

摘要

毛细管电泳 (CE) 是高效、快速、样品和试剂消耗少的一种分离技术, 存在的主要缺点之一就是检测灵敏度低, 提高检测灵敏度是目前 CE 研究的热点之一。激光诱导荧光 (LIF) 检测是 CE 最灵敏的检测方法之一, 不仅可以提高检测灵敏度, 还可改善选择性, 极大地拓展了 CE 的应用, 特别在生物样品方面具有广阔的应用前景。柱前衍生检测需要额外的操作步骤, 并且要求衍生产物具有一定的稳定性, 对具有多重标记位点的分析物会出现多重峰。对此, 柱后衍生 LIF 检测此时是更好的选择, 而且特别适合于高速在线衍生检测。另一方面, CE 的检测灵敏度受限于毛细管较短的检测光程, 而且毛细管管壁也容易产生散射光, 增加背景噪音。无窗检测池可以增加检测光程降低背景噪音, 提高信噪比。

本论文综述了 CE 灵敏的检测方法和技术, CE-LIF 检测原理、仪器结构, 荧光衍生方法和柱后衍生反应器。本论文的主要研究内容包括组装了简便的 CE-LIF 检测系统, 发展了一种简单易于制作的 CE-LIF 柱后反应器, 并应用于牛奶和动物样品中卡那霉素类抗生素残留的分析检测, 另外还提出 CE 无窗式检测的新方法。论文的主要内容和研究成果具体如下:

1、组装了一台毛细管电泳激光诱导荧光检测系统。采用共线型光学结构组装激光诱导荧光检测系统, 利用核黄素作为分析样品, 对影响系统检测性能的光学器件如光阑孔径、光电倍增管的工作电压条件进行了优化, 并讨论了进一步提高检测灵敏度的措施。核黄素的浓度检出限达到 9.0×10^{-9} mol/L (3.4×10^{-6} g/L), 质量检出限为 18 amol, 在 $3.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内成呈良好的线性关系, 方法的相对标准偏差 (RSD) 为 2.4%。

2、研制了一种毛细管电泳激光诱导荧光检测的共轴-间隙柱后反应器。采用毛细管聚酰亚胺涂层套对接和准直分离和反应毛细管, 衍生试剂从涂层套和分离毛细管之间的环隙, 以及两根毛细管之间的间隙引入反应管中, 实现高效分离和快速衍生反应。设计了衍生反应池的加压及冲洗装置, 从而解决了柱后衍生反应通道堵塞的问题。氨基酸的检出限为 $8 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L, 在两个多数量级浓度范围内呈线性关系, 其中甘氨酸线性范围为 $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L, 分离效率 $1.35 \times 10^5 \sim 1.67 \times 10^5$ 理论塔板数, 并成功地应用于香醋样品中的游离氨基酸的测定。该反应器结构简单, 易于制作, 无需显微操作, 可以采用短的反应距离适用于快速和产物易分解的衍生反应。在毛细管电泳分析中, 毛细管的准直耦合以及在柱试剂引入方面将会具有广泛的应用前景。

3、提出毛细管电泳柱后衍生激光诱导荧光测定卡那霉素类抗生素方法。利

用共轴一间隙柱后反应器，以酸性乙酸钠盐缓冲液，在反向电渗流和负高压下分离卡那霉素类抗生素，再与碱性硼酸钠盐缓冲液中的衍生试剂柱后衍生反应，用激光诱导荧光检测。该柱后反应衍生方法避免了分离缓冲液和衍生缓冲液两种不同缓冲体系的相互干扰，提高了分离度和检测灵敏度。氨基糖苷的检出限为 $3.6 \times 10^{-5} \sim 5.2 \times 10^{-5}$ g/L，线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ g/L。该法用于牛奶和动物组织中的卡那霉素类抗生素残留的测定，回收率为 81.6%~95.3% (n=4)。

4、提出一种毛细管电泳激光诱导荧光无窗式检测方法。利用聚酰亚胺涂层套准直两段毛细管制作了无窗检测池，利用显微成像监测检测池间隙距离和电泳分离电压对无窗检测池外形的影响，考察了分离电压对荧光检测信号的影响，理论分析和实验验证了无窗检测的可行性。在优化的实验条件下，比较了无窗式检测和柱检测的性能，结果表明采用无窗检测池，荧光信号增强，背景噪音减小，检出限降低，其中核黄素的检测灵敏度甚至提高了 15 倍。线性范围达到两个数量级以上，其中 RF 的线性范围为 $5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L，无窗检测分离效率为 $1.0 \times 10^5 \sim 2.4 \times 10^5$ 理论塔板数，RSD (n=5) 在 3.7%~5.8% 范围。用无窗式检测方法成功测定了实际样品菠菜和莴苣叶中三种黄素类化合物的含量。鉴于无窗检测池易于制作，没有在柱检测管壁出现吸附污染的缺点，该检测模式扩大了毛细管电泳分析的应用范围。

关键词：毛细管电泳；激光诱导荧光；柱后衍生；柱后反应器；氨基糖苷类抗生素；无窗式检测

ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation technique with fast separation speed, high separation efficiency and low sample consumption. For its short optical path and small sample volume, the detection sensitivity of ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry is not satisfied. Laser-induced fluorescence (LIF) is one of the most sensitive methods to be used in CE detection. It can both enhance the detection sensitivity and improve the selectivity. So, it extends the application of CE, especially for biological and medical samples. Pre-column derivatization needs additional manipulations and stable derivatives. Moreover, in pre-column derivatization of LIF, an analyte molecule with more than one labeled site may result in multiple separation peaks. However, the problem of multiple peaks can be avoided with post-column derivatization method, because the separation is based on the native analytes. The post-column LIF method is also suitable for high speed on-line derivatization detection. On the other hand, the fluorescence intensity suffers from the short optical detection path, and the S/N ratio decreases with the light scattering and background emission from the wall of a conventional on-column optical detection cell. A windowless fluorescence cell can resolve the problems of scattering and background emission from the conventional cell walls, and expand the optical path length.

The author reviews the sensitive detection methods of CE, fluorescence detection principle, instrumental structure, derivatization detection methods and post-column derivatization reactors of CE - LIF. The main tasks of the thesis are to assemble a simple CE - LIF system, to develop a simple and convenient post-column reactor for CE - LIF, which can be applied to analyze the kanamycin residues in foodstuff, such as milk and animal tissue. In addition, a windowless fluorescence detection method is also proposed. The research contents and results of the thesis are as follows:

1. A simple CE - LIF system was assembled. The detection system was based on the collinear or confocal optic configuration arrangement. The experiments were optimized by the effects of diaphragm and PMT voltage on detection performance. The discussion was made about the method of improve the detection sensitivity. The concentration detection limit (CLOD) and mass detection limit (MLOD) of the riboflavin and was 9.0×10^{-9} mol/L (3.4×10^{-6} g/L) and 18 amol, respectively. The

linear calibration range was 3.0×10^{-8} - 1.0×10^{-5} mol/L. The relative standard deviation (RSD) of the method was 2.4% (n=5).

2. A post-column reactor with coaxial-gap mode was developed for LIF in CE. The reactor could be assembled simply and conveniently without any micromanipulation, in which a thin polyimide sleeve of 10-mm length obtained from the capillary coating was used to align and connect the separation and reaction capillary with a 10 - 20 μm gap. Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) and 2-mercaptoethanol (2-ME) were used as derivatization reagents and delivered into the reaction capillary through the annulus between the separation capillary and polyimide sleeve and the gap of two capillaries by gravity. A reaction distance from the gap to detection point could be shortened to 5 mm. For the post-column reactor of CE-LIF, several configuration parameters were optimized, including liquid level difference between the derivatization solution and outlet buffer, annular dimension between the etched separation capillary and polyimide sleeve, and reaction distance etc. for amino acids, the detection limits ranged from 8.0×10^{-8} to 1.0×10^{-6} mol/L and linear calibration ranges were more than two orders of magnitude, e.g. 5×10^{-7} - 1×10^{-4} mol/L for glycine. The separation efficiency ranged from 1.35×10^5 to 1.67×10^5 theoretical plates. The method was applied to the analysis of amino acids in vinegar samples successfully.

3. An analytical method of capillary zone electrophoresis (CZE), post-column derivatization and LIF detection with the homemade coaxial-gap reactor was proposed for the determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin, kanmycin components of aminoglycoside antibiotics (AGs). The CZE separation was performed with 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.5 mmol/L cetyltrimethyl ammonium bromide to reverse the electroosmotic flow in separation capillary. The derivatization reagent solution contained 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME and 35 mmol/L sodium tetraborate buffer (pH 10.0) in 30% (v/v) methanol. The detection limits ranged from 3.6×10^{-5} to 5.2×10^{-5} g/L and the linear calibration concentrations were in the range of 1.1×10^{-4} - 5.0×10^{-2} g/L. The proposed method was verified by measuring the spiked aminoglycosides in milk samples and animal issues samples after a simple sample pretreatment with trichloroacetic acid. The recovery of the aminoglycosides ranged from 81.6% to 95.3% (n = 4).

4. A windowless detection cell combined with capillary electrophoresis for laser-induced fluorescence detection was proposed. The detection cell was simply and

conveniently assembled using polyimide coating sleeve, in which the thin polyimide sleeve obtained from the capillary was used to align two capillaries with a 140 μm gap. The effect of gap distance and running voltage on the contour of the windowless detection cell was investigated by imaging the windowless cell under a microscope. The experimental results validated the feasibility of the theory of the windowless detection method. Under optimized conditions, the windowless detection method presented lower LODs by compare with the on-column detection method. The detection sensitivity was improved about 15-fold for riboflavin. The linear calibration concentrations more than two orders of magnitude were obtained in the range of 5.0×10^{-9} - 1.0×10^{-6} mol/L for flavins. The separation efficiency of windowless detection method ranged from 1.0×10^5 - 2.4×10^5 theoretical plates. The RSDs were in the range of 3.7% - 5.8% ($n = 5$). The method was applied to the analysis of flavins in spinach and lettuce leaves. Since the windowless detection cell was simply assembled and eliminated the adsorption of matrix impurities, it could be employed in optical detection modes in CE.

Keywords: capillary electrophoresis; laser-induced fluorescence detection; post-column derivatization; post-column reactor; aminoglycoside antibiotics; windowless detection

缩写

ACE	Affinity capillary electrophoresis (亲和毛细管电泳)
AG	Aminoglycoside antibiotics (氨基糖苷类抗生素)
BGS	Background solution (背景溶液)
CCD	Charge coupled device (电荷耦合器件)
CE	Capillary electrophoresis (毛细管电泳)
CEC	Capillary electrochromatography (毛细管电色谱)
CGE	Capillary gel electrophoresis (毛细管凝胶电泳)
CIEF	Capillary isoelectric focusing (毛细管等电聚焦)
CITP	Capillary isotachopheresis (毛细管等速电泳)
CL	Chemiluminescence (化学发光)
CLIA	Chemiluminescence immunoassay (化学发光免疫分析)
CLOD	Concentration limits of detection (浓度检出限)
CMC	Critical micelle concentration (临界胶束浓度)
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide (十六烷基三甲基溴化铵)
CZE	Capillary zone electrophoresis (毛细管区带电泳)
DNA	Deoxyribonucleic acid (脱氧核糖核酸)
ECD	Electrochemical detection (电化学检测)
ECL	Electrogenerated Chemiluminescence (电致化学发光)
EDTA	Ethylene diaminetetra acetic acid (乙二胺四乙酸)
EIA	Enzyme immunoassay (酶免疫分析)
EOF	Electroosmosis flow (电渗流)
FASS	Field-amplified sample stacking (场放大样品堆积)
FI	Flow injection (流动注射)
FIA	Fluorescence immunoassay (荧光免疫分析)
FIIA	Flow injection immunoassay (流动注射免疫分析法)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (荧光素异硫氰酸盐)

GC	Gas chromatography (气相色谱)
HPLC	High performance liquid chromatography (高效液相色谱)
IA	Immunoassay analysis (免疫分析法)
I.D.	Inside diameter (内径)
ITP	Isotachophoresis (等速电泳)
LCW	Liquid-core waveguide (液芯波导)
LIF	Laser induced fluorescence (激光诱导荧光)
LOD	Limits of detection (检出限)
LPME	Liquid-phase microextraction (液相微萃取)
LVSS	Large-volume sample stacking (大体积样品堆积)
MCRB	Moving chemical reaction boundary (移动化学反应界面)
2-ME	2-mercaptoethanol (2-巯基乙醇)
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography (胶束电动毛细管色谱)
MIP	Molecular imprinted polymer (分子烙印聚合物)
MLOD	Mass limits of detection (质量检出限)
MS	Mass chromatography (质谱)
MSPD	Matrix solid phase dispersion (基质固相分散)
NA	Numerical aperture (数值孔径)
NACE	Non-aqueous capillary electrophoresis (非水毛细管电泳)
NDA	Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (萘二甲醛)
OPA	<i>o</i> -Phthalaldehyde (邻苯二甲醛)
O.D.	Outside diameter (外径)
PGD	Potential gradient detection (电势梯度检测)
PMT	Photomultiplier tube (光电倍增管)
PTFE	Polytetrafluoroethylene (聚四氟乙烯)
RIA	Radioimmunoassay (放射免疫分析)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (十二烷基硫酸钠)
SFE	Supercritical fluid extraction (超临界流体萃取)
SPAD	Single photon avalanche diodes (单光子雪崩型光电二极管)

SPE	Solid phase extraction (固相萃取)
SPME	Solid phase microextraction (固相微萃取)
TLC	Thin layer chromatography (薄层色谱法)
UV	Ultraviolet (紫外)
Vis	Visible Spectrometry (可见光谱)

中国科学技术大学学位论文原创性和授权使用声明

本人声明所呈交的学位论文, 是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

本人授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权, 即: 学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版, 允许论文被查阅和借阅, 可以将学位论文编入有关数据库进行检索, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

作者签名: 余子健

2008年6月10日

余子健

第一章 综述

1.1 研究背景

1.1.1 毛细管电泳简述

毛细管电泳(CE)是高效、快速、样品和试剂消耗少的一种分离技术, CE 以高压电厂为驱动力, 以毛细管为分离通道, 样品中的组分按淌度或(和)分配系数的差异而得以分离。毛细管电泳仪器装置通常包括高压电源、毛细管、检测器和缓冲液贮瓶, 如图 1.1 所示[1]。

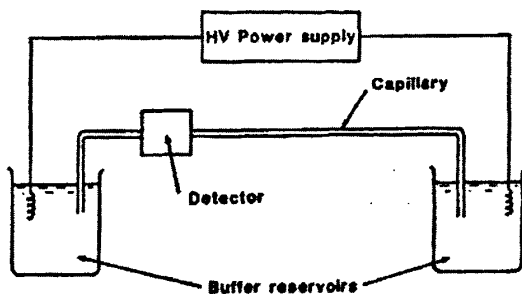


图 1.1 毛细管电泳仪器结构装置[1]

CE 分离模式主要包括毛细管区带电泳(CZE)[2]、毛细管凝胶电泳(CGE) [3]、胶束电动毛细管色谱(MECC)[4]、毛细管等电聚焦 (CIEF) [5]、毛细管等速电泳(CITP)[6]、毛细管电色谱(CEC)[7]、亲合毛细管电泳(ACE) [8]和非水相毛细管电泳(NACE)[9]等。

基础理论研究主要涉及区带展宽[10,11], 分离度优化[12], 电渗流(EOF)[13,14], 热效应[15], 管壁吸附效应[16]等, 这些问题的深入研究使 CE 技术迅速成熟和发展推广。

CE 广泛应用于生物、医药、化工、食品、环境、司法等领域[17-21], 从无机小离子到生物大分子, 从带电粒子到中性分子, 几乎涉及到国民生产生活的各个领域。

1.1.2 毛细管电泳研究趋势

在生物医学等多方面巨大的应用价值, 是 CE 目前成功的关键。微型化的芯片电泳是 CE 仪器发展的重要趋势, 毛细管阵列电泳极大地提高了工作效率, 缩

短了样品的分析周期。单细胞检测从细胞水平上去探寻生命的奥秘，单分子检测从单个分子水平上为开展化学动力学、反应动力学等研究提供了可能。这些工作均面临着高灵敏检测的挑战[22]。由于 CE 检测通道小和柱容量低，实现灵敏的检测需要发展高灵敏的检测器或检测方法，CE 仪器装置简单，其面临的最大挑战是高灵敏的检测方法和检测器的发展[23]。

1.1.3 发展灵敏的激光诱导荧光检测的意义

激光诱导荧光(LIF)检测器是 CE 最灵敏的检测器之一[22,24]。LIF 不仅提高了检测灵敏度，还可增加检测的选择性，仅对产生荧光或被选择性荧光标记的分子产生响应，可有效消除基体成分的干扰，在痕量生物样品和环境监测方面应用广泛。既可以使用小孔径的毛细管，处理更少的样品，得到更高的分离效率，具有更广阔的应用领域。由于大多数分析对象没有荧光基团，通常需要进行荧光标记，恰当地选择激发波长和荧光衍生试剂对检测灵敏度的提高具有重要的现实意义。LIF 检测系统存在的主要问题是通用性差、体积大、价格贵、光学结构比较复杂等，由于商品化的仪器[25-27]价格较贵往往难以满足实验需求，目前大多自行组装[28-30]。

1.2 提高毛细管电泳检测灵敏度方法

CE 采用内径很小的毛细管，样品负载能力小，而且在常规 UV-vis 检测中检测光程短，导致灵敏度相对较低，这也是目前 CE 面临的最大问题之一。为了扩大 CE 的应用范围，提高其检测灵敏度，可通过两种途径实现[31]。

一、增加样品负载量，主要有色谱富集技术和电动富集方法。

二、提高检测器的灵敏度，主要有增加检测吸收光程，降低荧光背景噪音，采用 LIF, CL, MS 等灵敏的检测方法。

1.2.1 样品富集技术

1.2.1.1 色谱富集技术

色谱富集技术是先将富集柱和 CE 毛细管连接或者将吸附固定相内置于毛细管，分析物溶液流经固定相后吸附，再用洗脱液将分析物从固定相洗脱下来，该方法的检测灵敏度通常能提高 2~3 个数量级，个别甚至达到 4 个数量级。

固相萃取预富集毛细管电泳分离装置由进样毛细管、萃取管和分离毛细管组成，萃取管一般用内径与分离毛细管外径相匹配的石英毛细管[32,33]、Teflon 管

[34]或聚乙烯管[35-37]管内填充 C_{18} 或 C_8 固定相填料, 填料两端用玻璃纤维膜[32-35]或聚醚砜膜[36]封住, 再用两段毛细管分别从萃取管两端插入, 分别作为进样管和分离毛细管, 然后用环氧树脂密封固定。相似的膜富集装置采用色谱固定相键合过的膜置于两毛细管之间[38]。

在线富集过程包括缓冲液平衡、压力进样、分析物富集、洗脱和分离, 检测灵敏度可提高 3~4 个数量级。另外还有在少量高纯石英毛中加入大量 $20\ \mu\text{m}$ 的多孔石英熔珠, 涡旋使多孔熔珠和石英毛缠绕, 并作为预富集材料嵌入 Teflon 管中构成预富集装置[39]。该装置易于制作、反压低, 不需柱塞。

FI-SPE-CE 富集技术[40]采用 FI-CE 接口, 将含有离子交换树脂的微柱用于离子交换预富集, 样品溶液经 FI 泵输送到预富集柱中, 分析物保留富集于固定相上, 然后用溶液洗脱后, 再进行 CE 分离测定。

SPME-CE 系统先利用固相萃取头的石英纤维涂层完成对样品的吸附除杂过程, 通过联用接口, 由洗脱液将萃取物解析到毛细管内进行分离检测[41]。

此外免疫亲和色谱法(IAC) [42]和分子烙印聚合物技术(MIP) [43]和 CE 联用也得到成功的应用。

1.2.1.2 电动富集方法

电动富集方法是基于样品区带和电泳缓冲液的离子强度不同而引起溶液的电导和电泳淌度差异的一种样品堆积方法。

大体积样品堆积(LVSS) [44]先在毛细管内引入大体积的样品区带, 由于样品区带离子浓度低、电阻大、场强度高, 样品从低电导率的样品带进入高电导率的缓冲液迁移速度骤减, 从而在两溶液的界面处完成堆积。LVSS 的缺点是受到毛细管长度的限制, 并且还需密切监测样品堆积时电流的变化。

场放大样品堆积(FASS) [45]通过电动进样, 利用样品溶液和电泳缓冲液电导率的差异, 带电的化合物可以从低电导率样品基质堆积到高电导率电泳缓冲液中, 该方法避免了引入大的样品体积从而影响分离。FASS 的应用必须满足样品溶液的离子强度远低于电泳缓冲液的离子强度, 难以同时用于阳离子和阴离子, 因而含有大量无机盐的生物样品难以直接应用。

等速电泳(ITP) [46]是基于离子淌度差异的一种模式, 样品区带夹在前导电解质(高淌度)和尾随电解质(低淌度)之间, 样品区带按照淌度大小连续排列, 每一条区带只含一种样品离子, 并以稳态速度迁移。ITP 对样品不仅是一种堆积技术, 而且对样品基体也是一种稀释技术, 但是不同样品体系需要研究不同的方法。

pH 调制堆积(pH mediated stacking)是用强酸或强碱中和样品中的高电导基

体,使样品变为电中性,同时电中性样品区带的电导率大大降低,样品堆积在样品区带与背景缓冲溶液的界面处。该法即可用于阳离子[47]又可由于阴离子[48]的富集。

动态 pH 联接 (Dynamic pH junction) [49]将毛细管先充满较高 pH 的背景溶液(BGS),进一段弱酸性样品溶液 (pH 比 BGS 低),两溶液界面发生 pH 联接, BGS 中的 OH^- 使样品区带前端中性分析物带负电荷,与 EOF 迁移方向相反(中性分析物与 EOF 迁移方向相同),向前迁移速度减慢完成样品堆积。弱碱性样品可以在反向电渗流负电压模式下富集[50]。

堆扫(Sweeping)方法由 Terabe 小组提出[51,52],他们先将样品溶解于和电泳缓冲液(不含胶束)相同电导率的基体(含胶束)中,压力进样一段样品区带,在出口端加负电压,伪固定相 SDS 胶束扫过样品区带并和样品相互作用,形成很窄的区带产生堆积效应,灵敏度能提高 3 个数量级,可同时富集带电离子和中性化合物。但是当样品中的杂质和胶束也具有亲和作用时,杂质也被富集,因而生物样品的应用受到一定限制。

此外,还有乙腈堆积(Acetonitrile stacking) [53,54]和移动化学反应界面(MCRB) [55-61]等富集方法。

1.2.1.3 液液萃取

液-液萃取是利用样品在两种不相混溶的液体或相之间的溶解度或分配比的不同,从而达到分离纯化样品的目的。在线CE-液相微萃取(LPME) [62]毛细管内先充满缓冲液,然后在进样端引入1-辛醇中;再将进样端放在样品溶液(供给相)中,样品池降低,在毛细管进样端形成一滴缓冲溶液(接受相)表面覆盖一层辛醇;通过有机薄层将悬挂在毛细管入口端的一滴接受相溶液同供给相样品溶液分开,根据供给相和接受相pH的差别使分析物被反萃到接受相中,萃取结束后使样品进入毛细管内,再进行CE分离检测。

目前由于受到接口技术和萃取机理的限制,CE与浊点萃取(Cloud point extraction, CPE) [63]以及超临界流体萃取(SFE) [64]联用的报道还较少。

1.2.2 检测池的改进

UV-vis 检测是 CE 分离的一种常规检测方法,最先由 F.J. Yang [65]设计,随后又不断改进而成。鉴于该检测器通用性好结构简单,是目前应用最广泛的一种 CE 检测池。但是毛细管短的光程严重限制了它的灵敏度,难以满足低浓度和微量样品的分析要求。因此,为了进一步降低检出限,提出了通过增大吸收光程来提高检测灵敏度的新方法、新技术。

1.2.2.1 矩形池

Tsuda 等[66]制作了矩形的扁平毛细管如图 1.2, 用 CE 分离 UV 在柱检测, 具有光程长、光学畸变小、散热效率高等优点。对截面积为 $50 \times 1000 \mu\text{m}^2$ 的扁平毛细管, 在相同的样品区带, 进样体积比 $50 \mu\text{m}$ 内径的圆柱形毛细管增加了 25 倍, 可检测 $8 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 的吡哆素和丹酰化丝氨酸, 灵敏度提高了 20 倍。但是该矩形池制备工艺复杂, 孔径大小不均匀。

