for 2-D system was developed. By optimizing sampling frequency and timing orders, the injection efficiency for CE is up to 81%, relative standard deviation of migration times and peak heights are 3.0% and 1.8%, respectively.

The third section focuses on the application of high efficiency micro-separation techniques, mainly for traditional Chinese medicine, protein, DNA samples. Hundrends of components in extracts from licorice and complex medicine have been separated using 2-D capillary HPLC-CE system, which demonstrates its powerful resolution capabilities. In the case of separating protein samples, performance of capillary HPLC columns is superior to conventional columns and provides support to proteome studies. Besides, capillary gel electrophoresis is applied to DNA analysis. For the prepared linear polyacrylamide CE column, high separation efficiency of $10^6/m$ has been obtained, RSD% of 20 consecutive injections is less than 4%. The technique has been applied to the separation and purity analysis of synthetic oligonucleotides.

第一章 文献综述

1. 引言

现代分析化学,因其可以提供有关物质组成、结构及能量状态等信息,而在生命科学、医药卫生、环境化学、材料科学等领域的发展中发挥着极其重要的作用。对于生化样品、天然产物等复杂体系的分析,已成为现代分析化学最重要的研究课题之一。

复杂样品的分析,一般包括提取制备、分离纯化、分析鉴定三个步骤。其中分离纯化是至关重要的一环。因为只有一定质量的纯品,才能满足下一步结构、物性测定,活性、毒理实验,乃至治疗、培育的需要。但生物大分子不仅本身的结构(组成、序列、构象)复杂,而且所处环境也是各种各样大小分子的混杂体^[1]。以中药为代表的天然产物也是品种繁多、成分多样,而且据样品来源不同含量变化不一。中药复方成分更是复杂多样^[2]。此外,复杂体系中还存在着相当数量的微量组分,可能对整个体系的功效起到关键性作用^[3-4]。因此,对生物大分子、天然化合物等复杂体系实现高效分离、高灵敏检测一直是广大生物学、化学、医药学工作者关心并研究的课题。

色谱自本世纪初问世以来,随着气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、毛细管电泳(CE)等多种分离模式的出现,已成为人类掌握的对复杂混合物分离效率最高的方法。伴随着分析仪器小型化的发展趋势,色谱微分离技术也日益引起关注并得到广泛应用^[5]。与常规尺寸的色谱分离方法相比,微分离方法使用更小的分离尺寸,对样品、固定相及流动相的消耗量都大为减少,特别适合对于来源比较困难的生化、天然产物的分析。同时,其分离效能、灵敏度都得以大幅度提高,分离时间也相应缩短,在多组分、低含量的复杂体系的分析中显示出独有的优势。

通常一维分离难以完全满足复杂体系对峰容量的要求。多维联合分离技术,是将几种基于不同机理的分离模式联用,使系统峰容量有了大幅度的提高

[6]。为复杂体系的高效分离开辟出一条崭新的途径。LC-LC^[7-8]、LC-CE^[9-12]等联用技术已被成功地应用于蛋白、多肽等复杂生化样品的分离分析中。

因此,发展高效微分离方法,并借助多维联合分离技术,成为解决复杂体系分离分析的最佳途径。各种微柱制备技术的成熟及小型化仪器的发展,必将为微分离技术的应用开辟更为广阔的前景。

2. 微分离技术研究进展

毛细管气相色谱、微柱高效液相色谱、毛细管电泳、毛细管超临界流体色谱是目前较为成熟的几种高效微分离技术,由于分离机理不同,而在不同的研究领域展现着其优势。微芯片分离作为微分离技术的又一个新方向,也日益引起关注。

2.1. 毛细管气相色谱

微分离技术的第一次重大突破是毛细管气相色谱(CGC)的出现。色谱动力学理论认为,传统GC填充柱相当于一束涂有固定液的毛细管,而毛细管内径等于固定相颗粒直径,由于这束毛细管是弯曲、多径的,致使气流运行中涡流扩散严重,传质阻力很大,柱效降低。1957年,Golay^[13-14]根据自己的理论推断,毛细管内径既决定毛细管对气流的阻力,也决定理论塔板高度。并以1m×0.8mm i.d.,内涂固定液的柱子进行了实验。这种效能极高的色谱柱被称为CGC柱。1958年,他又提出了涂壁毛细管色谱速率理论,奠定了CGC的理论基础,为高分辨色谱开创了一条新路。随后毛细管色谱仪和拉制机装配成功,在80m×0.25mm i.d.角鲨烷柱上获得了10万理论塔板数的柱效。

70年代初,研究工作者尝试对玻璃毛细管内壁进行各种处理。例如,气态HCl腐蚀法^[15]、涂载法^[16]、氟醚处理法^[17],都使得玻璃毛细管的柱效、惰性及热稳定性有了极大的提高与改善。1979年,Dandenean^[18]等借用拉制光导纤维的技术,拉制出石英弹性毛细管柱。它具有惰性的内表面和弹性,为毛细管柱增加了新的生命力,在微分离技术中得以广泛应用。现代CGC柱每米塔板数一

一般在 2000-5000, 总柱效可达 10^6 , 在 2h 内分析出 300 个组分, 它以其快速、高效的特点在人类健康、环境保护、生态平衡、能源供求等领域的研究中发挥着重要作用。

2.2. 微柱高效液相色谱

五十年代开始应用的 LC, 由于不受分析对象挥发性和热稳定性的限制, 而特别适宜于分析在生物学、医学上有重要意义的大分子、不稳定的天然产物、以及高分子量的化合物和离子型物质, 例如, 蛋白、核酸、氨基酸、多糖类、植物色素、类酯化合物、药物、动植物的代谢产物等^[19]。

经典 LC 是在直径约 10-20mm i. d. 的玻璃柱内, 装填直径大于 $100\mu\text{m}$ 的多孔性吸附剂完成的, 速度慢、效率低、灵敏度低。六十年代早期, Giddings 将 GC 理论用于 LC。同时直径从几个到几十微米的规则的高效液相色谱 (HPLC) 填料出现, 减少了分离过程的传质阻力, 使分离效率和速度都大大提高。

HPLC 兴起的同时, 少数研究工作者便开始了微柱 HPLC 的探索。1966 年, Lipsay^[20] 等首次使用 0.5mm、1.0mm i. d. $\times$ 1m 的不锈钢柱, 对核糖核酸进行了分离。70 年代中期, Ishii^[21-25] 等开展了许多以匀浆法装填 Teflon 微柱的研究, 使微柱 HPLC 方法得以重大突破。Scott^[26-28] 等以 1.0mm i. d. 的微柱对实际样品实现了快速、高效的分离。随后直径小于 1mm 的毛细管 HPLC 也相继得以应用^[29-31]。

HPLC 微分离方法按柱类型分, 可分为开管柱、拉制柱和填充柱^[32-33]见表 1-1。

表 1-1. 微柱 HPLC 分类

类型	柱内径
填充柱	
微 HPLC	0.5-1.0mm
毛细管 HPLC	100-500 μm
纳级 HPLC	10-100 μm
拉制 HPLC 柱	50-200 μm
开管 HPLC 柱	5-10 μm

从理论上来看,与常规 HPLC 填充柱相比,开管柱由于在管壁上涂渍固定相而使组分在流动相间的传质阻力大为减小,因此单位时间内能得到更高的理论塔板数。在操作中应尽量减少柱内径,降低柱外效应。

拉制柱是一种介于开管柱与填充柱之间的一种柱类型。由于它事先将填料颗粒装入玻璃管内,而后再拉制成所需尺寸的毛细管,因此柱制备过程相对简单。但柱内壁不均匀,重现性较差。

填充柱是使用最广的一种 HPLC 微分离柱,多采用熔融石英毛细管作为柱材料。其优越性主要体现在^[34-36]:

- (1) 样品、流动相、固定相消耗少,对于较为难得的试样极为有利
- (2) 降低溶质柱上稀释比,提高检测灵敏度高
- (3) 可装填长柱以获得较高的分离效率
- (4) 易于选择合适的操作条件
- (5) 便于与其他分离模式和检测技术联用

HPLC 微填充柱的制备方法与常规 HPLC 柱基本相同,多采用匀浆法,以高压或电泳力实施装填^[37-39]。随着 HPLC 柱内径的缩小,与之相匹配的 HPLC 小型化仪器装置也得以发展。HPLC 微泵可控制 50 μm 至 100 μm i.d. HPLC 柱所要求的 nL 到 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量^[40-41]。内置式可替换 loop 体积可降至 20 nL,各种自动微进样阀也得以发展^[42]。示差、紫外、荧光、电化学、气相色谱检测器、傅立叶变换等多种检测手段都被用于 HPLC 微柱的检测。

此外, HPLC 微柱还特别适宜于作为第一维,与其它色谱分离技术联用,例如,薄层色谱(TLC)、常规 HPLC、GC、超临界流体色谱(SFC)、CE 等。峰容量的大幅度提高为复杂样品的分离分析提供了可能。

HPLC 与质谱(MS)联用是蛋白、多肽定量、定性分析最常用的方法。使用微柱 HPLC,不仅提高了分离效率,而且减少了与 MS 联用时的样品稀释,这样便可以提高浓度型检测器电喷雾离子源质谱(ESI-MS)的灵敏度。表 1-2 显示了常规 LC-MS、毛细管 LC-MS、纳级 LC-MS 技术的比较,从表中可以看出,使用 75 μm i.d. 的纳级 LC,质谱的灵敏度与常规的 LC/MS 相比,可以提高 2844 倍^[43]。Henzel 等报道了将二维凝胶电泳上的蛋白斑点酶解,以微柱 HPLC-MS 联用技术分析多肽片段(图 1-1),结合基体辅助激光解析离子化(MALDI)-MS,

2.3. 毛细管电泳

毛细管电泳 (CE) 的出现, 是现代分离技术的一次重大变革。电泳作为划时代意义的突破性进展是在 1981 年, Jorgenson 和 Lukacs^[45] 用 75 μ m i.d 石英毛细管在 30KV 高电压下开管电泳, 获得了 40 万理论塔板数的效率, 并实现了正负离子的同时分离。CE 可以采用很高的电场, 如 100-1000 伏/厘米, 毛细管很大的表面积/体积比使产生的热量有效地扩散, 克服经典电泳的不足。这些研究奠定了高效、快速毛细管电泳的基础。1984 年 Terabe^[46] 用含十二烷基硫酸钠 (SDS) 的胶束溶液分离了中性分子, 开辟了 CE 的又一重要分支, 即胶束电动毛细管色谱 (MEKC)。1987 年 Hjerten^[47] 提出了毛细管等电聚焦 (CIEF)。同年, Cohen 和 Karger^[48] 发表了毛细管凝胶电泳工作 (CGE)。至此, CE 的几种主要分离模式已经形成。短短十几年内, 由于 CE 符合了以生物工程为代表的生命科学各领域中对多肽、蛋白、核苷酸乃至脱氧核苷酸 (DNA) 分离分析的要求而得到迅速发展。

CE 的主要优点在于^[49]: 1) 仪器简单、便于自动化。2) 分离模式多样化。3) 分离效率高、速度快。CE 电渗流的平面塞式流型对谱带展宽贡献很小, 使得高柱效的取得有了可能。而高电压的施加, 又使得分析时间大大缩短。4) 应用范围广。可以分离从离子到中性分子, 从小分子到生物大分子的一系列化合物。现已证明它能用于分离多种化合物, 诸如氨基酸、手性药物、维生素、杀虫剂、无机离子、有机酸、染料、药物活性成分、肽和蛋白质、糖类、低聚核苷酸和 DNA 限制性内切片段, 甚至整个细胞和病毒颗粒。5) 分析成本低, 柱体积只有几个微升。6) 样品消耗少, 一般样品进样量都是 ng、nL 级的。7) 样品预处理简单, 可以直接进样。

毛细管电色谱 (CEC) 是 CE 的一个分支。这种以电场驱动的微柱 HPLC, 把 CE 的高效 (理论塔板数高于 50 万/米) 和 HPLC 的选择性 (大量可供选择的固定相) 有机结合, 开辟了高效微分离的新途径。Pretorius^[50] 首次示范了 CEC, Knox^[51] 完善了其理论基础, 随后 CEC 也被越来越多的人所接受。目前, 已通过 CEC 实现与 MS 联用、富集样品、手性分离。此外, 它还在免疫学、药物分析、富勒烯化学等众多领域发挥着作用。

毛细管超临界流体色谱 (CSFC) 是介于 CGC 与微柱 HPLC 之间的一种现代微分离技术。1981 年, Novorny 和 Lee^[52] 首先报道了使用具有高分离效能的毛细管柱, 以超过其临界压力、临界温度的流体作为固定相的 CSFC 技术。它在石油、环保、医药、生物、聚合物等领域具有广泛的用途。

2.4. 微芯片分离

微分离技术的又一个研究热点便是微芯片分离技术。它将常规微分离技术移植到平方厘米量级大小的芯片上, 示例如表 3 所示^[53]。如果再与样品进样、反应、检测等过程集成到一起, 便成为多功能化的快速、高效、低耗、微型的集成分析装置, 即 μ -TAS (miniaturized total chemical analysis system)。由于其体积小、轻便, 故实验过程不必局限于实验室, 对需要实地采样、分析、在线检测等特殊工作都提供了极大的便利^[54]。

Table 3. Calculated parameter sets for a given separation performance obtained with CE, LC and SFC.

Parameter		CE (micellar)	LC	SFC
Number of theoretical plates	N	100,000	100,000	100,000
Analysis time	t ($k' = 5$) min	1	1	1
Heating power	P/L (W/m)	1.1	-	-
Capillary inner diameter	d (μm)	24	2.8	6.9
Capillary length	L (cm)	6.5	8.1	20
Press drop	ΔP (atm)	-	26	1.4
Voltage	ΔU (kV)	5.8	-	-
Peak capacity	n	180	220	220
Signal bandwidth	δ_r (mm)	0.21	0.56	1.4
Signal bandwidth	δ_r (ms)	42	70	70
Signal bandwidth	δ_r (pl)	94	3.3	52

实验装置的微型化得到了仪器加工的支持。80 年代兴起的光刻蚀微型制造技术被成功地用于微分离芯片的加工上。随后其材料也从硅片扩展至石英、玻璃等。 μ -TAS 装置形式多样,其中以集成毛细管电泳芯片(ICE)技术最为突出。Fluri 等就通过柱后衍生化分离氨基酸,理论塔板数达 83,000,保留时间在 0.65-1.7s,峰宽约 90ms^[55]。同时,ICE 在疾病诊疗、药物筛选、手性拆分等方面都取得了很好的效果。并使分析速度大大提高,样品和溶剂用量消耗减少,检测效率也得以提高。

HPLC 由于存在着塞子制作、柱装填等问题,而对微分离芯片提出了较高的技术要求。有报导使用生物膜^[56]、聚合物^[57]来实现纳级柱制备,Fegnier^[58]等最新运用微制造技术同时完成固定相颗粒和传质孔道的定位,在 CEC 分离中,非保留溶质柱效达 1,700,000,保留溶质达到 770,000。

3. 多维分离技术研究进展

3.1. 多维分离技术简介

随着对复杂体系中多组分及痕量组分分析的需要,高分辨便成了对色谱分离体系最为迫切的要求。对于单一的色谱模式,可以通过改变塔板数(N)、选择性(α)和容量因子(k')来提高分辨率。但是 k' 对分辨率的影响极为有限;选择不同的分离模式虽然可以获得很高的理论塔板数,但分辨率并不会相应得到大副度的提高;增加柱长由于增加分析时间,使分辨率的净增加近乎为零。相比之下,选择性因为对分辨率影响最大,而受到越来越多的关注^[59]。

为描述色谱分离技术对复杂物质中多组分的分离情况,1967 年 Giddings 首次提出了峰容量(n)的概念^[60]。它被定义为在满足分离需要的分辨率条件下及一定的分离范围内,所能容纳的最多的峰的个数^[61],计算公式如下:

$$n = (1 + N^{1/2}r) \ln(1 + k'_n)$$

其中 r 为峰宽相当的标准方差(通常取 4), k'_n 为一列峰中最后一个峰的容量因子。

现代高分辨色谱分离技术的峰容量大致在 100 - 300 范围内, 如果待测物质的组分数 (m) 小于色谱分离体系的峰容量 (n), 则单一的分离模式应该可以满足分析的需要。但由于复杂样品的多组分并未均匀分布, 根据理论推导^[62], 其最多可识别的峰个数只等于峰容量的 37%, 代表单一组分的峰个数也只等于峰容量的 18%。结果表明, 一维色谱分离技术在对复杂物质的分离中已有所局限。而将多种基于不同机理的色谱模式联用便成了最佳的选择。

多维分离体系可通过两种方式实现。一种是立体方式, 即前一维分离之后又在与之成 90° 的方向进行后一维分离, 比如二维薄层色谱^[63-64]、二维电泳^[65-67]。另一种便是多柱方式, 离线多柱分离, 是人工地将前一维的流出组分收集并送入下一维进行分离。尽管其分离效能优于一维分离, 但其难以自动化, 样品转移损失量大, 且后一维的转移会损失前一维的分辨率。在线 (或联合) 多柱分离, 是将一维的流出物按照一定的频率实时地切换入第二维进行分析。因其自动化程度高, 避免了样品转移损失, 而且在多维转移中保留了前一维的分离度, 而成为多维分离研究的主要方向^[68]。若每一维的分离机理完全不同, 即正交, 则系统可获得最大的峰容量 $n_{\text{total}} = \prod n$ ^[59]。将相匹配的分离模式联用, 由于峰容量的大幅度提高, 将使二维体系具有了更强的分离能力, 也可以降低对一维分离峰容量的要求。

常见的联用模式有 GC-GC、LC-LC、LC-GC、SFC-GC、SFC-SFC、LC-SFC、LC-CE 等。其中应用最为广泛的 GC-GC 虽然可以获得极高的理论峰容量, 但其主要适用于易挥发性物质的分离。多维 LC 技术自 70 年代开始使用以来^[69-70], 已在生物医学^[71]、医药学^[72]、毒物学^[73]等方面得到应用。接口多采用切换阀技术, 联用模式有分子排阻色谱 (SEC)-反相色谱 (RPLC)、离子交换色谱 (IEC)-反相色谱、正相色谱-反相色谱、分子排阻色谱-离子交换色谱、亲和色谱-反相色谱等。九十年代以后 Jorgenson 等^[9-12]开始了 LC-CE 联用技术的探索, 为生物样品、天然产物等复杂体系的分离分析开辟了新的方向。

3. 2. HPLC-CE 联合二维分离

HPLC、CE 是分离机理完全正交的两种模式。前者是基于各组分在流动相与

固定相之间分配的差异,而后者则是基于各组分荷质比的不同。因此,将这两种高分辨的色谱技术联用,为峰容量的大幅度提高提供了可能。此外,CE 以其快速、高效的特性,特别适用于作为二维体系中的第二维,可以频繁地切割第一维的流出物并加以分析,而不损失前一维分离的效率和分离度。

Yamanoto 等首先进行了蛋白质的凝胶渗透色谱-毛细管等速电泳二维分析^[74]。1990 年, Jorgenson 等^[9]利用六通阀(图 1-2)将反相液相色谱与毛细管区带电泳(CZE)联用,完全实现了从第一维流出物至第二维分析的切换进样自动化,并对卵白元的酶解产物实现了高效二维分离。1993 年,又利用改进的接口技术将微柱 SEC-CZE 联用,实现蛋白质二维分离^[10]。1995 年,他们利用光门阀接口(图 1-3)实现了快速 RPLC-CZE 分离,它利用照射于 CZE 进样端的强激光束对第一维流出物的光降解作用来实现二维接口的切换,并将 CZE 分析时间缩短至 3s,二维分离在 10min 内得以完成^[11]。1997 年,又以流动阀接口(图 1-4)实现了微柱 RPLC-CZE 联用,以缓冲液的流动和停止来控制 CZE 的进样与分析。利用此装置在人尿样中分离出 400 余种组分^[12](图 1-5)。

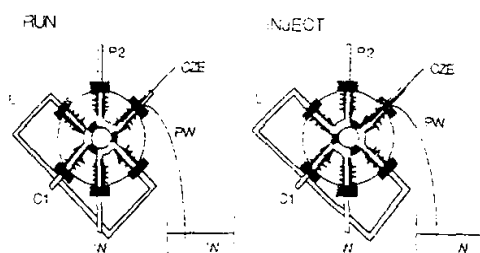


Figure 1.2. Two configurations of six-port, computer-controlled valve.

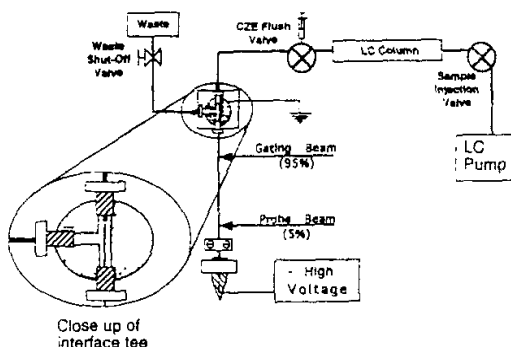


Figure 1.3. Two-dimensional RPLC/fast-CZE instrumental diagram.

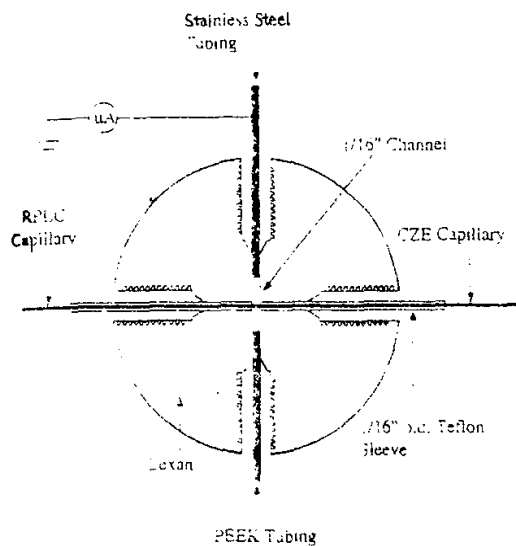


Figure 1.4. Schematic of the clear flow gating interface.

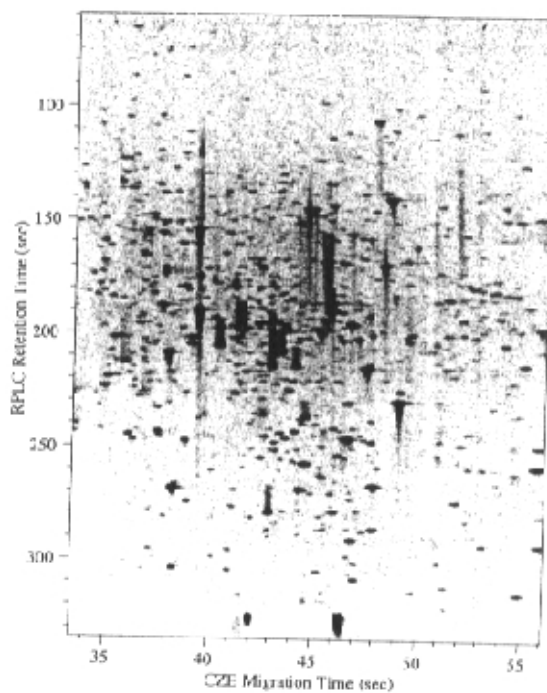


Figure 1.5. Gray scale image of a two-dimensional micro-RPLC-CZE separation of FITC-tagged human urine.

多维分离的小型化是必然的趋势。Norotroy 等指出,微柱 HPLC 由于其高选择性、高柱效,在蛋白质样品的分离,特别是微分离方面将显示独具的优越性^[110]。将其与 CE 联用,也能尽可能地减少样品转移损失^[59]。Jorgenson 等已成功地实现了微柱 HPLC-CZE 的在线联用^[110, 112]。

4. 本论文研究背景

为满足生物大分子、天然化合物等复杂体系极高的分离要求,需发展高效微分离方法,特别是多维微分离技术。本论文全面探讨了建立毛细管高效液相色谱-毛细管电泳二维分离系统方法学的研究及相关的柱制备技术、快速胶束电动色谱理论等问题,并将这些新方法应用于中药、蛋白、核酸等实际样品中的分析。证明了其超强的分离能力和潜在的应用价值。

5. 参考文献

- [1] 师治贤, 王俊德, *生物大分子的液相色谱分离和制备*, 科学出版社, 1996, 1
- [2] 魏伟, 王义明, 罗国安, *药学学报*, 1997, 32: 476
- [3] Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal Chem.* 1989, 61: 436
- [4] Hernandez, L.; Tucci, S.; Guzman, N.; Paez, X. *J. Chromatogr.* 1993, 652 : 393
- [5] Novotny, M. *Anal. Chem.* 1988, 60 : 500A
- [6] Giddings, J. C. *Anal. Chem.* 1984, 56: 1258 A
- [7] Cortes, H. J.; Rothman, D.; Cortes H. J. (Editor), *Multidimensional Chromatography*, Marcel, Dekker, New York, 1990 : 219
- [8] 刘照胜, 李永民, 蒋生祥, 陈之仁, *色谱*, 1997: 490
- [9] Bushey, M. M., Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1990, 62: 978
- [10] Lemmo, A. V.; Jorgenson, J. W., *J. Chromatogr.* 1993, 633: 213
- [11] Moore, A. W.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1995, 67: 3448
- [12] Hooke, T. F.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1997, 69 : 4134
- [13] Golay, M. J. E. *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1958: 1
- [14] Golay, M. J. E. *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1958: 36
- [15] Novotny, M. *Chromaographia*, 1968, 1: 332
- [16] Halasz, I. *Anal. Chem.* 1963: 35: 449
- [17] Schieke, J. D. *J. Chromatogr.* 1975, 112: 97
- [18] Dandenean, R. D. *HRC&CC*, 1979, 2: 35
- [19] 史坚, *现代柱色谱分析*, 上海科学技术文献出版社, 1988, 291
- [20] Horvath, C. G.; Press, B. A.; Lipsky, S. R. *Anal. Chem.* 1967, 39 : 1422
- [21] Ishii, D.; Asai, K.; Hibi, K.; Jonokuchi, T.; Nagaa, M.; J.