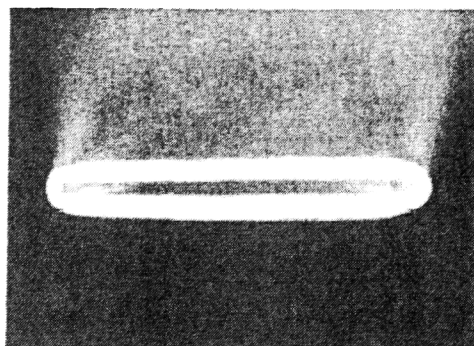


图1.2 矩形毛细管检测池[66]

1.2.2.2 Z-形池

Chervet 等[67]将 3 mm 光程的 Z-形池用于 CE-UV 检测, 信噪比提高 6 倍, 质量检出限(MLOD)降低 14 倍, 但是柱效略有下降。Moring 等[68]用 Z-形池(图 1.3)检测, 同传统检测器比较信噪比提高一个数量级, LOD 为 10^{-8}mol/L , 线性范围达到 4 个数量级, 柱效高达 2×10^5 理论塔板数。由于光程增加, 对于迁移时间相近的区带, 样品的分离度损失较多, 而且在检测窗口处毛细管由于失去了涂层的保护作用而容易断裂。

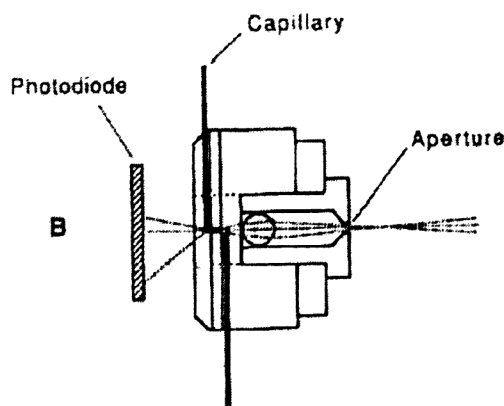


图 1.3 毛细管 Z-形检测池[68]

1.2.2.3 U-形池

Bruin 等[69]设计几种不同的 U-形池,可以获得高的灵敏度和低的噪音水平,尿嘧啶的 LOD 达到 9.8×10^{-8} mol/L。Harrison 小组[70]在玻璃芯片上制作 120-140 μm 光程的 U-形池(图 1.4),吸光度检测灵敏度提高 10 倍, FITC 的 LOD 为 6 $\mu\text{mol/L}$;而用于荧光检测时,信噪比提高 20 倍,荧光素的 LOD 为 3 nmol/L,约相当于 20,000 个分子。

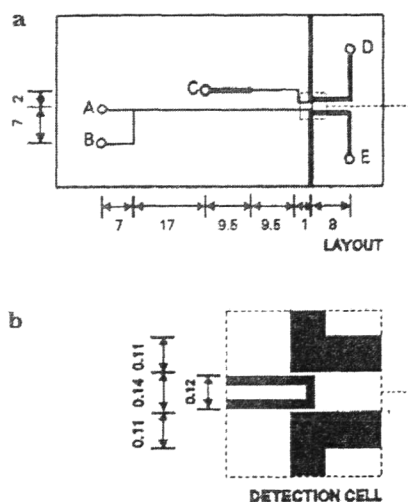


图 1.4 微芯片 U 形检测池[70]

1.2.2.4 泡形池

Hewlett-Packard 公司[71]将分离毛细管检测窗处的内腔加工成泡状(图 1.5),样品区带进入泡形池后,因内径增加场强降低,区带压缩,而且光程延长,灵敏度得以提高,具有泡形池的毛细管目前已经商品化。E.S. Yeung 小组[72]用泡形池进行了 LIF 检测,从理论上分析了峰形展宽的机理,并用 CCD 成像,孔雀石绿的信号可提高 8 倍。泡形检测池增加检测光程可提高检测灵敏度,但是分离度和柱效降低。

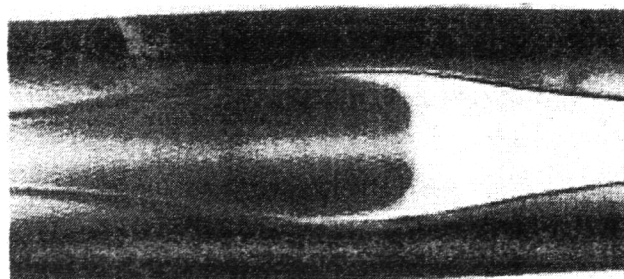


图 1.5 毛细管泡形检测池[71]

1.2.2.5 套形池

Djordjevic 等[73]用 $220\ \mu\text{m I.D.} \times 350\ \mu\text{m O.D.}$ 的毛细管制作了套形池（图 1.6），并进行 CZE-UV 检测，同 $75\ \mu\text{m I.D.}$ 毛细管的检测结果相比，校正的峰面积增加了 3.5 倍，柱效略有下降但峰形非常对称。

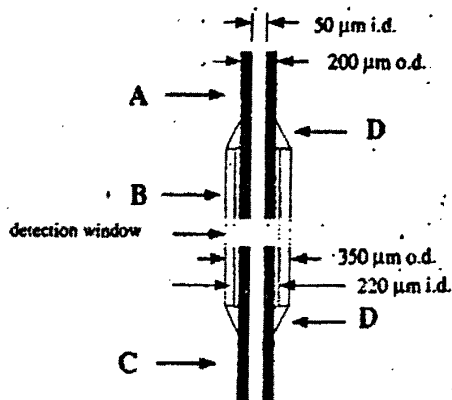


图 1.6 毛细管套形检测池[73]

1.2.2.6 轴向吸收池

光束从毛细管的一端入射，通过沿毛细管轴向传播来增加检测光程[74,75]

1.2.3 灵敏检测器

CE柱容量小，对检测器灵敏度要求较高，发展灵敏的检测器是CE的非常活跃的领域[22]。目前灵敏度高的检测器主要有质谱检测器(MS)、电化学检测器(EC)、化学发光检测器(CL)、激光诱导荧光检测器(LIF)等。

1.2.3.1 CE-MS 检测器

CE-MS结合了CE高效分离和MS的高鉴别能力[22]，能用于nI量级样品的分子结构和分子量的准确测定，特别适合复杂生物体系如蛋白质和多肽的分离鉴定，在药物分析如中草药分析、体内药物代谢分析方面也将发挥重大的作用。CE-MS检测具有较高的质量检出限(MLOD)，MLOD为pmol-fmol水平，但浓度检出限(CLOD)较高，CLOD在 $\mu\text{mol/L}$ 量级。

1.2.3.2 CE-ED 检测器

CE-ED检测主要有三种基本模式：安培法、电导法和电位法[76]。ED检测方法可以避免CE光学检测时光程短的问题，检测灵敏度高，检出限可以达到 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ mol/L。ED检测器体积小，特别适合对没有紫外或荧光发色团的无机离子和有机小分子的直接检测。但是ED检测要求溶质具有电化学活性，检测对象局限于容易氧化或还原的分析物。

1.2.3.3 CE-CL 检测器

CL检测具有结构简单、灵敏度高的特点[77,78]。将CE的高分离性能和CL高灵敏的检测性能结合，是近十多年来的研究热点之一。电致化学发光(ECL)和CE联用[79,80]展现出诱人的前景。

1.2.3.4 CE-LIF 检测器

LIF是最灵敏的检测器之一，1977年Zare[81]首次将LIF检测器引入到HPLC中，1985年，Gassman等[82]成功地将其应用于CZE，随后在生命科学的推动下，LIF检测器在分析技术中得到了迅猛的发展。LOD达到 $8 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L。LIF不仅提高了检测灵敏度，还可增加检测的选择性，仅对产生荧光或被选择性荧光标记的分子产生响应，可有效消除基体成分的干扰，在痕量生物样品和环境监测方面应用广泛。既可以使用小孔径的毛细管，处理更少的样品，得到更高的分离效率，具有更广阔的应用领域。

1.3 荧光检测的基本理论[83-85]

1.3.1 荧光分析的定性依据

某些物质吸收了与其自身特征频率相同的光子以后，分子或原子中的某些电子从基态中的最低振动能级跃迁到能级较高的激发能态，然后再无辐射跃迁到第一电子激发态中的最低振动能级。荧光是指当电子由第一电子激发态最低振动能级跃迁至基态时，发出比原来吸收波长长的一种光。荧光的产生与分子结构密切相关。对某一化合物而言，在给定条件下，其荧光光谱是一定的，可作为定性的依据。

1.3.2 荧光分析的定量依据

荧光是物质在吸收光能之后所发射的辐射,样品溶液的荧光强度与样品的吸收系数、量子效率和浓度有关。样品稀溶液荧光强度 F 表达式为

$$F = K\Phi \ln\left(\frac{I_0}{I_0 - I_A}\right) = K\Phi I_0 \epsilon bc \quad (1.1)$$

其中 Φ 是荧光物质的量子效率, I_0 是激发光的强度, I_A 为荧光物质吸收光的强度, ϵ 是该物质的摩尔吸光系数, b 为吸收光程, c 为物质浓度; K 是与收集效率、传输效率等因素相关的常数。在给定的荧光物质浓度较低的情况下, 荧光强度与荧光物质的浓度成正比, 这是荧光检测的定量基础。

1.3.3 影响荧光特性的因素

物质荧光的特性首先取决于其自身的能量状态, 即取决于其分子结构, 其次还受到外界因素, 如温度、溶剂、酸度等的影响。

1.3.3.1 分子结构的影响

荧光物质的激发光谱和发射光谱及其荧光强度与化学结构密切相关, 影响荧光特性的结构特征如下:

一、具有共轭大 π 键结构。

共轭体系越大, 越易产生荧光, 荧光量子产率越大, 但共轭体系增加到一定程度, 量子效率反而下降。

二、具有刚性平面。

若荧光物质大的共轭体系出现扭动或转动, 量子效率较低, 即分子的共轭大 π 键结构必须共面且具有一定的刚性。

三、取代基的种类及位置。

推电子取代基增强荧光, 如 $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$ 等, 但是两个以上推电子取代基减弱荧光; 吸电子取代基减弱荧光, 如 $-\text{NO}_2$, $=\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$, $-\text{Cl}^-$, $-\text{Br}^-$, 其中 $\text{R}=-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$ 等。大取代基比小的取代基共轭效应大, 取代基位置对分子的荧光量子产率的影响大小依次是对位(m)>间位(p)>邻位(o)

1.3.3.2 温度的影响

温度对荧光物质的荧光强度影响显著, 通常情况下, 随着环境温度上升荧光量子效率会下降, 这主要是因为温度上升, 荧光分子与溶剂分子碰撞几率增加,

增大了荧光猝灭机会。而有些物质的吸收光谱也随温度升高发生显著变化,可能是荧光分子结构发生了改变。因此,在实验过程中尽量保持温度恒定。

1.3.3.3 溶剂的影响

同一种荧光化合物在不同的溶剂中,其荧光光谱的形状和强度可能会有显著的差异。光在吸收和发射之间存在着一定的能量损失,即发生斯托克斯(Stokes)位移现象。这是多种动态过程综合作用的结果,而这些过程都与溶剂分子密切相关,因此,给定某一荧光化合物的荧光光谱时通常应注明溶剂。

1.3.3.4 酸度的影响

荧光分子和其离子具有不同的荧光特性,溶液酸度的变化使分子态和离子态比例发生改变,对荧光的形状和强度产生很大的影响。金属离子的酸度会影响发光螯合物的稳定性和组成进而影响荧光特性。酸度对荧光物质的荧光特性的影响,也可以用来提高荧光分析的选择性。

1.3.4 荧光的背景噪音

荧光的背景噪音主要来自检测池的管壁和溶液中的微量有机杂质荧光;激发光在空气/管壁以及样品/管壁界面产生的散射、反射和折射;瑞利散射和拉曼散射;激发光和散射光在光学器件产生的自发荧光。

目前除了通过改变激发光入射角度 [86]消除荧光背景噪音外,还有其它几种有效的方法。

1.3.4.1 采用浸入式流动池

将熔硅毛细管浸入一个盛有折射指数和熔硅管壁相近的液体的方形池,如图 1.7[87]内,熔硅管壁/空气界面的光散射和光折射得以有效的消除,但是不能消除样品/管壁界面的光散射的干扰。

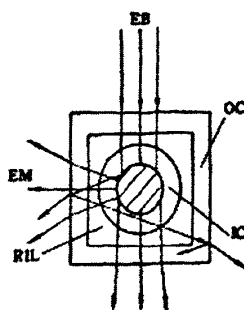


图1.7 浸入式流动池[87]

1.3.4.2 鞘流检测池

鞘流池[88-90]根据层流条件下液流不相混合的特点设计而成,鞘流液和样品的电泳缓冲液成分相同,因而在界面处不产生光散射,可消除样品/管壁界面的光散射。

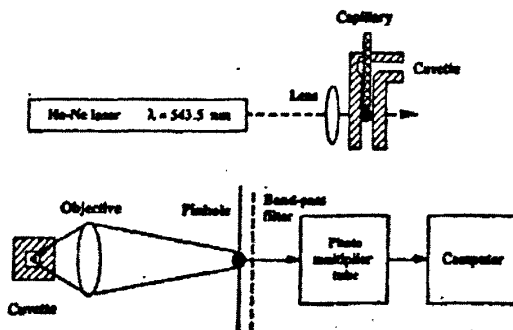


图1.8 鞘流检测池[90]

1.3.4.3 采用时间分辨技术

由于不同的物质具有不同的荧光寿命,采取短脉冲激光和时间门通技术[91],利用荧光和背景光寿命的差异进行时间分辨测量,可消除瑞利散射和拉曼散射及其它杂质荧光

1.4 毛细管电泳激光诱导荧光检测

1.4.1 光学器件

LIF检测系统的光学部件有激光光源、滤光片、透镜、光阑、检测池等

1.4.1.1 激光光源

激光光源[92]亮度极高,光照密度大,只需数mW至几十mW输出功率的激光器即可。激光相对于其它普通光源具有如下特点:

单色性强。激光谱线窄, $\Delta\lambda\approx 0.002\text{nm}$ 。

方向性强。激光的光束发散角小($<1\text{mrad}$),激光束能聚焦为几微米直径的光斑,能量高度集中。

常用的LIF激光光源有气体激光器如He-Cd激光器(325 nm, 442 nm), He-Ne激光器(543 nm, Ar+激光器(488 nm, 514 nm), 这类激光器体积大、价格高。半导体激光器(Laser diode, LD)又称二极管激光器,使用寿命长、体积小、价格便宜、输出功率稳定,输出波长在可见和红外区主要有457 nm, 473 nm, 532 nm, 632 nm等。激光器的选择首先考虑其发射波长与荧光物质的最大激发波长相匹配(或者根据激光器输出波长选择荧光试剂),输出功率以提高检测灵敏度和降低光漂白为选择原则,一般为1~20mW,此外发光空间模式和光束模式质量也应考虑。

1.4.1.2 滤光片

滤光片主要有带通滤光片,截止滤光片,具有透射率高、体积小、成本低、截通效率高的优点。二色镜(Dichroic mirror, DR)是具有特殊功能的滤光片,合适截止波长的DR能够实现荧光和激光的有效分离,消除激发光的干扰,应尽可能选取截通效率高的二色镜。

1.4.1.3 透镜

透镜,可用显微物镜代替,有聚光透镜和荧光收集透镜两种。考虑到空间位阻因素,聚光透镜尽量选用焦距长的透镜,聚焦后的光束斑点与检测池匹配,荧光收集透镜尽量选用数值孔径(NA)大的透镜,其荧光收集效率 η 与透镜的NA和周围介质的折射率(n)有如下关系:

$$\eta = \sin^2 \left[\frac{\arcsin\left(\frac{NA}{n}\right)}{2} \right] \quad (1.2)$$

1.4.4.4 光阑

光阑(Diaphragm)主要滤除非特异性的杂散光的大小,同时尽可能的通过荧

光，其孔径大小需通过实验优化。

1.4.4.5 光电检测器

常用的光电检测器有光电倍增管(PMT)、单光子雪崩型光电二极管(Single photon avalanche diodes, SPAD) 和电荷耦合器件(CCD)。PMT光敏面积大，暗电流小，增益大，但是体积较大，量子效率低，目前应用最广泛；SPAD量子效率高，光谱响应宽，但光敏面积小，暗电流大；CCD光谱响应范围宽，信噪比高，并有成像功能，但价格昂贵。

1.4.4.6 检测池

检测池的性能影响到检测灵敏度，发展新型检测池是毛细管电泳一个重要的研究方向。良好的检测池应具有对激发光畸变小，有利于收集荧光，而且柱外效应小。

一、在柱检测池(On-column Detection Cell)，制法简单，是目前CE等分析系统中应用最广泛的一种检测模式。但是存在激光束光学畸变大、产生较强的杂散光和噪音的缺点。

二、鞘流池(Sheath flow cell)，可消除了熔硅/空气和熔硅/溶剂界面的杂散光干扰，避免检测池受到样品的污染，但是该检测池需要特殊定制，而且实际操作繁琐。

三、液芯波导(LCW)检测池，LCW是一种全反射检测池，荧光在池壁内全反射输出，而激发光被消除。

四、微芯片检测池，检测池通常为几十微米宽和几十微米深的通道。

1.4.2 光学结构

荧光检测器的光学结构主要有正交型、共线型和轴向入射型。其光路结构设计的基本原则为：(1)高效激发荧光，(2)高效收集荧光，(3)消除荧光背景噪音。

1.4.2.1 正交型

正交型[82, 86, 88, 93, 94]结构(图1.9)中两套光学系统激发光路和发射光路相互垂直或呈一定角度，激发光对发射光路干扰小，正交型结构光学构造较为复杂，而且由于空间位阻因素，难以使用高NA的透镜(物镜)，影响荧光收集效率的提高。

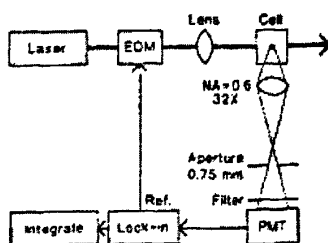


图1.9 正交型光学结构[93]

1.4.2.2 共线型

共线型[28-30, 95-97]结构(图1.10)激发光路和发射光路成一直线,特点是激光聚焦光斑和光阑分别位于透镜的两个共扼焦点上,即激光光束经透镜聚焦到样品后,激发的荧光被该透镜收集,再经过二色镜、滤光片、成像透镜、光阑至PMT被检测。它仅需一套光学系统,结构简单,而且能够使用高NA的物镜,荧光收集效率较高。共线型最常用的为反射式结构(二色镜是长通截止滤光片,即激发光被反射,而荧光透过)。

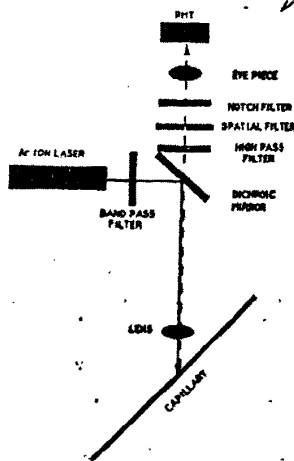


图1.10 共线型光学结构[95]

1.4.2.3 轴向入射型

轴向入射型[98-100],激光束向毛细管出口端轴向激发,消除了激光在检测池壁产生的光散射,延长激光的吸收光程,但对光不稳定样品检测不利。

1.4.3 荧光基团的化学衍生[101-103]

荧光检测灵敏度高,但是感兴趣的物质只有少数具有天然荧光,而大多数物质不发荧光或荧光量子产率很低,无法直接荧光检测需要间接荧光检测或荧光衍生检测。间接检测法的机理是物理置换,即具有强信号背景的探针被分析物取代后产生弱的信号,出现负峰,因此该法是一种近似通用的检测方法。但是间接法灵敏度没有直接法高,存在基线漂移、噪音大和扰动现象,而且对杂质也没有选择性。通过化学衍生是最常用的荧光测定方法,目前超过 90%的 LIF 检测采用的是衍生法[104,105]。根据衍生发生在分离前后顺序的不同,衍生方式分为柱前衍生(pre-column derivatization)、在柱衍生(on column derivatization)、柱后衍生(post-column derivatization)。

1.4.3.1 柱前衍生

样品在分离之前完成衍生过程。方法简单,无需专门的装置,易于操作,衍生效率高,内源性和荧光生成试剂均可使用,目前应用最为广泛。但是样品若具有多个标记基团,会出现多重峰,影响分离和检测,给峰识别和定量带来困难。此外,反应混合物中的过量衍生试剂能与分析物分离,柱前衍生还要求衍生产物稳定。

1.4.3.3 在柱衍生

样品在分离过程中进行衍生,以串联模式或三明治夹心模式将样品和试剂一起引入,根据两者移动速度不同混合反应,反应可以发生在柱端入口、柱中、整柱。在柱衍生对样品的稀释程度达到最小,特别适用于小体积的生物样品,如单细胞检测。但是需要控制两者的进样量比例和合适的迁移速率。

1.4.3.4 柱后衍生

样品在分离完成后进行衍生,样品组分的分离是基于其自身电泳性质的差异,衍生时避免了副产物的干扰以及因为多重标记而出现多重峰或区带展宽现象。柱后衍生在引入衍生试剂时需要特殊设计的柱后反应器,容易引起柱效下降、反应不完全以及高的背景噪音。在微量样品分析如单细胞分析、微透析分析等具有一定的应用价值。由于柱后衍生试剂种类有限,分析对象受限,柱后衍生主要应用于氨基酸、蛋白质、多肽、DNA、金属离子等检测。

1.4.4 柱后衍生接口

1.4.4.1 共轴式反应器

D.J. Rose 和 J.W. Jorgenson 于 1988 年率先进行了毛细管电泳激光诱导荧光柱后衍生检测的研究[106]。他们设计了一种共轴式柱后反应器如图 1.11 所示, 该反应器分离毛细管经氢氟酸刻蚀后插入反应毛细管内, 衍生试剂 OPA/2-ME 从试剂瓶由高差经 T 形池再进入反应管中, 当分离管的外径和反应管的内径的组合为 40/50 时, 样品峰的柱效和峰面积的乘积达到最大, 以高压 Hg-Xe 弧灯(312 nm)为激发光源, 甘氨酸的 LOD 为 7.5×10^{-8} mol/L (83 amol), 鲸骨肌红蛋白的 LOD 为 2.0×10^{-8} mol/L (22.1 amol)。

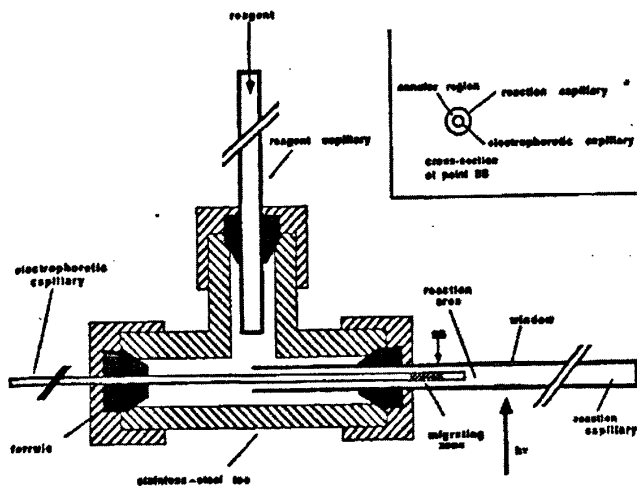


图 1.11 共轴式柱后反应器[106]

随后该研究组又改进这种柱后检测反应器[107], 用 He-Cd 激光器(325 nm)为光源, 以 He 压力替代高差压力精确控制衍生试剂流速, 并为了便于组装反应器而使用了大尺寸的毛细管, 反应距离优化为 0.5 mm。

Yeung 研究组[108]采用更小尺寸的分选毛细管($15 \mu\text{m}$ I.D. \times $150 \mu\text{m}$ O.D.)和反应毛细管($30 \mu\text{m}$ I.D. \times $360 \mu\text{m}$ O.D.)组装该反应器如图 1.12 所示, 反应距离为 5 mm, 衍生试剂 OPA/2-ME 的流速用电渗泵控制, 以 He-Cd 激光器(325 nm)为光源, 甘氨酸的 LOD 为 2.7×10^{-8} mol/L (17 amol), 并进行了人红细胞的单细胞分析。

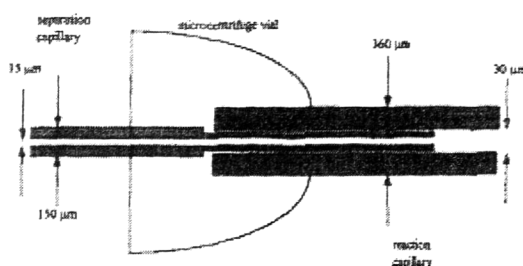


图 1.12 共轴式柱后反应器[108]

Daunert [109]利用共轴式反应器(图 1.13)研究了 streptavidin 和生物素的相互作用,以氙弧灯(495 nm)为激发光源,异硫氰荧光素(FITC)为衍生试剂,测定了海洋中的海胆卵母细胞的生物胞素含量。

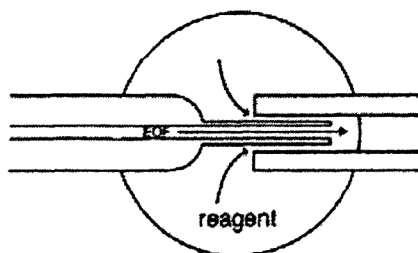


图 1.13 共轴式柱后反应器[109]

1.4.1.2 自由溶液

Rose 提出一种自由溶液柱端反应器[110],衍生试剂(OPA/2-ME)池如图 1.14 即为出口端缓冲液池,以高压 Hg-Xe 弧灯为激发光源,光纤放置于毛细管出口端收集检测荧光,该反应器区带分散较大,灵敏度低,而且试剂更换较为麻烦。

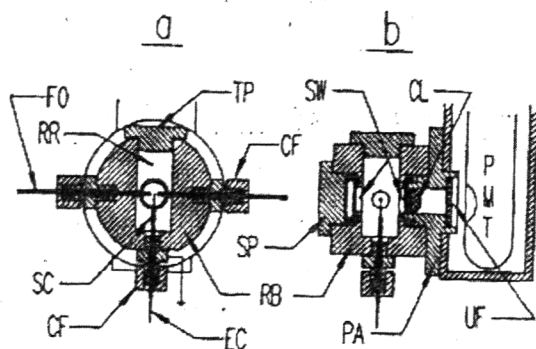


图 1.14 自由溶液柱端反应器[110]

1.4.1.3 鞘流池

Sweedler 研究组[111]首次将鞘流池应用于柱后检测,采用 Ar-Kr 离子激光器

(354 nm), 以衍生试剂(OPA/2-ME)作为鞘流液, 反应距离 0.5 cm, 甘氨酸的检出限为 9.4×10^{-8} mol/L (110 amol)。

Sepaniak 研究组[112]以 He-Ne 激光器(543.5nm), 溴乙非啉(EB)作为 DNA 衍生试剂, 反应距离 < 0.12cm, 利用鞘流池柱后检测研究了 DNA 与蛋白质的相互作用,

Timperman 研究组 [113]以 He-Cd 激光器(325 nm)为激发光源, 衍生试剂(OPA/2-ME)作为鞘流液, 反应距离 0.3 cm, 采用大数值孔径显微物镜(60×, 0.65 NA)收集荧光, 甘氨酸的检出限为 1.2×10^{-8} mol/L (28 amol), 反应器结构见图 1. 15。

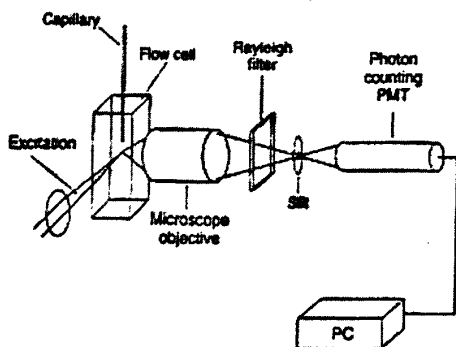


图 1. 15 鞘流池柱后反应器[113]

Dovich 研究组[114]研究了蛋白质和多肽柱后检测, 以氩离子激光器(488 nm)为光源, NDA/2-ME 为衍生试剂, 在低 pH 条件下碱性蛋白质的检出限(90~180nmol/L)要高于在高 pH 条件下酸性蛋白质的检出限(8~32nmol/L), 该反应器(图 1. 16)还用于蛋白质的在线消化和多肽谱图分析[115]。

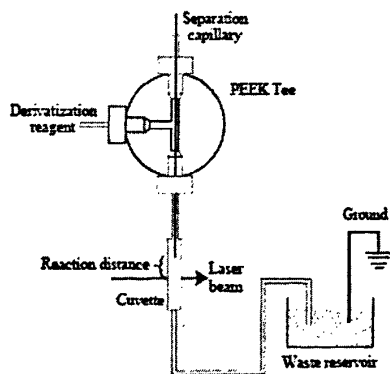


图 1. 16 鞘流池柱后反应器[114]

1. 4. 1. 3 十字式

Zare 小组[116]将一根毛细管两壁激光钻孔, 两根毛细管十字式与之连接作为

衍生试剂通道(图1.17), 抬高试剂池高差进样, He-Cd激光器(325 nm)为光源, 衍生试剂OPA/2-ME, 反应距离6-8 cm, 组胺酸的检出限为 9×10^{-7} mol/L (14 fmol)。

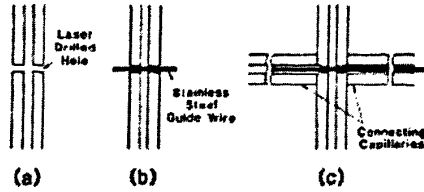


图 1.17 十字式柱后反应器[116]

1.4.1.4 间隙式

Albin等[117]用氙灯(350 nm)光源, 并用塑料螺母和聚四氟乙烯管准直于聚丙烯酸四通管作为反应器(图1.18), 两管间隙 $10 \sim 50 \mu\text{m}$, 衍生试剂OPA/2-ME根据反应管($75 \mu\text{m}$ I.D.)和分离管($50 \mu\text{m}$ I.D.)电渗流的差异引入, 反应距离8 cm, 甘氨酸LOD为60 ng/mL。

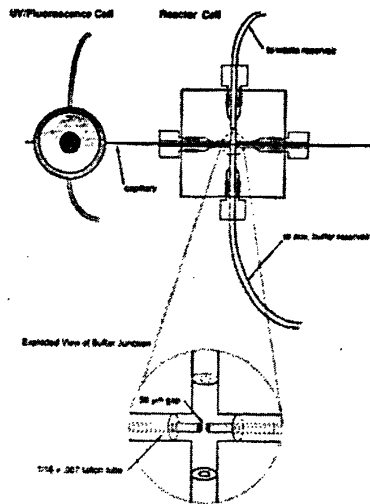


图 1.18 间隙式柱后反应器[117]

Wim Th. Kok 研究组[118]研制的反应管(图1.19)利用多孔聚四氟乙烯(PTFE)管耦合分离毛细管和反应毛细管, 衍生试剂 OPA/2-ME 加压引入反应管, 反应距离 11 cm, 以岛津 RF-530 荧光检测器氙灯(345nm)为光源, 氨基酸的检出限为 $2 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-6}$ mol/L (0.05 ~ 0.1 pmol)。

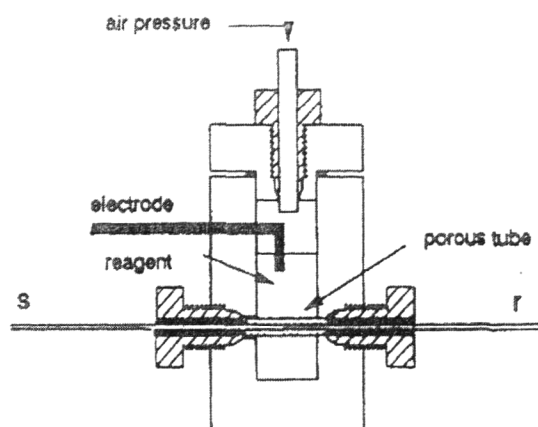


图 1.19 间隙式柱后反应器[118]

该研究组还用这种柱后反应器先后对儿茶酚胺类化合物[119]，多肽化合物[120]，痕量金属离子[121]进行了柱后检测研究。

Lee 研究组[122,123]利用间隙式反应器进行柱后亲和检测研究，该系统（图 1.20）是将分离毛细管和反应毛细管从试剂池的两端插入，用 PFTE 管准直对齐两根毛细管，缓冲液出口端试剂池真空抽吸引入试剂，氙离子激光器(488nm)为激发光源，反应距离 1.5 cm。

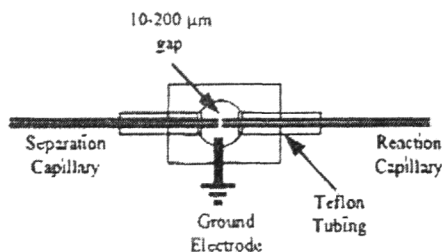


图1.20 间隙式柱后反应器[123]

Lunte[124]采用聚丙烯腈微透析半透膜连接两根毛细管(图 1.21)，He-Cd 激光器(442 nm)为激发光源，将出口端缓冲液池放低，高差引入衍生试剂 NDA/2-ME，反应距离 0.75 cm，进行了鼠脑中 P 物质及其代谢产物的微透析研究。

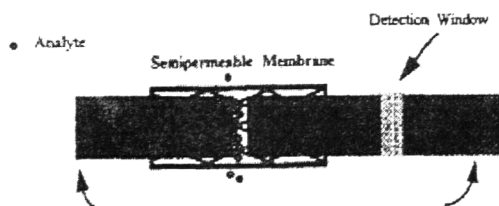


图 1.21 半透膜间隙式柱后反应器[124]

Li 研究组[125]在毛细管一端 26 cm 处除去聚酰亚胺涂层，用玻璃纤维切割器在石英管壁刻划一个刮痕，毛细管形成的间隙(< 3 μm)固定在固定器后放置到试剂池内（图 1.22），氙弧灯(340nm)为激发光源，将出口端缓冲液池放低，高

差引入衍生试剂 OPA/2-ME, 反应距离 15.5 cm, 甘氨酸的检出限为 6.7×10^{-7} mol/L (13.4 fmol)

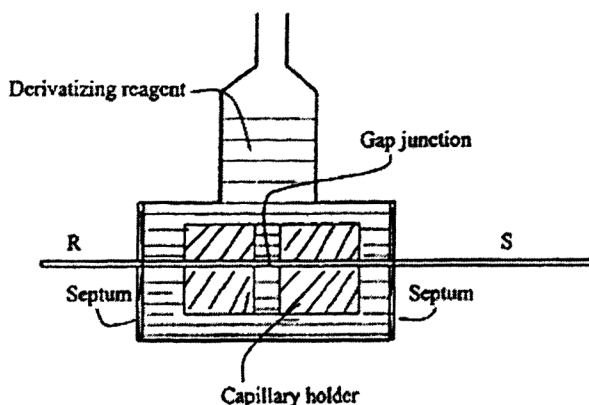


图 1.22 间隙式柱后反应器[125]

Jones 研究组[126]利用聚砜中空纤维膜准直对接两根毛细管, 间隙外面套接液相色谱保护柱(除去内芯, 钻两个小孔作为衍生试剂通道), 见图 1.23, 氦气加压引入试剂 4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚(PAR), 检测距离 5 cm, 测定了痕量金属离子。

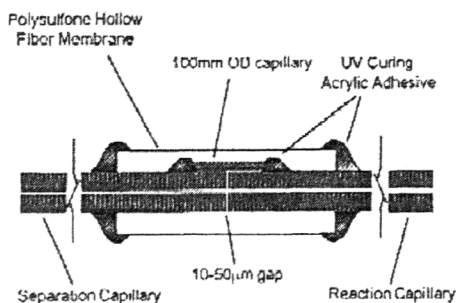


图 1.23 间隙式柱后反应器[126]

Gilman 小组[127]将毛细管固定在载玻片上, 利用激光器在毛细管壁刻蚀间隙, 封盖试剂池(图 1.24), 用聚四氟乙烯管引入试剂 NDA/2-ME, 用氩离子激光器(457.9 nm), 反应距离 1.4 cm, 甘氨酸的检出限为 6×10^{-7} mol/L。

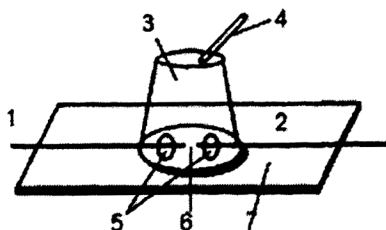


图 1.24 间隙式柱后反应器[127]

1.4.1.5 芯片

采用标准照相印刷、湿法化学刻蚀及键合技术，将分离通道、反应通道和试剂通道铸成微芯片柱后反应器，该方法可以根据不同需要设计成为较复杂的通道结构。Ramsey小组[128]制作的芯片反应器(图1.25)，通道深5.2 μm、上宽57 μm、下宽45 μm，Ar⁺激光器(351.1 nm)，用衍生试剂OPA/2-ME标记了氨基酸。

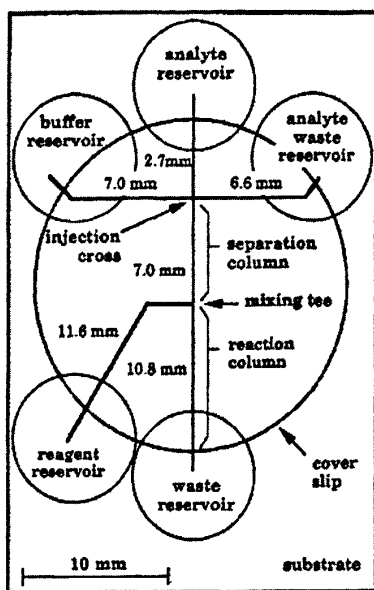


图 1.25 芯片柱后反应器[128]

该研究组又设计一种芯片反应器(图1.26) [129]，氮离子激光器(431.1 nm)，衍生试剂(NDA/NaCN)，胰岛素 B 链在线消化并分离柱后衍生检测。

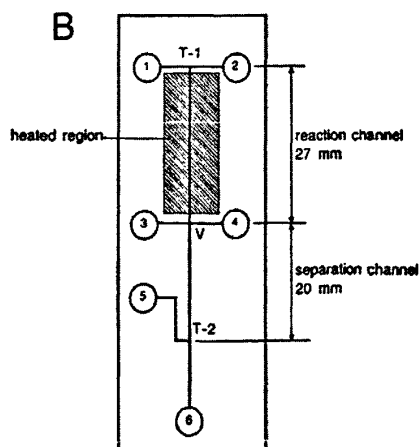


图 1.26 芯片柱后反应器[129]

Harrison小组[130]分别用Pyrex耐热玻璃和石英制作了三种微芯片柱后反应

器，采用He-Cd激光器(325 nm)为激发光源，衍生试剂为OPA/2-ME，石英材料的背景噪音低于Pyrex材料，氨基酸的检出限为2 $\mu\text{mol/L}$ (0.12fmol)，而Pyrex材料制作的一种反应器如（图1.27）柱效仅仅损失了10%。

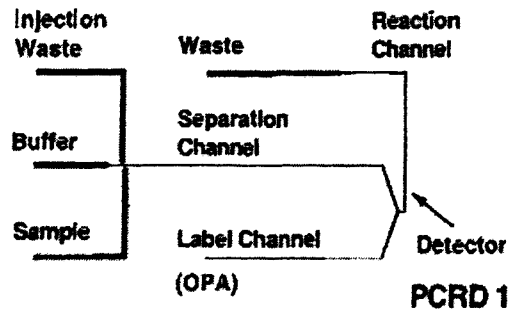


图 1.27 芯片柱后反应器[130]

Backhouse小组[131]通过定制的快速柱后标记电泳芯片（图1.28），采用激发波长635 nm，检测波长670 nm，用衍生试剂TO-PRO-3标记DNA片断，实现高分辨率和高重现性及低的检出限（每个片断约为66 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ）。

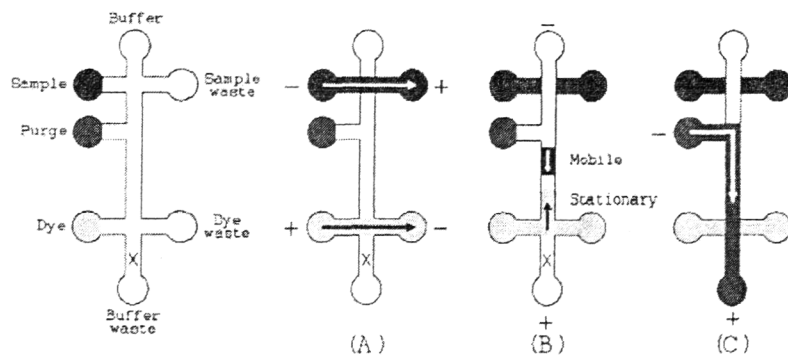


图 1.28 芯片柱后反应器[131]

1.4.5 柱后衍生试剂

荧光试剂种类繁多，可分为荧光标记试剂(fluorescent reagent)和荧光生成试剂(fluorogenic reagent)。荧光标记试剂自身具有荧光，与分析物反应后再进行荧光分析，如荧光素异硫氰酸酯(FITC)；荧光生成试剂自身没有荧光，与其它物质结合后形成荧光产物，如 OPA 和 NDA。

柱后衍生对衍生试剂的基本要求：

- 一、无内源性荧光，或者其荧光与衍生产物的荧光性质能够区别；
- 二、实验过程中，衍生试剂稳定；
- 三、反应快速，能够在数秒完成。

由于上述的限制，常见柱后衍生试剂种类主要有 OPA，NDA，荧光氨等。

1.4.5.1 OPA

是伯氨基的快速衍生试剂，水溶性好且稳定，在碱性条件下与巯基化合物（2-巯基乙醇、2-巯基乙酸和半胱氨酸等）反应，衍生产物荧光产率高($\lambda_{\text{ex}}=340\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=455\text{ nm}$)，但稳定性较差，适于用He-Cd激光器作激发光源柱后衍生检测。柱后衍生试剂OPA用于CE叙述参见柱后衍生反应器，反应方程见图1.29。

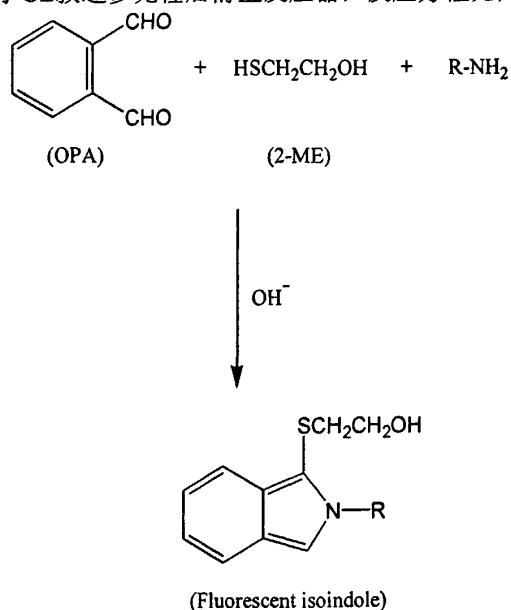


图1.29 OPA与伯氨的反应方程

1.4.5.2 NDA

是OPA的类似物，与伯氨基反应，常与2-巯基乙醇或氰化物在碱性下反应，其衍生产物稳定性高于OPA衍生产物，产物 $\lambda_{\text{ex}}=470\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$ ，2-ME与NDA反应速度快于氰化物与NDA的反应速度，最大激发波长位于可见区，适于价格便宜使用寿命长的半导体激光器作光源，但是水溶性差，试剂背景噪音相对较大。目前，NDA应用于CE柱后衍生报道较少。

1.4.5.3 荧光胺

又称荧光胺，试剂水解较快，和伯氨基反应快速，适合柱后衍生，但是水溶性不好，试剂价格高，应用受到限制。 $\lambda_{\text{ex}}=390-410\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=450-510\text{ nm}$ ，Tsuda和Kobayashi以荧光胺用三泵柱后反应系统CE-柱后检测了尿样中的多胺[132]，但柱效低，仅有2000理论塔板数；Albin等[117]用荧光胺柱后衍生检测，其灵敏度

比OPA的高了约8倍; R. Hua等[120]以荧光胺为柱后衍生试剂标记多肽。

另外, R. Zhu等[119]用TbCl₃-EDTA在pH 11的3-(环己胺)-1-丙磺酸钠(CAPS)缓冲液中柱后衍生检测了几茶酚胺, $\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{em}=545$ nm, LOD达到 10^{-7} mol/L; 磺酸-8-羟基喹啉自身没有荧光, 与金属离子螯合可激发强的荧光, 他们[121]将磺酸-8-羟基喹啉应用于柱后衍生检测痕量金属离子, LOD在ppb量级。

1.4.6 氨基糖苷类抗生素的检测

氨基糖苷类抗生素(Aminoglycoside antibiotics, AGs)在食品安全检测中, 是重要的检测项目[133,134]。由于氨基糖苷类抗生素的体内积蓄作用和严重的肾脏和听觉器官剂量相关性[135], 为确保食品安全, 需要监测司药的食用动物组织的药物残留。AGs没有UV-vis发光基团及荧光基团, 难以直接用紫外或荧光法测定, 但是AGs含有氨基糖结构, 萘二醛是伯氨基团的快速衍生试剂, 衍生产物激发波长位于可见区, 可用473 nm半导体激光器激发进行荧光法测定。

AGs的测定方法很多, 早期的法定标准方法是微生物效价测定法[136]该法测定的是AGs总量, 分析周期长。免疫分析法专属性强、灵敏度高, 报道检测AGs的方法有放射免疫分析法(RIA)[137]、酶免疫分析法(EIA)[138,139]、荧光免疫分析法(FIA)[140]、化学发光免疫分析法(CLIA)[141]等。

随着色谱技术的发展, 色谱分析方法用于AGs的检测也日益增多。Roets等用薄层色谱法(TLC)[142]分离硫酸新霉素B、硫酸新霉素C, 并以NBD-Cl荧光试剂衍生检测了硫酸新霉素B和C。Petz报道了气相色谱法(GC)-质谱(MS)法[143]分析了庆大霉素类和卡那霉素类抗生素, 采用两部法衍生: 分别用三甲硅烷基咪唑将羟基基团进行三甲硅烷基化, 庚氟丁酰基咪唑将氨基基团乙酰化。Silva小组[144,145]报道了以Cu²⁺为催化剂, AGs和鲁米诺/H₂O₂形成复合物, 用高效液相色谱(HPLC)-化学发光(CL)检测环境水样及体液中的AGs; Guo等用反相HPLC-MS测定了药物处方中妥布霉素的含量[146]; Di Corcia小组采用基质固相分散(MSPD)热水提取并以HPLC-MS分析检测牛奶中的AGs残留[147]。

毛细管电泳UV测定AGs研究相对较多, Beekers小组[148]提出通过加入FC135形成反向电渗流间接UV法测定了AGs; Flure [149,150]用硼酸钠盐和AGs形成复合物, 在195 nm波长处直接检测AGs; Holzgrabe小组[151]先用OPA-2巯基乙酸衍生AGs, 再用MEKC分离并在340 nm处检测了AGs; Chen小组[152]用戊磺酸为阴离子表面活性剂, MEKC-UV (200 nm)测定了药物处方中的AGs; Van Schepdael小组用OPA/2-巯基乙酸试剂柱前衍生UV检测分别测定了庆大霉素类[153,154]、卡那霉素类[155-157], 该研究组又用OPA/2-巯基乙酸试剂在柱衍生CE-UV检测AGs中的庆大霉素类[158]、卡那霉素类[159]; 最近他们[160]在焦磷

酸钠盐中加入CTAB形成反向电渗流,用CZE分离直接UV检测了庆大霉素类抗生素。

CE电化学检测灵敏度较高,检测AGs也有报道。Li研究组采用CE手提式通用电势梯度检测器应用于庆大霉素类[161]、新霉素类[162]的检测;Hauser小组[163]用电容耦合非接触式电导检测器(C⁴D)测定了卡那霉素类AGs;Fang小组[164]、Baldwin小组[165]、Chen小组[166]分别用镍电极、铜电极、铜微粒修饰碳纤维微圆盘阵列电极测定了AGs。

CE-LIF测定AGs报道较少,Ogun等[167]用1-甲氧基-羰基中氮茛-3,5-二甲醛柱前衍生,MEKC分离,414 nm激发,482 nm荧光检测,阿米卡星在血浆中的LOD为0.5 μg/ml;Silva小组[168]用荧光染料试剂菁色素衍生物(Cy5)硫代吲哚花青素琥珀酰亚胺酯柱前衍生MEKC分离,635 nm荧光检测,AGs的LOD甚至达到3.0 μg/L,适用于牛奶样品中的AGs残留检测。

1.5 研究内容

本文的主要研究内容及预期成果,拟采用的研究方法、技术路线、实验方案如下:

1. 组装了一台毛细管电泳激光诱导荧光检测系统。

采用共线型光学结构组装激光诱导荧光检测系统,利用核黄素作为分析样品,对影响系统检测性能的光学器件如光阑孔径、光电倍增管的工作电压条件进行了优化,并讨论了进一步提高检测灵敏度的措施。

2. 研制了一种毛细管电泳激光诱导荧光检测的共轴一间隙柱后反应器。

采用毛细管聚酰亚胺涂层套对接和准直分离管和反应管,衍生试剂从涂层套和分离管之间的环隙,以及两根毛细管之间的间隙引入反应管中,实现高效分离和快速衍生于一体。该反应器结构简单,易于制作,无需显微操作,成功地应用于香醋样品中的游离氨基酸的测定。