Chromatogr. 1971, 144: 157

[22] Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Jonokuchi, T. *J. Chromatogr.* 1978, 152 : 147

[23] Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Nagaga, M. *J. Chromatogr.* 1978, 152: 341

[24] Ishii, D.; Hibi, K.; Asai, K.; Nagaya, M.; Mochiznke, K. *J. Chromatogr.* 1978, 152: 173

[25] Ishii, D.; Hirose, A.; Hibi, K.; Iwasaki, Y. *J. Chromatogr.* 1978, 152: 43

[26] Rse, C. E.; Scott, R. P. W. *J. Chromatogr. Sci.* 1980, 18 : 479

[27] Scott, R. P. W. *J. Chromatogr. Sci.* 1980, 18 : 49

[28] Kucere, P. *J. Chromatogr.* 1980, 198 : 93

[29] Yang, F. J. *J. Chem.* 1982, 236: 265

[30] Takeuchi, T.; Ishii, D. *J. Chromatogr.* 1981, 213 : 25

[31] Tsuda, T.; Novotny, M. *Anal. Chem.* 1978, 50 : 632

[32] Ishii, D.; Takenchi, T., *Trends. In Anal. Chem.* 1990, 9: 152

[33] Vissers, J. P. C.; Claessens, H. A.; Craners, C. A. *J. Chromatogr.* 1997, 779: 1

[34] Krejc, M.; Tesarik, K.; Rused, M.; Pajurek, J. *J. Chromatogr.* 1981, 218: 167

[35] McGuffin; Novotny, M. *Anal. Chem.* 1983, 55: 2296

[36] Novotny, M. *Anal. Chem.* 1988, 8: 500A

[37] Takeuchi, T.; Fresenius, J. *Anal. Chem.* 1990, 337: 631

[38] Verzele, M.; Dewaele, C. *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 45: 37

[39] Novotny, M. *J. Chromatogr. Sci.* 1980, 18: 473

[40] Huang, E. C.; Wachs, T.; Conboy, J.; Henion, J. D. *Anal. Chem.* 1990, 62: 712A

[41] Brown, P. R. *Anal. Chem.* 1990, 62: 995A

[42] Chervet, J. P.; Ursem, M.; Salzmann, J. P. *Anal. Chem.* 1996,

68: 1507

[43] Vanhoutte, K.; Donger, W. V.; Hoes, I.; Lemiere, F.; Esmas, E. L.; Hudson, A. J. *Anal. Chem.* 1997, 69: 3161

[44] Henzel, W. J.; Grimely, C.; Bourell, J. H.; Bilerici, S.; Stults, J. T. *Methods Comparision, Methods, Enzyman*, 1994, 6: 239

[45] Jorgenson J.W.; Lukacs K.D. *Anal. Chem.* 1981, 53: 1298

[46] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* 1984, 56: 111

[47] Hjerten, A.; Liao, J.; Yao, K. *J. Chromatogr.* 1987, 387: 127

[48] Cohen, A.; Karger, B. *J. Chromatogr.*, 1987, 397: 409

[49] 罗国安, 王义明, *色谱*, 1995, 7: 254

[50] Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Scheke, J. P. *J. Chromatogr.* 1974, 99: 23

[51] Knox, J. H.; Grant, I. H. *Chroamtographia*. 1988, 26: 329

[52] 孙传经, *毛细管色谱法*, 化学出版社, 1991: 236

[53] Manz, A.; Fettingner, J. C.; Verpoorte, E.; Ludi, H.; Harrison, D. J. *Trends in Anal. Chem.* 1991, 10: 144

[54] 向容, 王义明, 罗国安, *分析化学*, 1999, 27: 104

[55] Fluri, K.; Fitzatrck, G.; Vhien, N.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* 1996, 68, 4285

[56] Tennikora, T. B.; Sves, F. *J. Chromatogr.* 1993, 646: 279

[57] Wang, Q. C.; Sves, F.; Frechet, J. M. *J. Chromatogr.* 1994, 669: 230

[58] He, B.; Tait, N.; Regnier, F. *Anal. Chem.* 1998, 70: 3790

[59] Cortes, H. J. *J. Chromatogra.* 1992, 626: 3

[60] Giddings, J. C. *Anal. Chem.* 1967, 39: 1927

[61] Giddings, J. C. *Anal Chem.* 1981, 53: 945A

[62] Giddings, J. C.; Davis, R. *Anal. Chem.* 1983, 55: 48

[63] Consden, R.; Gordon, A. H.; Martin, A. J. P. *Biochem. J.*

1994, 38: 224

[64] Grinberg, N.; Kalasz, H.; Han, S. M.; Armstrong, D. W. In *Modern Thin-Layer Chromatography*, Grinberg, N., Ed., Marcel-Dekker. Publishing: New York. 1990: Chapter 7.

[65] O'Farrel, P. H. *Biol. Chem.* 1975, 250: 4007

[66] Celis, J. E.; Braro, R. *Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, Academic Press. New York, 1984: 10

[67] Anderson, N. I.; Tayler, J.; Scandora, A. E.; Coulter, B. P.; Anderson, N. G. *Clin. Chem.* 1981, 27: 1807

[68] Holland, L. A.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1995, 67: 3275

[69] Scott, C. D. ; Chilcoto, D. D.; Lee, N. E. *Anal. Chem.* 1972, 44: 85

[70] Huber, J. F. K.; Vanlindon, R. *J. Chromatogr.* 1973, 83 :267

[71] Edlund, P. O.; Westerland, D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1984, 2: 315

[72] Walhagen, A.; Edholm, L. E. *J. Chromatogr.* 1989, 473 :371

[73] Karlsson, L. *J. Chromatogr.* 1987, 417: 309

[74] Yamanoto, H.; Manabe, T.; Okuyama, T. *J. Chromatogr.* 1989, 480: 277

第二章 高效微分离方法研究

1. 引言

随着现代科技的发展,研究对象的物质组成已变得日益复杂。对研究体系中的众多组分实现高效分离、高灵敏度检测,已成为现代分析化学最重要的研究课题之一。

高效微分离方法,采用比常规色谱更小的分离尺寸(通常 μm 级别),使样品、固定相、流动相的消耗量都大大减少,特别适宜于来源比较困难的试样的分析。同时,其分离效能和灵敏度都得以大幅度提高,能较好地满足复杂体系分离分析的需要。目前,得以应用的微分离技术有毛细管气相色谱(CGC)、微柱液相色谱(micro-column HPLC)、毛细管电泳(CE)、毛细管超临界流体色谱(CSFC)等。其中,微柱 HPLC 与 CE 不受分析对象挥发性和热稳定性的限制,对生物学、医学上有重要意义的大分子、不稳定的天然化合物、高分子量和离子型物质的分析极为有利,因而倍受生物、医药、化学工作者的关注。同时,由于一维分离的峰容量有限,发展多维联合分离技术,使系统峰容量有大幅度的提高,更成为研究的热点问题。

为满足生物大分子、天然产物等复杂体系的分离需要,本论文全面探索了 HPLC-CE 二维分离系统的方法学,包括毛细管 HPLC 柱制备、毛细管胶束电动色谱(MEKC)理论、联合二维分离接口技术等。二维体系的建立和优化,为复杂样品的高效分离奠定了基础。

2. 毛细管 HPLC 柱制备方法研究

2.1. 引言

微柱 HPLC 按制备方法不同,可分为拉制柱、开管柱和填充柱。拉制柱重

现性较差, 且与常规 HPLC 柱相比, 柱效的提高极为有限。开管柱尽管由于柱内径小, 可得到极高的理论塔板数, 但同时对仪器装置、特别是管路连接的要求也较高。填充柱则避免了以上问题, 以其高效、快速、稳定而成为使用最广的一种 HPLC 微柱分离模式^[1-3]

毛细管 HPLC 填充柱 (100-500 μm i. d.) 和纳级 HPLC 填充柱 (10-100 μm i. d.) 一般以熔融石英作为柱材料, 它不仅柔韧性好适宜装填长柱, 而且内表面均一、平滑且具有惰性。柱制备方法分整柱 (monolithic column) 制备^[4-7]和均浆装填 (slurry packing)^[8]两种。广为采用的均浆法原理如下: 先在柱末端制作一塞子, 而后将固定相分散于液体中形成悬浮液, 该悬浮液在整个装填中保持稳定, 即颗粒不沉降或凝聚。在高于实际操作压力下, 将此悬浮液在高压泵的驱动下迅速压入柱内。固定相被塞子堵住留在柱内, 而流动相则透过塞子的孔径流出。柱装填完成后, 在柱前端再制作一同样塞子, 防止固定相颗粒反冲, 如图 2-1。

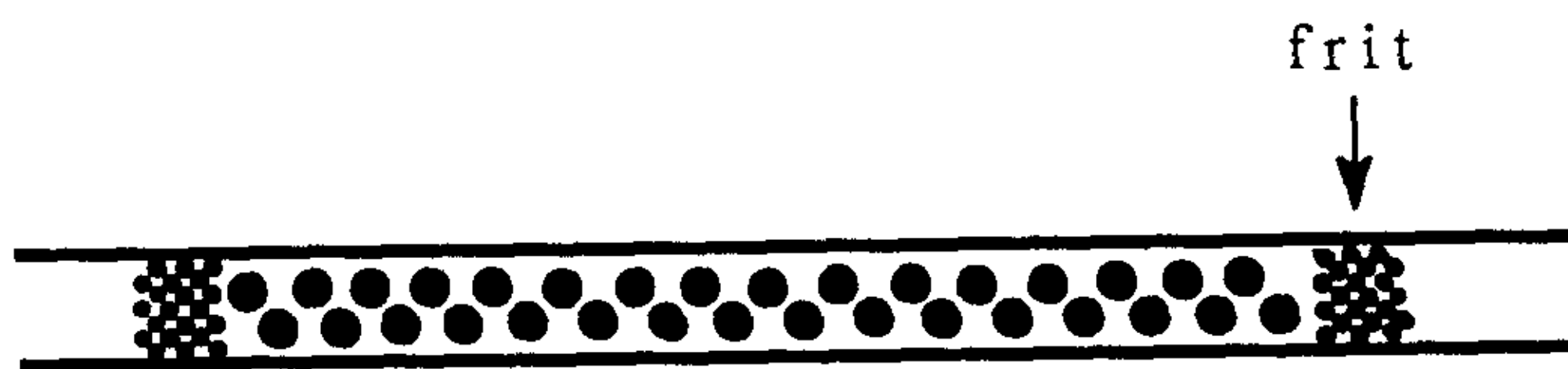


图 2-1. 均浆法填充柱示意图。

由此看来, 在均浆装填法中, 塞子的制备极为重要, 它必须具备这样的性能^[9]: (1) 较高的机械强度 (2) 良好的通透性能 (3) 一定的化学惰性。金属片、玻璃棉、聚合物薄膜 (多为聚四氟乙烯) 等材料都曾被用做毛细管 HPLC 柱的塞子^[10]。但它们难以被装入柱内, 故无法实现柱上检测, 而柱后检测易造成被分离组分柱后谱带扩展。此外, 运用硅胶颗粒烧结法^[9, 11-12]、硅酸钾与甲酰胺聚合法^[13]制作柱上塞子 (on-column frit), 多适用于内径小于 100 μm 的纳级 HPLC 柱, 对于内径较大的毛细管 HPLC 柱, 制作与操作均有一定的难度。因

此,探索新颖的、简便易行的柱上塞子制作法,对于毛细管 HPLC 的推广应用有着极为重要的意义。

溶胶-凝胶(sol-gel)法,最早是通过金属烷氧基化合物的水解和聚合,使液体状的溶胶变为凝胶,而后形成一种具有立体网状结构材料的方法。这之后,反应单体也逐步扩展至其他烷氧基化合物,在非线性光学材料、生物活性材料、化学传感器、催化材料的制备方面广泛得以应用^[14]。在毛细管色谱柱的制备方面,sol-gel 法也开辟了很多崭新的途径。比如,应用此法制备 CGC 柱,可以将柱表面去活化、修饰、固定相涂层等过程在一步内完成^[15]。此法制备开管 HPLC 柱和 CEC 柱,也避免了烦琐的制备过程,并取得了优于常规方法的分离结果^[14];以超临界流体 CO₂ 为介质,此法还可以用来完成 CEC 整柱的制备^[4]。

本论文介绍了利用 sol-gel 技术来制备毛细管 HPLC 柱上塞子的方法,用扫描电镜对其微观结构进行了表征,评价了以此法装填的毛细管 HPLC 柱的分离效能。

2.2. 毛细管 HPLC 柱的制备

2.2.1. 实验仪器与试剂

LC-4A 泵、LC 六通进样阀: Shimadzu 公司

Waters484 可调波长紫外检测器: Waters 公司

熔融石英毛细管 250 μ m i.d., 380 μ m o.d.: 河北永年光导纤维厂,

75 μ m i.d., 365 μ m o.d.: Phoenix 公司

10 μ m 十八烷基硅烷(ZORBAX BP-ODS), 10 μ m 球形硅胶(ZORBAX BP-SIL):

Du-Pont 公司

5 μ m 300SB-C8 Zorbax Packing: Hewlette Packard 公司

三氟乙酸(TFA): Merck 公司

三乙氧基甲基硅烷(MTES): 上海橡胶制品研究所

二氯甲烷、邻硝基苯乙酮、对硝基苯乙酮、苯乙酮、二苄基甲酮、二苯甲酮: 分析纯

2.2.2. sol-gel 法制塞子

毛细管内壁以二氯甲烷清洗，并用氮气吹干。将 75 μ L MTES、100 μ L TFA、200 μ L CH₂Cl₂、10 μ L H₂O 均匀混合，再加入 0.15g SIL，搅拌，将此溶胶溶液吸入毛细管末端合适位置。溶液在管内长度为 2-3mm 为宜。室温放置半小时，则溶胶变为凝胶，并与管壁键合，将毛细管置于 50℃ 左右烘箱内，保证 sol-gel 反应完全并使溶剂挥发。

2.2.3. 毛细管 HPLC 柱的装填

将毛细管接于 LC 泵上，并在超声波中振荡，检验塞子的机械强度，若保持在柱内原位置，则证明满足其性能要求。而后将 C₈、C₁₈ 固定相颗粒溶于甲醇中，在超声波中振荡 10min，使颗粒高度分散。此匀浆在高压泵的作用下被送入柱内。保持压力为 400-500bar，并以超声振荡，保证固定相颗粒均匀紧密装填于柱内。半小时后，使压力逐步释放至零。待柱内容剂挥发后，将柱前端浸入以固定相颗粒为本体的溶胶溶液中，方法同上，制备柱前塞子。

2.3. sol-gel 方法机理研究

在塞子的制备过程中，sol-gel 方法使 SIL 颗粒之间以及 SIL 颗粒与毛细管管壁之间紧密相连，又保持一定孔隙，以达到高机械强度、良好的通透性能的双重要求。此反应以 CH₂Cl₂ 作为溶剂，MTES 作为反应前体，TFA 作为前体水解的催化剂。在以 SIL 作为本体的 sol-gel 反应中，反应过程如下（图 2-2）：

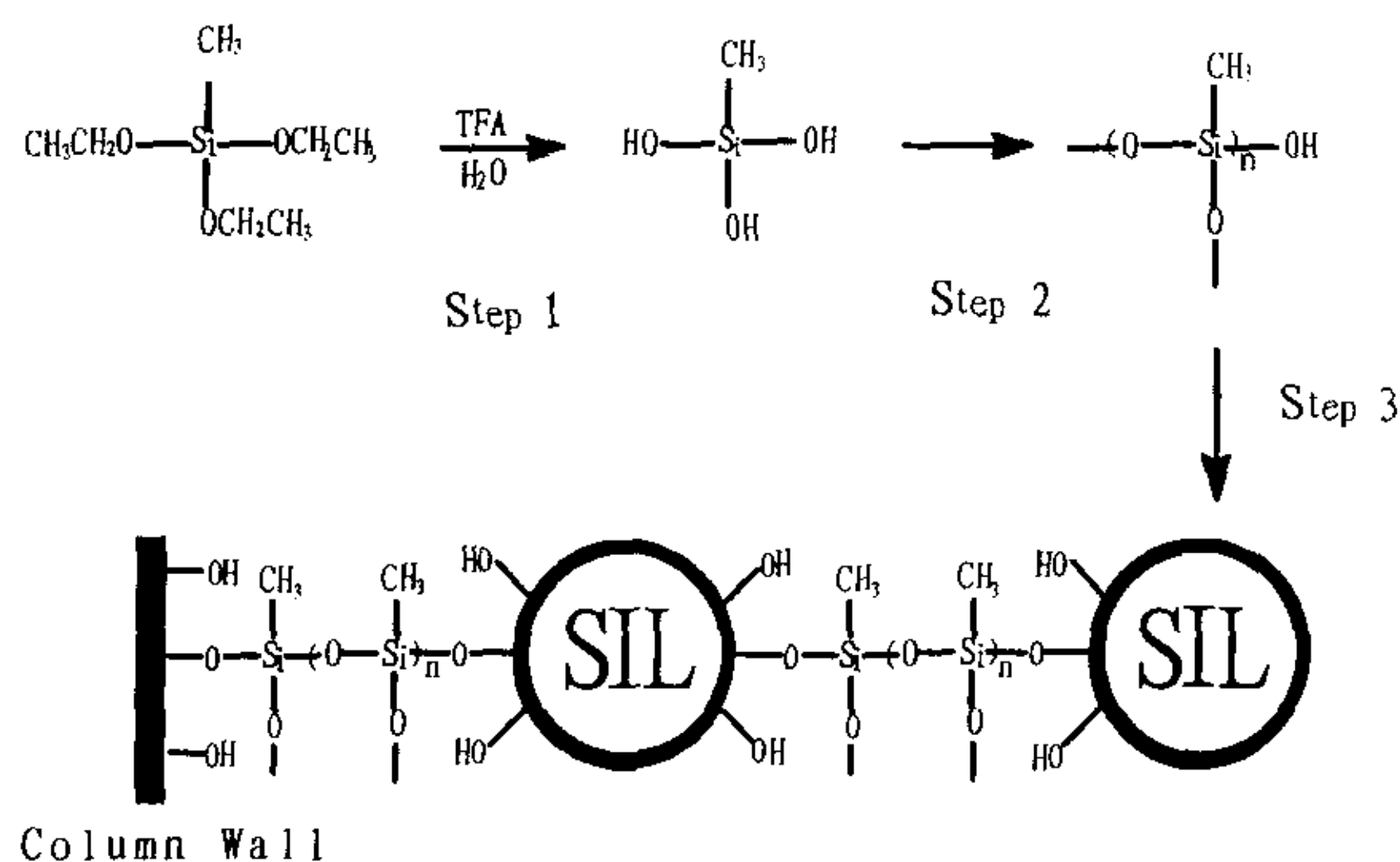


图 2-2. Sol-gel 反应示意图

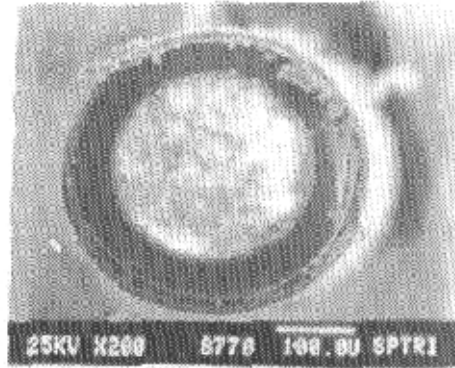
- (1) MTES 在 TFA 作用下水解
- (2) 水解产物进一步聚合
- (3) 聚合产物利用硅羟基将 SIL 颗粒以及毛细管管壁相连。

利用 sol-gel 反应, 均匀、致密的立体网状结构在毛细管内形成。塞子的通透性、高强度得以保证。对于 $250\mu\text{m}$ i.d 的毛细管内长约 3mm 的塞子, 便可承受高达 400bar 的压强, 而对于 $75\mu\text{m}$ i.d 的毛细管内的塞子, 其承受压强跟更可高达 500bar。

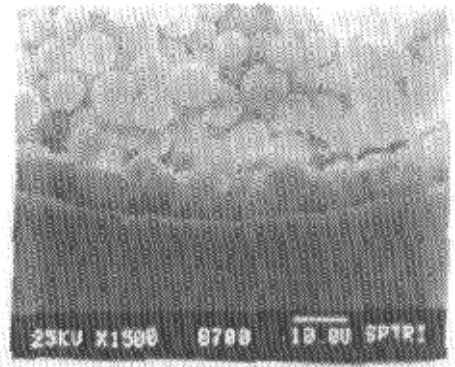
此外, C_8 , C_{18} 键合 SIL 也可作为 sol-gel 反应的本体来制作塞子。但与 SIL 相比, 其机械强度较低。这可能与 SIL 表面被烷氧基键合, 自由硅羟基较少有关。由于表面较少地与高聚物键合, 形成的空间网状结构也相对疏松, 由此制得的塞子强度也较低。而柱前端塞子对强度要求较低, 所以 C_8 , C_{18} 键合 SIL 仍可以作为柱前端塞子的本体, 避免了与固定相填料不同质而造成的柱效损失。

2.4. 扫描电镜表征微观结构

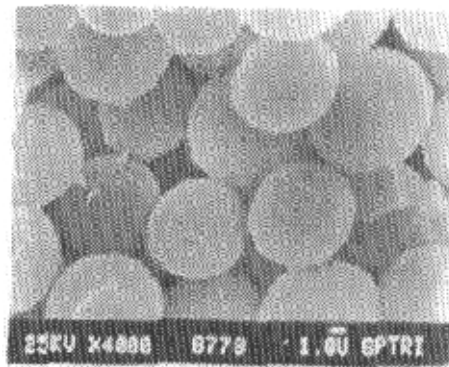
为了更好地了解柱上塞子的微观形态, 我们利用扫描电镜 (SEM) 对其进行了观察。柱上塞子的全貌可以在放大倍数为 200 的图 2-3 (A) 中看到, 图中显示出相当致密的形态结构。将放大倍数进一步提高, 在图 2-3 (B) 中便可观察到毛细管内壁变的不再光滑, 而是凹凸不平。这种由于被聚合物覆盖而造成内壁粗糙现象, 增加了 SIL 颗粒与毛细管内壁接触的表面积, 使二者的结合更加牢固。继续提高放大倍数, 在图 2-3 (C) 中可以看到在 SIL 颗粒表面也有同样的粗糙现象。除了可以增加颗粒之间键合的强度之外, 这种现象还可以避免溶质在 SIL 表面的吸附, 从而阻止内扩散, 减少了溶质在流经塞子时的谱带展宽。图 (B) 与 (C) 中, 还可看出 SIL 颗粒之间以及其与管内表面都紧密相连。在颗粒之间还有孔隙, 塞子的机械强度、通透性都得以满足, 与利用 sol-gel 方法的初衷吻合。



(A)



(B)



(C)

Figure 2. 3. Scanning Electron Microscopy of sol-gel-derived and SIL-based frit on $250\ \mu\text{m}$ i.d. capillary. (A) A cross-sectional view of capillary with a magnification of $200\times$; (B) Characterization of wall surface of the capillary with a magnification of $1500\times$; (C) Fine structure of silica gel spheres with a magnification of $4000\times$.

2. 5. 毛细管 HPLC 柱的评价

实验证明, 柱上塞子以 0.1M HCl、0.1M NaOH 连续冲洗数十分钟, 强度无明显变化。说明了它对酸、碱较强的抵御能力, 在 HPLC 中有较宽的 PH 操作范围。为进一步检验此法装填毛细管 HPLC 柱的分离效能, 我们挑选了 5 种芳香酮类化合物作为探针来对毛细管 HPLC 柱进行了评价。从图 2-4 中可以看出, 5 种化合物得到了很好的基线分离。而且峰对称性好、无拖尾。在以 10 μ m ODS 装填的毛细管柱上, 溶质的理论塔板数可达 30-40,000/m。这充分证明了以 sol-gel 方法来制备的塞子在获得高机械强度的同时, 并未以损失分离效能为代价。毛细管 HPLC 柱经过几年连续使用, 塞子依旧保持其稳定的性能。

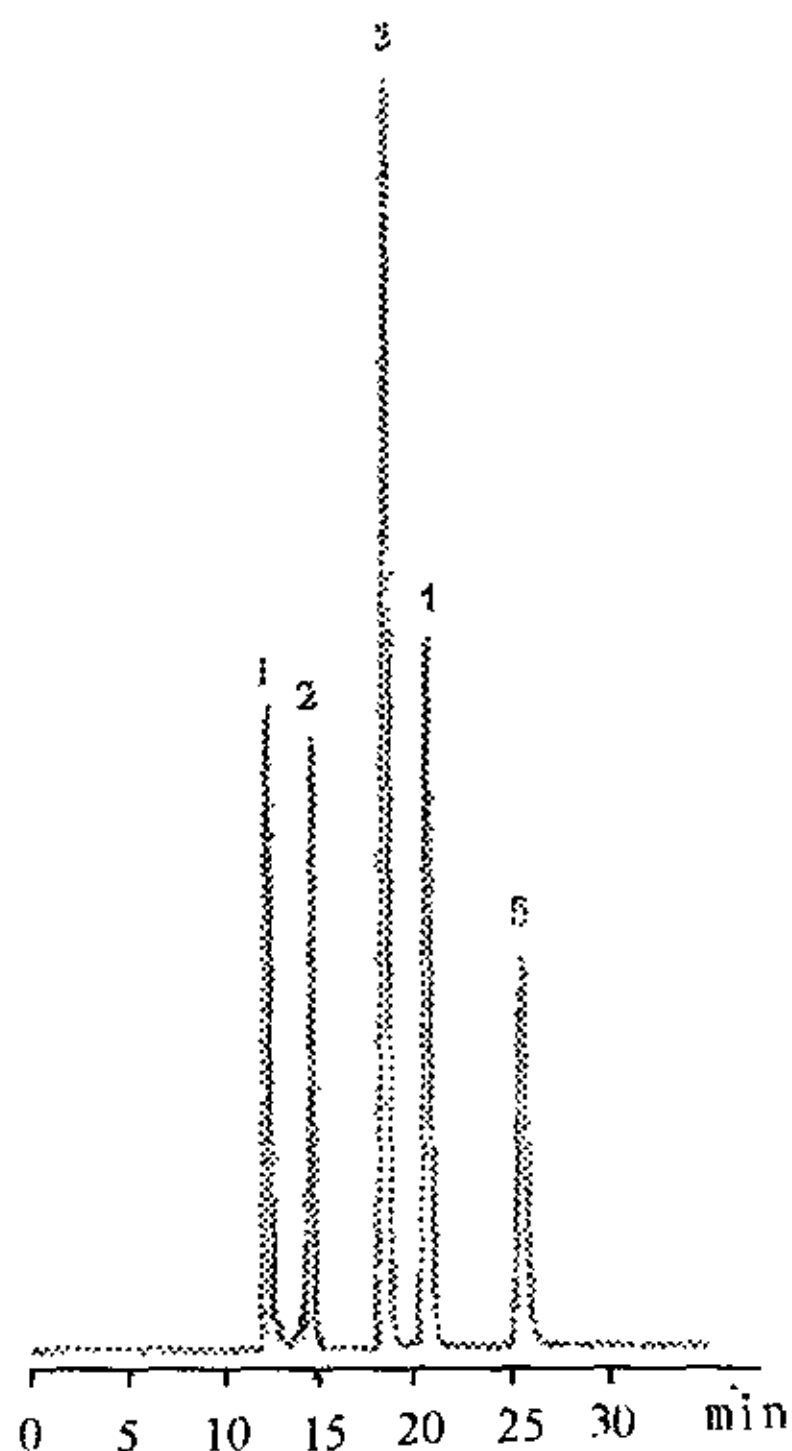


Figure 2.4. CHPLC separation of five aromatic ketones on a reverse-phase column with sol-gel-derived frit. Conditions: column, 250 μ m i.d. capillary with 44 cm packed length and 3 mm frit length; stationary phase: 10- μ m ODS; mobile phase: methanol - water (85:15); flow-rate: 3 μ L/min; detection: 280 nm. Peak identities: (1) o-nitro acetophenone, (2) acetophenone, (3) dibenzyl ketone, (4) diphenyl ketone, (5) fluorenone.