3. 提出毛细管电泳柱后衍生激光诱导荧光测定卡那霉素类抗生素方法。

利用共轴一间隙柱后反应器,以酸性缓冲液、反向电渗流和负高压分离卡那霉素类抗生素,再与衍生试剂于碱性缓冲液中柱后衍生检测,灵敏度高,适用于测定牛奶和动物组织中的卡那霉素类抗生素残留。

4. 提出毛细管电泳激光诱导荧光无窗检测池。

通过控制高压电场和毛细管间隙距离,显微实时观测在间隙处产生稳定的连续液流,本法可增加检测光程,减少光散射,降低背景噪音,提高了信噪比,提高了检测灵敏度。

参考文献

- [1] Guzman N A. (Eds.) 1993. Capillary Electrophoresis Technology. New York: Marcel Dekker, Inc. Chapter 19, p.605-614.
- [2] Jorgenson J W, Lukacs K D. 1981. Anal. Chem. 53:1298-1302.
- [3] Hjerten S. 1983. J. Chromatogr. 271:1-6.
- [4] Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K. 1984. Anal. Chem. 56:111-122.
- [5] Hjerten S. 1985. J. Chromatogr. 347:191-198.
- [6] Hjerten S, Eblebring K, Kilar F, et al. 1987. J. Chromatogr. 403:47-61.
- [7] Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G. 1982. J. Chromatogr. 248:241-247.
- [8] Chu Y H, Whitesides G M. 1992. J. Org. Chem. Chromatogr. 57:3524-3525.
- [9] Bjornsdottir I, Hansen S H. 1995. J. Pharm. Biomed. Anal. 13:1473-1481.
- [10] Roberts G O, Rhodes P H, Snyder R S. 1989. J. Chromatogr. 480:35-67.
- [11] Giddings J C. 1989. J. Chromatogr. 480:21-33.
- [12] Foley J P. 1990. Anal. Chem. 62:1302-1308.
- [13] Rasmussen H T, McNair H M. 1990. J. Chromatogr. 516:223-231.
- [14] Khaledi M G, Smith S C, Strasters J K. 1991. Anal. Chem. 63:1820-1830.
- [15] Grushka E, McCormick R M, Kirkland J J. 1989. Anal. Chem. 61:241-246.
- [16] Green J S, Jorgenson J W. 1989. J. Chromatogr. 478:63-70.
- [17] Guzman N A. (Eds.) 1993. Capillary Electrophoresis Technology. New York: Marcel Dekker, Inc. Chapter 20-30, p. 617-841.
- [18] 邓延倬,何金兰. 1996. 高效毛细管电泳. 北京:科学出版社, p. 272-345.
- [19] 陈义. 2000. 毛细管电泳技术及应用. 北京:化学工业出版社, p. 103-221.
- [20] 邹汉法,刘震,叶明亮,张玉奎. 2001. 毛细管电色谱及其应用. 北京:科学出版社, p.165-203.
- [21] 方肇伦. 2003. 微流控分析芯片. 北京:科学出版社, p. 312-361.
- [22] 汪尔康. 1999. 21 世纪的分析化学. 北京:科学出版社, p. 102-111.
- [23] Jorgenson J W, Lukacs K D. 1988. Science 222:266-272.
- [24] 马明生,韩慧婉,刘国诠. 1995. 色谱 13:257-261.
- [25] <http://www.beckman.com/products/pr2.asp> (2008/04/20)
- [26] <http://www.chem.agilent.com/scripts/PHome.asp> (2008/04/20)
- [27] <http://www.picometrics.com/html/somprod.htm> (2008/04/20)
- [28] 杨丙成,关亚风,黄威东,车迅. 2002. 色谱 20:332-334.
- [29] 杨丙成,谭峰,关亚风. 2004. 分析实验室 23:14-16.

- [30] 周小棉,戴忠鹏,林炳承. 2004.高等学校化学学报, 25:436-440.
- [31] Hempel G. 2000. *Electrophoresis* 21:691-698.
- [32] Petersson M, Wahlund K G, Nilsson S. 1999. *J Chromatogr. A* 841:249-261.
- [33] Viberg P, Nilsson S, Skog K. 2004. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:1729-1734.
- [34] Zhang P, Xu G, Xiong J, et al. Yang, 2003. *J. Sep. Sci.* 26:1527.
- [35] Strausbauch M A, Landers J P, Wettstein P J. 1996. *Anal. Chem.* 68:306-314.
- [36] Knudsen C B, Beattie J H. 1997. *J Chromatogr. A* 792:463-473.
- [37] Bonneil E, Waldron K C. 1999. *J. Chromatogr. B* 736:273-287.
- [38] Rohde E, Tomlinson A J, Johnson D H, Naylor S. 1998. *J.Chromatogr. B* 713:301-311.
- [39] Herring C J, Qin J. 1999. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:1-7.
- [40] Mardones C, Rios A, Valcarcel M. 2001. *Electrophoresis* 22:484-490.
- [41] Whang C W, Pawliszyn J. 1998. *Anal. Commun.* 35:353-356.
- [42] Guzman N A. 2003. *Electrophoresis* 24:3718-3727.
- [43] Schweitz L, Andersson L I, Nilsson S. 1998. *J Chromatogr. A* 817:5-13.
- [44] Chien R L, Burgi D S. 1992. *Anal. Chem.* 64:1046-1050.
- [45] Chien R L, Burgi D S. 1991. *J. Chromatogr.* 559:141-152.
- [46] Kaniansky D, Marak J. 1990. *J. Chromatogr.* 498:191-204.
- [47] Hadwiger M E, Torchia S R, Park S R, et al. 1996. *J. Chromatogr. B* 681:241-249.
- [48] Xiong Y, Park S R, Swerdlow H. 1998. *Anal. Chem.* 70:3605-3611.
- [49] Britz-McKibbin P, Wong J, Chen D D Y. 1999. *J. Chromatogr. A* 853:535-540.
- [50] Kim J B, Okamoto Y, Terabe S. 2003. *J. Chromatogr. A* 1018:251-256.
- [51] Quirino J P, Terabe S. 1998. *Science* 282:465-468.
- [52] Quirino J P, Terabe S. 1999. *Anal. Chem.* 71:1638-1644.
- [53] Shihabi Z K. 1996. *J. Chromatogr. A* 744:231-240.
- [54] Shihabi Z K, Friedberg M. 1998. *J. Chromatogr. A* 807:129-133.
- [55] Cao C X. 1998. *J. Chromatogr. A* 813:153-172.
- [56] Cao C X, Zhou S L, He Y Z, et al. 2000. *J. Chromatogr. A* 891:337-347.
- [57] Cao C X, Zhou S L, He Y Z, et al. 2001. *J. Chromatogr. A* 907:347-352.
- [58] Cao C X, Zhou S L, He Y Z, et al. 2001. *J. Chromatogr. A* 922:283-292.
- [59] Cao C X, Zhou S L, Qian Y T, et al. 2002. *J. Chromatogr. A* 952:29-38.
- [60] Cao C X, He Y Z, Li M, et al. 2002. *J. Chromatogr. A* 952:39-46.
- [61] Cao C X, He Y Z, Li M, et al. 2002. *Anal. Chem.* 74:4167-4174.
- [62] Choi K, Kim Y, Chung D S. 2004. *Anal. Chem.* 76:855-858.
- [63] Ortega C, Cerutti S, Olsina R A. 2004. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 36:721-727.

- [64] Mardones C, Rios A, Valcarcel M. 2000. *Anal. Chem.* 72:5736-5739.
- [65] Yang F J. 1981. *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 4:83-85.
- [66] Tsuda T, Sweedler J V, Zare R N. 1990. *Anal. Chem.* 62:2149-2152.
- [67] Chervet J P, Van Soest R E J, Ursem M. 1991. *J. Chromatogr.* 543:439-449.
- [68] Moring S E, Reel R T, Van Soest R E J. 1993. *Anal. Chem.* 65:3454-3459.
- [69] Bruin G J M, Stegeman G, Van Asten A C, et al. 1991. *J. Chromatogr.* 559:163-181.
- [70] Liang Z, Chiem N, Ocvirk G, et al. 1996. *Anal. Chem.* 68:1040-1046.
- [71] Hewlett-Packard Company. 1993. *Peak 2:11.*
- [72] Xue Y, Yeung E S. 1994. *Anal. Chem.* 66:3575-3580.
- [73] Djordjevic N M, Widder M, Kuhn R. 1997. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20:189-192.
- [74] Xue Y, Yeung E S. 1993. *Anal. Chem.* 65:1988-1993.
- [75] Xue Y, Yeung E S. 1993. *Anal. Chem.* 65:2923-2927.
- [76] Ewing A G, Mesaros J M, Gavin P F, *Anal. Chem.* 66 (1994) 527A-537A.
- [77] Huang X J, Fang Z L. 2000. *Anal. Chim. Acta* 414:1-14.
- [78] Jiang H L, He Y Z, Zhao Y Q, Hu Y Y, 2004. *Anal. Chim. Acta* 512:111-119.
- [79] Huang X J, Wang S L, Fang Z L. 2002. *Anal. Chim. Acta* 456:167-175.
- [80] Forbes G A, Nieman T A, Sweedler J V. 1997. *Anal. Chim. Acta* 347:289-293.
- [81] Diebold G J, Zare R N. 1977. *Science* 196:1439-1441.
- [82] Gassmann E, Kuo J E, Zare R N, 1985. *Science* 230:813-814.
- [83] 许金钩,王尊本. 2006. *荧光分析法*. 第三版.北京:科学出版社, p.18-63.
- [84] 张华山,王红,赵媛媛. 2002. *分子探针与荧光试剂*. 第一版.北京:科学出版社, p.163-203.
- [85] Lakowicz J R. 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York. Plenum Press, p. 187-214.
- [86] Yeung E S, Wang P, Li W, Giese R W. 1992. *J. Chromatogr.* 608:73-77.
- [87] Kurosu Y, Sasaki T, Saito M. 1991. *J. High Resolut. Chromatogr.* 14:186-190.
- [88] Wu S, Dorvichi N J. 1989. *J Chromatogr.* 480:141-155.
- [89] Cheng Y F, Wu S, Chen D Y, Dovichi N J. 1990. *Anal. Chem.* 62:496-503.
- [90] Chen D Y, Swerdlow H P, Harke H R, et al. 1991. *J. Chromatogr.* 559:237-246.
- [91] Miller K J, Lytle F E. 1993. *J. Chromatogr.* 648:245-250.
- [92] 马养武,陈钰清. 2002. *激光器件*. 杭州:浙江大学出版社, p.135-162.
- [93] Dorvich N J, Martin J C, Jett J H, Keller R A. 1983. *Science* 219:845-847.
- [94] Cheng Y F, Dovichi N J. 1988. *Science* 242:562-564.
- [95] Hernandez L, Escalona J, Joshi N, Guzman N. 1991 *J. Chromatogr.* 559:183-196.
- [96] Jansson M, Roeraade J, Laurell F. 1993. *Anal. Chem.* 65:2766-2769.

- [97] Hill E K, Mello de A J. 2000. *Analyst* 125:1033-1036.
- [98] Sweedler J V, Shear J B, Fishman H A, et al. 1991. *Anal. Chem.* 63:496-502.
- [99] Taylor J A, Yeung E S. 1992. *Anal. Chem.* 64:1741-1744.
- [100] Taylor J A, Yeung E S. 1993. *Anal. Chem.* 65:956-960.
- [101] Bardelmeijer H A, Waterval J, Lingeman H, et al. 1997. *Electrophoresis* 18:2214-2227.
- [102] Waterval J C M, Lingeman H, Bult A, et al. 2000. *Electrophoresis* 21:4029-4045.
- [103] Underberg W J M., Waterval J C M. 2002. *Electrophoresis* 23:3922-3933.
- [104] Craig D B, Arriaga E A, Wong J C Y, et al. 1998. *Anal. Chem.* 70:39A-43A.
- [105] Lau S K, Zaccardo F, Little M, Banks P. 1998. *J. Chromatogr. A* 809:203-210.
- [106] Rose Jr D J, Jorgenson J W. 1988. *J. Chromatogr.* 447:117-131.
- [107] Nickerson B, Jorgenson J W. 1989. *J. Chromatogr.* 480:157-168.
- [108] Zhang L, Yeung E S. 1996. *J. Chromatogr. A* 734:331-337.
- [109] Feltus A, Hentz N G, Daunert S. 2001. *J. Chromatogr. A* 918:381-392.
- [110] Rose Jr D J. 1991. *J. Chromatogr.* 540:343-353.
- [111] Oldenburg K E, Xi X, Sweedler J V. 1997. *Analyst* 122:1581-1585.
- [112] Nirode W F, Staller T D, Cole R O, Sepaniak M J. 1998. *Anal. Chem.* 70:182-186.
- [113] Coble P G, Timperman A T. 1998. *J. Chromatogr. A* 829:309-315.
- [114] Ye M, Hu S, Quigley W W C, Dovichi N J. 2004. *J. Chromatogr. A* 1022:201-206.
- [115] Ye M, Hu S, Schoenherr R M, Dovichi N J. 2004. *Electrophoresis* 25:1319-1326.
- [116] Pentoney Jr S L, Huang X, Burgi D S, Zare R N. 1988. *Anal. Chem.* 60:2625-2629.
- [117] Albin M, Weinberger R, Sapp E, Moring S. 1991. *Anal. Chem.* 63:417-422.
- [118] Zhu R, Kok W T. 1995. *J. Chromatogr. A* 716:123-133.
- [119] Zhu R, Kok W T. 1997. *Anal. Chem.* 69:4010-4016.
- [120] Zhu R, Kok W T. 1998. *J. Chromatogr. A* 814:213-221.
- [121] Zhu R, Kok W T. 1998. *Anal. Chim. Acta* 371:269-277.
- [122] Abler J K, Reddy K R, Lee C S. 1997. *J. Chromatogr. A* 759:139-147.
- [123] Kelly J A, Reddy K R, Lee C S. 1997. *Anal. Chem.* 69:5152-5158.
- [124] Kostel K L, Lunte S M. 1997. *J. Chromatogr. B* 695:27-38.
- [125] Wei H, Li S F Y. 1998. *Anal. Chem.* 70:5097-5102.
- [126] Hardy S, Jones P, Riviello J M, Avdalovic N. 1999. *J. Chromatogr. A* 834:309-320.
- [127] Rezenom Y H, Lancaster III J M, Pittman J L, et al. 2002. *Anal. Chem.* 74:1572-1577.
- [128] Jacobson S C, Koutny L B, Hergenroder R, et al. 1994. *Anal. Chem.* 66:3472-3476.
- [129] Gottschlich N, Culbertson C T, McKnight T E, et al. 2000. *J. Chromatogr. B.* 745:243-249.
- [130] Fluri K, Fitzpatrick G, Chiem N, Harrison D J. 1996. *Anal. Chem.* 68:4285-4290.

- [131] Sieben V J, Backhouse C J. 2005. *Electrophoresis* 26:4729-4742.
- [132] Tsuda T, Kobayashi Y. 1988. *J. Chromatogr.* 456:375-381.
- [133] Stead D A. 2000. *J. Chromatogr. B* 747:69-93.
- [134] Hernandez M, Borrull F, Calull N, 2003. *Trends Anal. Chem.* 22:416-427.
- [135] Hardman J G, Limbird L E (Eds.). 2001. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th Ed. New York: McGraw-Hill, p. 1219.
- [136] 中国药典二部. 1900.北京:化学工业出版社, 附录 p. 113.
- [137] Lin C C, Veals J, Korduba C, Hilbert M J, Nomeir A. 1997. *Therap. Drug Monit.* 19:675.
- [138] Haasnoot W, Stouten P, Cazemier H, et al. 1999. *Analyst* 124:301-305.
- [139] White L O. 1998. *Therap. Drug Monit.* 20:464-468.
- [140] Touw D J, de Graaf A I, de Goede P. 1996. *Therap. Drug Monit.* 18:189-193.
- [141] Wild D, Davies C, Wild D. (Eds.). 1994. *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press, New York, p. 49.
- [142] Roets E, Adams E, Muriithi I G, et al. 1995. *J. Chromatogr. A* 696:131-138.
- [143] Preu M, Guyot D, Petz M, 1998. *J. Chromatogr. A* 818:95-108.
- [144] Serrano J M, Silva M. 2006. *J. Chromatogr. A* 1117:176-183.
- [145] Serrano J M, Silva M. 2006 *J. Chromatogr. B* 843:20-24.
- [146] Guo M X, Wrisley L, Maygoo E. 2006. *Anal. Chim. Acta* 571:12-16.
- [147] Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, et al. 2005 *J. Chromatogr. A* 1067:93-100.
- [148] Ackermans M T, Everaerts F M, Beekers J L. 1992. *J. Chromatogr.* 606:229-235.
- [149] Flure C L., Wolnik K A. 1994. *J. Chromatogr. A* 663:259-263.
- [150] Flurer C L. 1995. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13:809-816.
- [151] Wienen F, Holzgrabe U. 2003. *Electrophoresis* 24:2948-2957.
- [152] Yeh H H, Lin S J, Ko J Y, et al. 2005. *Electrophoresis* 26:947-953.
- [153] Kaale E, Leonard S, Van Schepdael A, et al. 2000. *J. Chromatogr. A* 895:67-79.
- [154] Kaale E, Long Y, Fonge H A, et al. 2005. *Electrophoresis* 26:640-647.
- [155] Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, et al. 2001. *J. Chromatogr. A* 924:451-458.
- [156] Long Y H, Hernandez M, Kaale E, et al. 2003, *J. Chromatogr. B* 784:255-264.
- [157] Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, et al. 2002. *Electrophoresis* 23:1695-1701.
- [158] Kaale E, Van Goidsenhoven E, Van Schepdael A, et al. 2001. *Electrophoresis* 22:2746-2754.
- [159] Kaale E, Van Schepdael A, Roets E. et al. 2003. *Electrophoresis* 24:1119-1125.
- [160] Curiel H, Vanderaerden W, Velez H, et al. 2007. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44:49-56.
- [161] Yuan L L, Wei H P, Li S F Y. 2005. *Electrophoresis* 26:196-201.

- [162] Yuan L L, Wei H P, Feng H T, et al. 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:1575-1579.
- [163] Law W S, Kuban P, Yuan L L, et al. 2006. *Electrophoresis* 27:1932-1938.
- [164] Fang X M, Ye J N, Fang Y Z. 1996. *Anal. Chim. Acta* 329:49-55.
- [165] Voegel P D, Baldwin R P. 1997. *Electroanalysis* 9:1145-1151.
- [166] Yang W C, Yu A M, Chen H Y. 2001. *J. Chromatogr. A* 905:309-318.
- [167] Oguri S, Miki Y. 1996. *J. Chromatogr. B* 686:205-210.
- [168] Serrano J M, Silva M. 2006. *Electrophoresis* 27:4703-4710.

第二章 毛细管电泳激光诱导荧光检测系统组装与性能测试

2.1 引言

激光诱导荧光(Laser-induced fluorescence, LIF)检测是毛细管电泳最灵敏的检测技术之一[1,2]。半导体泵浦固体激光器 (Diode-pumped solid-state laser, DPSSL)是一种新兴的激光光源,相比气体激光器具有输出功率稳定性高、使用寿命长、价格低廉、体积小、维护方便的优点[3]。多数荧光探针激发波长在短波长可见区和近紫外区,只有少数荧光探针激发波长处于长波段区域且多是疏水性大分子物质[4,5]。发射波长为473 nm的DPSSL具有很多优点[6],在该波长附近,有很多高效的荧光探针;另外由于很多荧光探针的激发光谱谱带较宽(>40 nm),473 nm-LD可以替代LIF检测系统Ar⁺激光器(488 nm),降低了仪器的尺寸及成本,在实验室常规分析中具有重要的现实意义。

毛细管电泳激光诱导荧光检测系统按照光学结构划分, LIF检测器主要可分为正交型、共线型和轴向入射型。正交型[7-11]结构中两套光学系统激发光路和发射光路相互垂直或呈一定角度,优点在于激发光对发射光路干扰小,但结构较为复杂,而且由于空间位阻因素,难以使用数值孔径(Numerical Aperture, NA)大的物镜,影响荧光收集效率的提高。轴向入射型[12-14]的激光束向毛细管出口端轴向发射,消除了激光在检测池壁产生的光散射,延长了激光的吸收光程,但对光不稳定样品检测不利。共线型[15-19]结构激发光路和发射光路成一直线,激光聚焦光斑和光阑分别位于透镜的两个共扼焦点上,优点是它仅需一套光学系统,结构简单,而且能够使用高数值孔径的物镜,荧光收集效率较高。

本文采用共线型光学结构组装了CE-LIF检测系统,利用核黄素样品评价了该系统的性能,并用于尿样测定。

2.2 实验部分

2.2.1 仪器设备与系统装置

1229型毛细管电泳仪(北京新技术应用研究所)高压电源;激光诱导荧光检测系统为自制的共线光学结构见图2.1,采用MBL-10二极管泵浦固体激光器

(DPSSL, 10mW, 长春新产业光电技术有限公司) 发射473 nm激光, 500 nm截止二色镜(安徽光机所) 反射激光, 经过25×物镜(重庆光电仪器有限公司) 聚焦, 80 cm × 50 μm I.D.石英毛细管(河北永年锐沅色谱器件有限公司) 固定在三维调节平台(北京卓立汉光仪器有限公司) 上; 荧光经物镜收集后透过二色镜, 用510 nm高通滤光片(安徽光机所) 过滤, 由10 mm焦距石英双凸透镜(北京欧普特科学有限公司) 聚焦, 再通过孔径为1.5 mm的可调光阑(北京卓立汉光仪器有限公司), 光电倍增管(PMT, R456, Hamamatsu, 日本) 在-450V电压下工作, 信号由GD-1型微光测量仪(西安瑞科电子设备有限公司) 和N-2000双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所) 转化采集。

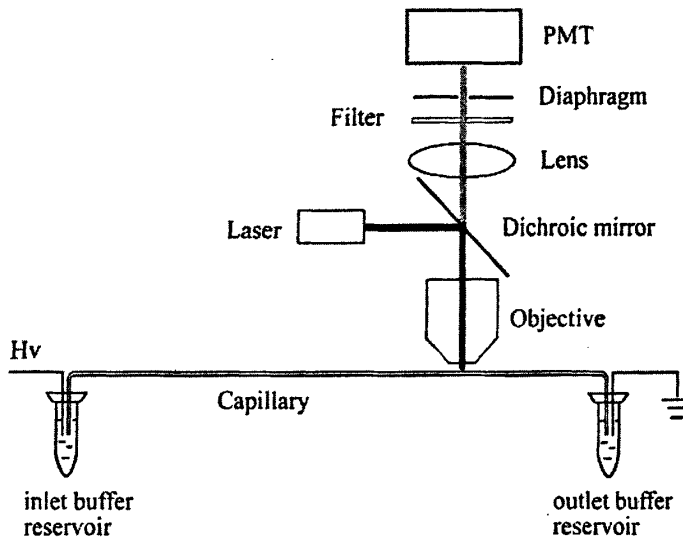


图2.1 毛细管电泳激光诱导荧光检测系统

2.2.2 试剂

核黄素(又名维生素 B₂, V_{B2})、硼酸等试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司, 试剂均为分析纯, 所有溶液均用三重蒸馏水(上海沪西分析仪器厂) 配制。工作缓冲液为 50 mmol/L 硼酸溶液, 用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节其 pH 为 8.5。核黄素制成 1×10^{-4} mol/L 贮备液于棕色容量瓶中 4℃ 避光保存, 不同浓度的标准液用水稀释而成。缓冲液使用前用 S-2200 超声清洗仪(120 W, 35 kHz, 上海杰理科技有限公司) 超声脱气 10 min。

核黄素具有天然荧光，最大荧光激发波长在 450 nm 附近，最大荧光发射波长在 530 nm 附近[20]，可以作为分析中的模型化合物，其化学结构见图 2.2。

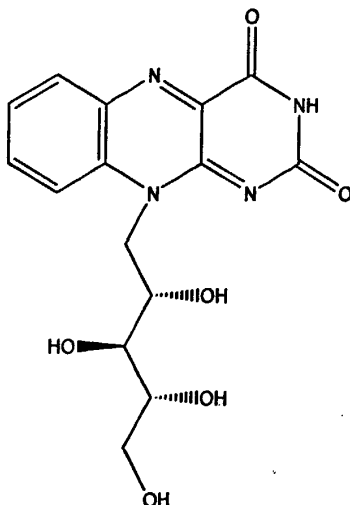


图2.2 核黄素的化学结构

2.2.3 电泳过程

毛细管每天使用前依次用 0.1 mol/L 盐酸、水、0.1 mol/L 氢氧化钠和水清洗，最后用缓冲液平衡 10 min。两次电泳间歇用缓冲液冲洗 2 min，缓冲液使用 10 次即更换。阳极端缓冲液液面与阴极端缓冲液液面水平，样品溶液液面高于衍生试剂液面 10 cm，高差进样 10 s，电泳电压 18 kV。