随着毛细管内径的减少,塞子的机械稳定性将会增加。因而此法也可被用在纳级 HPLC 柱的制备上,从而使毛细管电色谱的制备技术更加多样。

2.6. 总结

以 sol-gel 方法制备毛细管 HPLC 柱上塞子,不仅机械强度高、通透性好,而且简便易行、可操作性强。SEM 图表征了其致密的立体网状结构,毛细管 HPLC 分离谱图表明了以此法装填柱子较高的分离效能,这种简便的柱上塞子制作方法为毛细管 HPLC 多维联合分离技术的实现提供了可能,使之在复杂体系的分离分析中得以更加广泛的应用。

3. 快速胶束电动色谱条件探索

3.1. 引言

胶束电动色谱 (MEKC) 于 1984 年由 Terabe 提出,它是在毛细管电泳 (CE) 中加入表面活性剂形成胶束,利用被分离组分在水相与胶束相之间分配的差异而实现分离的一种分离模式。胶束电动色谱突破了毛细管区带电泳 (CZE) 只能分离带电物质的限制,将 CE 的适用范围扩展至中性物质。

在 HPLC-CE 联合分离技术中,CE 基于与 HPLC 完全不同的分离机理,而使系统峰容量有了较大的提高。在目前此领域相关的研究中,第二维多采用 CZE 模式,但它对于中性物质并不能实现有效的分离。若以 MEKC 替代 CZE,必将使 HPLC-CE 联合分离技术对于天然产物等含有大量中性组分的复杂体系实现更加高效的分离,其应用前景也将更加广阔。

二维分离技术对于第二维的耗时有极高的要求。一般来讲,第一维的流出组分被第二维分离 3 次以上,才能不损失前一维的分离峰^{[16][17]}。因此,应尽量缩短后一维的分离时间。在快速 CZE 方面,Jorgenson 等人于 1991 年就开始

了许多有益的尝试,并在近几年的发展中取得了很大进展^[18-21]。1995年,采用快速CZE在2.5秒内分离了牛心脏细胞色素^[20]。1997年,采用RPLC-CZE联用技术在3秒内分离了FITC-精氨酸、FITC-谷氨酸、FITC-甘氨酸、FITC-苯丙氨酸,而在普通电泳中一般要花费30分钟。并且分离柱效能够达到48000理论塔板数。在连续2小时测定中,峰高、峰面积和迁移时间的标准偏差低于0.7、0.6、0.02%^[21]。而在快速MEKC方面,目前尚未见相关的报导。本论文针对含有SDS的MEKC分离模式,考察了电场强度、柱长等操作参数对于MEKC的迁移速度的影响,并探讨了在快速MEKC中最佳电泳条件的选择。

3.2. 快速MEKC理论基础

根据MEKC的分离原理,所有的中性溶质和部分带电溶质的流出时间都应在电渗流的流出时间(t_0)和胶束相的流出时间(t_{mc})之间。于是, t_{mc} 与 t_0 的比值,即 t_{mc}/t_0 被用来表征MEKC的流出窗口。在此流出窗口内,所能容纳的最大的峰的个数,即峰容量,可依据下式得到:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{mc}}{t_0} \quad (1)$$

由此可见,流出窗口 t_{mc}/t_0 、柱效 N 共同决定着峰容量 n 的大小,从而成为影响多维分离的重要参数。

根据Jorgenson^[17]的理论,在CE理想状态下,假设 $L_{eff}=L$ (L_{eff} 为有效柱长, L 为毛细管总长),则

$$N = \mu V / 2D \quad (2)$$

$$t = L^2 / \mu V = L / \mu E \quad (3)$$

μ 为电泳淌度, V 为工作电压, D 为扩散系数, E 为电场强度。

要达到快速MEKC的要求,可以通过两条途径,一是增加工作电压即场强,二是减短柱长。因此,场强、柱长,是决定快速胶束电动色谱的主要因素。但分析时间缩短的同时,有可能伴随柱效的下降。因此,衡量单位时间的柱效变化,即 N/t ,应成为考察快速MEKC的主要指标^[22]。

据色谱理论,理论塔板数(N)由塔板高度(H)来决定,即

$$N = \frac{L}{H} \quad (4)$$

在 MEKC 中, 总的塔板高度 (H_{tot}) 等于进样、检测等柱外因素, 扩散、传质、散热等柱内因素贡献的加和^[23]。即

$$H_{tot} = H_{inj} + H_{det} + H_{dif} + H_{tra} + H_{the} \quad (5)$$

通常情况下, H_{dif} 、 H_{tra} 对 H_{tot} 贡献较大, 其它各项贡献较小, 可近似为常数。则 (5) 式可简化为

$$H_{tot} = A + H_{dif} + H_{tra} = A + B/u + Cu \quad (6)$$

其中, A、B、C 为常数, u 为线速度。由 (3)、(4)、(6) 式得:

$$\frac{N}{t} = \frac{L}{t(A + B/u + Cu)} = \frac{u}{A + B/u + Cu} = \frac{1}{A/u + B/u^2 + C} \quad (7)$$

$$u = \mu E = \mu \frac{V}{L} \quad (8)$$

3.3. MEKC 的实验设计

根据 MEKC 的特点及已有的探索^[24], 我们挑选了 3 种有代表性的化合物作为探针来研究考察 MEKC 的迁移行为。其中, 以甲醇为电渗流的标记物, 苏丹 (III) 为胶束的标记物, 而二氯苯酚为在电渗流与胶束之间流出待分离组分的代表。以下图表中所指时间均为二氯苯酚的迁移时间。

实验仪器、试样如下:

毛细管电泳仪 P/ACE 5010: Beckman 公司, 254nm 柱上紫外检测。

熔融石英毛细管柱 (75 μ m i.d., 360 μ m o.d.): 河北永年光导纤维厂

十二烷基硫酸钠 (SDS): 上海化学试剂公司进口分装, 使用前提纯处理, 以乙醇回流、重结晶两次^[25]。

硼砂、磷酸二氢钾、甲醇、二氯酚: 分析纯

苏丹 (III): 上海试剂厂。

配置盐浓度为 5mmol/L 硼砂+2mmol/L 磷酸二氢钾, SDS 浓度 100mmol/L 的缓冲液; 配置甲醇、二氯酚、苏丹 (III) 的混合样品。

采用压力进样方式, 进样时间 1 秒。采用恒压方式电泳。每次 CE 分离后

用甲醇、超纯水、缓冲液依次清洗毛细管。

3.4. 电场强度对快速 MEKC 的影响

根据公式 (3), 提高电压即场强, 是实现快速 MEKC 的一条途径。在一定柱长和 SDS 浓度条件下, 我们在不同电压条件下考察了 MEKC 的变化规律, 结果如表 2-2。

表 2-2 电场强度对快速 MEKC 的影响

(电泳条件: [SDS]=100mM, L=47cm)

V(KV)	E(v/cm)	t(min)	N	N/t (/s)
7	149	33.49	94,000	46.780
10	213	21.49	129,000	100.046
15	319	13.37	176,000	219.396
20	426	9.96	189,000	316.265
25	532	7.16	116,000	270.018
29	617	5.63	65,000	192.421

将不同场强下的电泳淌度 μ 看作常数。则由 (7)、(8) 式得:

$$\frac{N}{t} = \frac{1}{\frac{A}{\mu E} + \frac{B}{(\mu E)^2} + C} = \frac{1}{\frac{A'}{E} + \frac{B'}{E^2} + C'} \quad (9)$$

由表中 $N/t-E$ 数据进行拟合, 可得 $A'=-10.248$, $B'=1993.8$, $C'=0.016244$ 。所建立理论数学模型与实验结果的比较如图 2-5 所示。可看出理论值与实验值偏差较小, 说明数学模型实验规律基本吻合。

分析曲线的变化趋势, 可以看出, 在较低场强时 ($E < 195 \text{ v/cm}$) 时, $\frac{B'}{E^2}$ 在分母几项中数值最大, 说明此时扩散项占主导因素, $N/t-E$ 函数关系在此范围内近似二次函数。E 从 195 v/cm 增至 390 v/cm 范围内, $\frac{A'}{E}$ 的绝对值已超过 $\frac{B'}{E^2}$ 项, N/t 随 E 近似线性增加。在 E 达到 390 v/cm 时, $\frac{A'}{E} + \frac{B'}{E^2}$ 数值最小, N/t 达到最大值。E 继续增加, 使传质项 C' 所占比例越来越大。N/t 逐渐减少, 最

后趋于一恒定值。

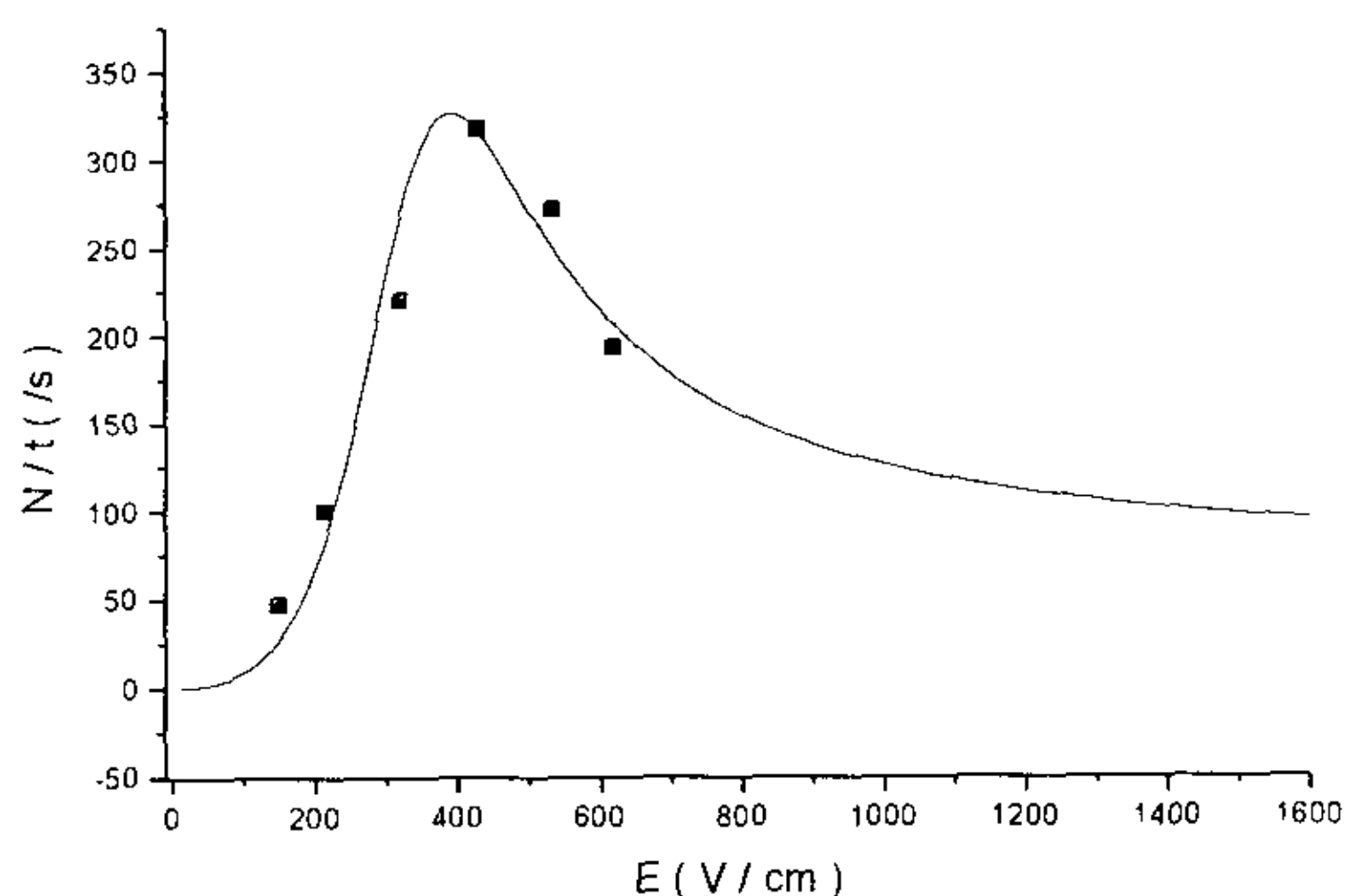


图 2-5. 电场强度 E 对 N/t 的影响。曲线：理论模型；散点：实验数据。

由此看出，由于传质项的作用，使 N/t 随 E 并未一直保持增大的趋势，而是有一最佳值。对于 $[SDS]$ 为 100mM 的缓冲体系，最佳场强值为 390V/cm 。但此最佳值亦随 SDS 浓度、盐浓度、溶质的不同，而有所变化。例如，对于 $[SDS]$ 为 50mM 的 MEKC 体系^[24]， E 最佳值为则增加至 460V/cm ，如图 2-6。

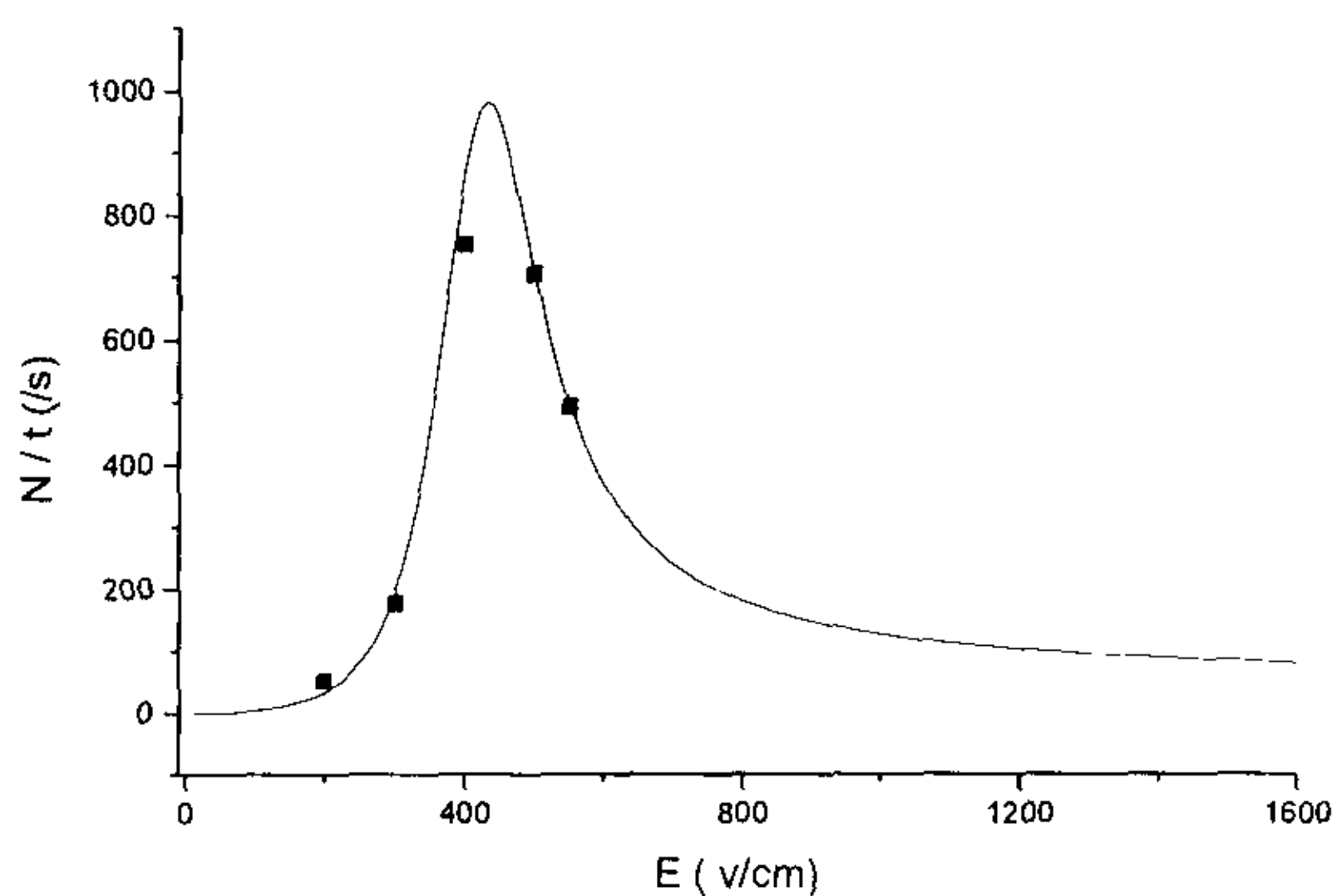


图 2-6. $[SDS]$ 为 50mM 条件下场强对 N/t 影响。曲线：理论模型。散点：实验数据。

3.5. 柱长对快速 MEKC 速度的影响

据公式 (3), 分析时间会随柱长呈指数倍变化。因此, 缩短柱长是实现快速 MEKC 的重要途径。在固定电压情况下, 改变柱长, 所得数据如表 2-3 所示^[24]。

表 2-3 柱长对快速 MEKC 的影响

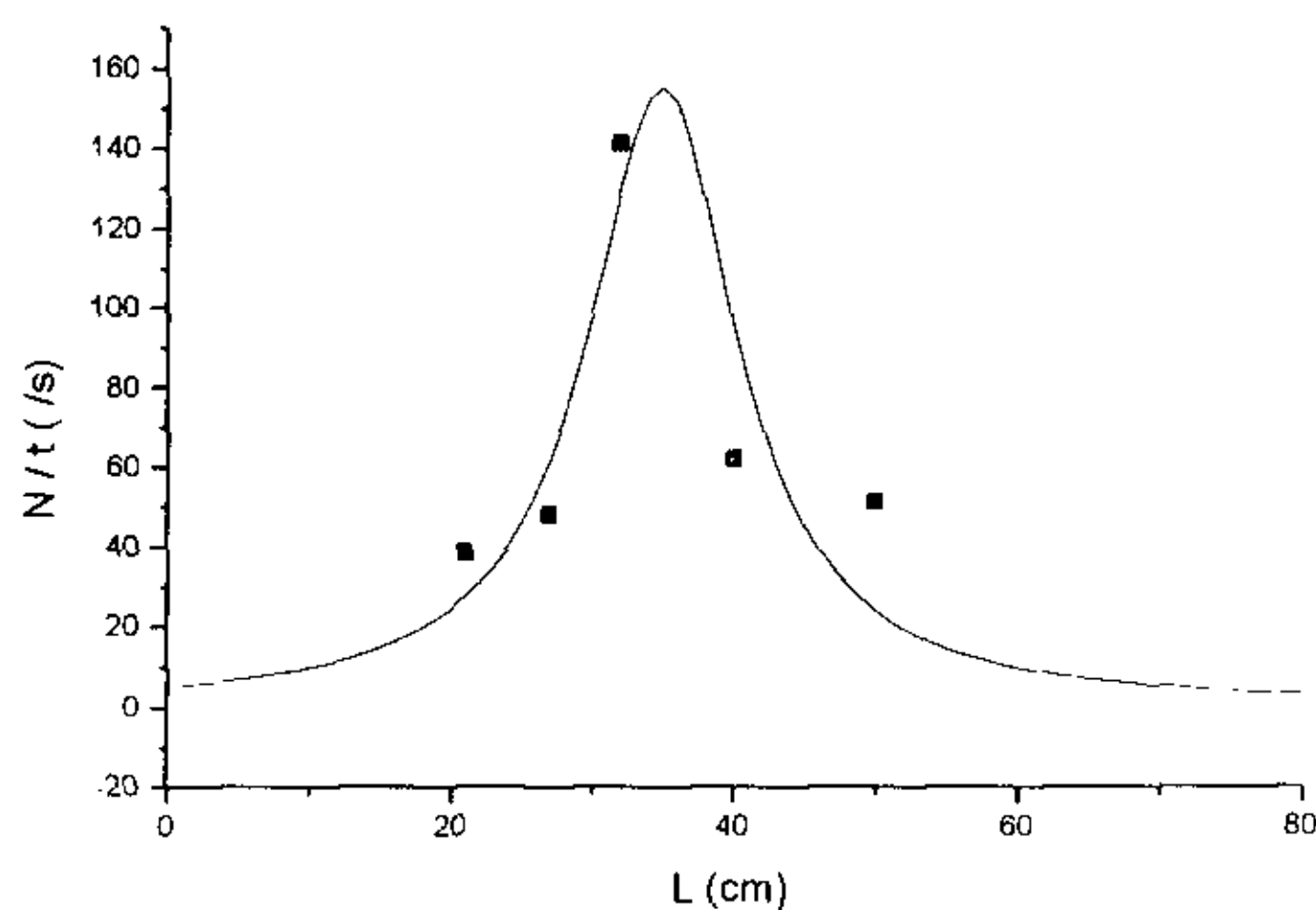
(电泳条件: [SDS]=50mM, V=10kv)

L (cm)	t (min)	N	N/t (/s)
50	23.2	71,000	50.973
40	20.9	77,000	61.600
32	11.82	100,000	140.893
27	13.27	38,000	47.850
21	8.62	20,000	38.368

若将 μV 近似看作常数, 则由 (7)、(8) 式得:

$$\frac{N}{t} = \frac{1}{\frac{AL}{\mu V} + \frac{BL^2}{(\mu V)^2} + C} = \frac{1}{A''L + B''L^2 + C''} \quad (10)$$

利用表中 $N/t-L$ 数值, 经拟合得到 $A''=-0.01092$, $B''=0.0001563$, $C''=0.1972$ 。从建立的理论模型来看 (图 2-7), N/t 随 E 的变化也有一最佳值。在电压为 10kv 条件下, 此最佳值为 35cm。柱长过长 (大于 50cm)、过短 (小于

图 2-7. 柱长 L 对 N/t 的影响。曲线: 理论模型; 散点: 实验数据。

20cm) 时, N/t 趋于极小。由于过分缩短柱长, 分析时间虽大大降低, N/t 也大幅度下降, 所以柱长的缩短有一定的限度, 并不能一味地通过缩短柱长来达到快速 MEKC 的目的。

从以上关于场强和柱长对快速 MEKC 行为影响的讨论中可以看出, N/t 随 E 、 L 的变化有一最佳值。不能一味地提高电压或减小柱长。因此, 保持一定的柱长, 并提高电压, 是实现 MEKC 的最佳途径。

4. 毛细管高效液相色谱 - 毛细管电泳联合二维分离体系的建立

4.1. 引言

多维分离技术, 因其潜在的高峰容量, 在生物、医药、环境等领域的复杂样品的分离分析中日益受到关注。将毛细管 HPLC 与 CE 这两种高分辨色谱模式联用, 由于它们完全不同的分离机理, 尤为适合对生物大分子、天然产物等复杂体系的分离分析。

联合二维 HPLC-CE 分离技术, 要求按照一定的采样频率, 不断地将第一维 HPLC 流出物转移入第二维 CE, 进行分离分析。在此联用技术中, 接口的设计是极为重要的环节。它必须达到易于自动化、进样效率高、重现性好的性能要求。由于其技术难度较大, 目前仅有少数探索性研究, 如 Jorgenson 等人设计的光门阀与流动阀等。

本论文研究了一种全新的动态脉冲接触式接口技术。与已有的静态接口相比, 这种动态接口在设计原理上有了新的突破。它以两根毛细管柱的接触实现进样, 提高了进样效率。同时样品的冲洗时间缩短, 减小了谱带展宽, 有利于第二维的分离。利用这种接口, 使样品在第二维的进样浓度达到第一维流出浓度的 81%, 100 次连续进样峰高及迁移时间的 %RSD 平均值分别为 3%、1.8%, 进样时间也得以缩短。

4.2. 二维分离的接口设计

二维 HPLC-CE 系统如图 2-8 所示。第一维的 HPLC 分离在改装的 Shimadzu LC-4A 高效液相色谱仪（日本岛津制作所）上进行，毛细管 HPLC 柱 $250\mu\text{m}$ i.d., $380\mu\text{m}$ o.d.（河北永年光导纤维厂），以匀浆法自行装填。第二维 CE 利用 30 kV 高压电源（中国科学院上海原子核所）的负高压进行分离。以 30mM SDS 与 6mM 硼砂溶液做为缓冲电解质。毛细管柱 $50\mu\text{m}$ i.d., $360\mu\text{m}$ o.d.（河北永年光导纤维厂），总长 30 cm，距进样端 23 cm 处烧制一泡状检测池^[26]，以 Waters 484 可调波长紫外检测器（美国 Waters 公司）在波长 210nm 实现柱上检测。

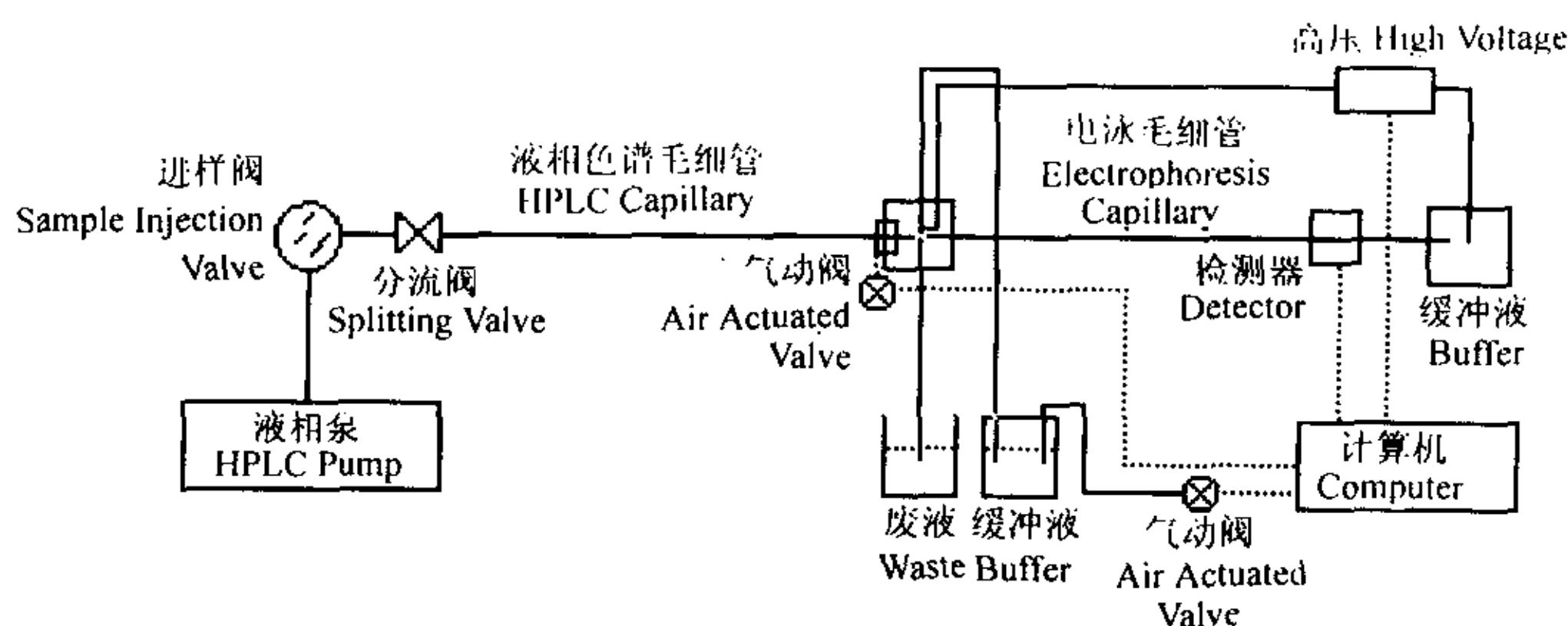


图 2-8. 毛细管 HPLC-CE 二维分离装置示意图

接口的结构如图 2-9 所示，它采用工程塑料材料加工设计而成，自制 HPLC 毛细管柱与固定的电泳毛细管柱由同轴套管相接。图 2-10 为接口的工作时序图。在 CE 分析状态，HPLC 柱与 CE 柱保持一定距离，由气动阀控制的缓冲液从套管中间孔洞流过，洞口直径约 1.5mm。一部分缓冲液流入 CE 柱中，使样品在高压电场下分离，大部分缓冲液则携带第一维流出物成废液流出。CE 分离结束后，电压回零，缓冲液继续流动，以保证两毛细管柱之间没有残留的第一维流出组分。0.5s 后，由气动阀驱动的 HPLC 柱向前运动与 CE 柱接触，同时缓冲液停止流动，使第一维流出组分能充满 HPLC 毛细管柱和 CE 毛细管之间的空隙。

保持 1s 后, 电压升至设定的进样电压, 通过电迁移作用而实现二维 CE 的进样, 进样 2s, HPLC 柱复位, 电压回零, 缓冲液流动。0.5 s 后, 电压升至工作电压, CE 分离开始。

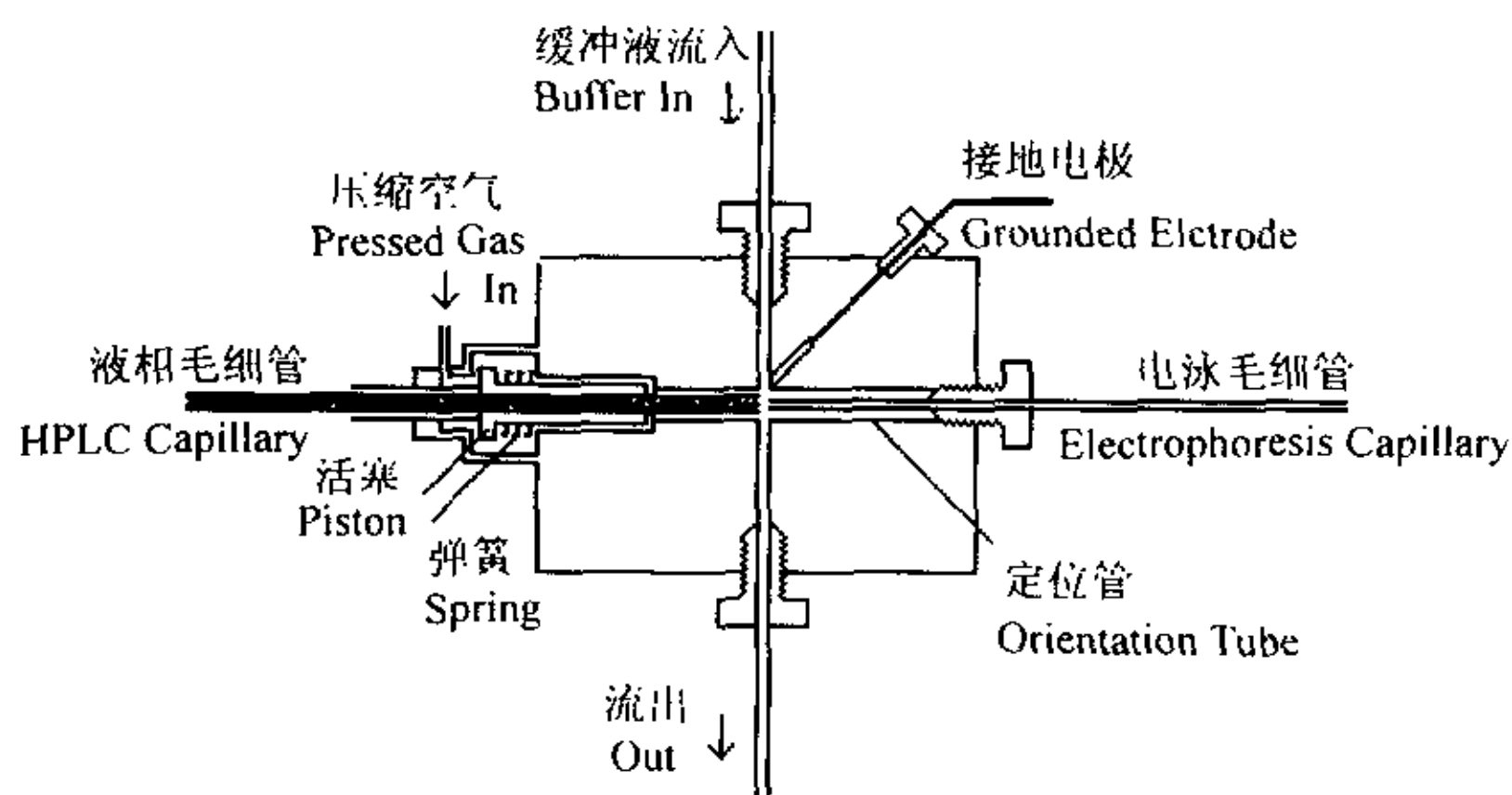


图 2-9. 动态脉冲接触接口示意图。

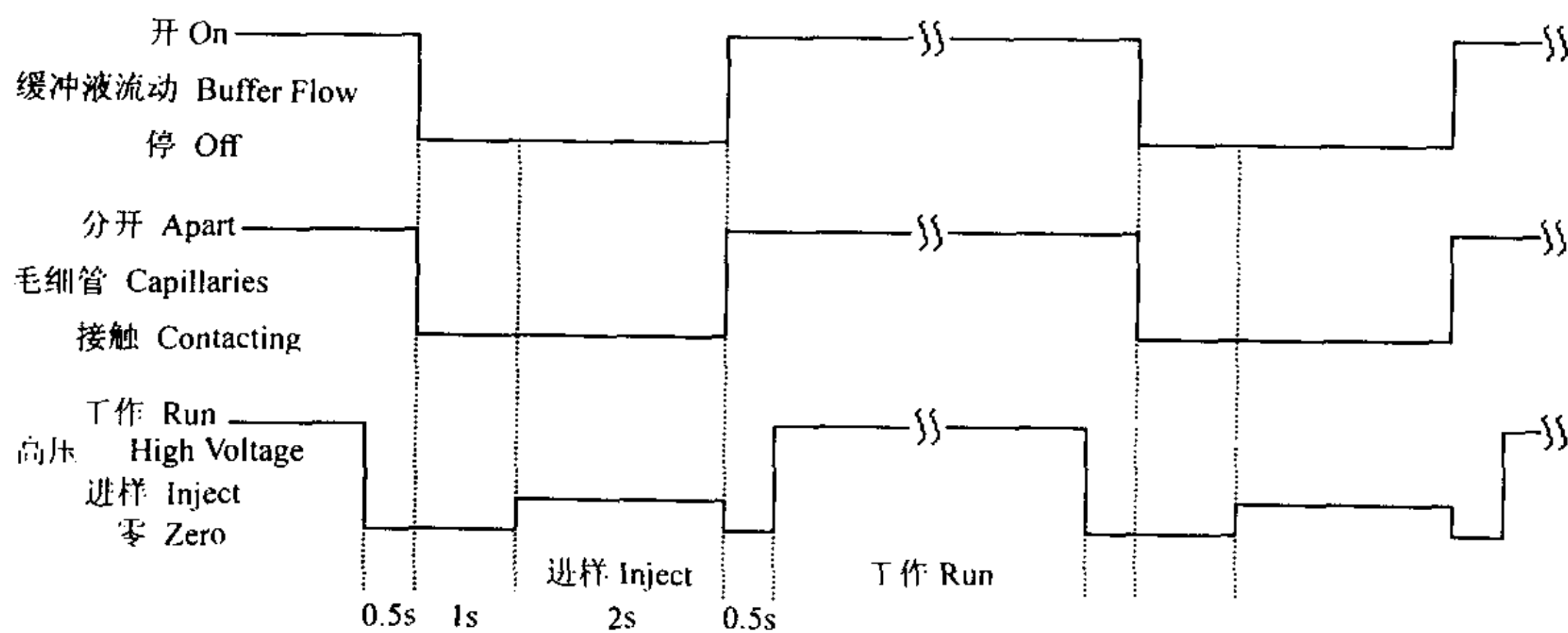


图 2-10. 动态脉冲接触接口时序图

接口的性能评价, 是以一根 $250\mu\text{m}$ i. d. 的毛细管空柱替代 HPLC 毛细管柱完成的。样品依照与 HPLC 毛细管柱相近的流量 ($1.0\text{--}1.5\mu\text{L}/\text{min}$) 从空柱流出, 类

似二维分离第一维的流出组分, 经动态接口, 进行第二维 CE 的分离。

检测信号以自行设计的数据接口板和工作站软件进行采集处理, 等高线图采用 Origin5.0 软件绘制。

4.3. 二维分离接口的评价

4.3.1 接口的优化

这种动态的脉冲接触接口技术, 与静态的流动阀接口进样技术不同。它利用 HPLC 柱与 CE 柱的短暂接触, 而非样品在两柱间的逐渐堆积来实现进样。这样不仅有效地减小了在接口处的样品稀释, 而且使进样过程缩短、进样浓度增加、峰宽降低。

经过优化, HPLC 柱与 CE 柱保持间距 0.5mm 左右为宜。若间距大于 0.5 mm, 在实施进样时, HPLC 柱与 CE 柱接触所需冲程过长, 会造成进样量重现性的降低。而间距小于 0.5mm 时, 则需要较大的缓冲液流动速度或较长时间, 方可将 CE 柱头残余组分及时地冲洗干净。此外, 缓冲液流动速度为 0.1-0.12mL/min 时, 即可保证 CE 良好的峰形。过低时, 由于冲洗不完全, 则造成 CE 峰拖尾、基线不稳。

对于第二维 CE 的分离, L_{inj} (样品起始宽度) 是影响分离效率的一个极为重要的因素^[27, 28]。根据电动进样公式, L_{inj} 与 V_{inj} (进样电压), T_{inj} (进样时间) 成正比^[29]。因此在通常选定的电迁移进样电压 5kV 下, 我们以 1×10^{-4} M 间苯二酚为探针, 进行了不同进样时间的比较, 结果如表 2-4 所示。从表中可以看出, T_{inj} 小于 2s 时, 峰高随 T_{inj} 近似线性增加, 而峰宽只有微小变化。而当 T_{inj} 大于 2s 时, 峰高随 T_{inj} 增加减慢, 而峰宽增大明显。结果表明, 对于实验所采用的 CE 毛细管, 在 V_{inj} 为 5kV、 T_{inj} 为 2s 时, 系统可以在不损失柱效的情况下, 获得最高的灵敏度。而进一步增加 CE 进样量, 只会使峰宽增加, 柱效降低。这一结果与相关的理论和实验报导相符合^[27]。故以下实验选定此条件实现接口切换进样。

表 2-3 进样时间对 CE 峰高和峰宽的影响

进样时间 (s)	1	2	3	4
峰高 (mau)	3.99	7.58	8.70	8.82
峰宽 (s)	0.72	0.79	1.01	1.37

4.3.2 接口的进样效率

动态接口的设计原理表明, 通过两根毛细管柱的短暂脉冲接触来实现进样, 可以有效地提高样品利用率和系统检测浓度。对于此二维联用技术, 样品总的浓度利用效率等于经 HPLC 柱分离、接口、CE 分离浓度利用效率的乘积, 即 $\frac{C_2}{C_0} = \frac{C_1}{C_0} \cdot \frac{C_r}{C_1} \cdot \frac{C_2}{C_r}$ 。其中 C_0 、 C_1 分别为 HPLC 柱进样浓度、流出浓度, C_r 为经接口切换后样品浓度, C_2 为 CE 检测浓度。等式中 $\frac{C_r}{C_1}$ 即为所讲的接口进样效率。为评价其对系统检测浓度的影响, 我们做了以下对照实验。

以 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 间苯二酚作为研究对象, 分别采用直接电迁移进样、经接口切换进样两种方式进行 CE 分离。如表 2 所示, 采用相同的分离条件, 在两种进样方式下柱效没有明显差异, 而从峰高即浓度的比值中, 可推知样品经接口切换后浓度为初始浓度的 81%, 表明了接口较高的进样效率。与常规 $250 \mu\text{m}$ HPLC 毛细管柱的浓度利用效率相比^[28], 接口并未对样品的稀释造成很大的影响。

表 2-4 直接电迁移进样与经接口切换进样的比较

	直接电迁移进样	经接口进样
进样时间 (s)	2	2
进样电压 (kV)	5	5
峰高 (mau)	9.25	7.49
塔板数	89,362	86,485

4.3.3 接口的重现性

动态接口的重现性,也是一个至关重要的问题。我们以浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 的邻、间、对苯二酚混合样品为对象,连续切换进样,如图 2-11。三种组分 100 次连续进样的峰高及迁移时间相对标准偏差(%RSD)平均值分别为 3%、1.8%,如表 3 所示。实验证明这种以动态的脉冲接触来实现的二维接口进样切换技术具有良好的重现性。

4.4. 二维分离操作条件的选择

在联合二维分离体系中,为了发挥接口的最佳效能,第一维与第二维操作条件的匹配是重要的一环。研究表明,二维分离第一维流出的每个色谱峰需用第二维至少分离三次,方能不损失第一维流出色谱峰的基本峰形。比如第一维 HPLC 色谱峰的流出时间为 3min,则第二维 CE 的分析时间不宜大于 1 min。因此缩短第二维的分析时间非常重要。

缩短 CE 分析时间的两条途径为缩短柱长和提高电压。CE 中的毛细管胶束电动色谱(MEKC)分离模式可以有效地提高对中性物质的分离效能,然而有关快速 MEKC 的研究尚未见报道。根据对快速 MEKC 的理论探索,我们发现保持一定的柱长,并提高电压,可以使 MEKC 的整个分析时间大大缩短,而峰容量和柱效又不会损失太大。

同时,在第一维采用毛细管 HPLC 柱,降低了第一维到第二维的样品稀释,提高了系统的检测灵敏度。而使用近 1m 长的 HPLC 柱,以及较低的流速(1.0-1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$),也有利于与第二维操作条件的匹配。此外,HPLC 采用梯度洗脱来实现样品的柱头富集,CE 采用泡状检测池,也都有效地提高了系统的检测灵敏度。

4.5. 总结

自行设计的毛细管 HPLC-CE 二维分离的动态脉冲接触式接口,进样效率高、重现性好、完全自动化,满足了多维分离的要求。加之相关的毛细管 HPLC 柱制

备技术的成熟、快速 MEKC 理论的发展,使整个 HPLC- MEKC 二维分离体系的方法学得以完全建立。利用此二维系统,我们对中药等复杂体系实现了高效分离,详细讨论见第三章。

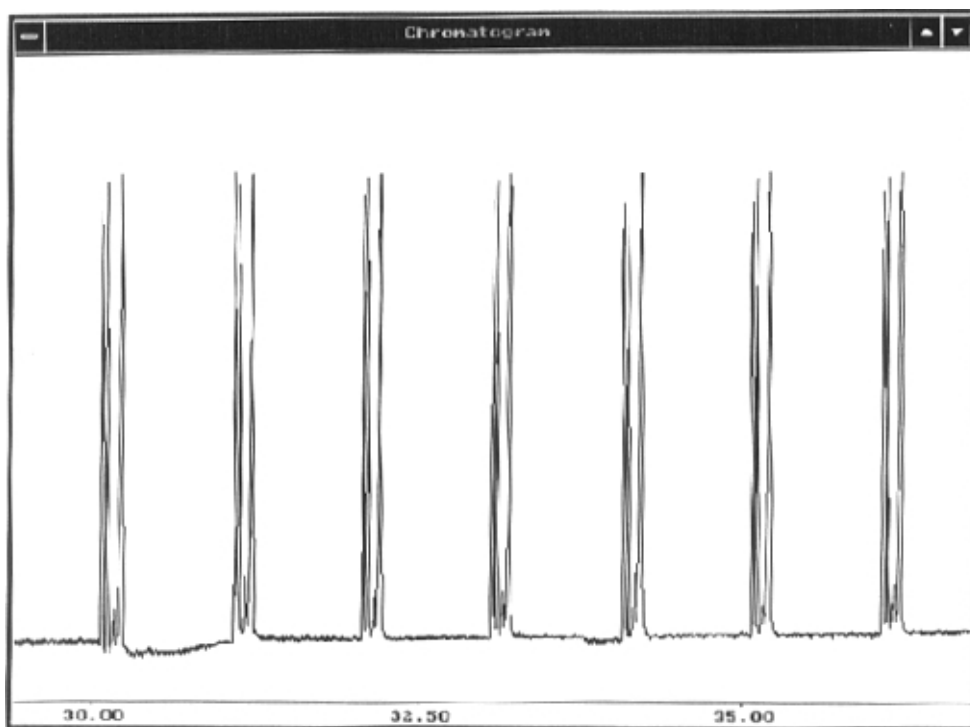


图 2-11 邻、间、对苯二酚经接口连续切换进样 30 min-36 min CE 分离谱图。CE 工作电压: 20kv; 进样: $5\text{kv} \times 2\text{s}$; 缓冲液: 30mM SDS+ 6mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 。

表 2-7 100 次连续 CE 分离的峰高及迁移时间

	峰高			迁移时间		
	平均值	标准偏差	相对标准偏差	平均值	标准偏差	相对标准偏差
	(mau)	(mau)		(s)	(s)	
对苯二酚	7.102	0.214	3.0	30.0	0.450	1.5
间苯二酚	7.511	0.195	2.6	32.64	0.588	1.8
邻苯二酚	7.763	0.260	3.4	38.46	0.84	2.2

5. 参考文献

- [1] Gluckman, J. C.; Hirose, A.; McGuffin, V. L.; Novotny, M. *Chromatographia*, 1983, 17(6): 303
- [2] Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1989, 61: 128
- [3] Yang, F. J. *J. Chromatogr.* 1982, 236: 265
- [4] Tang, Q.; Xu, B.; Lee, M. L. *J. Chromatogr.* 1999, 837, 35
- [5] Fujimoto, C.; Kino, J.; Sawada, H. *J. Chromatogr.* 195, 716: 107
- [6] Fields, S. M. *Anal. Chem.* 1996, 68: 2709
- [7] Asaine, R., Huang, X.; Farnan, D.,; Horuath, C. *J. Chromatogr.*, 1998, 806: 251
- [8] 史坚, *现代柱色谱分离技术*, 1988, 上海科学技术文献出版社, 317
- [9] Behuke, B.; Grom, E.; Bayer, E. *J. Chromatogr.* 1995, 716,: 207
- [10] Vissers, J. P. C.; Claessens, H. A.; Cramers, C. A. *J. Chroamtogr.* 1997, 779: 1
- [11] Yamomoto, H.; Banman, J., Erini, F. *J. Chromatogr.* 1992, 593: 313
- [12] Yan, C.; Schanfelbberger, D.; Erni, F. *J. Chromatogr.* 1994, 670: 15
- [13] Cortes, H. J.; Bfeiffer, C. D.; Richer, B. E.; Stevens, T. S. *J. Hgh. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commu.* 1987, 10 146
- [14] Guo, Y.; Colin, L. A. *Anal. Chem.* 1995, 67: 2511
- [15] Wang, D.; Chon, S. L.; Malik, A. *Anal. Chem.* 1997, 69: 4566
- [16] Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P. *Anal. Chem.* 1998, 70 : 1585
- [17] Holland, L. A.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1995, 67: 3275
- [18] Monning, C. A.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1991, 63: 802
- [19] Moore, A. W.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1993, 65: 3550
- [20] Moore, A. W.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1995, 67: 3448

- [21] Hooker, T. F.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1997, 69: 4134
- [22] Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1994, 66: 1114
- [23] Sepaniak, M. J.; Cole, R. J. *Anal. Chem.*, 1987, 59: 472
- [24] 柳臻, 胶束电动色谱理论及高灵敏度方法研究, 复旦大学硕士学位论文, 1999: 20
- [25] Hames, B. D.; Rickwood, D., 刘毓秀, 程桂芳译, 蛋白质的凝胶电泳-实践方法, 北京, 科学出版社, 1981: 19
- [26] 张祥民, 柳臻, 姚健, 黄爽, 分析化学, 1999, 27(4): 485
- [27] Huang X.; Coloman W. F.; Zare R. N. *J. Chromatogr.* 1989, 480: 95
- [28] Schure, M. R. *Anal. Chem.* 1999, 71 (8): 1645
- [29] Jorgenson J. W.; Lukacs K. D. *Sciences.* 1983, 222: 266

第三章 高效微分离方法应用研究

1. 高效液相色谱-毛细管电泳技术在天然化合物组分分析中的应用

1.1. 引言

以天然植物药为主的中医药是我国医药宝库的重要组成部分，中药材及其复方制剂，以其独特的疗效，而日益引起世界的关注。近几十年来，我国对中药的药材、炮制、化学、制药工艺、质量标准、药理、毒理、及临床等方面都开展了大量的研究，为实现中药现代化奠定了一定的基础。

要与国际接轨，中药的质量问题、药效机理研究仍显得比较突出。就中药材质量而言，由于其多为天然产物，在生长、采收、加工、储藏过程中受诸多因素影响，本身质量就有差异，以其为原料生产的中药饮片和中成药，如果生产过程缺乏科学化、规范化的生产工艺和检测手段的跟踪，必然造成产品质量的不稳定，其结果直接影响了中药的安全、有效^[1]。就药理来看，中药的化学成分，尤其是有效成分，是中药发挥药效的物质基础。但中药的有效成分极为复杂，大部分结构尚不清楚。某些药材中有效组分含量极低。若没有现代化的分析化学方法，不能指明其化学组成，就很难从分子反应水平阐明药物的药理，同时阻碍了药代动力学的进一步研究。

色谱技术由于其兼具分离和鉴别两种功能，而在中药的质量控制、成分分析中占有重要位置。它可以鉴别药物真伪、区别类同品，控制剧毒药的微量成分限度。同时，它既能对已知有效成分的品种定性定量，又可对成分未明确或成分复杂的品种进行指征成分分析或进而做指纹图谱分析^[2]。

有关中药成分的分析研究，从分析对象来说，可分为各类有效成分（生物碱、黄酮、香豆素、有机酸、各种甙类等）和复方制剂的分析。就分析方法来看，高效液相色谱、薄层扫描法、气相色谱都被用做为中药的常规分析手段，其中以高效液相色谱应用最为广泛。但它在实际应用中常遇到麻烦。一是不适用于提取困难的样品的分析。二是中药成分多样，HPLC 即使采用梯度洗脱技术，

也很难实现其成分的完全分离,且分析时间长、分离效率低。此外,柱子的污染、堵塞也是容易碰到的问题。

毛细管电泳作为一种迅速发展的柱分离技术,以其微量、快速、高效、分离模式多样的特点,而在中药分析中崭露头角^[3-4]。其中毛细管区带电泳(CZE)多用于中药提取物带电组分的分离,如生物碱、有机酸等^[5-6]。而胶束电动色谱(MEKC)则被用于黄酮、蒽醌、香豆素等中性组分的分离^[7-9]。此外,毛细管电泳,毛细管等速电泳也相继被用于中药成分分析^[10]。在对中药材有效成分分析的基础上,毛细管电泳还被用在小承气汤、小柴胡汤、加味道遥散等复方及制剂的研究中^[11-13]。

中药提取困难,且成分复杂,有效组分含量低,因此发展高效、快速的微分离技术是天然药物药理研究、质量控制的迫切需要。本论文以甘草、大黄、银杏等中药提取物和复方小承气汤为研究对象,将毛细管高效液相色谱及其与胶束电动色谱联用等微分离技术用于天然化合物的分析,显示了这些微分离方法高效、快速、灵敏的优势。

1.2. 毛细管高效液相色谱在天然化合物中的应用

高效液相色谱(HPLC)是目前广泛采用的中药成分分析的手段,使用毛细管HPLC,将使样品用量大大减少,同时其分离效能、检测灵敏度都得以提高。目前,极少有人进行这方面的中药应用研究。