2.2.4 样品测定

V_{B2} 片样品 (5 mg/片) 购自医药超市，取 V_{B2} 样品 10 片，称取平均片重，精密称定研磨细粉适量 (约相当于 0.3 片样品)，置于 100 ml 棕色量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀后过滤，滤液稀释 100 倍直接进样测定。

尿样样品：健康志愿者在服用 1 片 V_{B2} 样品后，在 3 小时之前每隔 20min 采集尿样，3~5 小时每隔 30 min 采集尿样，5 小时后间隔 1 h 采集尿样，尿样用水稀释 50 倍，直接进样测定。

2.3 结果与讨论:

2.3.1 光阑孔径对信噪比的影响

光阑主要滤除非特异性的杂散光的大小,同时尽可能通过荧光。在实际过程中检测到的荧光以荧光强度最大值相应的半高宽(The full-width at half-maximum, FWHM)为高、光阑半径除以物镜放大倍率为半径的圆柱体[21]。光阑孔径大小可通过考察检测器的信噪比进行优化。

分别将光阑孔径调节为 1.0, 1.5, 2.0 mm, 以 5×10^{-7} mol/L 核黄素为样品, 信噪比(S/N)随孔径变化见表 2.1。孔径从 1.0 mm 调到 1.5 mm, 噪音几乎不变, 信号增强, 信噪比增加, 说明部分荧光被光阑屏蔽; 再增加孔径到 2.0 mm, 信号和噪音均增加, 而信噪比却下降, 表明光阑孔径过大, 杂散光增多。因此, 选择 1.5 mm 光阑孔径。

表 2.1 光阑孔径对信噪比的影响

孔径(mm)	信号(mV)	噪音(mV)	信噪比(S/N)
1.0	47.6	0.5	190
1.5	54.4	0.5	218
2.0	73.2	0.8	183

2.3.2 PMT 电压的影响

PMT的工作电压是检测系统的重要参数。以 5.0×10^{-7} mol/L核黄素为样品, 考察了PMT的工作电压对信噪比的影响, 结果见图2.3。结果表明, 在工作电压低时信噪比低, 随着电压的增加, 信噪比增加较快, 在达到440 V以后信噪比变化不大。实验选择450 V作为检测系统的工作电压。

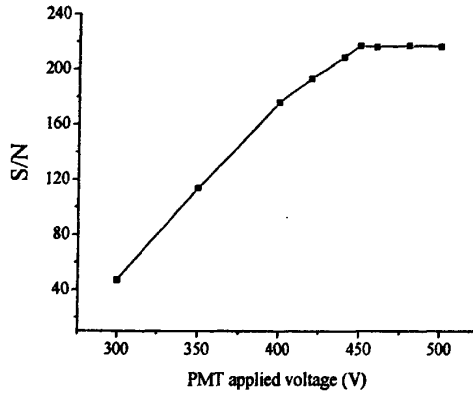


图2.3 PMT工作电压对信噪比的影响

2.3.3 物镜数值孔径的影响

数值孔径又叫镜口率，是物体与物镜之间介质的折射率(n)与物镜孔径角(a)一半的正弦值的乘积：

$$NA = n \cdot \sin(a/2) \quad (2.1)$$

10×物镜和25×物镜对应的NA分别为0.25和0.40，选择10×物镜和25×物镜考察不同NA对荧光信号的影响，以 1.0×10^{-6} mol/L核黄素为样品，结果见图2.4。从图中看出，25×物镜的荧光强度约为10×物镜的2倍，说明使用高NA的物镜可以提高灵敏度。

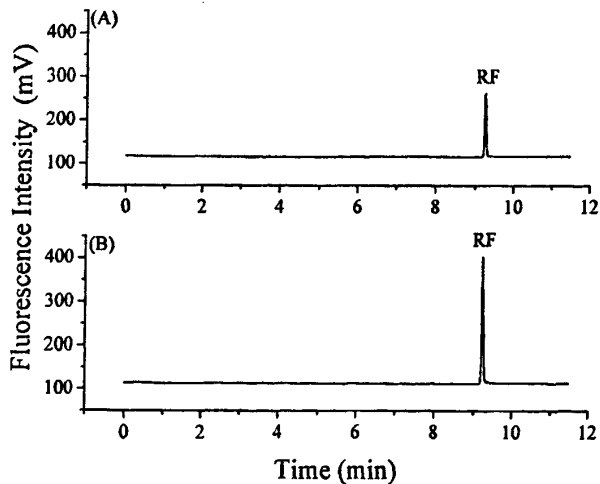


图2.4 核黄素在不同NA的物镜下的电泳谱图：(A) 10×物镜 (B) 25×物镜

2.3.4 其它光学器件的性能

激光器的部分出厂性能指标, 10 mW, 功率稳定性 $<3\%$, 连续工作方式, 出口光斑直径2 mm, 光斑模式为基模(TEM_{00}), 光束发散角 <1.2 mrad (毫弧度)。

图2.5为二色镜出厂的扫描谱图(45°角测试), 473.55 nm波长透过率0.227%, 535.01 nm的透过率为59.8%, 在 >550 nm波长处的透过率超过85%。

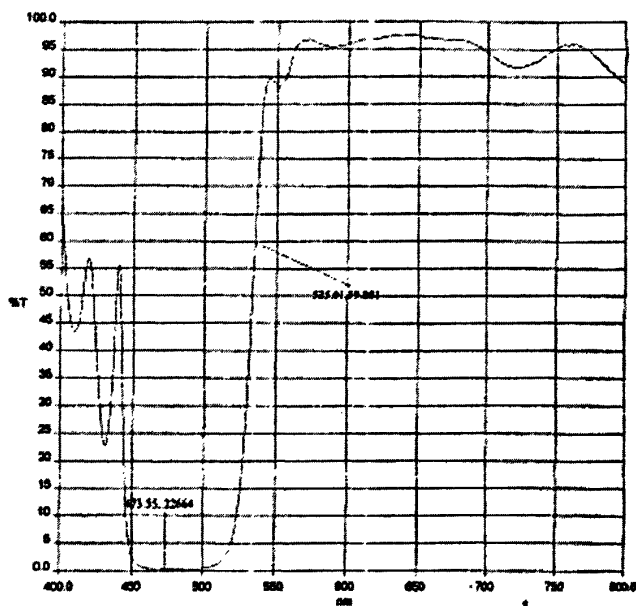


图2.5 二色镜扫描谱图

截止滤光片的出厂扫描谱图见图2.6, 在473.0 nm透过率为0.10%, 在500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm的透过率分别为36.5%、65.5%、76.1%、81.0%、83.5%, >550 nm波长处的透过率均高于超过85%。由于水的拉曼散射谱带为270.2 ~322.5 nm和606 nm[22], 如果用带通滤光片代替截止滤光片, 将能够有效的滤除606 nm的拉曼散射光, 增加信噪比, 检测灵敏度提高。

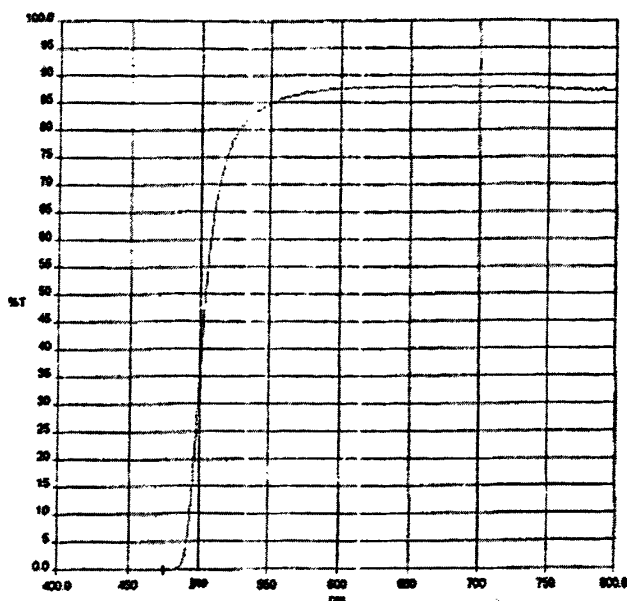


图2.6 滤光片扫描谱图

2.3.5 系统的性能评价

以核黄素系列标准溶液为样品,用 50 mmol/L 硼酸盐溶液(pH 8.5)为缓冲液,采用 CZE 分离检测。表 2.2 为系统以核黄素为分析对象的性能,核黄素的浓度检出限为 9.0×10^{-9} mol/L,即 3.4×10^{-6} g/L,质量检出限 18 amol,在 $3.0 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内成良好的线性关系($r=0.999$),而文献[20]报道的核黄素的浓度检出限和质量检出限分别为 5.0×10^{-7} g/L 和 50 amol,线性范围为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 3.5 \times 10^{-4}$ g/L。用 5.0×10^{-7} mol/L 核黄素为样品,在同一天测定连续五次(日内差),峰面积的 RSD 为 2.4%,连续五天每天测定 3 次(日间差),RSD 为 3.1%,分离效率达到 2.1×10^5 理论塔板数。

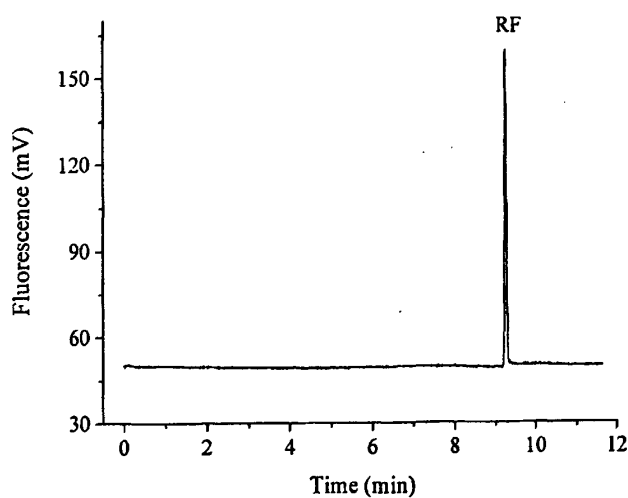
表 2.2 核黄素的线性范围、检出限和分离效率

线性范围 (mol/L)	回归方程 ^(a)	检出限		相对标准偏差		分离效率 (理论塔板数)
		(LOD)		RSD% (n=5)		
		CLOD ($\times 10^{-9}$ mol/L)	MLOD (amol)	日内差	日间差	
3.0×10^{-8} $\sim 1.0 \times 10^{-5}$	$Y=5.92 \times 10^8 X + 11$	9.0	18	2.4	3.1	2.1×10^5

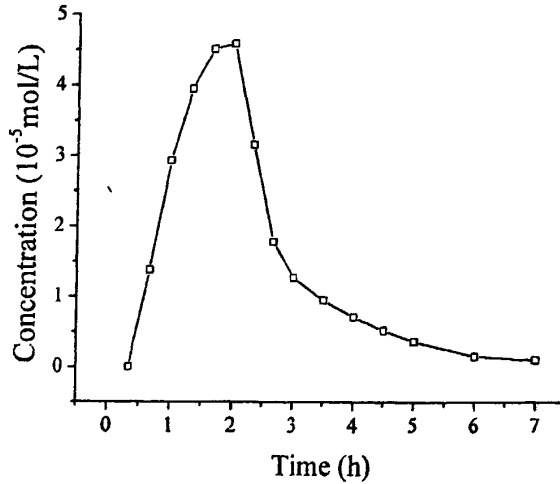
注: (a) Y, 峰面积 ($mV \cdot s$); X, 样品浓度 (mol/L)。

2.3.6 实际样品的分析

核黄素又名 V_{B2} ，是辅酶的组成成份，参与糖、蛋白质、脂肪的代谢，是一种重要的维生素类药物，在人体主要通过肾脏在尿液中以原形排泄。采用自制的 CE-LIF 检测系统用于 V_{B2} 片的测定如图 2.7，按标示量的 80%、100%、120% 浓度加样，回收率分别为 99.6%、101.2%、100.7% (RSD=2.7%, n=3)，测定了两个厂家三个批号 V_{B2} 片的含量，结果分别为标示量的 102.1%、99.4%、101.6%。

图2.7 V_{B2} 片的电泳谱图

采用本系统对服用 V_{B2} 的健康志愿者进行了尿样药物浓度监测，在 2 h 达到尿药浓度峰值 (4.59×10^{-5} mol/L)，药时曲线见图 2.8。

图2.8 V_{B2} 片的尿样药时曲线

2.4 本章小结

本文采用共线型光学结构，以473nm LD-DPSSL为激发光源，组装了一台CE-LIF检测器。以核黄素为样品考察了该系统性能，核黄素的LOD为 9.0×10^{-9} mol/L，质量检出限为18 amol，在 $3.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L浓度范围内呈线性相关，利用该系统测定了 V_{B2} 片的含量，并监测了 V_{B2} 片的尿样药物浓度-时间曲线，均取得了较好的结果。本系统的性能还可通过以下途径改善：(1)提高二色镜的截止效率；(2)使用带通滤光片消除水的拉曼散射；(3)使用更大数值孔径物镜收集荧光。

参考文献

- [1] Guzman N A. (Eds.) 1993. Capillary Electrophoresis Technology. New York: Marcel Dekker, Inc. Chapter 19, p.605-614.
- [2] 汪尔康. 1999. 21世纪的分析化学. 北京:科学出版社, p.102-111.
- [3] 马养武,陈钰清. 2002.激光器件. 杭州:浙江大学出版社, p.135-162.
- [4] 张华山,王红,赵媛媛. 2002.分子探针与检测试剂. 北京:科学出版社, p.349-429.
- [5] 许金钩,王尊本. 2006.荧光分析法. 北京:科学出版社, p.18-48.

- [6] 杨丙成,谭峰,关亚凤. 2004.分析试验室 23: 14-16.
- [7] Dorvich N J, Martin J C, Jett J H,Keller R.A. 1983. Science 219:845-847.
- [8] Gassmann E, Kuo J E, Zare R N, 1985. Science 230:813-814.
- [9] Cheng Y F, Dovichi N J. 1988. Science 242:562-564.
- [10] Wu S, Dorvichi N J. 1989. J Chromatogr. 480:141-155.
- [11] Yeung E S, Wang P, Li W., Giese R W. 1992. J Chromatogr. 608:73-77.
- [12] Sweedler J V, Shear J B, Fishman H A, et al. 1991. Anal. Chem. 63:496-502.
- [13] Taylor J A, Yeung E S. 1992. Anal. Chem. 64:1741-1744.
- [14] Taylor J A, Yeung E S. 1993. Anal. Chem. 65:956-960.
- [15] Hernandez L, Escalona J, Joshi N, Guzman N. 1991. J Chromatogr. 559:183-196.
- [16] Jansson M, Roeraade J, Laurell F. 1993. Anal. Chem. 65:2766-2769.
- [17] Hill E K, de Mello A J. 2000. Analyst 125:1033-1036.
- [18] 杨丙成,关亚凤,黄威东,车迅. 2002.色谱 20:332-334.
- [19] 周小棉,戴忠鹏,林炳承. 2004.高等学校化学学报 25:436-440.
- [20] Cataldi T R I, Nardiello D, Benedetto De G E, et al. 2002. J. Chromatogr. A 968:229-239.
- [21] Wilson T. 1989. J. Microscopy 154:143-156.
- [22] 张晓彤,云自厚. 2000.液相色谱检测方法.北京:化学工业出版社, p.91-92.

第三章 毛细管电泳激光诱导荧光检测共轴-间隙式柱后反应器的研究

3.1 引言

毛细管电泳是一种分离效率高、速度快、样品试剂用量少等的分离技术,由于毛细管光程短和小的样品体积,紫外-可见检测灵敏度往往不能令人满意,因此,灵敏的检测方法或预富集技术常常应用到毛细管电泳分析中[1]。激光诱导荧光是最灵敏的检测方法之一,然而只有少数分析物具有天然荧光[2],并且紫外光区激发的激光器由于其高价格和短寿命在使用上受到限制。因此在荧光检测时,柱前或柱后化学衍生,经常采用可见光区激发的激光器。

柱前衍生激光诱导荧光检测方法已应用于多种样品的分析[3,4],然而,由于需要额外的操作步骤,而且要求反应产物具有一定的稳定性,柱后衍生激光诱导荧光检测在很多情况下是另一种选择,特别适合于高速在线衍生检测。由于毛细管的体积微小,制作柱后反应器并不是一件容易的事情,而且样品和反应试剂的有效混合,以及减小区带展宽都是应该考虑的因素。Zhu 和 Kok 综述了毛细管电泳柱后反应器的发展[5],自从 Rose 和 Jorgenson [6]首先报道毛细管电泳共轴式柱后衍生检测以来,多种模式的柱后反应器相继报道,包括共轴式(分离管插入反应管中)[7-10]、鞘流式(分离毛细管置于鞘流池中间)[11-14]、自由溶液(一种柱端反应器)[15]、十字式(在毛细管壁钻孔引入衍生试剂)[16]、间隙式(分离管和反应管准直对齐形成微小的间隙)[17-24]以及微芯片(分离通道、反应通道和试剂通道同时在芯片上铸成整体结构)[25-28]。

鞘流反应器特制的矩形鞘流池能够减少光的散射及区带展宽,因而具有较低的检出限和高的分离效率[29,30]。设计共轴反应器时,反应毛细管和分离毛细管的内径需要匹配使区带展宽最小化。因而分离毛细管的管壁用氢氟酸刻蚀后通常很薄,刻蚀的端部容易折断,组装共轴反应器时分离管插入反应管需要非常小心。制作间隙反应器时,准直分离毛细管和反应毛细管显得非常重要而且困难,轻微的错位将会导致部分样品区带从两管之间的微小间隙扩散出去[31]。为了减少样品的损失和区带展宽,精密准直两根毛细管是研究人员设计该反应器挑战性的任务。由于引入衍生试剂的间隙需要置于试剂池或T形接口内,采用短的反应距离比较困难,另一方面衍生速度以及产物的稳定性在柱后检测方法中均需要考

虑。

本文描述了一种用于毛细管电泳激光诱导荧光检测的共轴-间隙式柱后反应器。这种反应器采用毛细管聚酰亚胺涂层套对接和准直分离管和反应管，在组装时甚至可以不用显微操作平台，衍生试剂从涂层套和分离管之间的环隙，以及两根毛细管之间的间隙引入反应管中。本文采用萘二甲醛和 2-巯基乙醇衍生氨基酸评价了共轴-间隙式柱后反应器的效能。

3.2 实验部分

3.2.1 仪器

1229 型毛细管电泳仪（北京新技术应用研究所）；石英毛细管（河北永年锐沅色谱器件有限公司），分离管(58 cm × 50 μm I.D. × 365 μm O.D.)和反应管(17 cm × 75 μm I.D. × 365 μm O.D.)，外径 365 μm，聚酰亚胺涂层厚度 12.5 μm。

毛细管电泳激光诱导荧光检测系统自制，采用共线光学结构。MBL-10 蓝光二极管泵浦固体激光器（DPSSL, 473 nm, 10 mW, 长春新产业光电技术有限公司）；500 nm 截止二色镜（安徽光机所）；25×物镜（重庆光电仪器有限公司）；三维调节平台（北京卓立汉光仪器有限公司）；510 nm 高通滤光片（安徽光机所）；10 mm 焦距石英双凸透镜（北京欧普特科学有限公司）；可调光阑光孔直径 1.5 mm（北京卓立汉光仪器有限公司）；光电倍增管（PMT, R456, Hamamatsu, 日本），工作电压 -450 V；GD-1 型微光测量仪（西安瑞科电子设备有限公司）；N-2000 双通道色谱工作站（浙江大学智能信息工程研究所）。

3.2.2 试剂

萘二甲醛（naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde, NDA）购自 Fluka 公司（瑞士 Buchs），其它所有试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司，2-巯基乙醇(2-ME)为化学纯，其它均为分析纯。用三重蒸馏水（上海沪西分析仪器厂）配制溶液。工作缓冲液为 50 mmol/L 硼酸溶液，用 1 mol/L 的氢氧化钠调节其 pH 值为 9.5。1.0 mmol/L 氨基酸贮备液于 4 °C 保存，混合标准液用水稀释而成。10 mmol/L NDA 甲醇溶液置于暗处 4 °C 保存，每周新鲜配制。衍生试剂由 2 mmol/L NDA、8 mmol/L 2-ME、30% 甲醇、70% 50 mmol/L 硼酸钠盐缓冲液（pH 9.5）组成，试剂按照上述顺序依次加入配制，衍生试剂每天更新。缓冲液和衍生试剂使用前超声脱气 10 min。

3.2.3 衍生反应机理及衍生产物荧光光谱图

含有伯氨基的化合物在碱性介质中，在 2-ME 存在下与 NDA 生成具有强荧光的苯吲哚类化合物，其衍生反应式见图 3.1。由于 NDA 自身无荧光，而衍生产物荧光强度高但是稳定性较差，所以适于柱后衍生。

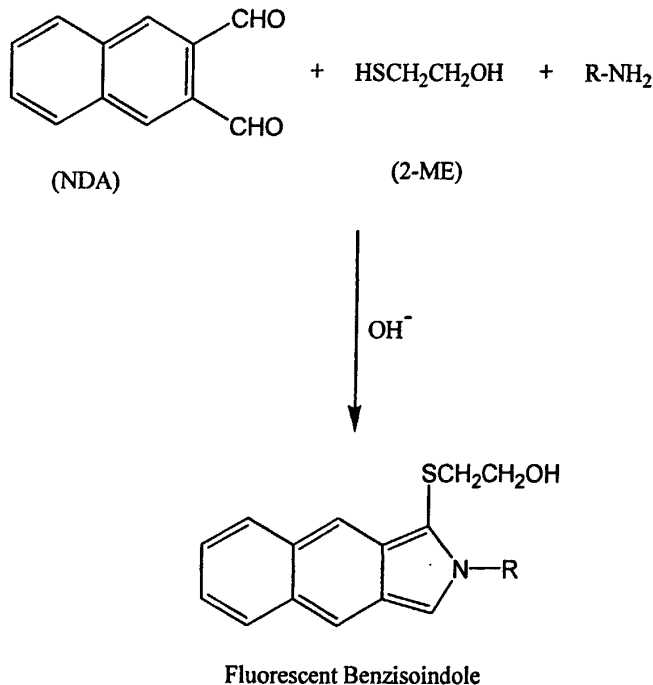


图 3.1 NDA 与伯氨的衍生反应方程

采用 LS55 发光仪扫描衍生产物的荧光激发和发射光谱。衍生试剂由 2 mmol/L NDA、8 mmol/L 2-ME、30%甲醇、70% 50 mmol/L 硼酸 (pH 9.5) 组成，每种氨基酸的浓度均为 1.0×10^{-3} mol/L。在 3.5-mL 荧光池中先加入 2.0 mL 衍生溶液，再快速加入 0.1 mL 的 1.0×10^{-3} mol/L 的氨基酸溶液，快速混合，以 5 nm 带宽快速扫描衍生产物的荧光激发和发射光谱。固定 473 nm 记录荧光发射光谱，固定 545 nm 记录荧光激发光谱，激发和发射荧光光谱如图 3.2。从图中可知采用 473 nm 激光器的 CE 检测系统可以应用于氨基酸的柱后分离检测。

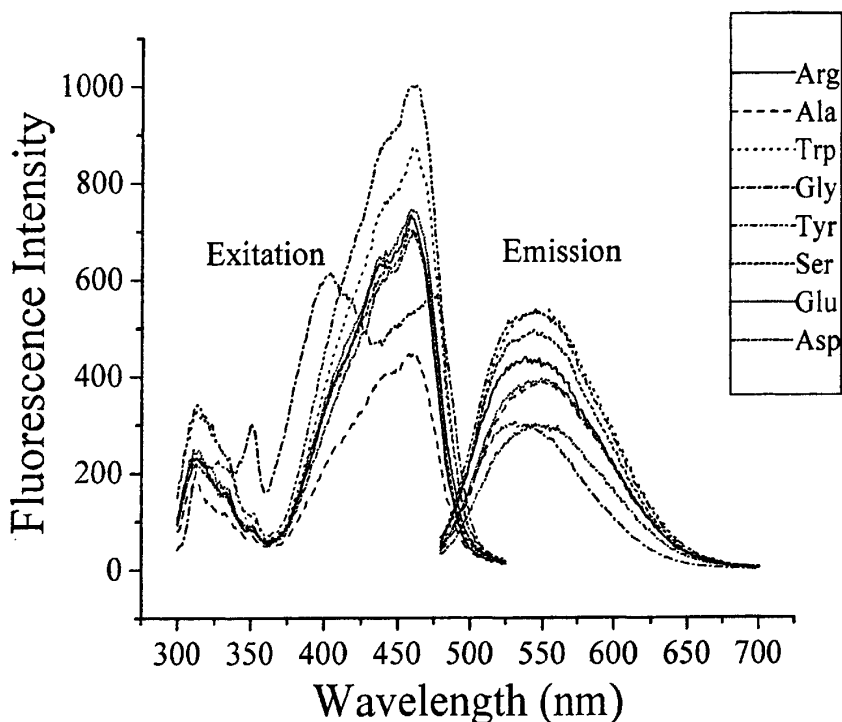


图 3.2 氨基酸衍生产物的荧光发射和激发谱图

3.2.4 柱后反应器的制作

聚酰亚胺涂层套的制作：将 1 cm 长石英毛细管浸入密闭的 49% 氢氟酸溶液中，于通风橱室温放置 24 小时，取出，用 1 mol/L 氢氧化钠中和氢氟酸，水漂洗吹干保存，即得 12.5 μm 厚的聚酰亚胺涂层套。操作过程中戴上乳胶手套防止氢氟酸接触到皮肤。