1.2.1 实验仪器与试样

LC-4A 泵、LC 六通进样阀: Shimadzu 公司

Waters484 可调波长紫外检测器: Waters 公司

自行装填熔融石英毛细管 HPLC 柱

毛细管 250 μ m i.d. $\times$ 50cm: 河北永年光导纤维厂,

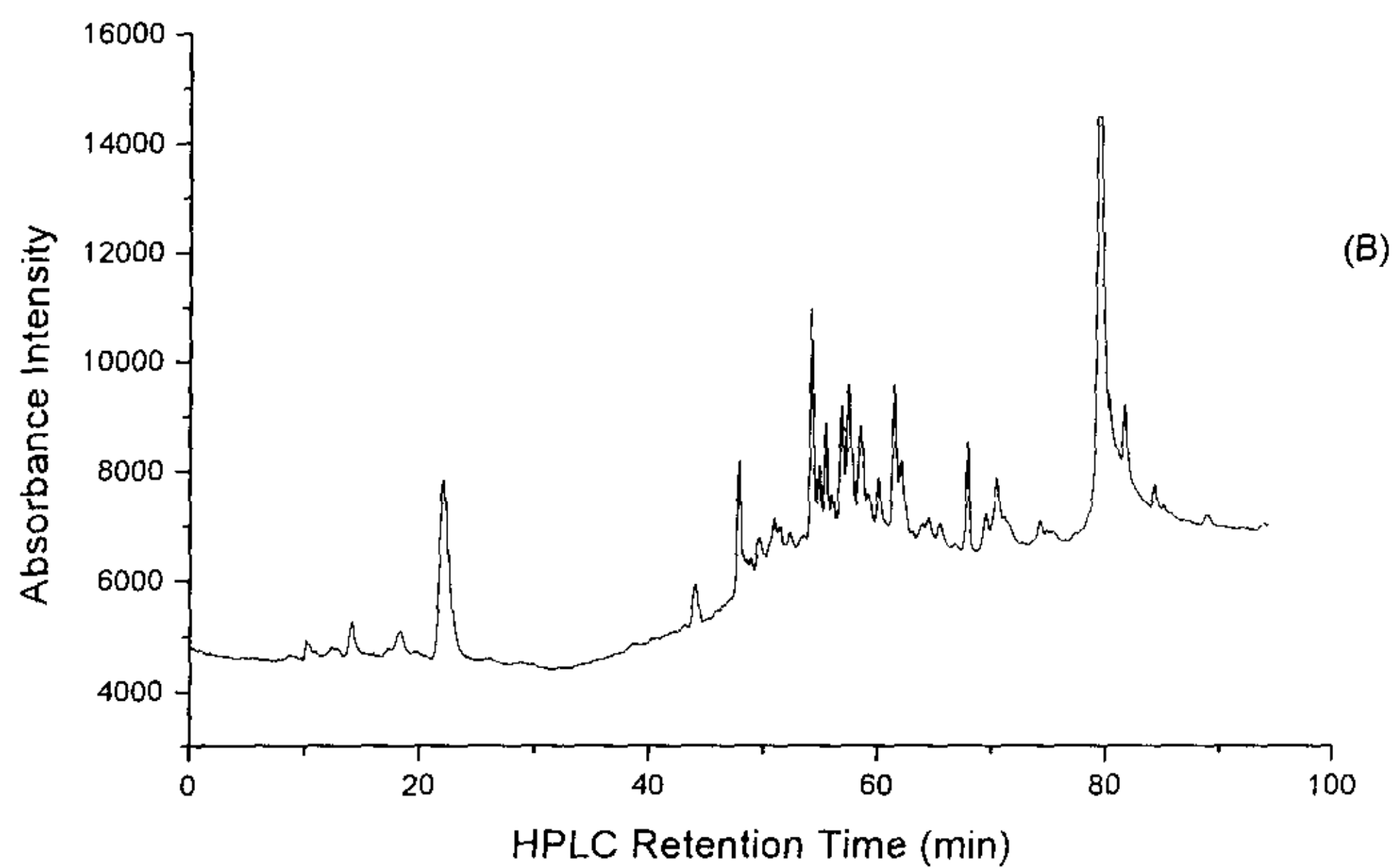
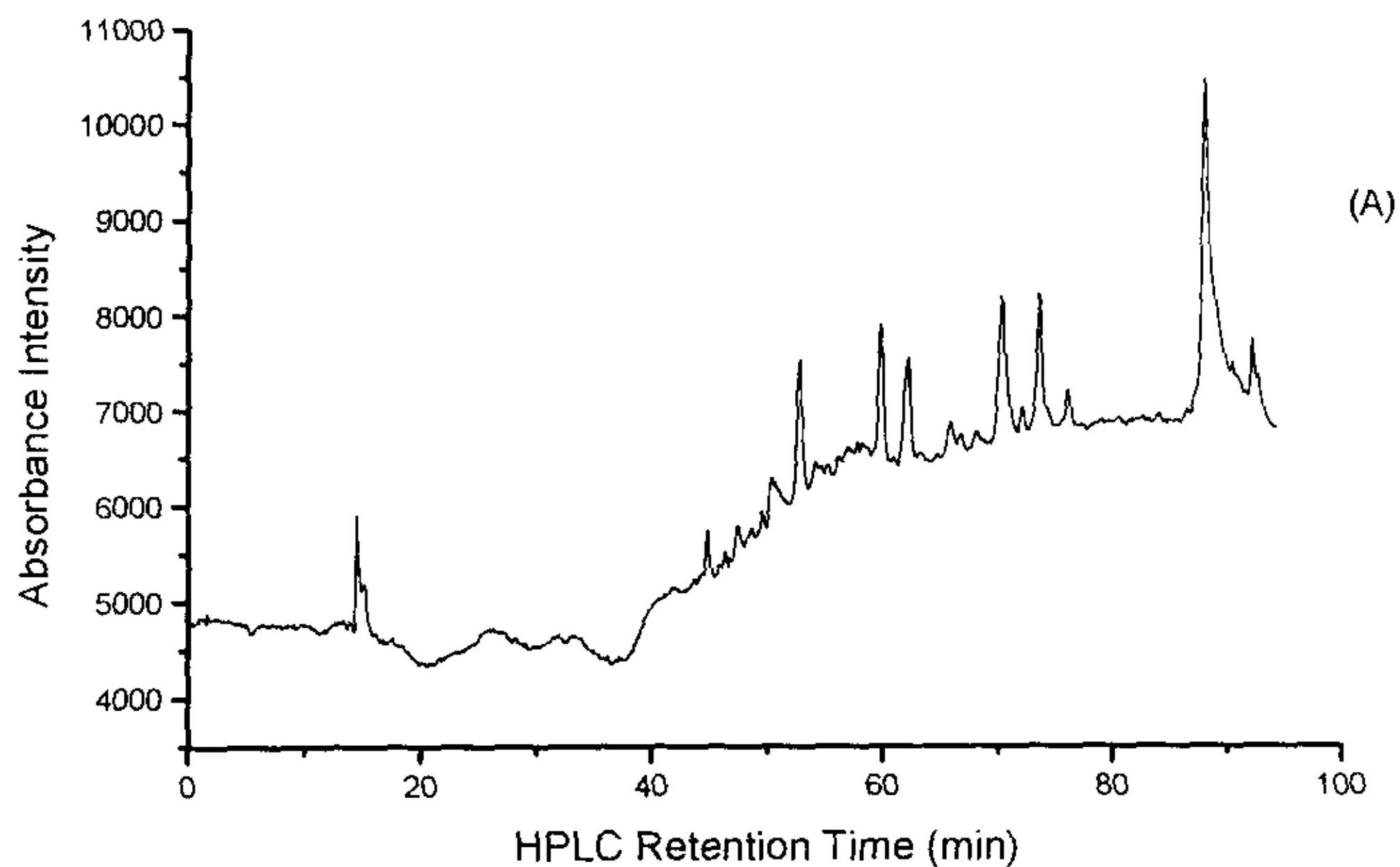
固定相 10 μ m 十八烷基硅烷(ZORBAX BP-ODS): Du-Pont 公司

甲醇、磷酸: 分析纯

各类中草药均购自上海健民药店。取大黄、甘草、银杏各 10g, 小承气汤

11g (大黄: 厚朴: 枳实 质量比为 4: 3: 4), 分别加 60 mL H_2O , 浸泡 2h 后, 加热回流 0.5h, 冷至室温, 过滤, 冷藏。进样前, 以 $0.45\mu m$ 微孔滤膜过滤。

1.2.2 结果与讨论



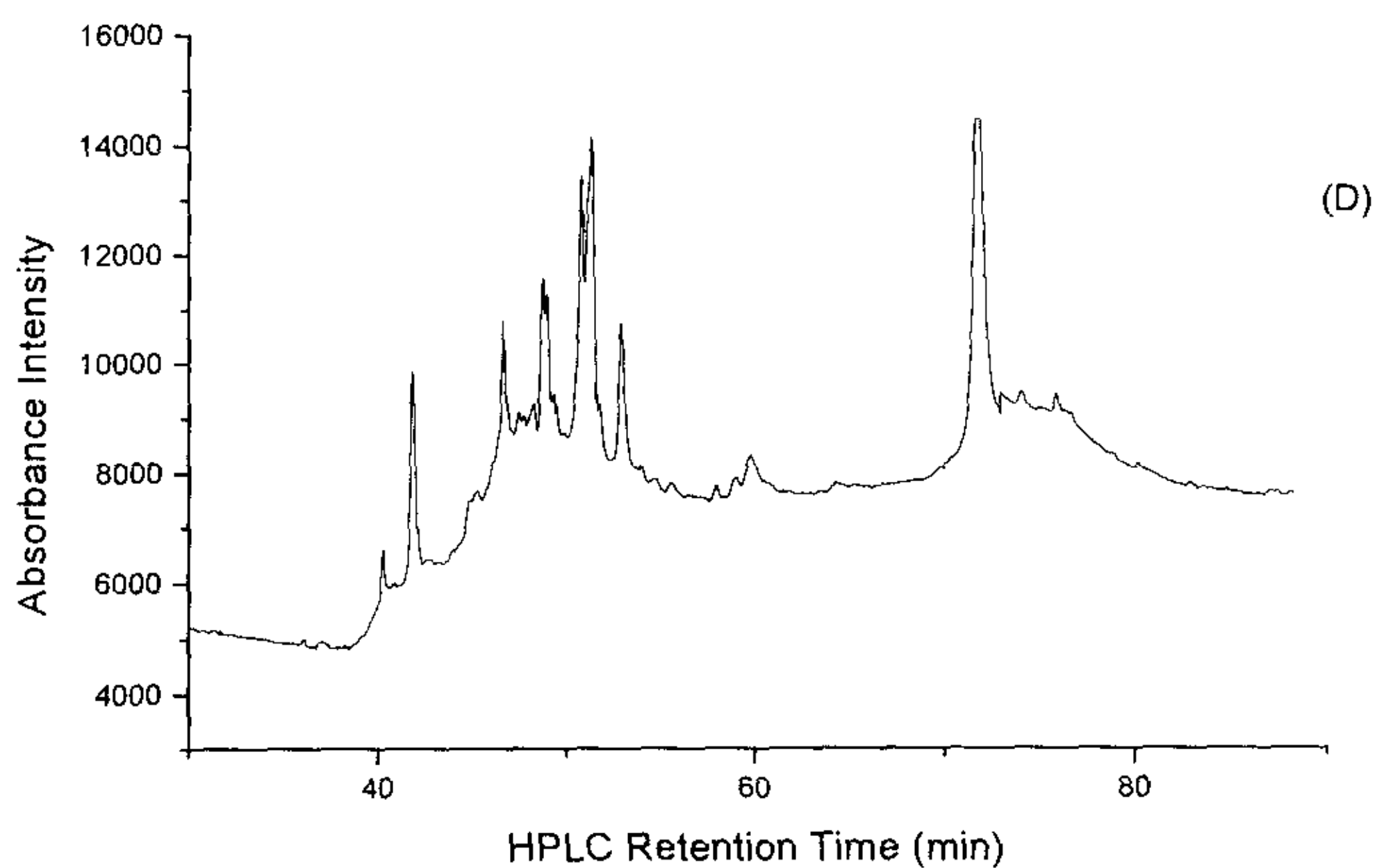
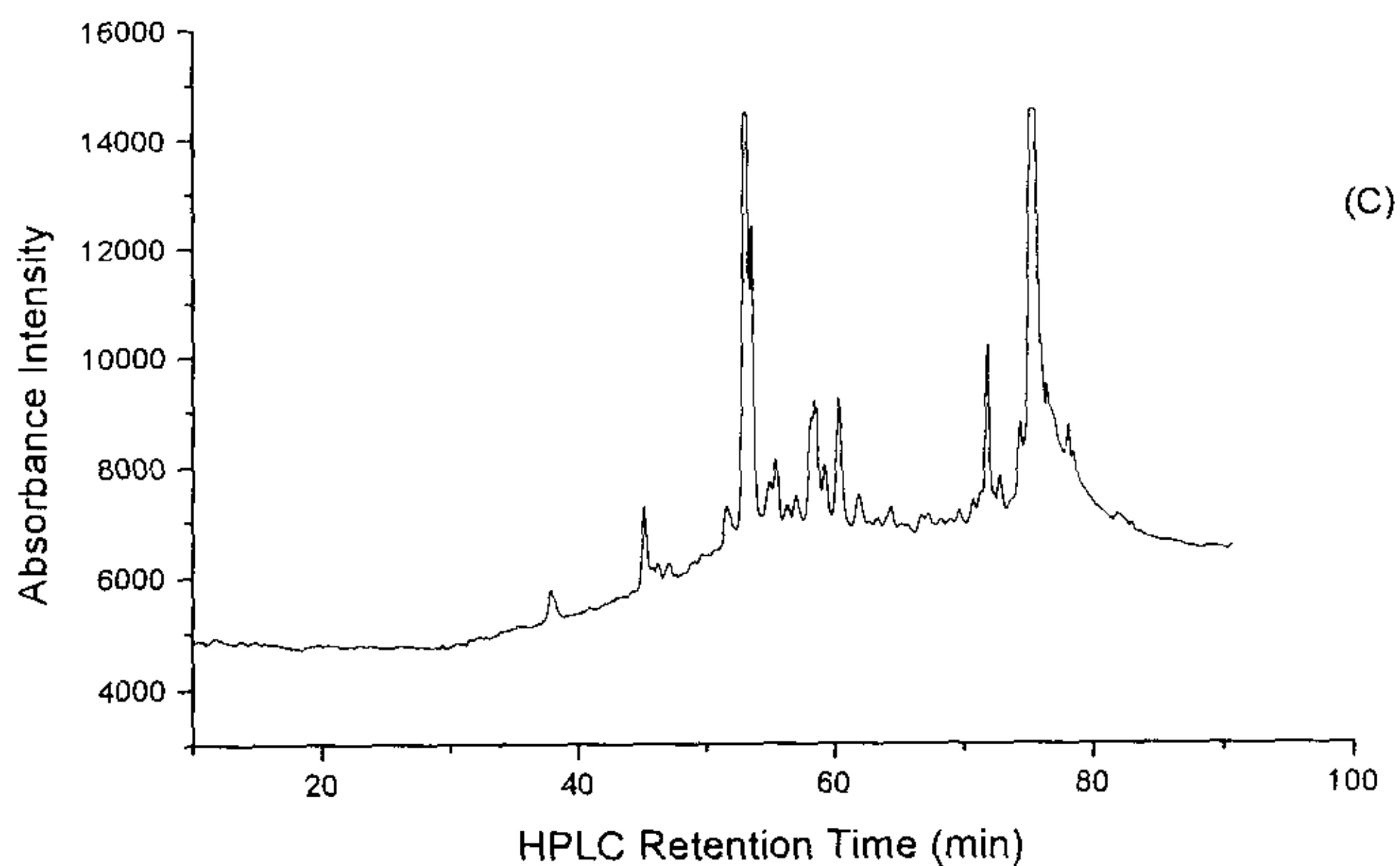


图 3-1. 中药提取物的毛细管 HPLC 分离谱图。C₁₈HPLC 柱: 250 μ m i.d. $\times$ 50cm; 流动相: 甲醇 (a)、0.005M 磷酸 (b); 进样: 10 μ L; 流速: 0.4mL/min; 分流比 100:1; 检测波长: 280nm. (A) 银杏。洗脱梯度: 10% a 保持 2min, 30min 内线性增加至 50%a, 保持 6min, 22 min 内线性增加至 90%a, 10 min 内线性增加至 100%a, 保持 50min. (B) 大黄。洗脱梯度: 10% a 保持 2min, 50min 内线性增加至 90%a, 保持 70min. (C) 甘草。洗脱梯度同 (B). (D) 小承气汤。洗脱梯度同 (B).

在所选用梯度条件下,对银杏、大黄、甘草、小承气汤提取物的分离谱图见图 3-1 (A)、(B)、(C)、(D)所示。

常规 4.6mm i.d. HPLC 柱,进样量 20 μ L,流量 0.5-1.5mL/min,使用毛细管 HPLC 柱。使用毛细管 HPLC 柱,即使在分流的情况下,样品与流动相的消耗量都得以降低。从分离效能来看,采用梯度洗脱条件,在近 1h 的有效分离时间内,分离效果并不逊色于常规 HPLC 柱。

但从图中也看出,许多组分峰重叠在一起,尚未分开,或未达到基线分离。这些组分可能在 HPLC 柱上保留性质极为相近。在此一维分离模式下,若想达到更高的分离效能,只有进一步提高毛细管 HPLC 的峰容量或优化分离条件。而 HPLC 的分离效能到达一定限度,便很难继续提高。而尝试毛细管 HPLC 与 CE 联用技术,凭借峰容量的大幅度提高,借以提高对复杂体系的分离效能,成了我们探索的新方向。

1.3. 毛细管高效液相色谱-胶束电动色谱联合二维分离技术在中药研究中的应用

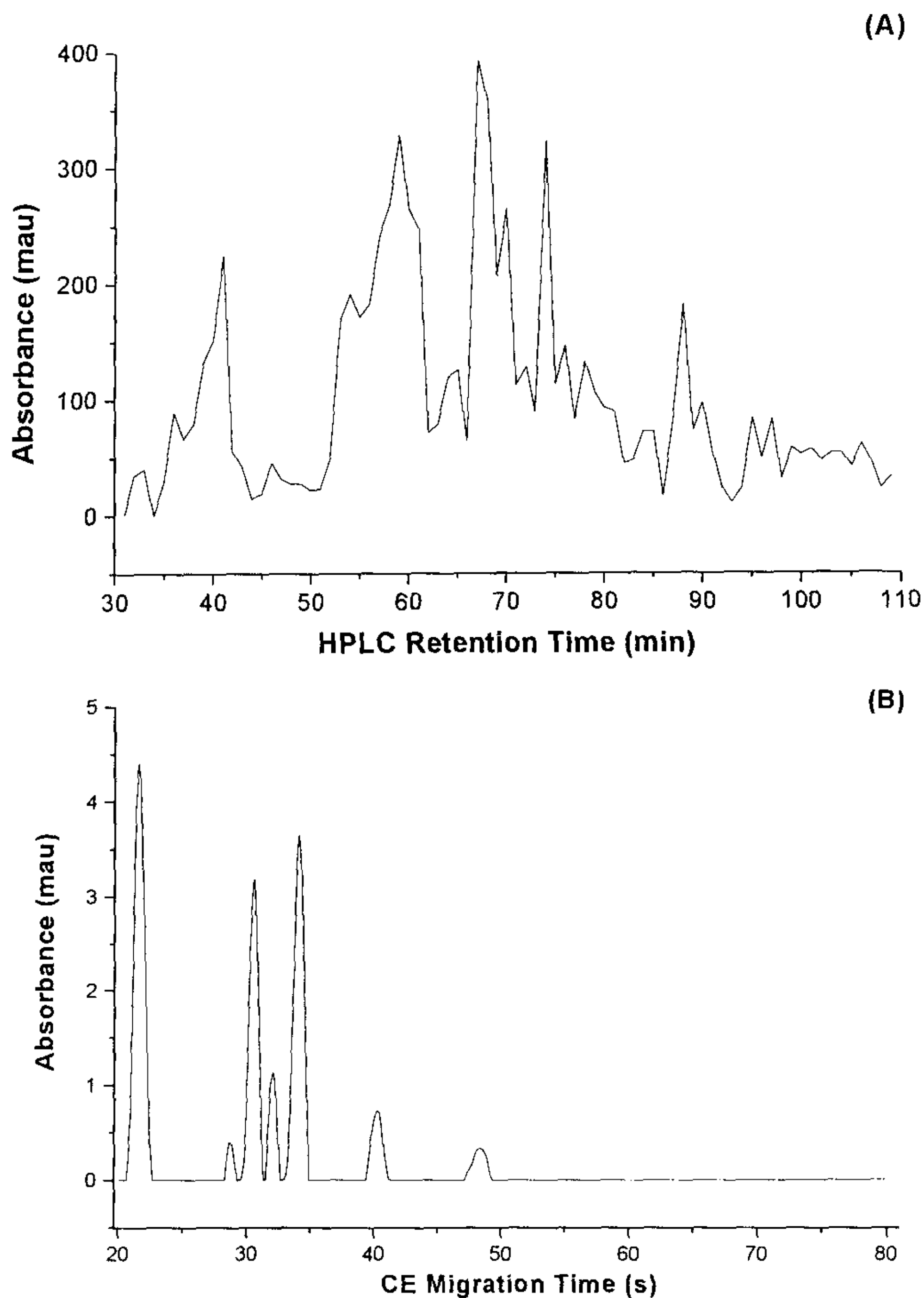
HPLC 在中药成分分析中应用甚广,CE 以其快速、高效的特点极宜作为 HPLC 的第二维来继续分离尚未分开的中药组分。但 CZE 只适合于带电物质的分离,MEKC 对中药组分中的大量中性物质(蒽醌、黄酮、香豆素、皂甙类)具有超高的分离效能。因此,我们尝试利用自行建立的毛细管 HPLC-MEKC 二维分离体系,对组分相对繁多的甘草、小承气汤提取物进行了分离研究。

在实际样品的二维分离中,为了发挥接口的最佳效能,第一维与第二维操作条件的匹配是重要的一环。研究表明,二维分离第一维流出的每个色谱峰需用第二维至少分离三次,方能不损失第一维流出色谱峰的基本峰形。因此缩短第二维的分析时间非常重要。

我们在对快速 MEKC 的探索中发现,保持一定的柱长,同时提高电压,是 MEKC 取得快速、高效的最佳途径。于是选定 30cm 的柱长,提高电压至 20KV,使作为电渗流标记的甲醇在 22s 流出,作为胶束标记物的苏丹(III)在 78s 流出,MEKC 的整个分析时间缩短至 1min,而峰容量和柱效又不会损失太大。同时,在第一维采用毛细管 HPLC 柱,降低了第一维到第二维的样品稀释,提高了系统的

检测灵敏度。而使用 80 cm 长的 HPLC 柱, 以及较低的流速 ($1.0-1.5 \mu\text{L}/\text{min}$), 也有利于与第二维操作条件的匹配。此外, HPLC 采用梯度洗脱来实现样品的柱头富集, CE 采用泡状检测池, 也都有效地提高了系统的检测灵敏度。

利用这种毛细管 HPLC-MEKC 二维分离新技术, 我们对传统中药甘草、复方小承气汤的提取物进行了分离分析, 见图 3-2、3-3。



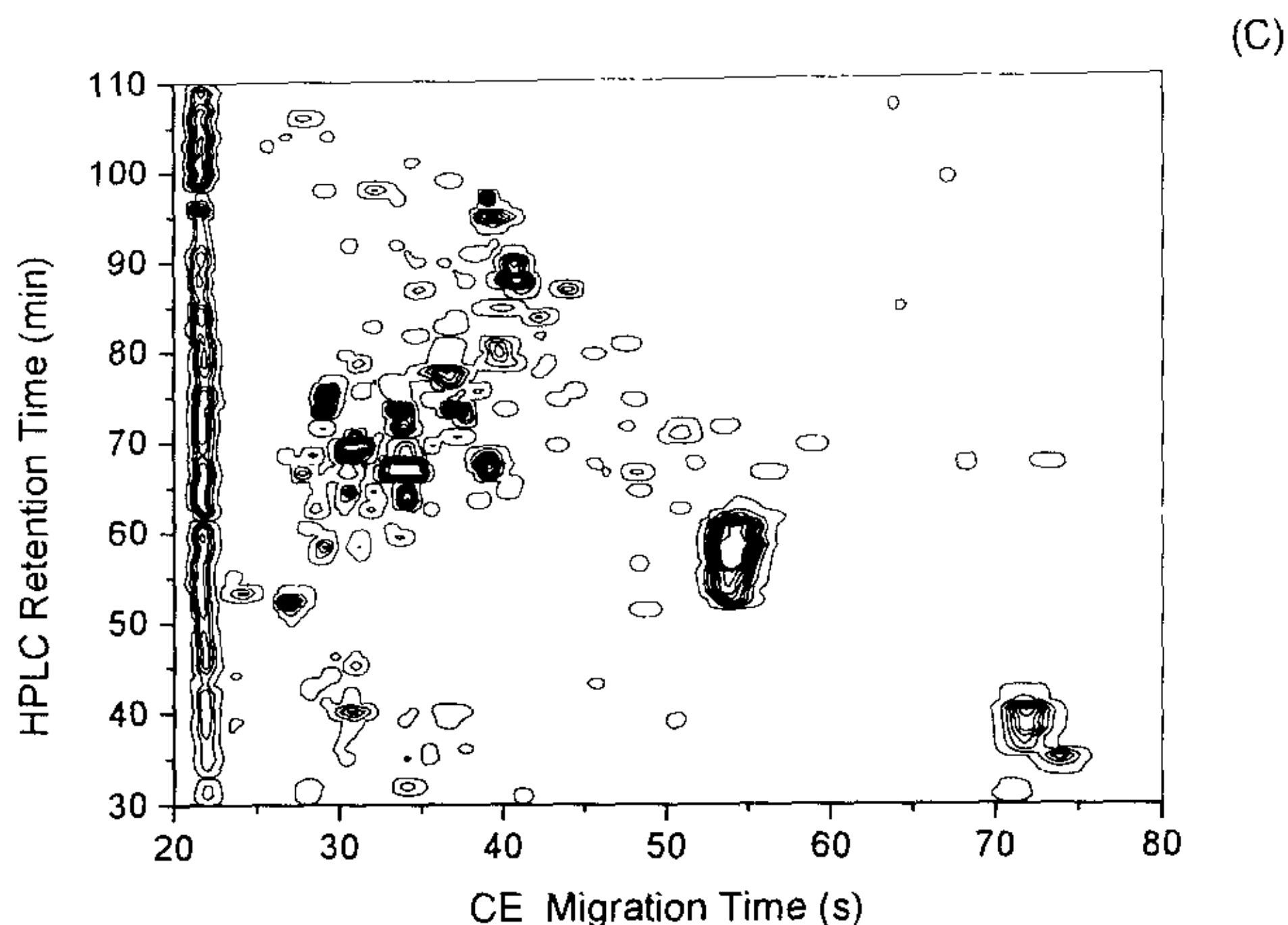


图 3-2. 中药甘草提取物的色谱图。(A) 第一维毛细管 HPLC 谱图。(B) HPLC 第 65 分流出组分在第二维胶束电动色谱的谱图 (C) 二维毛细管 HPLC-MEKC 谱图, HPLC 毛细管柱: $80\text{cm} \times 250\mu\text{m i.d.}$; 流动相梯度: 10% a 保持 2min, 30min 内线性增加至 50%a, 保持 6min, 22min 内线性增加至 90%a, 10min 内线性增加至 100%a, 保持 50min, 恢复初始条件; 流速: 0.15mL/min ; 分流比: 100:1. CE 毛细管柱: $30\text{cm} \times 75\mu\text{m i.d.}$, 有效长度: 23cm; 缓冲液: $30\text{mM SDS} + 6\text{mM Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; 工作电压: -20kV ; 电流: $100\mu\text{A}$; 分析时间: 60s; 检测: 210 nm.

对甘草提取物第一维 HPLC 能分离出约 20 种组分, 见图 3-2(A) 所示。图 3-2(B) 为选取的分析时间为 65min 时, HPLC 流出组分在 MEKC 中分离得到谱图, 其中第一个峰为 HPLC 流动相甲醇峰。可以看出, 在第一维中的一个峰在图 (B) 中得到了良好的分离。最终分离结果如二维分离等高线图 3-2(C) 所示, 110 余种组分得以完全分离。处于同一水平线上的组分, 在 HPLC 上保留时间相同, 而在 MEKC 中得以分开。同一竖直线上的组分, 在 MEKC 中同时流出, 而在 HPLC 上保留不同。由此看出, 两种分离模式相互补充, 为众多组分的高效分离提供了可能。图中可以估算出, 第一维的毛细管 HPLC 在实验操作条件下, 80 min 内峰容量约为 50, 而 MEKC 在 60s 内峰容量约为 40。据 Giddings 理论^[15], 可推知此二维系统在图示区间内的峰容量约 2000。此结果表明, 毛细管 HPLC-CE

联合分离技术, 与常规一维分离技术相比, 可以大幅度地增加峰容量, 提高对复杂样品的分离效能。复方与单味药相比, 成分更加复杂。对小承气汤提取物经二维分离后, 250 余种组分得到分离。对复杂体系的超高效分离, 使毛细管 HPLC- MEKC 极有希望作为以天然化合物为主体的中医药研究的强有力的分离分析工具。

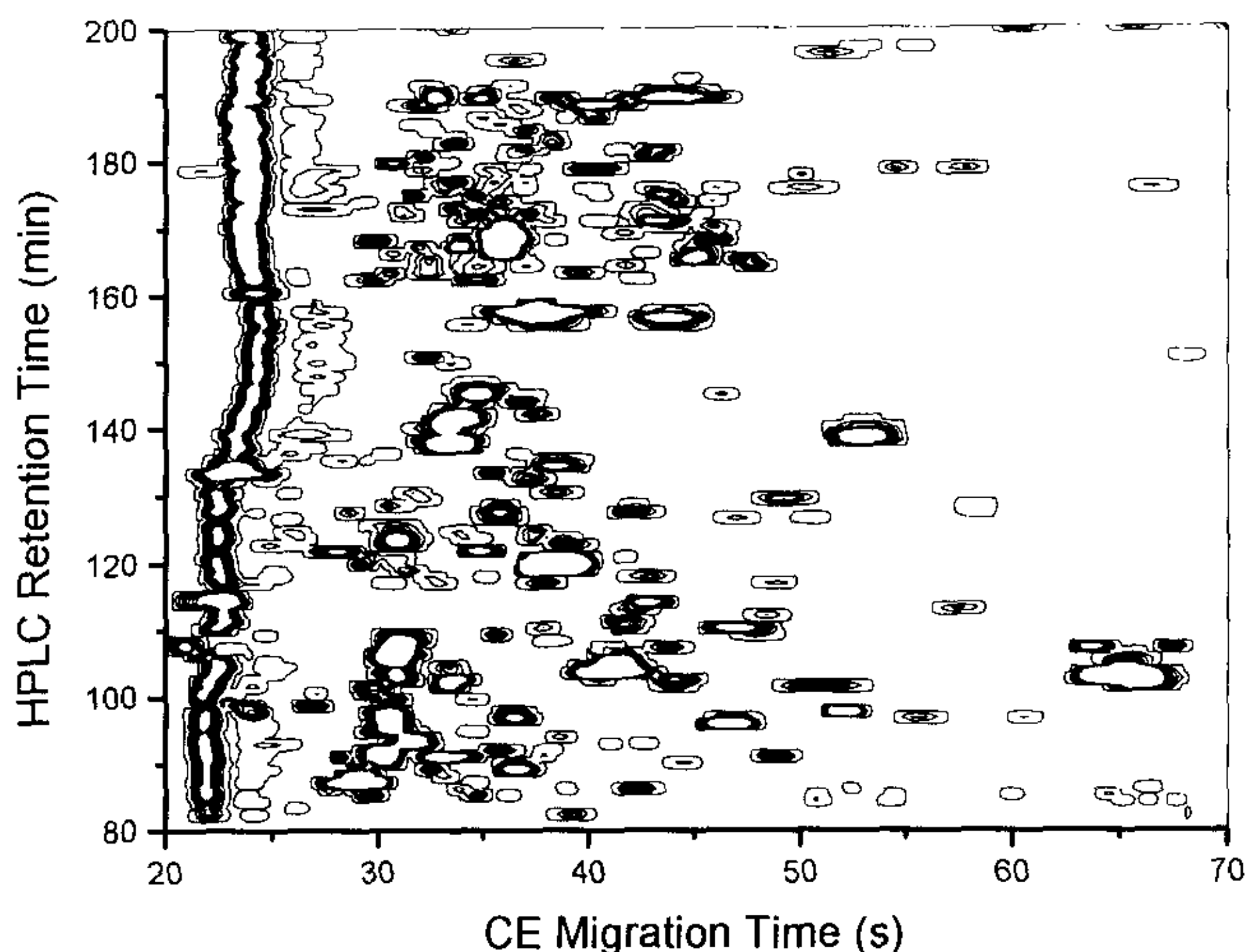


图 3-3. 小承气汤提取物的毛细管 HPLC-MEKC 二维分离谱图. 分析时间: 50s, 其它分离条件同 3-2。

2. 毛细管高效液相色谱技术在蛋白质组学上的应用

2.1. 引言

随着基因组计划的迅猛推进, 近 50 种病毒和原核生物基因组的工作接近或已完成。与此同时, 一些更高等生物的基因组研究也取得了日新月异的进展。而最为世人瞩目的人类基因组计划预计将在今年 6 月份完成, 到时人们将能读解到全部 30 亿个碱基的序列。人类将向了解自己的生命奥秘这一目标迈进一大

步。但是,人类对这些遗传密码编码基因的功能还知之甚少。因此,越来越多的人已开始致力于这方面的研究。虽然利用基因表达连续分析法、微阵列分析法可同时检测到成千上万个基因的表达,但由于基因表达水平与蛋白质水平间并不完全相关,我们仍得不到完整的信息。其解决方法之一就是直接研究基因的产物—蛋白质,即某一物种、个体、器官、组织乃至细胞的全部蛋白质。对应于基因组,人们称其为蛋白质组^[14]。与以往蛋白质化学的研究不同,蛋白质组研究的对象不是单一或少数蛋白质,它着重的是全局性和整体性,需要获得体系内所有蛋白质组分的物理、化学及生物学参数。

目前,蛋白质组研究的主要方法之一是利用双向电泳(2D PAGE)来分离复杂的蛋白质组分,然后采用质谱(MS)分析、氨基酸组成分析、微量蛋白质序列分析等技术将从胶上回收的蛋白质斑点进行精细的鉴定,获得有关蛋白性质、表达变化及翻译后加工等方面的大规模信息。对蛋白质组中众多组分实现高效、快速分离是进行后分析的基础。但传统2D PAGE耗时长(一般需2-3天),且不能与MS等鉴定手段直接联用。因此,发展多维柱色谱联用技术,并将其与MS联用,成为蛋白质组学研究的新方向。

在蛋白质、多肽的分析中,HPLC是最常用的柱色谱分离技术,MS可以提供此类物质分子量和结构方面的信息,因此HPLC-MS已成为蛋白、多肽研究中被广泛采用的方法。与此同时,与HPLC相关的多维分离技术,也被进一步与MS联用,以求得到最佳的分析结果。1997年,Opiteck^[15]等首次实现了LC-LC-MS联用,其中阴离子交换色谱与反相液相色谱被八通阀和两个样品环相连接。而后又实现了体积排阻色谱-反相液相色谱-质谱联用^[16]。多维柱色谱技术的又一个突破口HPLC-CE联用技术。目前,仅有Jorgenson等实现了HPLC与CE联用,将其用于蛋白质、多肽的分离上。1997年,Jorgenson与Lewis^[17]进一步实现了HPLC-CE-MS联用。

常规HPLC柱与MS联用,需大量分流。发展高效微分离技术,特别是微柱HPLC,减少了样品柱上稀释,不需要分流便可以与MS联用,大大提高了检测灵敏度。1998年,Opiteck^[18]等将微柱HPLC用于SEC-RPLC-MS,使样品柱上浓度和MS检测灵敏度都得以提高。

本论文利用自行装填的毛细管HPLC柱,对蛋白质的酶解产物进行了分离

分析,验证了其高效、灵敏的特性,并将其与 MS 联用。为今后毛细管 HPLC-CE-MS 联用技术在蛋白质组学中发挥作用打下了良好的基础。

2.2. 实验仪器与试样

HP 1100 HPLC 泵: HP 公司

PE API165 HPLC-MS 分析仪: PE 公司

Waters 484 可调波长检测器: Waters 公司

自行装填毛细管 HPLC 柱

熔融石英毛细管 $250\mu\text{m}$ i. d. $\times$ 35cm: 河北永年光导纤维厂

固定相 $5\mu\text{m}$ 300SB- C_8 Zorbax Packing: HP 公司

阻力管-熔融毛细管 $50\mu\text{m}$ i. d. $\times$ 20cm: 河北永年光导纤维厂

TFA、乙腈: Merck 公司

天花粉蛋白 (TCS): 上海细胞研究所提供

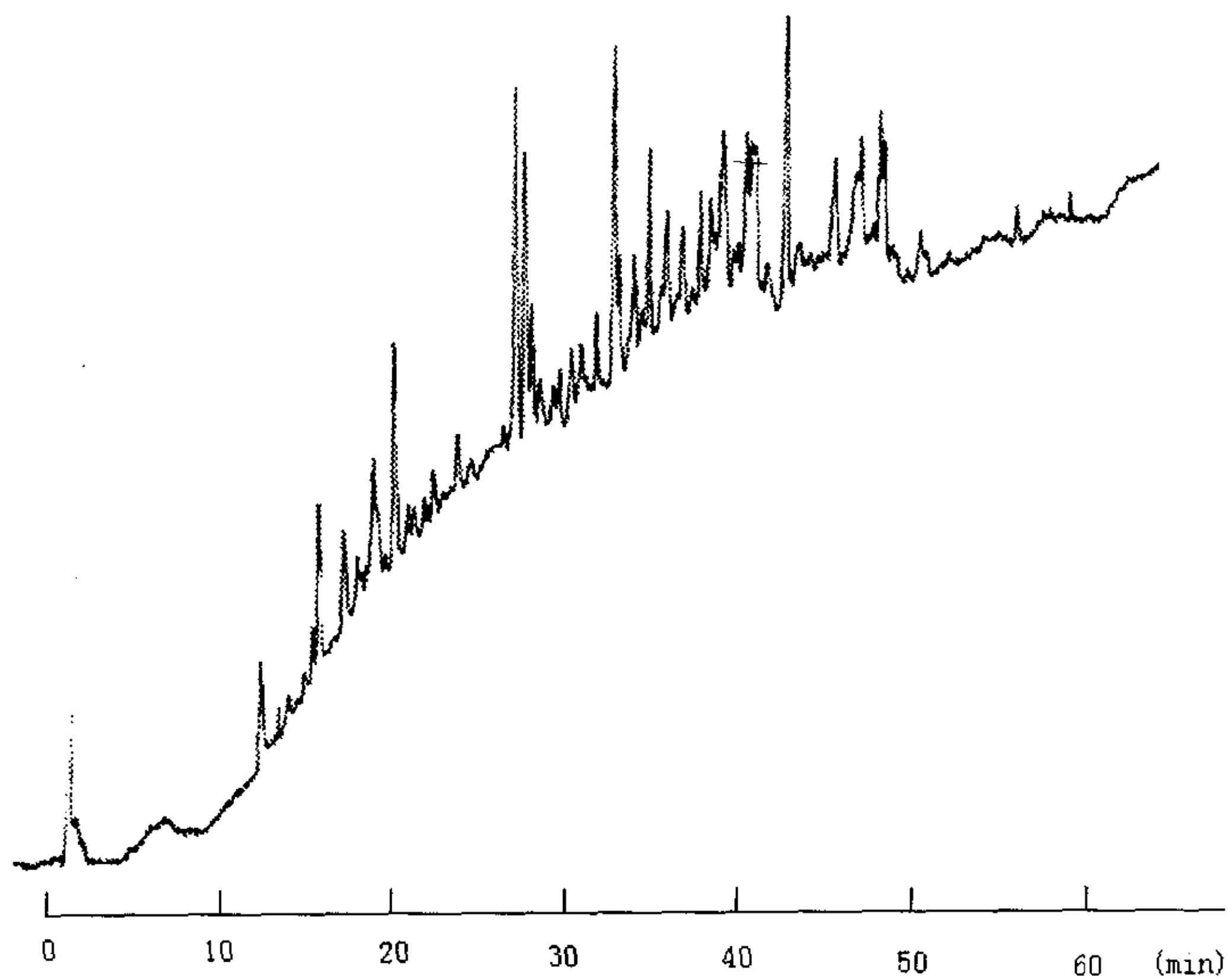
牛血清白蛋白 (BSA)、胰蛋白酶: Sigma 公司:

酶解反应条件如下: 蛋白与胰蛋白酶质量比 50: 1, 加入 0.1M NH_4HCO_3 , 室温下反应过夜。

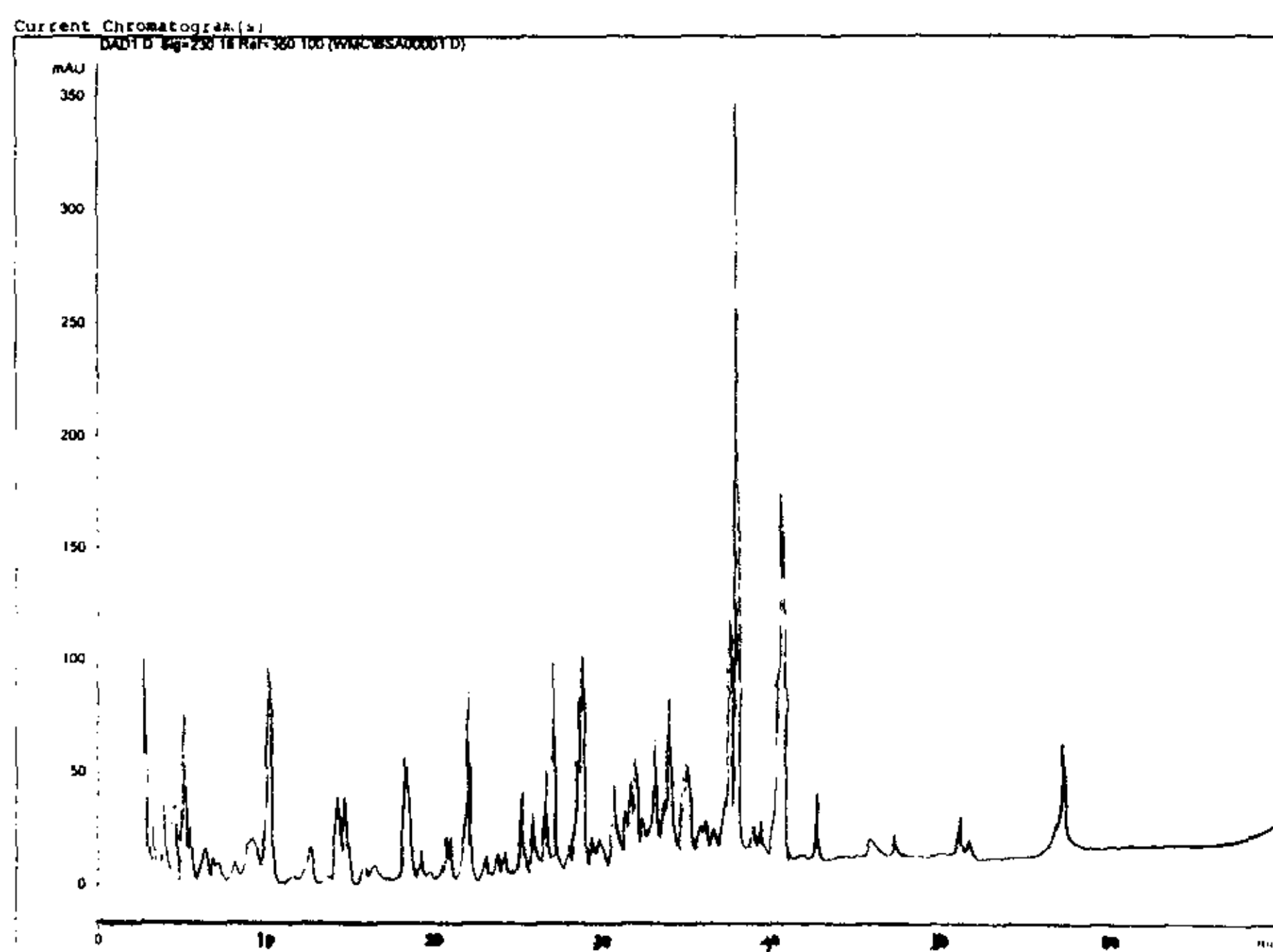
SDS-PAGE 胶上割下蛋白条带和参比空白条带, 以乙腈洗去染色剂考马斯亮蓝, 真空冷冻抽干溶剂。同上法进行酶解反应。

2.3. 标样 BSA 酶解产物的分析

为检验自行装填的毛细管 HPLC 柱的分离效能, 我们选择了标样 BSA 的酶解产物进行了分离分析。据报导, BSA 酶解最多可得到 110 余种多肽片段。而利用毛细管 HPLC 柱, 选择合适的梯度洗脱条件, 有近 70 种肽段得以分离, 如图 3-4 (A) 所示。与常规 4.6mm i. d. $\times$ 25 cm HPLC 柱的分离结果相比 (图 3-4 (B)), 总的被分离组分数相近, 而大多组分谱带明显变窄, 峰形得以改善。结果表明, 自行装填的毛细管 C_8 柱, 分离效能优于常规柱。试样的消耗量又大大降低, 极适合作为蛋白、多肽的分离分析手段。



(A)



(B)

图 3-4. BSA 酶解产物的 HPLC 分析. (A) 毛细管 HPLC 柱. 进样 $5\mu\text{L}$; 流速 $0.2\text{mL}/\text{min}$; 分流比: $50:1$; 流动相: 乙腈 (a)、 0.1% TFA (b); 洗脱梯度: 0% a 保持 2min , 13min 内线性增加至 20% a, 保持 35min , 30min 内线性增加至 60% a, 20min 内线性增加至 80% a. 检测波长: 230nm . (B) HPLC 柱. 进样 $20\mu\text{L}$, 无分流. 其它条件与 (A) 相同.

2.4. 进样方法探索

与常规 HPLC 相比, 毛细管 HPLC 的上样量大大减少. 对于 50 至 $100\mu\text{m i.d.}$ 的微柱, 进样体积只在 nL 数量级. 即使对于 1.0mm i.d. HPLC 柱, 进样体积也只需 $1\mu\text{L}$ 左右. 一般来讲, 毛细管 HPLC 的进样量应为柱体积的 $1/100^{[19]}$. 依此计算, 对于我们所使用的 $250\mu\text{m i.d.} \times 35\text{cm}$ 毛细管柱, 进样体积应为 $0.2\mu\text{L}$ 左右. 在我们一贯采用的六通阀进样, 而后以阻力管分流 (分流比 $50:1$) 的操作模式下 (图 3-5 (A)), 进样量约为 $10\mu\text{L}$. 对于来源极为困难的样品, 这种进样方式大大受到了限制. 因此, 我们尝试了将六通进样阀置于阻力管分流之后, 同时将 $20\mu\text{L}$ 的样品环换做 $2.5\mu\text{L}$ (图 3-5 (B)). 希望在管路简单变动的情况下, 避免样品被大量分流, 借此降低样品的消耗量, 同时不影响毛细管柱的分离效能.

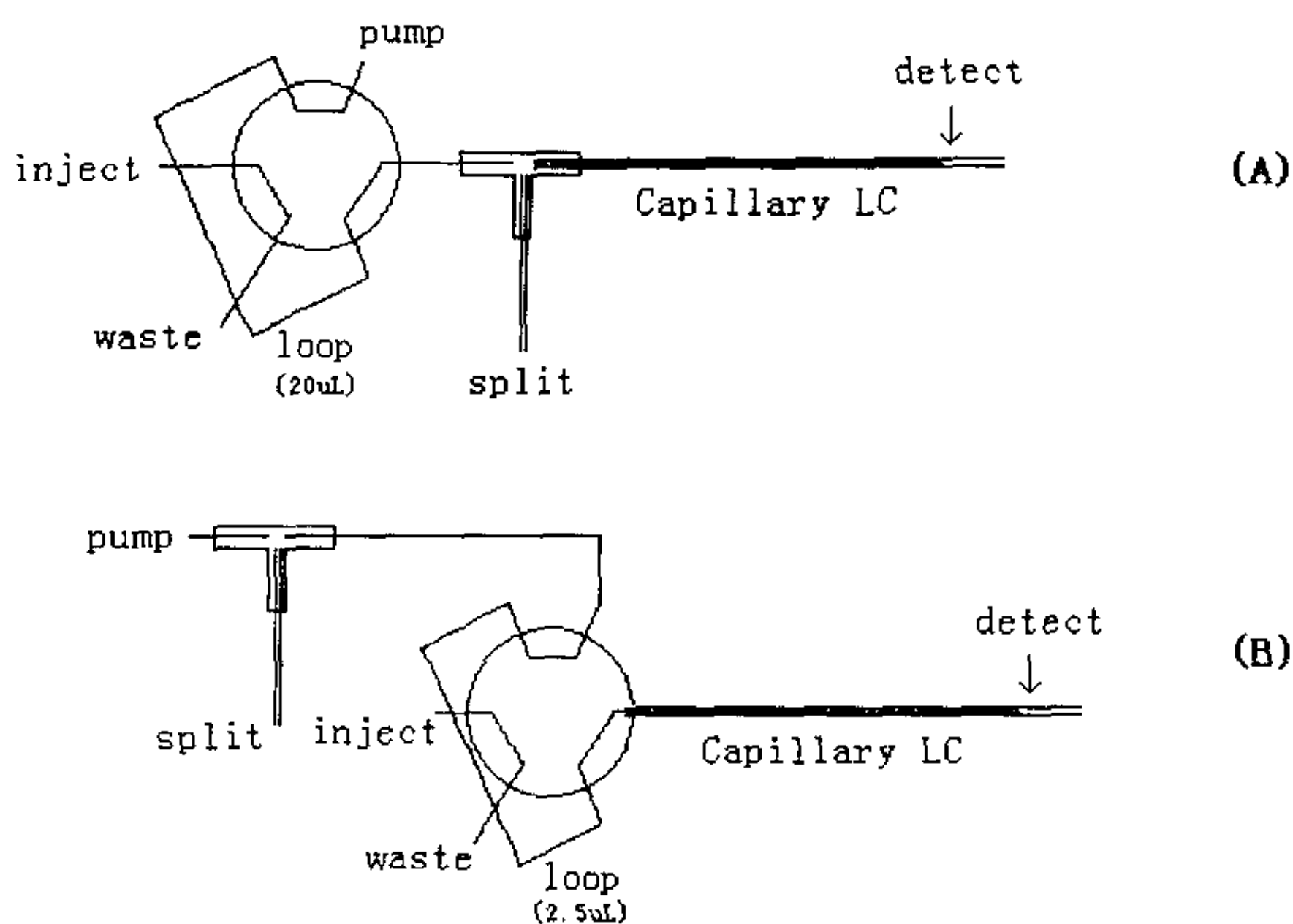


图 3-5. 两种进样方式示意图. (A) 分流进样. (B) 无分流进样.

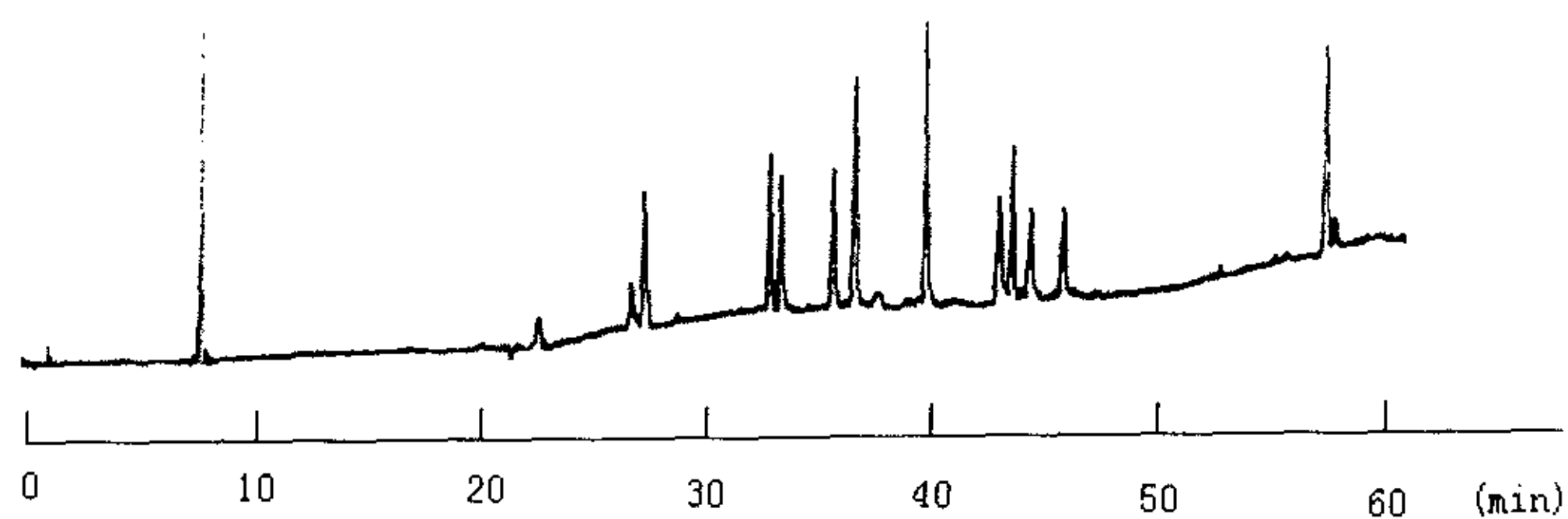
为对两种进样方式进行比较,我们以 TCS 的酶解产物为研究对象进行了分离分析。分离结果如图 3-6 (A)、(B)所示。图 (A) 采取分流进样 $5\mu\text{L}$, (B) 则采用无分流进样 $1\mu\text{L}$, 其余 HPLC 操作条件基本相同。从两图的比较来看,被分离组分的相对强度变化不大,而绝对强度有明显增强(约为 2 倍)。两种进样方式,表观进样量之比为 5: 1, 实际进样量比值近似为 1: 10, 信号强度比为 1: 2。(B) 的实际进样量 ($1\mu\text{L}$) 增加至 (A) 实际进样量 ($0.1\mu\text{L}$) 的 10 倍, 而峰强只增加至 2 倍。说明毛细管 HPLC 柱的承载量有一范围, 峰强并不会随着进样量线性增加。最佳进样量为 $0.2\mu\text{L}$ 左右, 与文献报导吻合^[19]。进样量继续增大后, 峰强度变化不显著, 对峰宽可能会有所影响。而从图 (B) 的分离谱图来看, 毛细管柱的分离效能并没有明显降低。且峰强度的增大使检测到的峰个数明显增多。结果表明, 此种简单易行的进样方式使进样量大大减少, 且对分离效能无显著影响, 检测灵敏度又得以提高, 可以用于蛋白、多肽等极其微量样品的分析。