柱后反应系统装置如图 3.3。分离毛细管和反应毛细管的一端分别除去 10 mm 和 2 mm 涂层，在显微镜下观察确定断面切割较为垂直光滑，将分离管无涂层部分浸入 49% 氢氟酸中，通入氮气防止内壁被腐蚀，刻蚀 15 min，洗净吹干，分离管外径从 340 μm 刻蚀到 310 μm 。先在反应管距离接口端 5 mm 处除去 2 mm 涂层作为检测窗口，将反应管石英段插入聚酰亚胺套，用环氧树脂胶密封固定，再把分离管插入聚酰亚胺套中，在显微镜下仔细调节两管间隙距离为 20 μm ，用胶平行固定两根毛细管于一根 40 mm \times 1.5 mm O.D. 玻璃棒，以便聚酰亚胺套不易折断并保持平直。分离管和聚酰亚胺套之间形成的环隙即为试剂通道，分离管露出约 2 mm 石英管，为衍生试剂入口。2 ml 聚四氟乙烯试剂瓶两侧钻孔，反应

器连同玻璃棒穿过试剂瓶使试剂入口处于试剂池中间位置,用环氧树脂密封瓶壁两侧。保持试剂液面和进样端缓冲液液面高度一致,衍生试剂的流量通过改变出口端缓冲液池的高度来控制。可自由拆卸的试剂瓶盖外接氮气减压阀(上海第二阀门厂)及气压表,该装置主要用于实验后清洗反应器,而且在缓冲液平衡毛细管时加压可防止衍生试剂的稀释。

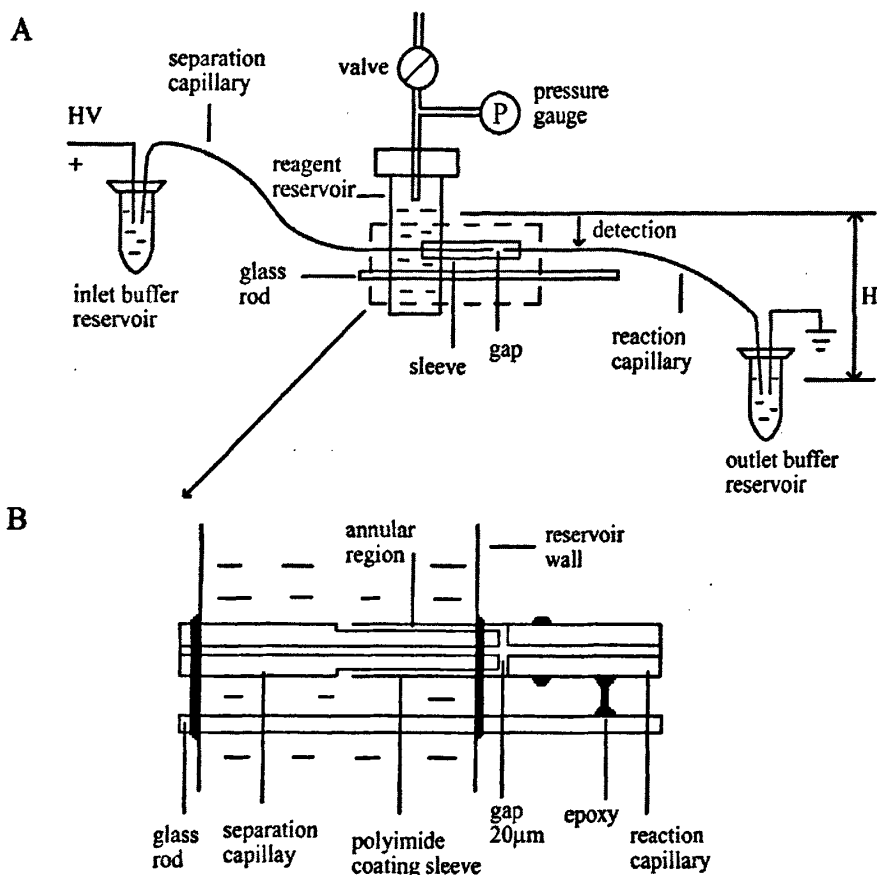


图 3.3 (A) 共轴-间隙柱后反应系统(B) 反应器横截面示意图

注: H, 衍生试剂和出口端缓冲液液面高度差; HV, 高压电源。

聚酰亚胺涂层套容易获得, 具有轻便和化学耐受性, 以及与毛细管的匹配性, 涂层套尽管非常薄, 在用于毛细管的准直, 采用短反应距离时它不会阻碍物镜在检测窗的聚焦, 而且在组装反应器时也不易发生断裂, 因此是一种好的准直材料。

3.2.5 电泳过程

毛细管每天使用前依次用 0.1 mol/L 盐酸、水、0.1 mol/L 氢氧化钠和水清洗，最后用缓冲液平衡 10 min。两次电泳间歇用缓冲液冲洗 2 min，冲洗的同时在衍生试剂瓶外加 10 kPa 的氮气压避免衍生试剂被工作缓冲液稀释。进样端缓冲液液面与衍生试剂液面水平，出口端缓冲液液面低 12 cm，样品溶液液面高于衍生试剂液面 10 cm，高差进样 10 s，电泳电压 18 kV。标准加入法，确认样品峰。缓冲液使用 10 次后更换，每天实验结束，毛细管、试剂池和衍生试剂通道用水和 50% 甲醇 (v/v) 相继在氮气压下冲洗。

3.2.6 实时观察反应产物荧光强度曲线

实时观察测量氨基酸衍生产物荧光强度曲线用上述自制的激光诱导荧光系统进行，但是需要将毛细管从光路中移出。先在 10 mm 的荧光池中加入衍生试剂，再迅速加入氨基酸溶液，快速混合，并立即将荧光池放置于物镜前纪录反应产物的荧光强度变化曲线，从混合反应到开始检测时间约为 2 s，衍生物的实时荧光强度变化曲线纪录 30 s。

3.3 结果与讨论

3.3.1 液面高度差对检测信号的影响

由于衍生试剂和出口端缓冲液液面高度差影响衍生试剂的流量，本文研究了高差分别为 0.5 cm、5 cm、10 cm、12 cm、15 cm 时对峰面积和柱效的影响见图 3.2。图 3.4A 表明，当高差从 0.5 cm 增加到 10 cm 时，峰面积随着高差的增加而快速增加，而当高差大于等于 12 cm 时，峰面积增加随高差的增加变化缓慢。由于衍生试剂是通过重力引入的，随高度差的增加，试剂流速增加，低的流量使氨基酸衍生反应不完全，因而荧光信号较弱。高的流量引起分析物样品扩散，限制荧光信号的增加。

图 3.4B 显示，高差从 0.5 cm 增加到 12 cm，分离效率增加，进一步增加高差分离效率下降。这是由于在较低的衍生试剂流速下，当分析物从小内径 (50 μm) 的毛细管迁移到大内径 (75 μm) 的毛细管时，发生径向扩散效应，增加试剂流速产生鞘流可提高分离效率，然而过量的试剂流速增加了抛物面流引起的区带展宽，在径向扩散和区带展宽最小化时理论塔板数最大。综合考虑氨基酸的荧光信号和柱效，取 12 cm 高差进行下一步的工作。

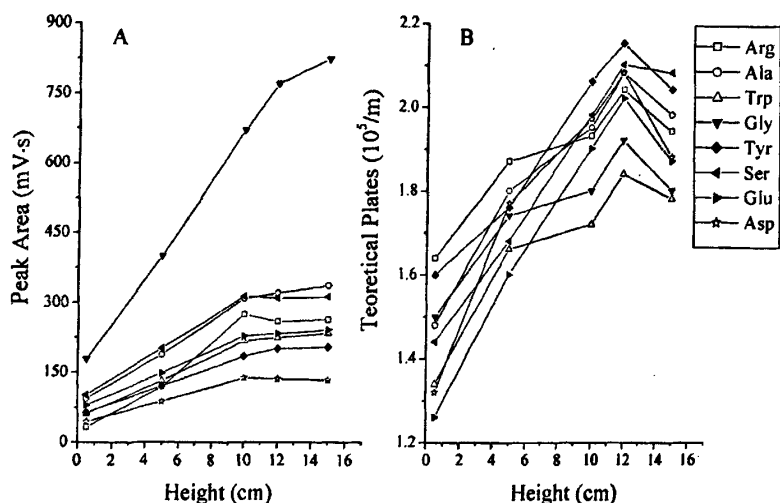


图 3.4 液面高度差对 (A) 峰面积和 (B) 柱效的影响

实验条件：分离毛细管，58 cm × 50 μm I.D. × 365 μm O.D.；反应毛细管，17/0.5 cm × 75 μm I.D. × 365 μm O.D.；环隙间距，15 μm；工作缓冲液，50 mmol/L 硼酸钠盐 (pH 9.5)；衍生试剂，1 mmol/L NDA、8 mmol/L 2-ME、30% 甲醇、70% 50 mmol/L 硼酸 (pH 9.5)；氨基酸浓度，1.0 × 10⁻⁵ mol/L；进样，10 cm (样品池和衍生试剂池液面高度差)，10 s；分离电压，18 kV。峰：(1)Arg, (2)Ala, (3)Trp, (4)Gly, (5)Tyr, (6)Ser, (7)Glu, (8)Asp。

3.3.2 环隙尺寸对检测信号的影响

在设计间隙反应器时，准直分离管和反应管是首要的考虑因素之一，套管内径与分离管和反应管外径越接近，则两根毛细管的准直精度越高，毛细管石英和聚酰亚胺涂层尺寸非常匹配，是准直毛细管一种选择。由于衍生试剂要引入反应毛细管内，分离管和套管之间的环隙尺寸影响到衍生试剂的流量，环隙大小可通过控制分离管的刻蚀时间进行优化。

粘度为 η 的溶液流过长 L 半径 R 的毛细管时，流量 Q 由著名的 Hagen-Poiseuille 方程[32]得到：

$$Q = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8 \eta L} \quad (3.1)$$

ΔP 为压力差，溶液通过分离管和涂层套之间的圆柱形环隙的流量 Q 方程如

下:

$$Q = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8\eta L} \left[(1 - \kappa^4) - \frac{(1 - \kappa^2)^2}{\ln(1/\kappa)} \right] \quad (3.2)$$

其中, r 为聚酰亚胺套的内径, κ 为分离毛细管的外径与聚酰亚胺套内径的比值, 当环隙很小时, 该方程修正如下:

$$Q = \frac{\pi r^4 \Delta P}{6\eta L} \varepsilon^3 \left(1 - \frac{1}{2}\varepsilon\right) \quad (3.3)$$

$\varepsilon = 1 - \kappa$, 即环隙间距与涂层套内径的比值。由于 ε 较小, 流量方程可进一步简化为

$$Q = \frac{\pi r^4 \Delta P}{6\eta L} \varepsilon^3 \quad (3.4)$$

从方程 (3.4) 看出, 对于固定的高差, 流量决定于环隙间距, 环隙间距微小的变化就引起流量较大的改变。使用较小的环隙间距, 毛细管准直精确但流量小, 采用较大的环隙间距, 可以获得不太精确的准直以及较大的流量, 因此组装共轴-间隙式反应器需要优化环隙尺寸 (即控制分离管的刻蚀时间)。

本文考察了环隙间距尺寸对氨基酸荧光信号的影响, 如图 3.5 所示。分离毛细管端石英外径 $340 \mu\text{m}$ 分别经过 10 min、15 min 和 20 min 刻蚀到 $320 \mu\text{m}$ 、 $310 \mu\text{m}$ 和 $300 \mu\text{m}$ (相应的环隙间距分别为 $10 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m}$ 和 $20 \mu\text{m}$)。因此, 与共轴反应器相比, 本反应器的分离管刻蚀很少, 它的管壁较厚强度好于共轴式反应器, 在组装过程中不易折断。

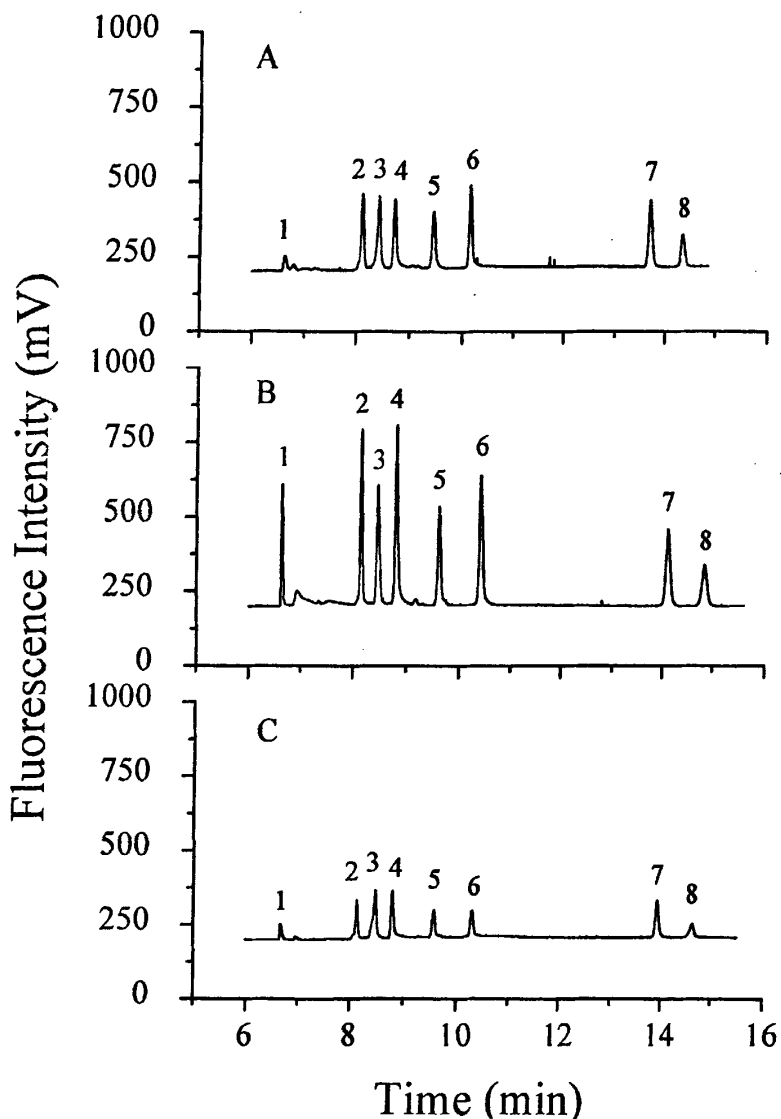


图 3.5 环隙间距尺寸(A) 10 μm , (B) 15 μm , (C) 20 μm 对氨基酸荧光信号的影响

实验条件: 分离毛细管, 58 cm \times 50 μm I.D. \times 365 μm O.D.; 反应毛细管, 17/0.5 cm \times 75 μm I.D. \times 365 μm O.D.; 液面高度差, 12 cm; 工作缓冲液, 50 mmol/L 硼酸(pH 9.5); 衍生试剂, 1 mmol/L NDA、8 mmol/L 2-ME、30% 甲醇、70% 50 mmol/L 硼酸钠盐(pH 9.5); 氨基酸浓度, 5.0×10^{-5} mol/L; 进样, 10 cm (样品池和衍生试剂池液面高度差), 10 s; 分离电压, 18 kV。
峰: (1)Arg, (2)Ala, (3)Trp, (4)Gly, (5)Tyr, (6)Ser, (7)Glu, (8)Asp.

由方程 (3.4) 估算, 环隙间距分别为 $10\ \mu\text{m}$ 和 $20\ \mu\text{m}$ 时, 试剂流量为环隙间距 $15\ \mu\text{m}$ 的 0.3 和 2.4 倍。 $10\ \mu\text{m}$ 环隙间距试剂流量较低, 荧光强度弱。当环隙间距较大为 $20\ \mu\text{m}$ 时, 试剂过量产生区带扩散, 此时荧光信号下降, 荧光强度的降低不仅受到区带扩散的影响, 还受到反应动力学效应的影响, 这将在下一节讨论。在环隙间距为 $15\ \mu\text{m}$ 时, 荧光信号最强。此条件下, 经过测定具有天然荧光的核黄素荧光强度, 柱后反应器中环隙的衍生试剂和分离管的电泳缓冲液流量之比计算为 1.5: 1, 简单地说, 在衍生试剂瓶中加入或不加入 30% (v/v) 甲醇—70% (v/v) 50 mmol/L 硼酸钠盐 (pH 9.5) 的衍生试剂基体溶液, 分别代表检测的经过稀释或未经稀释的核黄素。环隙和分离管溶液流量之比 (1.5: 1) 近似于反应管和分离管横截面积之差与分离管横截面积之比值 (1.25: 1), 上述数据说明共轴-间隙反应器的两股液流在间隙处混合时产生的紊流效应减低, 防止了柱效的下降。事实上, 高差和环隙间距对于调节衍生试剂与分析物的流量比具有相同的效应, 而环隙间距相对于高差而言具有更大的影响作用。因此, 本反应器采用 $15\ \mu\text{m}$ 环隙间距。

3.3.3 反应距离对检测信号的影响

本反应器如图 3.3 所示, 其优点之一, 就是使用聚酰亚胺套能够将引入试剂的间隙置于试剂池外, 因而该反应器可以使用短的反应距离 (从间隙到检测点距离)。图 3.6 为不同反应距离氨基酸的毛细管电泳谱图。在反应距离为 4 cm 时所有的氨基酸荧光强度都很弱, 甘氨酸和精氨酸几乎检测不到。当反应距离减小到 2 cm 时, 荧光强度增加, 色氨酸和酪氨酸信号最强。当反应距离从 1 cm 改变到 0.5 cm 时, 色氨酸和酪氨酸分别下降 40% 和 30%, 其它氨基酸的强度增加而且甘氨酸荧光强度增加了 60%。

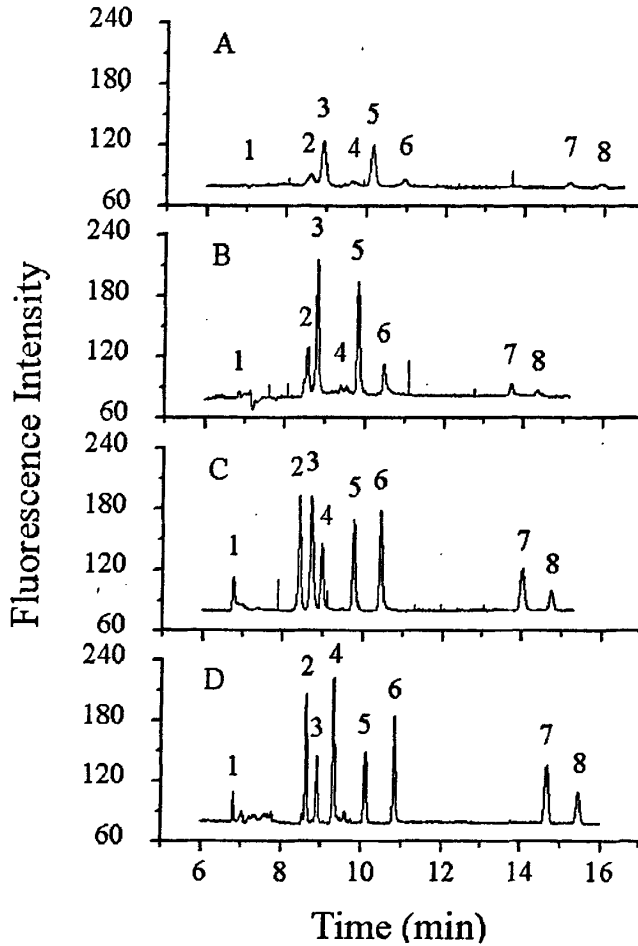


图 3.6 不同反应距离(A) 4 cm, (B) 2 cm, (C) 1 cm 及 (D) 0.5 cm 氨基酸电泳谱图

实验条件: 分离毛细管, 58 cm × 50 μm I.D. × 365 μm O.D.; 反应毛细管, 17/0.5 cm × 75 μm I.D. × 365 μm O.D.; 液面高度差, 12 cm; 环隙间距, 15 μm; 工作缓冲液, 50 mmol/L 硼酸钠盐(pH 9.5); 衍生试剂, 2 mmol/L NDA、8 mmol/L 2-ME、30% 甲醇、70% 50 mmol/L 硼酸(pH 9.5); 氨基酸浓度, 1.0×10^{-5} mol/L; 进样, 10 cm (样品池和衍生试剂池液面高度差), 10 s; 分离电压, 18 kV. 峰: (1) Arg, (2) Ala, (3) Trp, (4) Gly, (5) Tyr, (6) Ser, (7) Glu, (8) Asp.