2.5. SDS-PAGE 提取蛋白的酶解产物分析

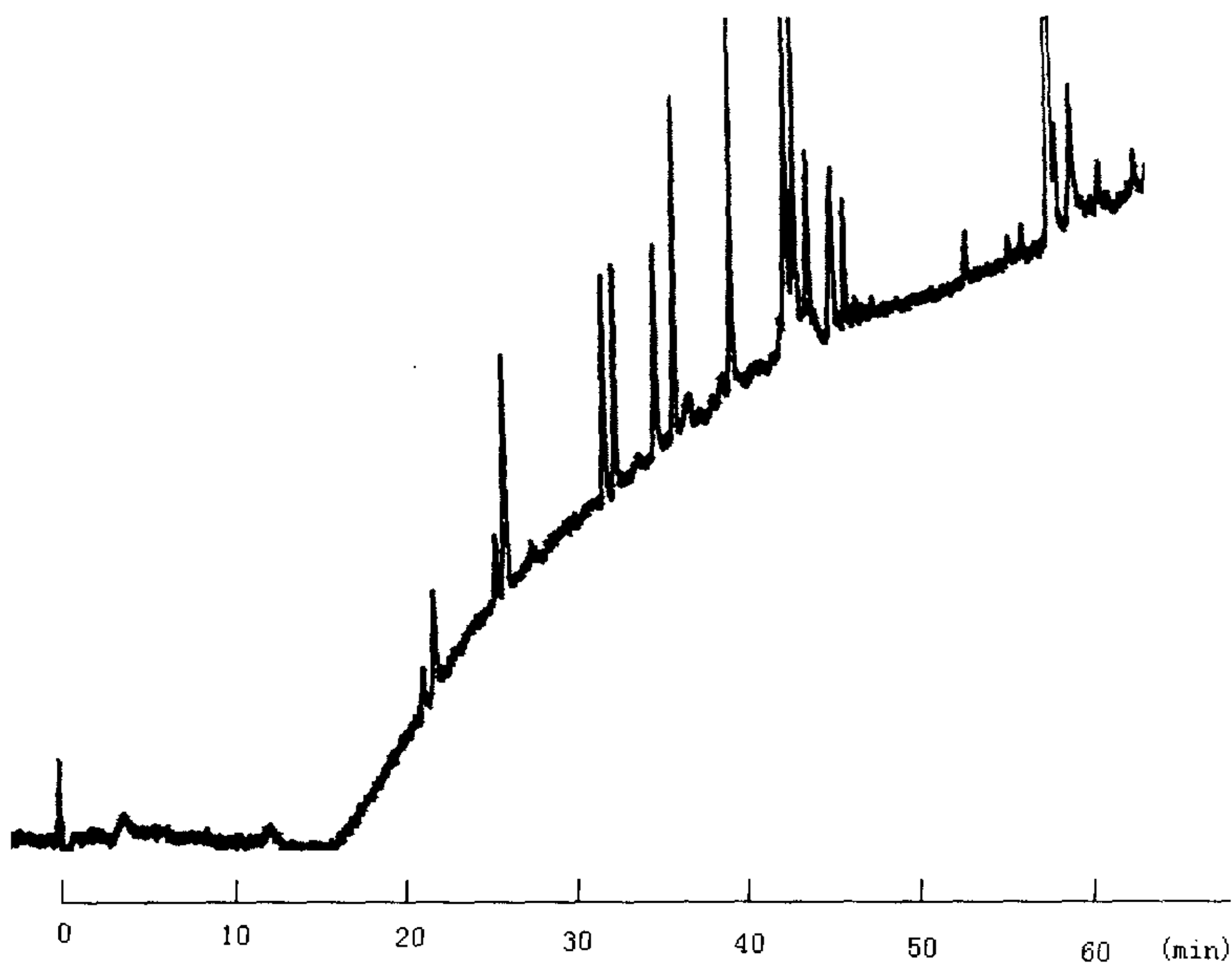
目前, SDS-PAGE 仍是蛋白分离纯化制备的主要手段。若要进一步进行结构鉴定, 则需要将蛋白斑点从胶体上萃取下来, 而后加酶解液进行酶解反应。所得肽段经 HPLC 分离, 由 MS 进行序列分析和结构鉴定。蛋白的转移、酶解成功与否, 是至关重要的一环, 对于蛋白质组学的方法建立也起着关键作用。

由于 SDS-PAGE 条带上蛋白浓度很难准确测定, 所以酶解条件不易掌握恰当。为摸索此步的合适条件, 我们利用毛细管 HPLC 柱, 对 PAGE 显色条带、空白条带的酶解产物进行了分离分析, 如图 3-7 (A) (B) 所示。图 (A) 中除在 40.6min 前后出现的 4 个组分峰之外, 其余峰均在图 (B) 中出现, 且强度、保留时间基本相同。证明此 4 个峰代表提取蛋白的酶解产物, 而其余峰则为酶自身降解产物。结果表明, 蛋白酶解量过少, 提取与酶解条件有待进一步改善。

使用毛细管 HPLC 柱, 在蛋白、多肽分离上可看出微量组分变化。这是由其较高的柱上检测灵敏度决定的。这正是它优于常规 HPLC 柱之所在。因此, 毛细管 HPLC 柱极宜作为蛋白、多肽微量分析鉴定的手段和工具。

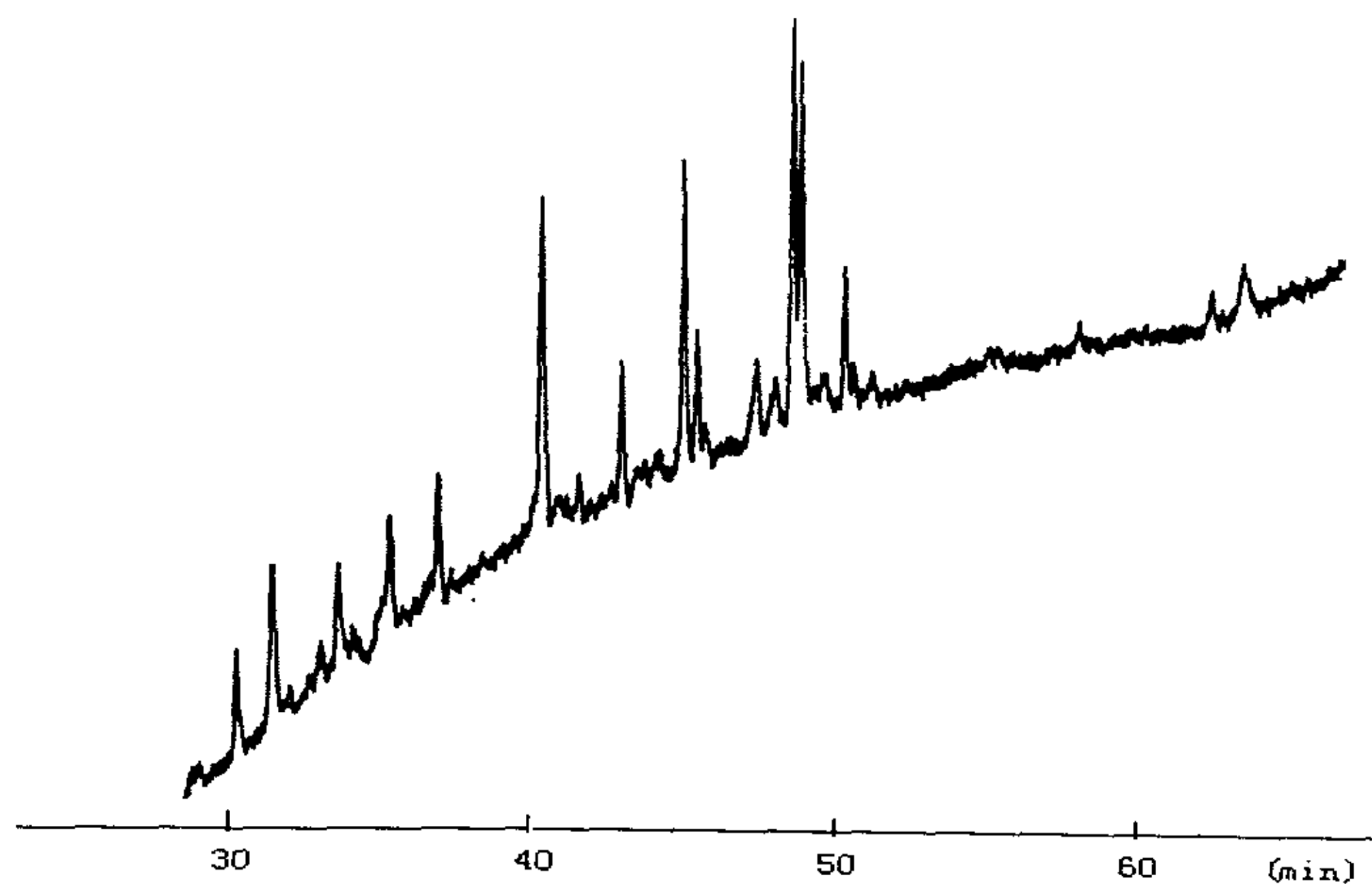


(A)

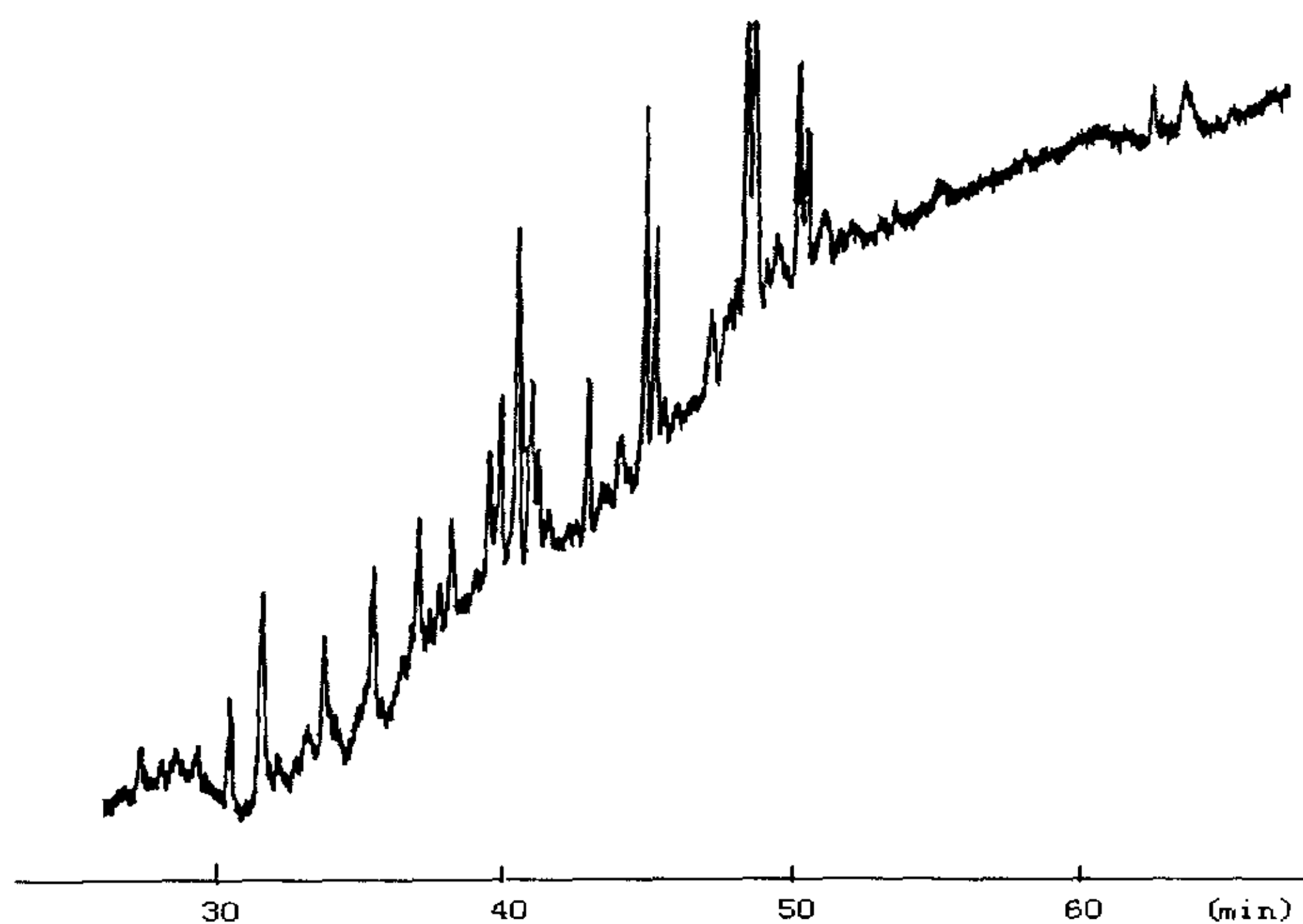


(B)

图 3-6 TCS 酶解产物的毛细管 HPLC 分离谱图。(A) 分流进样 $5\mu\text{L}$ 。(B) 无分流进样 $1\mu\text{L}$ 。
流动相: 乙腈 (a)、0.1% TFA (b); 流速: 0.2mL/min 。洗脱梯度: 0% a 保持 5min, 50min
内线性增加至 45% a, 10min 内线性增加至 80% a, 保持 20min。检测波长: 210nm 。

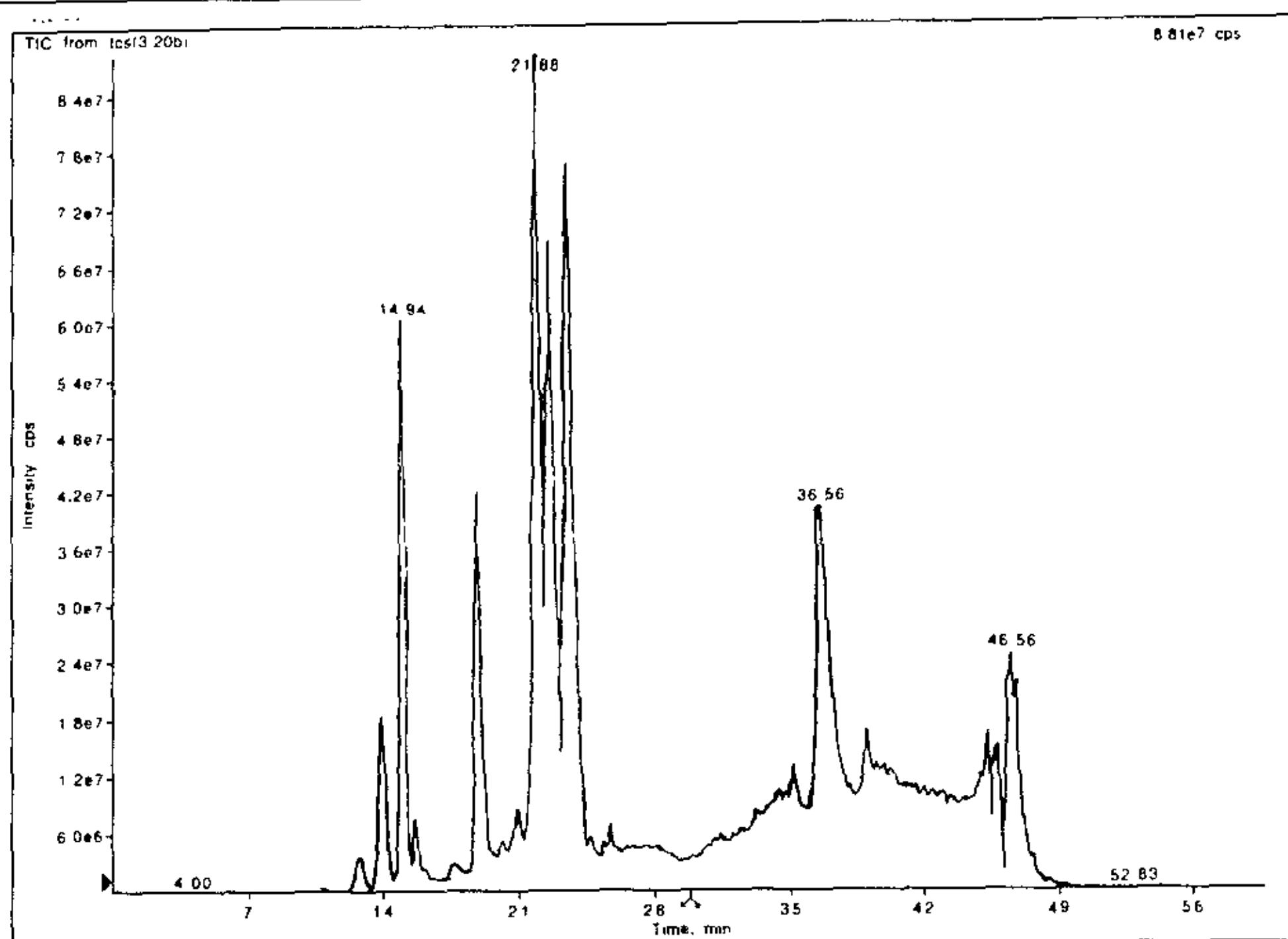


(A)

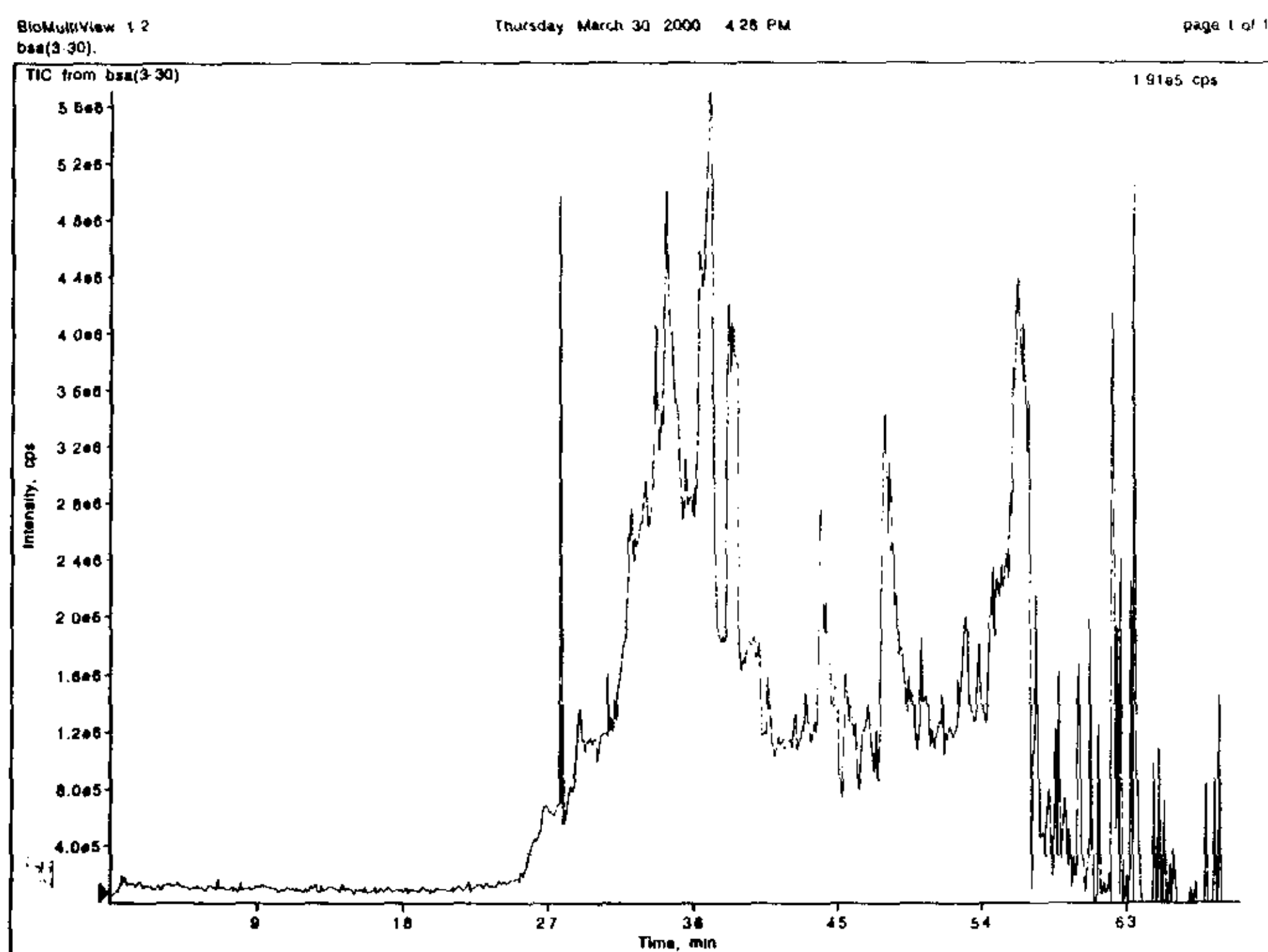


(B)

图 3-7. SDS-PAGE 显色条带 (A) 与空白条带 (B) 提取物酶解产物的 HPLC 分离分析。无分流进样 $2\mu\text{L}$; 梯度同图 3-6; 流速: 0.2mL/min ; 检测波长 210nm



(A)



(B)

图 3-8 毛细管 HPLC-MS 对 TCS (A)、BSA(B) 酶解产物的分析。分流进样 $10\mu\text{L}$ ，毛细管 HPLC 操作条件同前，MS 以标样 ppg 校正。

2.6. 毛细管 HPLC-MS 联用

在毛细管 HPLC 对蛋白酶解产物进行分离的基础上, 我们又将其与 MS 联用。在所使用的操作条件下, 毛细管 HPLC 的流量为 $5\mu\text{L}/\text{min}$, 在电喷雾离子源质谱 (ESI-MS) 所允许的流量范围内 ($5\text{--}50\mu\text{L}/\text{min}$)。因此, 毛细管 HPLC 不需分流, 便可以直接与 MS 联用。对 TCS、BSA 酶解产物的 HPLC-MS 总离子流图如图 3-7 (A)、(B)。结果表明, 自行建立的毛细管 HPLC-MS 联用体系工作正常, 完全可以用于蛋白、多肽的分离、及其分子量和结构测定。

实验结果证明, 用于蛋白质、多肽产物分析的毛细管 HPLC 及其与 MS 联用的研究方法已完全建立, 并日趋成熟。它还为进一步实现蛋白质的 HPLC-CE 二维联用打下了良好的基础。随着在此领域的深入尝试和探索, 必将为蛋白质组学研究提供更强有力的工具。

3. 毛细管凝胶电泳在 DNA 分析上的应用

3.1. 引言

做为遗传信息主要载体的脱氧核糖核酸 (DNA) 是又一类广泛研究的生物大分子。其基本结构单元是脱氧核苷酸, 由含氮碱基、脱氧核糖、磷酸组成。DNA 分析包括碱基、核苷、核苷酸、寡核苷酸、引物、探针、单链 DNA、双链 DNA (DNA 片段、PCR 产物) 分析等。由于 DNA 分子上四种含氮碱基性质极为相似, 且在 PH 为 7 时, 磷酸基团所带负电荷大于其他碱基上电荷, 所以对 DNA 的分离原理大多基于分子量大小的不同。自 60 年代中期, 凝胶电泳成功分离 DNA 分子以来, 它已成为 DNA 常规分析法^[20]。但这种方法分析速度慢、分辨率低、自动化程度低且用量大。随后, HPLC 中的凝胶渗透色谱、亲和色谱也被用于 DNA 的分离分析^[21]。

CE 自八十年代出现以来, 在生物技术、临床诊断等方面倍受瞩目。1983 年, Hjerten^[22]首次将传统凝胶电泳技术中的聚丙烯酰胺凝胶装入 $150\mu\text{m i.d.}$

的玻璃毛细管,以消除毛细管内壁对蛋白质的吸附,并利用这种方法对多种蛋白质进行了分离,开创了毛细管凝胶电泳 (CGE) 这一崭新的分离模式。1987年, Cohen 和 Karger^[23-26] 使用了 100 μm i. d 内径以下的弹性毛细管,用同管内壁交联的方法制备凝胶柱,分离了蛋白、DNA 和寡聚核苷酸。1990 年 Lux^[27] 对 Cohen 和 Karger 的柱制备技术进行了改进,提出了用线性聚丙烯酰胺对柱内表面预处理和用 γ 射线引发聚合的方法,在分离 DNA 内切片段和寡聚核苷酸时取得了极好的效果。目前, CGE 已被用于 DNA 分子 Southern Blot 杂交研究^[28]、寡核苷酸纯度分析^[29]、PCR 产物分析^[30]、蛋白-DNA 反应测定、基因突变测定^[31] 的研究中。最为令人关注的是 CGE 在人类基因组计划中的应用,毛细管阵列^[32]、毛细板阵列^[33] DNA 测序仪的使用,使 DNA 的测序速度得到极大的提高。

CGE 常用的凝胶介质有聚丙烯酰胺 (polyacrylamide) 和琼脂糖 (agarose) 两种。其中以前者应用最多。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺 (Acr) 和交联剂 N、N' 亚甲基丙烯酰胺 (Bis) 聚合而成。Hjerten^[34] 曾提出 T、C 两个参数:

$$T = \frac{a+b}{m} \times 100\%, \quad C = \frac{b}{a+b} \times 100\%$$

式中, a: Acr 的量 (g), b: Bis 的量 (g), m: 缓冲溶液的体积 (mL), T: 两个单体的总百分浓度即凝胶浓度 (V/V), C: 交联度。可以通过控制 T、C 的大小,改变凝胶孔径大小,从而对分离组分起到了分子筛的作用。

聚丙烯酰胺凝胶在毛细管中的填充方式除交联聚合外,还有非交联聚合 (线性聚合),如图 3-9 所示。由于凝胶浓度 (T) 大时,则聚合时体积改变小,机械强度高;凝胶交联度 (C) 大,则聚合后凝胶孔径小。机械强度高,但聚合时体积缩小严重。所以降低交联度甚至不加入 Bis (C=0),同时 T 增大,在聚合时体积变化不再严重。这既可保证机械强度,又避免气泡的产生,同时孔径增大。Hjerten^[35] 等于 1990 年开始用低交联和非交联的方法制备 CGE 柱。这种凝胶具备如下的特点: (1) 制备简单, (2) 毛细管可以重复使用, (3) 凝胶-缓冲体系可更换, (4) 柱子对样品组分敏感, (5) 所有类型的毛细管均可使用。由于凝胶孔径增加,非交联线性柱在 DNA 片段的应用上有更宽的分子量大小范围,因而被用于 DNA 序列分析中。1993 年 Karger^[36] 等在 CGE 中运用线性聚丙烯酰胺 (LPA) 凝胶介质完成了对含有 350 个碱基的 DNA 片段的序列分析。1996 年^[37] 又在 80min 内完成了对含有 1000 个碱基的噬菌体模板的序列分析,准确率高

达 96.8% 目前, 毛细管线性聚丙烯酰胺凝胶电泳仪作为新一代的 DNA 测序仪, 已在人类基因组计划中起到极其重要的作用。

鉴于线性聚丙烯酰胺筛分介质在分析寡聚核苷酸和 DNA 分子上独具的优势, 我们通过优化凝胶制备条件和柱壁改性方法, 探索了高效毛细管线性聚丙烯酰胺凝胶电泳柱的制备方法, 并将其运用于人工合成的寡聚核苷酸片段分离分离、纯度鉴定等常规 DNA 分析中。