氨基酸与萘二甲醛 /2-巯基乙醇衍生试剂反应快速, 然而产物非常不稳定,

导致荧光信号下降很快，特别是氨基酸在较低浓度下更为明显。本文采用 2.2.5 节方法研究了四种氨基酸在高低浓度下衍生反应的实时荧光强度变化情况，实验结果见图 3.7。图 3.7A 中，氨基酸的反应浓度为 2×10^{-4} mol/L，甘氨酸比其它氨基酸反应迅速，荧光强度在 4 s 后开始下降；丙氨酸荧光强度约 15 s 后上升到水平值；色氨酸和丝氨酸超过 15 s 以后荧光强度增加缓慢。在图 3.7B 中，氨基酸的反应浓度为 10^{-5} mol/L，由于试剂浓度过量，反应动力学为伪一级过程[19]。在高的衍生和分解速度下，反应产物荧光强度下降极快，特别对于甘氨酸，衍生产物在 1 s 内就形成并在 20 s 几乎就完全分解，色氨酸相对于丙氨酸和丝氨酸来说，荧光强度下降稍慢，其荧光强度衰减到一半超过 15 s。由于氨基酸衍生和分解速度快，采用短的反应距离和时间能够获得更低的检出限，根据图 3.6 氨基酸的电泳谱图，迁移 0.5 cm 的反应距离大约需要 4~8 s 的时间，而该反应距离有助于提高检测灵敏度。文献报道的共轴反应器[6, 9]和鞘流反应器[11, 13] 采用的反应距离不超过 0.5 cm，氨基酸的检出限比间隙式反应器[17, 19, 22, 24]（反应距离不低于 1.4 cm）更低，可见采用短的反应距离能够改善检出限。由于当反应距离小于 0.5 cm 时，用胶固定聚酰亚胺套和反应毛细管会阻挡物镜的聚焦，而且 0.5 cm 反应距离色氨酸和酪氨酸荧光强度已开始下降，因此，本反应器采用 0.5 cm 反应距离，其检出限优于间隙式反应器。

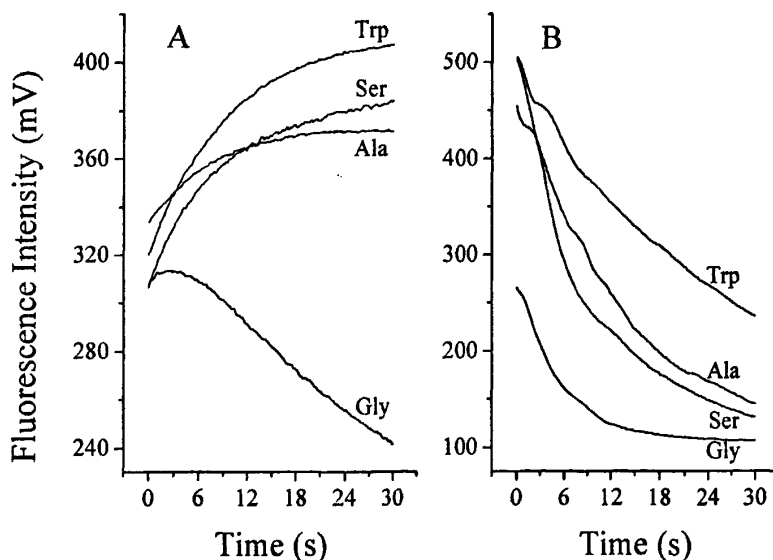


图 3.7 氨基酸荧光强度随反应时间变化曲线

实验条件: (A): 0.5 ml 氨基酸 (10^{-3} mol/L) 加入 2 ml 衍生试剂中, 比色皿位于物镜前约 0.8 cm 检测; (B): 0.2 ml 氨基酸 (10^{-4} mol/L) 加入 1.8 ml 衍生试剂中, 比色皿位于物镜前约 0.3 cm 检测。

3.3.4 线性范围和检出限

采用共轴-间隙式柱后反应器, 氨基酸的检出限($S/N=3$)和柱效列于表 3.1。甘氨酸的浓度检出限和质量检出限分别为 8×10^{-8} mol/L 和 0.24 fmol, 同文献报道相比, 由于该反应器采用了短的反应距离 (0.5 cm), 其结果要优于其它间隙式反应器[17, 19, 22, 24], 但是不如共轴反应器[6, 9] (反应距离 < 1.5 cm)。甘氨酸在 $5 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L 浓度范围内具有线性响应, 斜率为 50.2 (mV·s / (μmol/L)), $R=0.999$ 。分离效率为 $1.35 \times 10^5 \sim 1.67 \times 10^5$ 理论塔板数。

表 3.1 氨基酸的检出限和柱效

Amino acids	CLOD ($\times 10^{-7}$ mol/L)	MLOD (fmol)	Column efficiency ($\times 10^5$ plates)
Arginine	6.0	1.8	1.60
Alanine	1.5	0.45	1.59
Tryptophan	10	3.0	1.35
Glycine	0.8	0.24	1.59
Tyrosine	8.0	2.4	1.67
Serine	1.0	0.30	1.63
Glutamic acid	8.0	2.4	1.44
Aspartic acid	8.0	2.4	1.38

注: 实验条件同图 3.6D。

以 1×10^{-5} mol/L 氨基酸为样品, 氨基酸的迁移时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别低于 0.45% 和 5.0% (日内差), 0.72% 和 8.1% (日间差), 结果见表 3.2。

表 3.2 氨基酸的迁移时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD)

Amino acids	RSD%			
	迁移时间		峰面积	
	日内差	日间差	日内差	日间差
Arginine	0.28	0.55	4.8	6.8
Alanine	0.28	0.58	4.1	7.1
Tryptophan	0.31	0.69	4.7	7.9
Glycine	0.30	0.72	5.0	8.1
Tyrosine	0.45	0.68	4.4	7.5
Serine	0.26	0.64	5.0	7.7
Glutamic acid	0.15	0.70	4.3	7.1
Aspartic acid	0.20	0.70	7.5	7.5

注：日内差，同一天测定连续五次；日间差，连续五天每天测定 3 次。

3.3.5 实际样品的分析

本共轴-间隙反应器中，聚酰亚胺套内径匹配毛细管的外径，两根毛细管能方便可靠的准直对齐。由于毛细管端面难以做到非常光滑平直，两根毛细管端部在聚酰亚胺套内接触时存在 10-20 μm 固有的间隙，因此可以在不用显微镜情况下组装本反应器。图 3.8 为用未经显微操作制作的反应器得到一种糯米制成的香醋氨基酸电泳谱图。香醋样品用水稀释 1000 倍未经其它任何处理，标准加入法定性定量氨基酸，某些氨基酸的柱效甚至高达 3.0×10^5 塔板数。因此，在不用显微镜情况下组装本反应器是切实可行的。

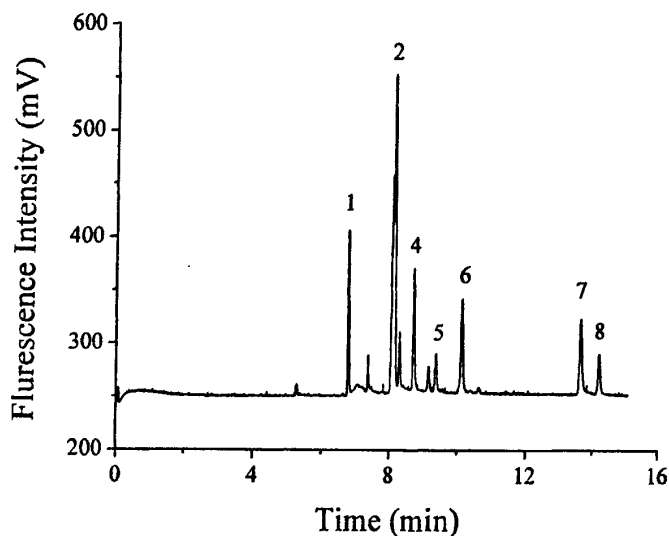


图 3.8 香醋样品电泳谱图（反应器未经微操作制作而成），其它条件如图 3.6D。

由于香醋样品中没有检出色氨酸，丙氨酸与一未知组分没有分离，测定了其它 6 种氨基酸含量，酪氨酸浓度约为 2.6×10^{-3} mol/L，其它氨基酸含量在 7.5×10^{-3} ~ 10.2×10^{-3} mol/L 范围，结果见表 3.3，与参考文献[33]吻合。

表 3.3 香醋中氨基酸的含量及回收率

氨基酸	含量($\times 10^{-3}$ mol/L)	RSD% (n=3)	回收率(%)	RSD% (n=3)
Arginine	7.5	5.6	98.2	7.0
Glycine	7.8	6.6	103.2	7.3
Tyrosine	2.6	5.9	100.9	6.4
Serine	9.2	6.3	103.8	5.9
Glutamic acid	10.2	6.7	95.6	6.4
Aspartic acid	8.6	5.8	96.9	6.8

3.4 本章小结

本文描述了一种毛细管电泳激光诱导荧光检测共轴-间隙式柱后反应器简单方便的制作方法。这种杂合反应器采用短的 5 mm 反应距离，衍生试剂 NDA/2-ME

溶液由重力驱动经过环隙引入反应管。本文考察了该反应器衍生试剂液面与阴极端液面高度差对检测信号的影响, 分离管接口端环隙的大小对试剂流量的影响, 以及反应距离对荧光强度的影响。在优化的实验条件下, 八种氨基酸在两个多数量级范围呈线性关系, 检出限 $8 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L, 柱效 $1.35 \times 10^5 \sim 1.67 \times 10^5$ 理论塔板数。本文的柱后反应器的设计, 主要解决了其它柱后反应器不易制作难以推广的难题, 能够保留毛细管电泳的高分离效率, 并且可采用短反应距离以获得较低的检出限。因此, 本反应器在毛细管电泳分析中, 在毛细管的准直耦合以及在柱试剂引入方面将会具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Hempel G. 2000. *Electrophoresis* 21:691-698.
- [2] Weston A, Brown P R. 1997. *HPLC and CE: Principles and Practice*. San Diego: Academic Press, Chapter 6, p.185-213.
- [3] Waterval J C M, Lingeman H, Bult A, et al. 2000. *Electrophoresis* 21:4029-4045.
- [4] Underberg W J M, Waterval J C M. 2002. *Electrophoresis* 23:3922-3933.
- [5] Zhu R, Kok W T, 1998. *J. Pharm Biomed. Anal.* 17:985-999.
- [6] Rose Jr D J, Jorgenson J W. 1988. *J. Chromatogr.* 447:117-131.
- [7] Nickerson B, Jorgenson J W. 1989. *J. Chromatogr.* 480:157-168.
- [8] Emmer Å, Roeraade J. 1994. *J. Chromatogr. A* 662:375-381.
- [9] Zhang L, Yeung E S. 1996. *J. Chromatogr. A* 734:331-337.
- [10] Feltus A, Hentz N G, Daunert S. 2001. *J. Chromatogr. A* 918:381-392.
- [11] Oldenburg K E, Xi X, Sweedler J V. 1997. *Analyst* 122:1581-1585.
- [12] Nirode W F, Staller T D, Cole R O, Sepaniak M J. 1998. *Anal. Chem.* 70:182-186.
- [13] Coble P G, Timperman A T. 1998. *J. Chromatogr. A* 829:309-315.
- [14] Ye M, Hu S, Quigley W W C, Dovichi N J. 2004. *J. Chromatogr. A* 1022:201-206.
- [15] Rose Jr DJ. 1991. *J. Chromatogr.* 540:343-353.
- [16] Pentoney Jr S L, Huang X, Burgi D S, Zare RN. 1988. *Anal. Chem.* 60:2625-2629.
- [17] Albin M, Weinberger R, Sapp E, Moring S. 1991. *Anal. Chem.* 63:417-422.
- [18] Emmer Å, Roeraade J. 1994. *Chromatographia*. 39:271-278.
- [19] Zhu R, Kok W T. 1995. *J. Chromatogr. A* 716:123-133.
- [20] Abler J K, Reddy K R, Lee C S. 1997. *J. Chromatogr. A* 759:139-147.
- [21] Kostel K L, Lunte S M. 1997. *J. Chromatogr. B* 695:27-38.

- [22] Wei H, Li S F Y. 1998. *Anal. Chem.* 70:5097-5102.
- [23] Hardy S, Jones P, Riviello J M, Avdalovic N. 1999. *J. Chromatogr. A* 834:309-320.
- [24] Rezenom Y H, Lancaster III J M, Pittman J L, et al. 2002. *Anal. Chem.* 74:1572-1577.
- [25] Jacobson S C, Koutny L B, Hergenroder R, et al. 1994. *Anal. Chem.* 66:3472-3476.
- [26] Fluri K, Fitzpatrick G, Chiem N, Harrison D J. 1996. *Anal. Chem.* 68:4285-4290.
- [27] Gottschlich N, Culbertson C T, McKnight T E, et al. 2000. *J. Chromatogr. B* 745:243-249.
- [28] Sieben V J, Backhouse C J. 2005. *Electrophoresis* 26:4729-4742.
- [29] Wu S, Dovichi N J. 1989. *J. Chromatogr.* 480:141-155.
- [30] Cheng Y F, Wu S, Chen D Y, Dovichi N J. 1990. *Anal. Chem.* 62:496-503.
- [31] Kuhr W G, Licklider L, Amankwa L. 1993. *Anal. Chem.* 65:277-282.
- [32] Bird R B, Stewart W E, Lightfoot E N. 2002. *Transport Phenomena*. New York: Wiley, Chapter 2, p.40-74.
- [33] Shen Z Y. 2003. *Chin. J. Food Sci.* 23:33-35.

第四章 毛细管电泳柱后衍生激光诱导荧光测定动物组织中 卡那霉素类抗生素残留

4.1 引言

氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycoside antibiotics, AGs) 主要用于治疗人和动物受到厌氧型革蓝氏阴性菌和一些革蓝氏阳性菌的感染[1]。卡那霉素类 (kanamycins) 药物属于氨基糖苷类抗生素, 包括卡那霉素、阿米卡星和妥布霉素等。卡那霉素常和其它药物联合治疗肺结核, 主要药效组分为卡那霉素 A (>95%), 妥布霉素主要用于耐药的革蓝氏菌引起的严重感染, 阿米卡星是卡那霉素 A 的半合成衍生物, 常用于治疗耐受庆大霉素、妥布霉素的微生物感染。由于氨基糖苷类抗生素的体内积蓄作用和严重的肾脏和听觉器官剂量相关毒性, 长期使用会引起高的持久的组织亲和性, 而且食物中的氨基糖苷残留导致长期消费者的耐抗生素病原菌链的问题。因此, 为确保食品安全, 控制药物的食用动物的治疗剂量和给药时间显得非常重要。为了避免人类食物链受到氨基糖苷残留的危害, 需要发展灵敏的监测食物如牛奶、动物组织中的氨基糖苷残留的检测方法。

氨基糖苷类抗生素由于结构非常相近, 而且没有 UV 或荧光发色基团, 完成高效分离和灵敏检测是分析工作者的一个挑战。氨基糖苷类抗生素的测定方法主要有色谱法[2], 如薄层色谱(TLC)[3], 气相色谱(GC)[4]和液相色谱(LC)[5~7]。自从毛细管电泳(CE)间接 UV 方法[8]检测氨基糖苷类抗生素报道以来, 一些其它紫外方法的检测方法也有报道, 这些方法包括硼砂复合物直接 UV 法[9], 经过衍生[10]和没有衍生[11]的 MEKC-UV 方法, 柱前衍生 CZE-UV 方法[12,13], 在柱衍生电泳介质微分析 UV 方法[14,15]。然而由于进样量少和毛细管光程短, UV 方法灵敏度较低。CE-电化学法分析氨基糖苷也有很多尝试, 如电势梯度检测(PGD)[16,17]、电容耦合非接触式电导检测(C⁴D)[18]、灵敏的金属或金属修饰电极电化学检测[19-21]。毛细管电泳-激光诱导荧光法 (CE-LIF) 灵敏检测氨基糖苷类化合物报道仅见于柱前衍生方法[22, 23]。

在 LIF 柱前衍生分析过程中, 如果分析物分子含有多于一个的标记位点会产生多重分离峰[23,24], 然而在柱后衍生方法中, 样品的分离是基于原始的分析物而不是衍生产物, 这种问题可以避免。CE-LIF 柱后检测方法在 Rose 和 Jorgenson 首次报道以来[25], 主要用于氨基酸、多肽、蛋白质[26-35]和 DNA[36, 37]分析,

最近我们提出一种简单方便容易制作的共轴-间隙式柱后反应器用于氨基酸分析的 CZE-LIF 系统[38]。

本文提出一种在CZE-LIF共轴-间隙式柱后反应系统中采用萘二醛和2-巯基乙醇柱后衍生测定三种卡那霉素类抗生素的方法。卡那霉素类抗生素在酸性条件和反向电渗流下用毛细管区带电泳(CZE)分离,再与衍生试剂于碱性缓冲液中进行衍生反应,并用LIF检测,该方法用于牛奶和食用动物组织中卡那霉素类抗生素残留的分析。

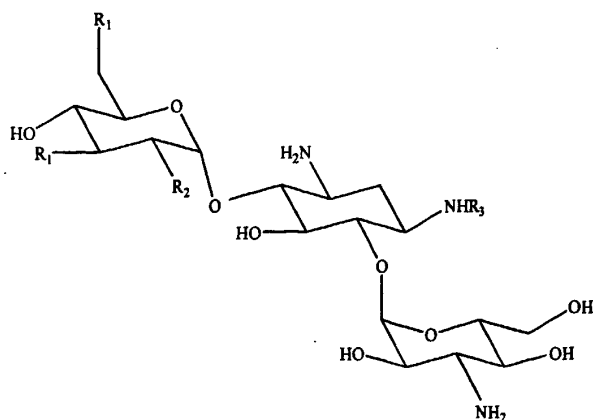
4.2 实验部分:

4.2.1 仪器

1229 型毛细管电泳仪(北京新技术应用研究所),采用共线光学结构的自制激光诱导荧光检测系统[38], MBL-10 二极管泵浦固体激光器(DPSSL, 473nm, 10mW, 长春新产业光电技术有限公司), GD-1 型微光测量仪(西安瑞科电子设备有限公司)和 N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。石英毛细管(河北永年锐洋色谱器件有限公司)包括分离管(60 cm × 50 μm I.D.)和反应管(19 cm × 75 μm I.D.)。共轴-间隙式柱后衍生反应器的制作过程见文献[38]:将一小段 10 mm 石英毛细管浸泡于氢氟酸中,石英管被腐蚀,得到聚酰亚胺涂层套;分离和反应毛细管连接端除去聚酰亚胺涂层,裸分离管外壁稍经刻蚀与裸反应管在聚酰亚胺涂层套内对接,由于石英管端部略微不平整,即保持 10-20 μm 的间隙,因此可以不用显微操作;涂层套一端与反应管粘接密封,涂层套外壁粘接于衍生试剂池壁;衍生试剂溶液经分离管外壁与涂层套的环状间隙以及分离与反应毛细管的接触间隙引入。

4.2.2 试剂

卡那霉素 A(kanamycin A)、阿米卡星(amikacin)和妥布霉素(tobramycin)购自中国药品生物制品检定所(北京),化学结构见图 4.1,萘二醛(Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde, NDA)购自瑞士 Fluka 公司,2-巯基乙醇(2-ME)、冰乙酸、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、三氯乙酸(TCA)和其它试剂购自上海化学试剂有限公司,2-ME 为化学纯,其它试剂为分析纯。用去离子水(合肥蓝蓝水业)配制溶液。



	R ₁	R ₂	R ₃
amikacin	OH	OH	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH(OH)C=O
kanamycin A	OH	OH	H
tobramycin	H	NH ₂	H

图 4.1 三种卡那霉素类化合物的化学结构

各抗生素贮备液浓度为 1.00 g/L，用去离子水配制 4℃ 保存，混合标准液用水稀释而成。分离缓冲液为 50 mmol/L 乙酸含 0.5 mmol/L CTAB 溶液，用 1.0 mol/L NaOH 调节至 pH 5.0。50 mmol/L 四硼酸钠缓冲液 (pH 10.0) 用作衍生溶液的基体溶液；10 mmol/L NDA 甲醇储备液置于棕色瓶内 4℃ 保存，每周配制；100 mmol/L 2-ME 甲醇储备液，每月配制。衍生试剂溶液含 1.0 mmol/L NDA，8.0 mmol/L 2-ME，35 mmol/L 四硼酸钠缓冲液 (pH 10.0) 用 30% (v/v) 甲醇溶液配制，每天更新。分离缓冲液和衍生溶液使用前超声除气 10 min (S-2200 超声清洗仪，120 W，35 kHz，上海杰理科技有限公司)。

4.2.3 衍生物的荧光光谱

采用近似通用缓冲液 (pH 2.0~12.0, 0.2 mol/L 硼酸, 0.05 mol/L 柠檬酸和 0.1 mol/L 磷酸三钠按照一定比例混合) [39] 作为荧光光谱实验中的氨基糖苷衍生反应的基体溶液。用 RF-5301 PC 荧光仪 (日本岛津) 以 5 nm 带宽快速扫描衍生产物的荧光激发和发射光谱。在 3.5-mL 荧光池中快速混合 0.1 mL 1.0 g/L 的氨基糖苷和 2.0 mL 衍生溶液 (pH 10.0)，用 RF-5301 PC 荧光仪 (日本岛津) 以 5 nm 带宽快速扫描衍生产物的荧光激发和发射光谱。固定 473 nm 记录荧光发射光谱，

固定 550 nm 记录荧光激发光谱。pH 对荧光强度的影响实验方法如前所述。反应时间对荧光强度的影响采用自制 LIF 检测系统测定，如文献[38]所述。

4.2.4 样品处理

牛奶：牛奶和奶粉样品购自超市，1.0 g 奶粉溶于 10 mL 水中。取 5 mL 的牛奶或奶粉溶液于 15 mL 聚四氟乙烯离心管中，加入 1.0 mL 10% (m/v) TCA，涡旋 30 s，3000 rpm 离心 10 min，上清液转移到另一离心管内，残渣按照上述方法重复处理两次。收集的上清液在 3000 rpm 再离心 5 min，0.45- μ m 注射过滤器过滤，滤液可直接作为 CZE 样品溶液进样。回收率实验用 2.0×10^{-4} g/L， 6.0×10^{-4} g/L 和 6.0×10^{-3} g/L 三个浓度水平的氨基糖苷在牛奶中加样测定，标准加入法确定样品峰。

动物组织：取 5.0 g 动物组织匀浆于 15 mL 聚四氟乙烯离心管中，后面处理过程参见上述牛奶项“加入 1.0 mL…确定样品峰”。

4.2.5 电泳过程

毛细管每天使用前依次用 0.1 mol/L 盐酸、去离子水、0.1 mol/L 氢氧化钠和去离子水清洗，最后用分离缓冲液平衡 10 min。两次电泳间用缓冲液冲洗 4 min，同时在衍生试剂瓶内加 10 kPa N_2 压强避免衍生试剂被分离缓冲液稀释。进样端缓冲液面与衍生试剂液面持平，出口端液面降低 12 cm。高差进样时，升高进样端 10 cm，时间 10 s。电泳电压 -15 kV。每天实验结束，衍生试剂池先以水和 50% (v/v) 甲醇清洗，再用水在试剂池以 10 kPa N_2 压力冲洗毛细管和试剂通道。

4.2.6 实时观察反应产物荧光强度曲线

实时观察测量氨基糖苷衍生产物荧光强度曲线在上述自制的激光诱导荧光系统进行。先在 10 mm 的荧光池中加入衍生试剂，再迅速加入氨基糖苷溶液，快速混合，并立即将荧光池放置于物镜前纪录反应产物的荧光强度变化曲线。

4.3 结果与讨论：

4.3.1 荧光光谱特性

萘二醛是伯氨基团的快速衍生试剂，激发波长位于可见区，可用半导体激光

器激发荧光。卡那霉素类抗生素含有两个或两个以上的氨基糖基团，萘二醛和卡那霉素 A、妥布霉素、阿米卡星衍生物的激发和发射荧光光谱如图 4.2，三种衍生物的荧光激发和发射谱图相似，谱峰强度存在差异，按照妥布霉素、卡那霉素 A、阿米卡星依次减弱。谱峰位置也略有偏移，三种衍生物的荧光激发光谱均有两个强峰，其中一个在 400 nm 处；而另一个强峰，三种卡那霉素所处波长不同，卡那霉素 A 和妥布霉素在 473 nm 有强激发荧光峰，而阿米卡星在 484 nm 处有强峰，在 473 nm 也有较强激发性能。荧光发射光谱中，卡那霉素 A 和妥布霉素在 550 nm 为峰值，阿米卡星在 530 nm 为峰值。阿米卡星与卡那霉素 A 和妥布霉素荧光光谱存在较大的差别，原因可能是化学结构上不同，如图 4.1，阿米卡星含有 4-氨基-2-羟基丁酰基(4-amino-2-hydroxybutyryl)基团。根据荧光光谱分析，采用本激光诱导荧光检测系统适合卡那霉素类抗生素的荧光法测定。

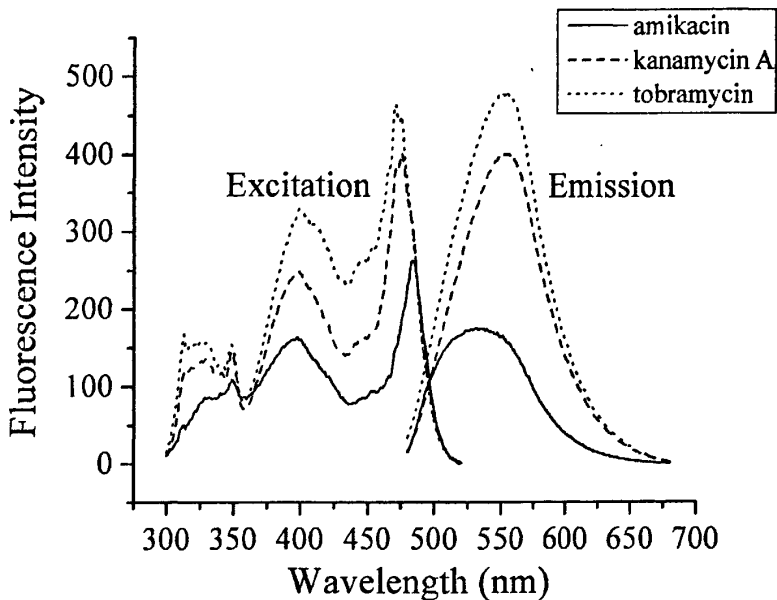


图 4.2 卡那霉素类抗生素衍生物的荧光激发和发射谱图。

Fig.4.2 实验条件(Experimental conditions): 卡那霉素类 (each kanamycin), 1.0 g/L, 0.1 mL; 衍生试剂(derivatization reagent), 2.0 mL; 发射荧光光谱(emission spectra obtained at)在激发波长(excitation wavelength) 473 nm 处检测; 激发荧光光谱(excitation spectra obtained at)在发射波长(emmission wavelength) 550 nm 检测; 荧光光度计(spectrofluorophotometer), 5 nm 狭缝宽度 slit width)和快速扫描(fast scanning speed)。

4.3.2 荧光反应时间曲线

衍生产物的稳定性会影响 LIF 检测方法的灵敏度，我们考察了 NDA 标记的卡那霉素衍生物荧光强度随时间的衰减曲线，如图 4.3，衍生物的荧光强度下降很快，半衰期小于 18 s，因为在衍生试剂浓度相对于分析物的较高，同时增加了衍生和分解的速度。因此，采用柱后衍生检测要求反应距离短，灵敏度才得以提高，本共轴-间隙式柱后反应器能够将反应距离缩减到 5 mm，可以获得满意的灵敏度。

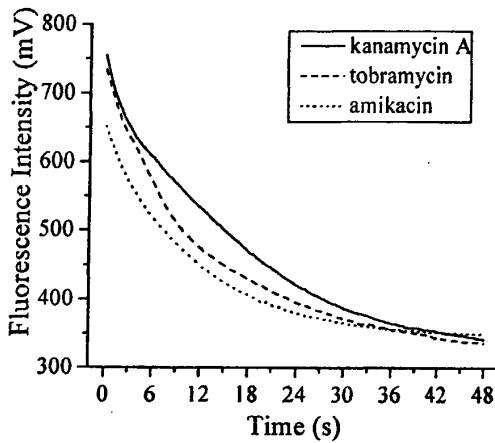


图 4.3 衍生时间对荧光强度的影响

Fig.4.3 Effect of derivatization time of three AGs on fluorescence intensity. The solution contains 7.5×10^{-3} g/L of each AG, 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME and 70% (v/v) approximate universal buffer (pH 10.0) in 30% (v/v) methanol. The fluorescence intensity of the derivatives is measured at 0.5 cm in front of the objective on the homemade LIF system.