3.2 线性聚丙烯酰胺 CGE 柱的制备

3.2.1. 试验仪器与试剂

P/ACE5010 毛细管电泳仪: Beckman 公司, 紫外检测波长为 254nm, 恒温于 25℃。

熔融石英毛细管 (75 μm i.d., 365 μm o.d): 河北永年光导纤维厂, 有效长度 23cm, 总长 30cm。

γ -甲基丙烯酰基-三(甲氧基)硅烷 (γ -MAPS)、丙烯酰胺: Sigma 公司

四甲基乙二胺 (TEMED): Koch-Light 公司

Tris 碱: Boehringer Mannheim 公司

过硫酸胺 (APS)、尿素、甲酰胺、硼酸、EDTA、冰醋酸: 分析纯。

3.2.2. 毛细管柱表面的改性

80 μL γ -MAPS 与 20mL PH 为 3.5 的醋酸水溶液均匀混合后, 吸入毛细管中, 室温放置 1 小时, 用水冲洗。配置单体浓度为 3% 的丙烯酰胺溶液 10mL, 加入 10 μL TEMED 和 10mg APS, 脱气后注入毛细管内, 反应 30min, 用水、空气冲洗毛细管, 并在 35℃ 炉温下去除管内残留水分。这样在柱内表面 γ -MAPS 键合层上又键合一层线性聚丙烯酰胺, 抑制电渗流, 从而保证了凝胶柱的稳定性。

3.2.3. LPA 凝胶的制备

配制 10mL 1 $\times$ TBE (100mM Tris/100mM 硼酸/2mMEDTA) / 3.5M 尿素 / 30%甲

酰胺缓冲液, 0.6g 丙烯酰胺溶解其中, 用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤。在 0°C 条件下通氮气 30min, 除去溶液中氧气。分别加入 $10\mu\text{L}$ 10% 的 TEMED (催化剂)、APS (引发剂) 溶液后, 使丙烯酰胺单体在 0°C 、氮气气氛下开始聚合。24 小时后聚合完全, 置于 0°C 以下保存。

使用前以密封针管将 LPA 凝胶注入毛细管内, 电泳缓冲液与凝胶缓冲介质相同。每次进样前先平衡 10min, 而后采用阴极电迁移方式进样。

3.3. LPA 毛细管凝胶电泳柱的评价

毛细管内壁在不改性的条件下进行实验, 实验结果很难重现。对此现象进行分析, 认为可能是由于毛细管内表面硅羟基的存在, 使包含凝胶介质的溶液本体在电渗流的作用下向阴极移动。筛分介质的迁移导致分离结果很难重现。

采用双官能团催化剂对柱表面进行改性, 意在掩蔽硅羟基, 使柱表面惰化, 消除电渗流, 保持凝胶介质的相对静止状态。如图所示:

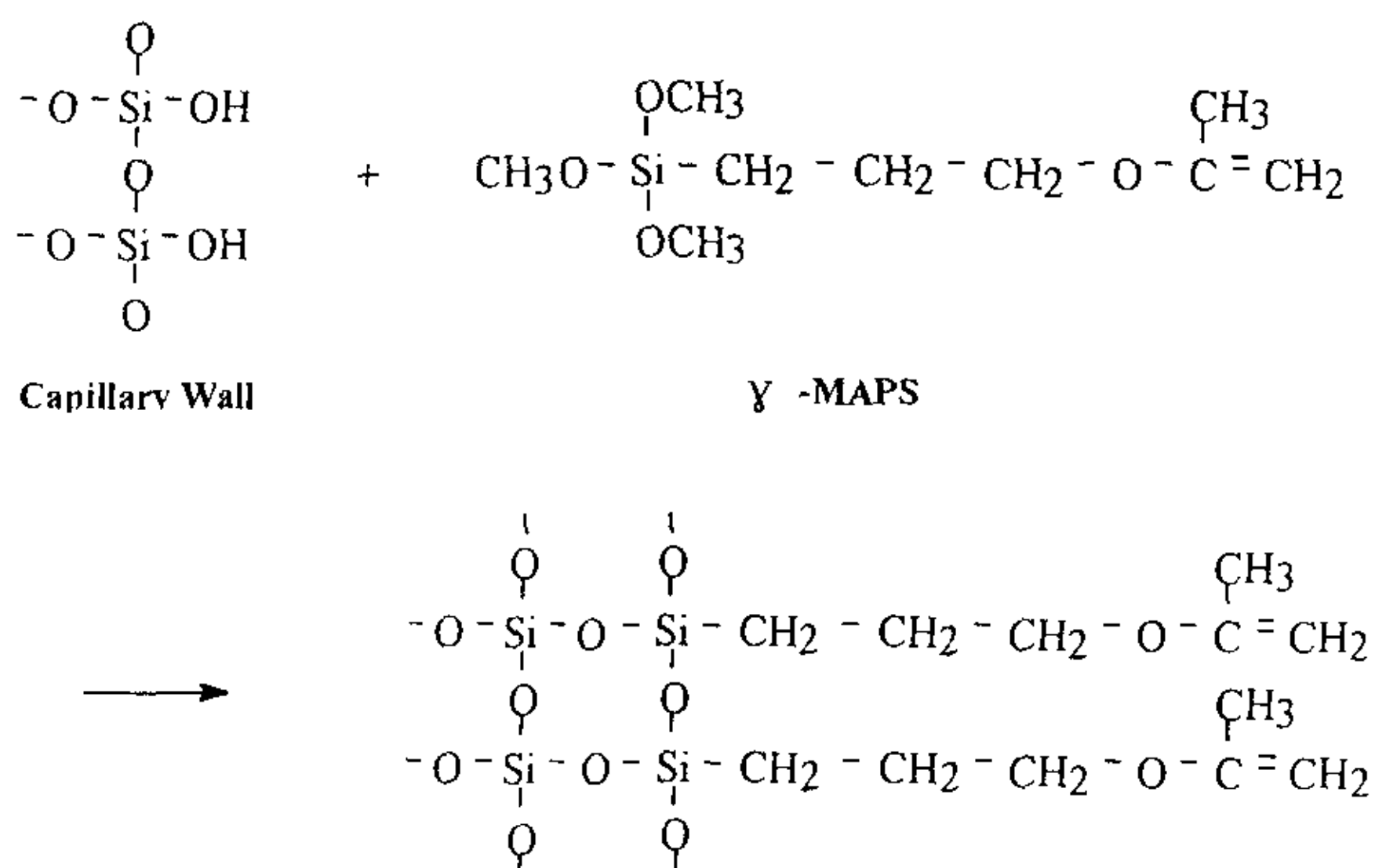


图 3-9. 用 γ -MAPS 将柱表面改性示意图。

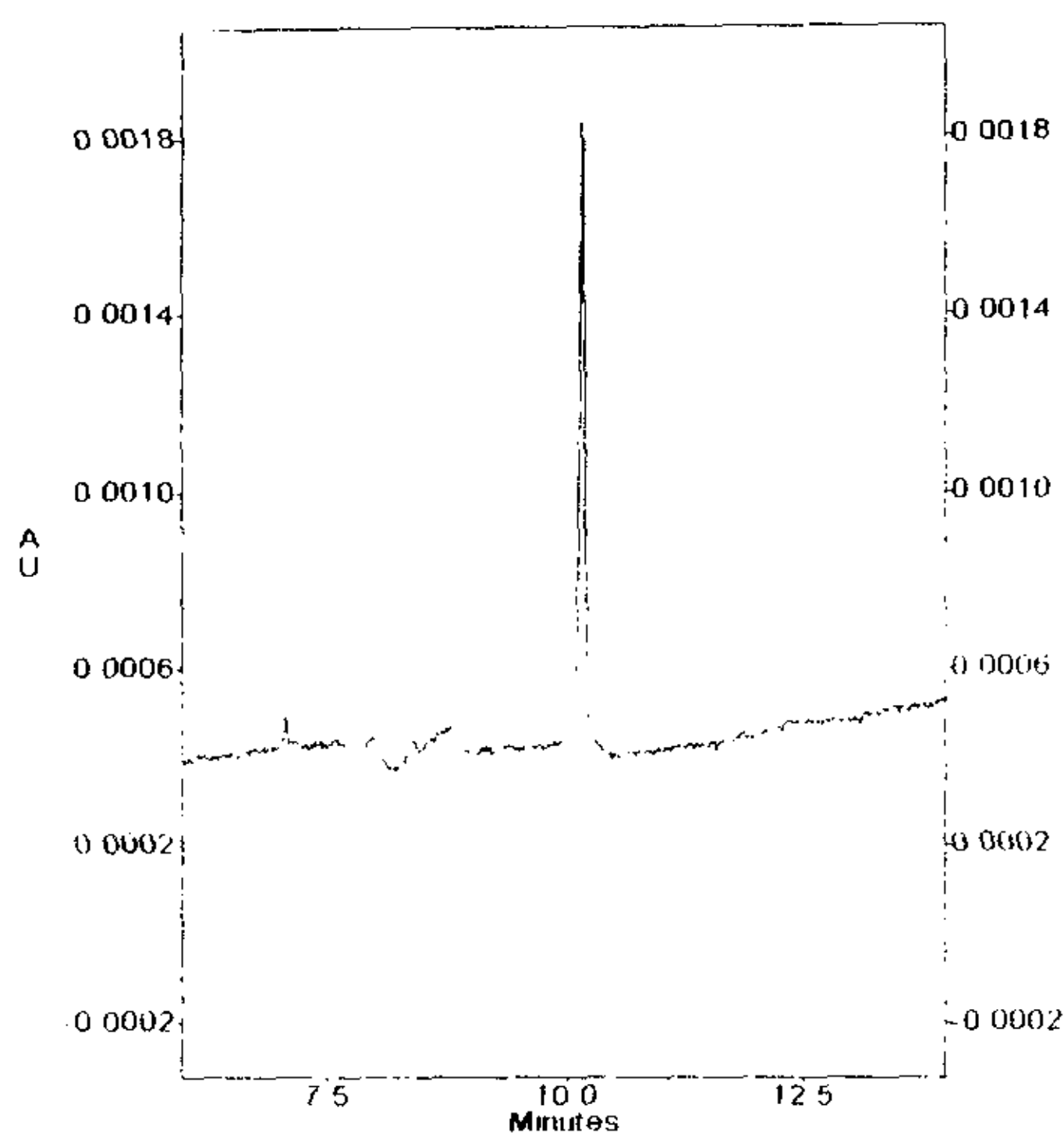


图 3-10. 寡聚核苷酸 $G_s' - p$ 的 CGE 分离谱图。筛分介质：6%聚丙烯酰胺线性凝胶；缓冲液：1×TBE (100mM Tris/100mM 硼酸/2mMEDTA) / 3.5M 尿素 / 30%甲酰胺；电压：10KV；进样 3KV×5s；温度：25℃；检测波长：254nm。

用自制的 LPA 凝胶电泳柱分析寡聚核苷酸样品 $G_s' - p$ ，如图 3-10 所示。对称的峰形表示管壁表面的改性效果良好，理论塔板数高达 $10^6 / m$ 。用此样品连续进样 20 次后，柱效没有明显下降，表明该 CGE 柱寿命较长，且 20 次迁移时间的相对标准偏差不超过 4%，说明重现性较好。

3.4. 线性聚丙烯酰胺 CGE 对合成寡聚核苷酸纯度的分析

人工合成的寡聚核苷酸片段在分子生物学实验室被频繁使用，常被用做人工合成基因的小片段和 PCR 引物，这就要求它具有极高的纯度。

G312 为人工合成的含 18 个碱基的寡聚核苷酸片段，(固相亚磷酸胺法合成)，其序列如下：



在利用 LPA 对 G312 的分离分析中，发现在对主峰后始终有一拖尾的杂峰出现，如图 3-11 所示。从合成方法来看，出现杂质峰有两种可能。一种是由于

脱去一个或几个碱基而造成纯度下降, 由于 CGE 是根据被分离物质分子量的大小进行分离, 分子量越小, 越早流出。这显然与谱图结果并不相符。另一种可能是由于因为在合成寡聚核苷酸的过程中加入了特殊的保护基团, 而在后继脱保护过程中没有完全脱掉, 使样品中含有少量带保护基团的寡聚核苷酸。由于分子量大于主产物分子量, 故在主产物后出现拖尾峰。人工合成的寡聚核苷酸通常在 3' 后加上保护基团三甲氧基三苯甲基 (DMT), 这是一个高度疏水基团, 若在反相 HPLC 上分离则造成杂质峰保留时间的增加, 这一点在此样品的 HPLC 分离谱图中也得以验证。

由此看出, LPA 对人工合成的寡聚核苷酸样品可以进行较好的纯度检验和分析, 并为杂质的来源提供了极其重要的信息。在与反相 HPLC 谱图的对照中, 也进一步得到了验证。

3.5. 线性聚丙烯酰胺 CGE 对混合寡聚核苷酸片段的分析

对于一系列人工合成的含有不同碱基对个数的寡聚核苷酸片段, 我们也利用 LPA 介质进行了分离。图 3-12 便是分别带有 12、42、51 个碱基的寡聚核苷酸片段混合物的分离谱图。三种片段在 18 min 内得到了完全的基线分离, 分离片段相差 9 个碱基, 表明了较高的分辨率。

3.6. 小结

CGE 与传统凝胶电泳相比, 分析速度快, 分辨能力高、样品用量少、分析过程自动化。使用线性聚丙烯酰胺 CGE 柱, 柱制备简便, 分离效能高, 且每次分离可用新胶, 使寡聚核苷酸片段分离、纯度鉴定等 DNA 常规分析变得更加便捷。

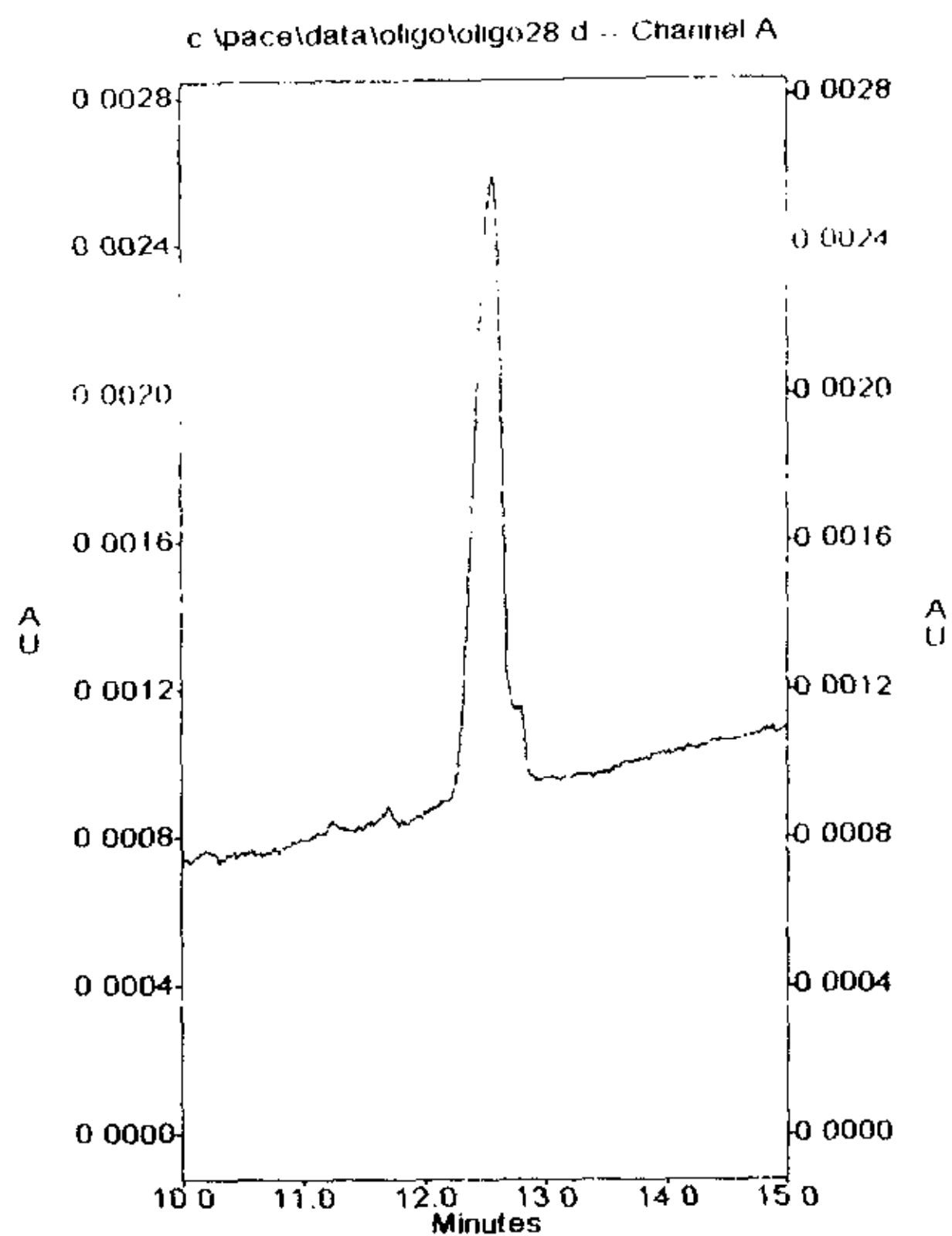


图 3-11. G312 的 CGE 分离谱图. 操作条件同图 3-10.

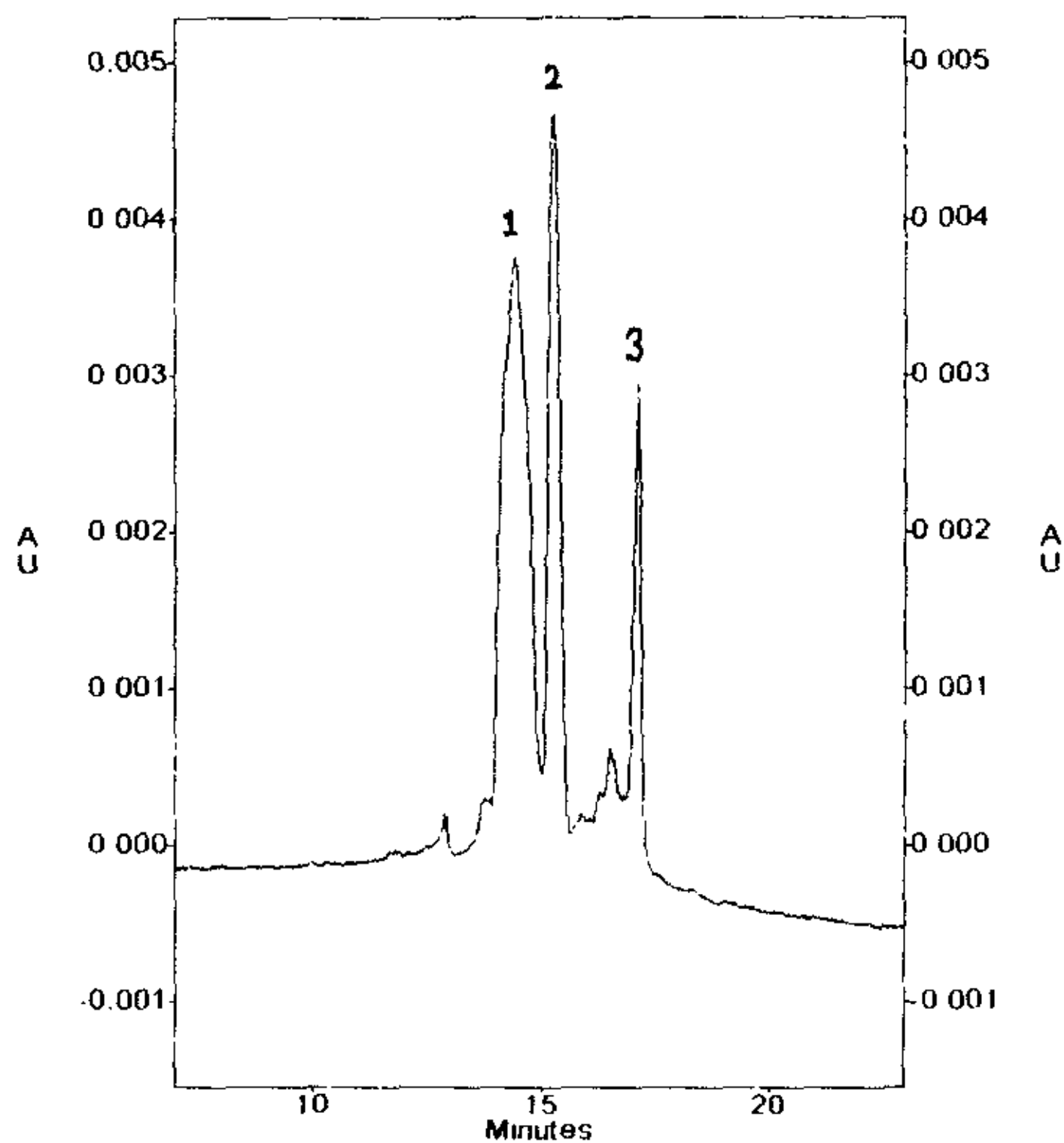


图 3-12. 不同碱基寡聚核苷酸混合物的 CGE 分离谱图. 分离条件同上. 1. 12bp. 2. 42bp. 3. 51bp. 分离电压 7.5kv, 其余条件同上.

4. 参考文献

- [1] 陈发奎主编, 常用中草药有效成分含量测定, 人民卫生出版社, 北京, 1997: 1
- [2] 周海钧, 中国药学杂志, 1999, 1: 1
- [3] 王义明, 罗国安, 魏伟, 关燕华, 色谱, 1997, 15(6): 494
- [4] 魏伟, 王义明, 罗国安, 药学学报, 1997, 32(6): 476
- [5] Liu, Y. M.; Shen, S. J. *J. Chromatogr.* 1992, 600: 370
- [6] Liu, Y. M.; Shen, S. J. *J. Chromatogr.* 1992, 623: 196
- [7] Pietta, P. J.; Mauri, P. L.; Raura, A. *J. Chromatogr.* 1991, 549: 367
- [8] 宗玉英, 金满堂, 朱志强, 药学学报, 1995, 30: 594
- [9] Chen, H. R.; Shen, S. J. *J. Chromatogr.* 1993, 653: 184
- [10] 沈红梅, 乔传卓, 苏中武, 中国药学杂志, 1995, 30: 133
- [11] Liu, Y. M.; Shen, S. J. *J. Chromatogr.* 1993, 637: 219
- [12] Liu, Y. M.; Shen, S. J. *J. Chromatogr.* 1993, 639: 323
- [13] Shen, S. J.; Lu, C. F. *J. HRC.* 1995, 18: 269
- [14] 胡志远, 贺福初, 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3): 202
- [15] Opiteck, G. J.; Lemis, K. C.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1997, 69: 1518
- [16] Opiteck, G. J.; Ramirez, S. M.; Jorgenson, J. W.; Moseley, M. A.; *III Anal. Biochem.* 1998, 258: 349
- [17] Lewis, K. C.; Opiteck, G. J.; Jorgenson, J. W.; Sheoley, D. M. *J. Am. Soc. Mass. Spectrum.* 1997, 8(5): 490
- [18] Opiteck, G. J.; Jorgenson, J. W.; Moseley, M. A. III; Anderegg, R. J. *J. Microcolumn Sep.* 1998, 10: 365
- [19] Ishii, D.; Takeuchi, T. *Trends in Anal. Chem.* 1990, 9(5): 152
- [20] Rickwood, D.; Hames, B. D., edit, 赵大健, 孙有祯, 齐义鹏译, 核酸的凝胶电泳实践方法, 科学出版社, 1989: 3

- [21] 苏拔贤主编, *生物化学制备技术*, 科学出版社, 1986: 121
- [22] Hjerten, S. *J. Chromatogr.* 1983, 270: 1
- [23] Colen, A. S.; Langer, B. L. *J. Chromatogr.* 1987, 697: 409
- [24] Colen, A. S.; Paulus, A.; Karger, B. L. *Chromatographia*, 1987, 24: 15
- [25] Guttman, A.; Colen, A. S.; Heiger, D. N. *Anal. Chem.* 1990, 62: 137
- [26] Chen, J. W.; Colen, A. S.; Karger, B. L. *J. Chromatogr.* 1991, 559: 295
- [27] Lux, J. A.; Yin, H. Y.; Schomburg, G. *Chromatographia*, 1990, 30: 7
- [28] Vilenchik, M.; Belenky, A.; Cohen, A. S. *J. Chromatogr.* 1994, 663: 105
- [29] Warren, W. J.; Vella, G. *Biotechniques*. 1993, 14: 598
- [30] Lu, W.; Han, D. S.; Yuan, J. *Nature*. 1994, 368: 269
- [31] Arakawa, H.; Nakashiro, S.; Macda, M. *J. Chromatogr.* 1996, 722: 359
- [32] Lu, X. D.; Yeung, E. S. *Applied Spectroscopy* 1995, 49: 605
- [33] Wooley, A. T.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* 1995, 67: 3676
- [34] Hjerten, S. *Arch. Biophys. Suppl.* 1962, 1: 147
- [35] Heiger, D. N.; Olen, A. S.; Karger, B. L. *J. Chromatogr.* 1990, 516: 33
- [36] Ruiz-Martinez, M. C.; Berka, J.; Belenki, A.; Frantisek, F.; Miller, A. W.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* 1993, 65: 2851
- [37] Carrilho, E.; Ruiz-Mahinez, M. C.; Berka, J.; Smirnow, I.; Goetzinger, W.; Miller, A. W.; Brady, D.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* 1996, 68: 3305

致 谢

本论文是在导师张祥民教授的悉心指导下完成的。张老师对全新领域勇于探索、对科研事业执着追求的精神深深令我折服。同时，张老师在研究工作中给予我的耐心的启迪和教诲，在立身为人方面给予我的潜移默化的感染和熏陶，更使我铭刻在心，受益终生。在此，致以我最衷心的感谢和崇高的敬意。

感谢徐韶瑛老师在论文工作中给予的无私的合作和支持，在日常工作中给予的热心关怀和帮助。

感谢本实验室王力、胡华玲、柳臻、姚健等同学在平日工作和生活中给予的真诚的帮助，我会永远铭记集体的温暖，珍惜这份友情。

感谢分析化学科研组的老师和同学三年来给予的有益的指导和帮助，使我受益匪浅。

最后，我要感谢我的父亲、母亲多年来对我的养育之恩和学业上的支持，我会尽努力以回报。

附录：硕士期间论文发表情况

1. “毛细管高效液相色谱-毛细管电泳二维分离接口的优化”， 分析化学， 已接收
黄爽， 徐韶瑛， 张祥民*
2. “毛细管电泳泡状检测池的制备及性能考察”， 分析化学， 1999，
27 (4): 485-489
张祥民*， 柳臻， 姚健， 黄爽