4.3.3 衍生试剂条件

酸度是影响 NDA/2-ME 与伯氨基团衍生反应的一个重要因素。测试 pH 4.0~12.0 对荧光强度的影响，图 4.4 说明三种卡那霉素衍生产物的荧光强度具有 pH 依赖性，卡那霉素 A 和妥布霉素的荧光强度随 pH 的变化曲线更为相似，这是因为两者的化学结构极其相近。在 pH 9.0~10.5 时荧光强度最大，我们选择 pH 10.0 作为衍生试剂的基体缓冲溶液的酸度。

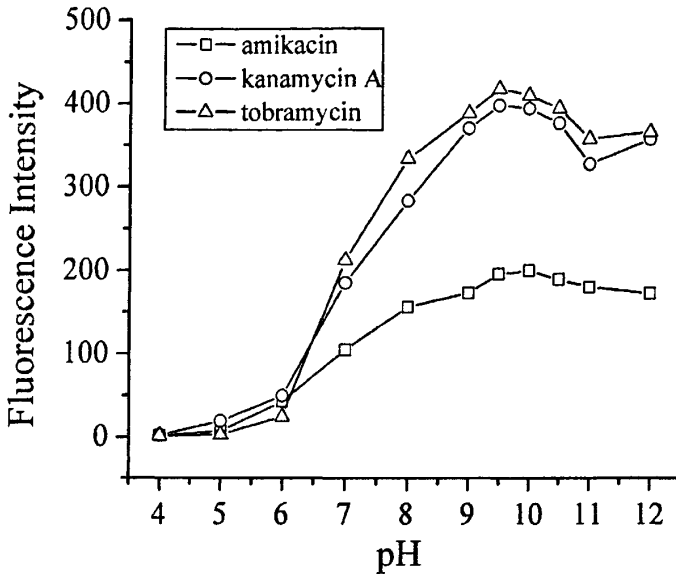


图 4.4 pH 对卡那霉素类衍生物荧光强度的影响

Note: The examined solution contains 0.05 g/L each AG, 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME and 70% (v/v) approximate universal buffer in 30% (v/v) methanol. The excitation wavelength is 473 nm. The experiment is performed with the spectrofluorophotometer.

实验分别考察了衍生试剂 NDA 和 2-ME 浓度对荧光强度的影响, 结果见图 4.5。在图 4.5A 中, 2-ME 浓度为 8.0 mmol/L, 当 NDA 浓度从 0.05 mmol/L 增加到 1.0 mmol/L 时, 峰面积增加较快, 当浓度超过 1.0 mmol/L 时, 峰面积变化缓慢。在图 4.5B 中, 当 NDA 浓度为 1.0 mmol/L 时, 2-ME 浓度增至 8.0 mmol/L 峰面积最大, 浓度超过 8 mmol/L 荧光强度反而下降。因为该衍生反应很快, 荧光产物分解也快, 在衍生试剂过量的情况下, 衍生反应表现为假一级反应动力学过程[26], 衍生反应和产物分解的速率加快, 导致荧光强度下降明显, 最大的荧光强度受到试剂浓度和反应时间的共同影响。

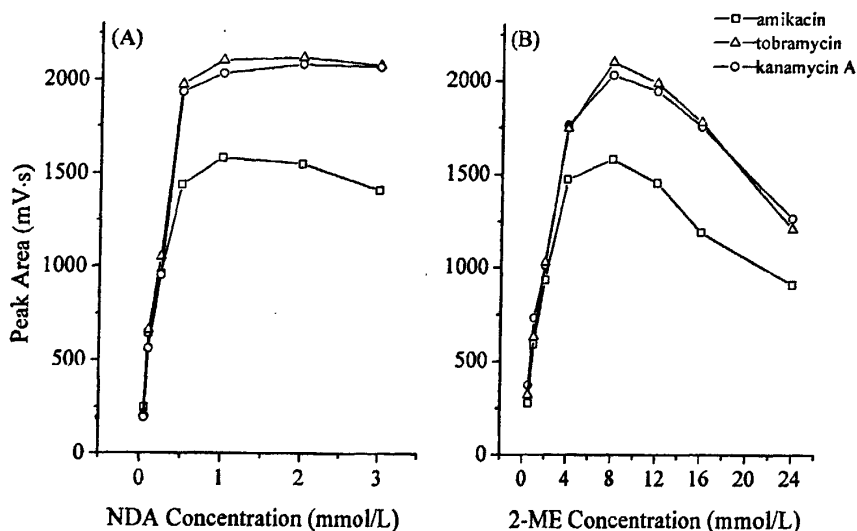


图 4.5 衍生试剂浓度对荧光强度的影响

Fig.4.5 Effect of derivatization reagent concentrations of NDA (A) and 2-ME (B) on fluorescence intensity. Experimental conditions: separation capillary, 54 cm \times 50 μ m i.d.; reaction capillary, 17 cm \times 75 μ m i.d.; separation buffer, 50 mmol/L sodium acetate (pH 5.0) containing 0.5 mmol/L CTAB; derivatization reagent, 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME, 35 mmol/L sodium tetraborate buffer (pH 10.0) in 30% (v/v) methanol; the concentration of each AG, 6.0×10^{-3} g/L; sample injection, 10 cm height difference between sample and derivatization reservoir for 10 s; separation voltage, -15 kV.

如前所述, pH 9.0 ~ 10.5 的碱性衍生溶液可以获得高的荧光强度, 在本柱后反应器中, 衍生试剂和分离缓冲液的流量之比为 1.5 : 1, 将 35 mmol/L 四硼酸钠盐缓冲液(pH 10.0)和 50 mmol/L 乙酸钠盐缓冲液(pH 5.0)按照 4 : 1 ~ 1 : 4 比例混合, 混合溶液的 pH 在 9.1 ~ 9.9 范围。因此, 本实验选择 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME, 35 mmol/L 四硼酸钠 (pH 10.0) 的 30% (v/v) 甲醇溶液作为衍生试剂。

4.3.4 分离条件

氨基糖苷类抗生素含有醇羟基, 在高 pH 条件下带负电荷, 能够用 CZE 分析 [21], 但是由于分离缓冲液离子强度大, 需要采用低电压分离。我们尝试采用 pH

11.5~12.5 的缓冲液分离三种卡那霉素, 分析时间较长达到 20~30 min, 而且分离度相对较小, 低于 1.0。另一方面, 氨基糖苷的氨基的 pK_a 值在 6.5~10.5 范围 [40], 由于氨基在酸性缓冲液中质子化, 带正电荷的氨基糖苷在低 pH 缓冲液中可用 CZE 分离; 而且, 通过加入 EOF 改性剂 CTAB, 毛细管管壁带正电荷, 对带正电荷氨基糖苷的吸附作用减弱, 由于氨基糖苷与 EOF 反向迁移, 分离度得以提高。

实验考察了乙酸钠盐缓冲液 pH 对卡那霉素类分离的影响, 见图 4.6。50 mmol/L 乙酸钠盐缓冲液, 在 pH 4.0~5.5 范围, 随着缓冲液 pH 从 5.5 降低到 4.0, EOF 减小, 而 EOF 与卡那霉素迁移方向相反, 分析时间延长, 迁移时间甚至超过 30 min, 相邻的卡那霉素 A 和阿米卡星的分离度也从 0.35 增大到 4.6, 但是三种卡那霉素的荧光强度变弱, 因为经过相同的反应距离所需的反应时间增加, 衍生物分解更多。实际样品中有一个较强的未知化合物, 在 pH 5.0 时能够与卡那霉素完全基线分离, 在 pH 4.5 时不完全分离, 而且在 pH 5.0 时具有较强的荧光信号和适宜的迁移时间, 因此选取 pH 5.0 作为下一步的工作。

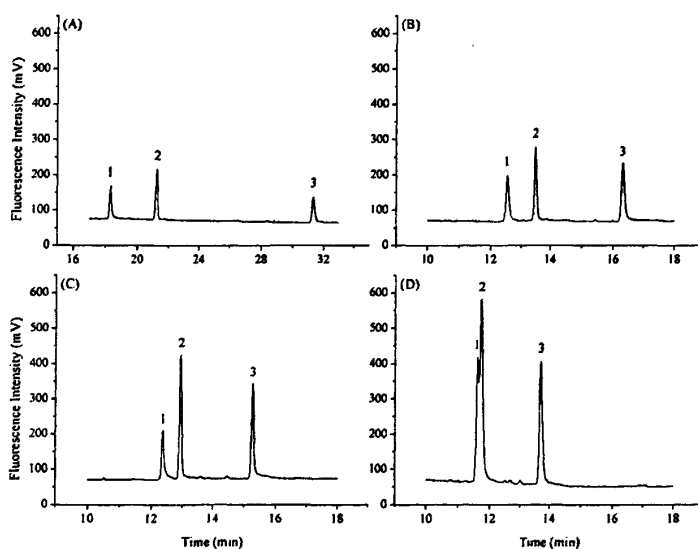


图 4.6 不同乙酸钠盐缓冲液 pH 的卡那霉素电泳谱图

Fig.4.6 Electropherograms of the AG standards with different pH buffers. 50 mmol/L acetate separation buffer at (A) pH 4.0, (B) pH 4.5, (C) pH 5.0 and (D) pH 5.5. Other conditions are the same as in Fig. 4.5. Peak identification: (1) amikacin, (2) kanamycin A and (3) tobramycin.

考察了乙酸钠盐缓冲液浓度对卡那霉素类分离的影响, 结果见图 4.7。在 25~100 mmol/L 范围改变浓度, 缓冲液浓度增加, 迁移时间从 14 min 增加到 17 min, 卡那霉素 A 和阿米卡星的分离度相应地从 1.4 增加为 1.7, 但是荧光强度略有下降, 50 mmol/L 和 100 mmol/L 乙酸钠缓冲液得到的卡那霉素平均荧光强度分别是 25 mmol/L 乙酸钠缓冲液的 86% 和 70%。因为离子强度增加, EOF 减小, 迁移速度减慢, 相应的反应时间增加。综合考虑卡那霉素类的分离度、迁移时间和荧光强度, 选择 50 mmol/L 乙酸盐 (pH 5.0) 作为电泳缓冲液。

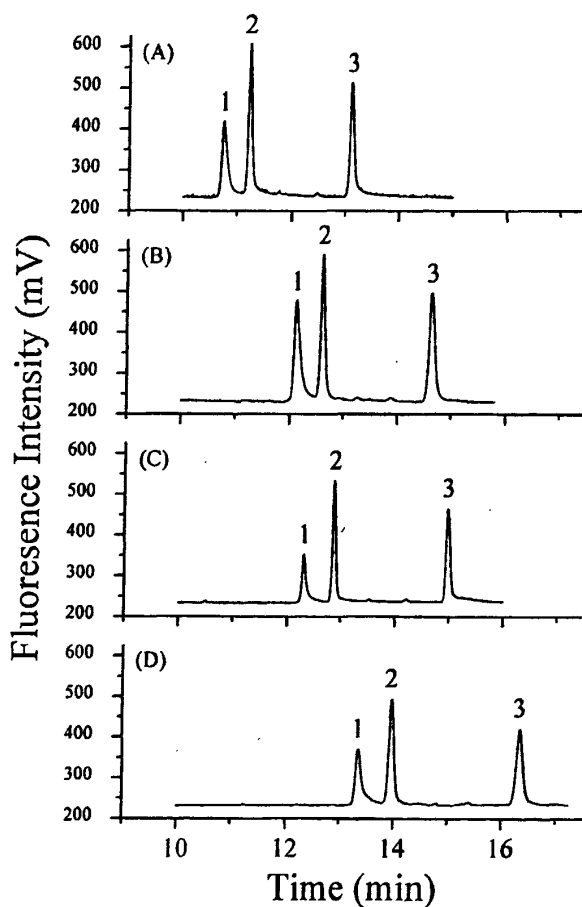


图 4.7 不同乙酸钠盐缓冲液浓度的卡那霉素电泳谱图

Fig.4.7 Electropherograms of the AG standards with acetate separation buffer (pH 5.0) at different concentrations: (A) 25 mmol/L, (B) 50 mmol/L, (C) 75 mmol/L and (D) 100 mmol/L. Other conditions are the same as in Fig. 4.5. Peak identification: (1) amikacin, (2) kanamycin A and (3) tobramycin.

4.3.5 分析方法的性能

方法的线性范围、回归方程、检出限和分离效率见表 4.1。采用 5 个浓度水平的混合标准液得到线性回归方程，相关系数 $r > 0.998$ 。在毛细管电泳分析方法中，浓度检出限(CLOD)和质量检出限(MLOD)分别为 3.6×10^{-5} g/L 和 0.09 pg，不如激光诱导荧光柱前衍生体系[23]，但优于其它非荧光检测方法，如 UV [11,13,15]和电化学检测法[18,19,21]。用 CE 测定卡那霉素几种方法性能的比较列于表 4.2。本法线性范围较宽，分离效率高，分离效率为 $2.0 \times 10^5 \sim 2.4 \times 10^5$ 理论塔板数。测试 6.0×10^{-3} g/L 的卡那霉素，迁移时间和峰面积的 RSD(n=5)分别低于 0.49%和 5.7% (日内差)、0.77%和 7.3% (日间差)。

表 4.1 卡那霉素类抗生素的回归方程、检出限和分离效率

卡那霉素	线性范围(g/L)	回归方程 ^(a)	检出限(LOD)		相对标准偏差 RSD% (n=4)	分离效率 (理论塔板数)
			CLOD ($\times 10^{-5}$ g/L)	MLOD (pg)		
阿米卡星	$1.6 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-2}$	$Y=1.32 \times 10^5 X+43$	5.2	0.13	5.7	2.0×10^5
卡那霉素 A	$1.1 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-2}$	$Y=2.94 \times 10^5 X-27$	3.6	0.09	4.8	2.4×10^5
妥布霉素	$1.3 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-2}$	$Y=2.89 \times 10^5 X-54$	4.2	0.10	5.2	2.1×10^5

注：(a) Y, 峰面积 peak area (mV·s); X, 样品浓度 analyte concentration (g/L)

表 4.2 CE 测定卡那霉素几种方法性能的比较^(a)

Detection method	AGs	Linear calibration range (g/L)	LOD (g/L)	Analysis time	Sample	Reference
UV, 200 nm	amikacin	0.1 – 0.5	0.08	8 min	drug formulations	[11]
	tobramycin	0.4 – 2.0	0.2			
	kanamycin A	0.4 – 2.0	0.2			
UV, 335 nm pre-column derivatization	kanamycin A	0.007 – 1.01	0.0003	15 min	commercial samples	[13]
	kanamycin B–D	0.003 – 0.1				
UV, 335 nm in-column derivatization	kanamycin A	0.07 – 0.84	0.0007	<20 min	commercial samples	[15]
	kanamycin B–D	0.003 – 0.04	0.001			
C ⁴ D, (stacking 25-fold)	tobramycin	1.0×10^{-4} – 3.0×10^{-3}	5.0×10^{-5}	450 s	serum	[18]
ED	kanamycin	1.0×10^{-6} – 1.0×10^{-3}	2.6	<20 min	raw kanamycin; urine	[19]
	amikacin	1.0×10^{-6} – 1.0×10^{-3} (mol/L)	5.0 (pg)			
ED	tobramycin	1.0×10^{-5} – 1.0×10^{-3}	1.7×10^{-6}	<20 min	injections; urine	[21]
	kanamycin A	8.0×10^{-6} – 1.0×10^{-3}	1.3×10^{-6}			
	amikacin	7.0×10^{-6} – 1.0×10^{-3} (mol/L)	1.2×10^{-6} (mol)			
LIF, pre-column derivatization	amikacin	0.005 – 0.1	0.0005	20.6 min	plasma	[22]
LIF, pre-column derivatization	kanamycin B	1.0×10^{-5} – 2.5×10^{-4}	3.0×10^{-6}	~20 min	milk	[23]
	amikacin	1.5×10^{-5} – 25×10^{-4}	4.5×10^{-6}			
LIF, post-column derivatization (Proposed method)	amikacin	1.6×10^{-4} – 5.0×10^{-2}	5.2×10^{-5}	<20 min	milk	
	kanamycin A	1.1×10^{-4} – 5.0×10^{-2}	3.6×10^{-5}			
	tobramycin	1.3×10^{-4} – 5.0×10^{-2}	4.2×10^{-5}			

Note: (a) Linear calibration ranges and LODs are obtained from aqueous standard solutions of AGs except those obtained from biologic matrix samples [22, 23].

4.3.6 实际样品的分析

为了评价采用柱后反应检测卡那霉素的方法,我们测定了牛奶和一些动物组织中这些卡那霉素的浓度,结果所有样品均未发现这些卡那霉素抗生素残留。欧洲医学署规定氨基糖苷类抗生素在牛奶以及动物脂肪、肌肉、肝脏等组织中的最大残留限(MRLs)为 1.0×10^{-4} ~ 5.0×10^{-4} g/kg (或 g/L),在肾脏中 MRLs 为 $1.0 \times$

10^{-3} g/kg。本法的 LODs 低于 MRLs，因而用于测定牛奶和动物组织的卡那霉素残留具有一定的可行性。

TCA 广泛地应用于牛奶和动物组织基体蛋白质的沉淀，减少基体干扰，而质子化的卡那霉素保留在上清液里。尽管蛋白质沉淀后溶液中还存在一些其它化合物，高效的分离和选择性的衍生方法能够有效的消除基体的干扰，避免了如固相萃取方法等繁琐和费时的预处理操作。与柱前衍生方法相比，含有酸性的 TCA 的样品溶液，其酸度在衍生之前可以不必调节为碱性。因此，可以采用 TCA 的简单预处理方法，如 4.2.4 节所述，分析牛奶和动物组织样品中的卡那霉素。

图 4.8 为牛奶样品、 6.0×10^{-4} g/L 的混合标准卡那霉素样品和含有 6.0×10^{-4} g/L 混合标准卡那霉素的牛奶样品的电泳谱图。图中可见，经过简单的样品处理，卡那霉素能够和牛奶中的基体杂质分离。

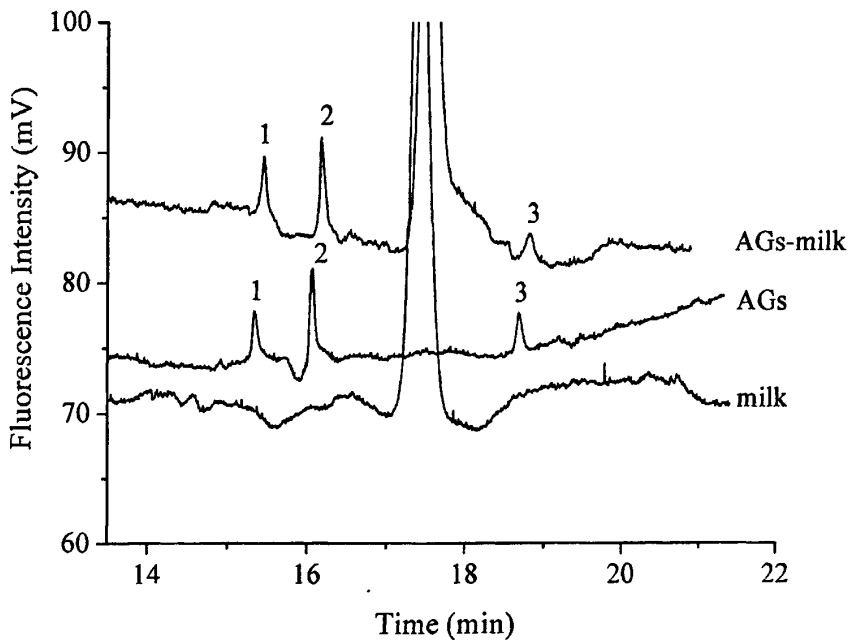


图 4.8 牛奶、标准卡那霉素和加标的牛奶样品的电泳谱图

Fig. 4.8 Electropherograms of milk, standard and milk sample spiked with 6.0×10^{-4} g/L each AG. Experimental conditions: separation capillary, 60 cm \times 50 μ m i.d.; reaction capillary, 19 cm \times 75 μ m i.d. Other conditions are the same as in Fig. 4.

考察了 6 个厂家共计 12 个批次的牛奶和奶粉样品，标准加入法定性样品峰，

结果均没有发现卡那霉素样品残留峰。考察了 2.0×10^{-4} g/L, 6.0×10^{-4} g/L 和 6.0×10^{-3} g/L 三个浓度水平的回收率,回收率在 81.6%~93.1%范围, RSDs 在 4.9%~8.9%范围, 见表 4.3 所示。

表 4.3 牛奶中卡那霉素不同浓度水平的回收率

卡那霉素	Level 1 ^(a)		Level 2 ^(b)		Level 3 ^(c)	
	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)
阿米卡星	87.5	7.8	91.4	5.7	91.7	4.9
卡那霉素 A	83.2	8.6	88.5	7.1	93.1	7.1
妥布霉素	81.6	8.9	90.8	7.8	92.2	5.9

注: (a) Spiked concentration of 2.0×10^{-4} g/L each AG.

(b) Spiked concentration of 6.0×10^{-4} g/L each AG.

(c) Spiked concentration of 6.0×10^{-3} g/L each AG.

图 4.9 为牛肉样品、 6.0×10^{-3} g/L 的混合标准卡那霉素样品和含有 6.0×10^{-3} g/L 混合标准卡那霉素的牛肉样品的电泳谱图。图中可见, 牛肉中的基体杂质没有干扰卡那霉素的分离测定。

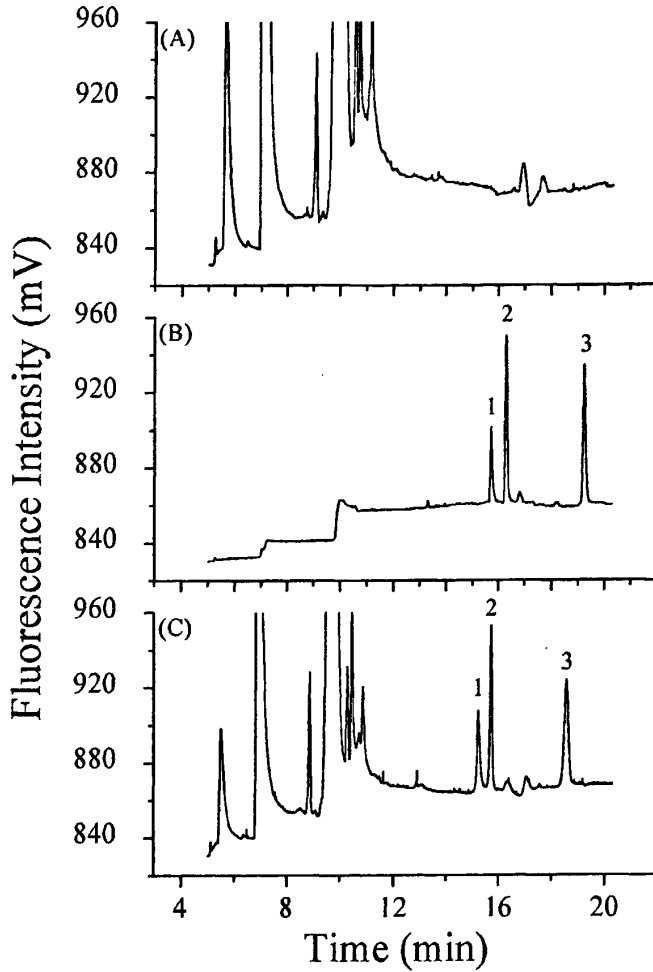


图 4.9 牛肉样品 (A)、卡那霉素类标准品 (B) 和加标牛肉样品 (C) 的电泳谱图

图注: 实验条件 (Experimental conditions): 分离毛细管 (separation capillary), 60 cm × 50 μm I.D.; 反应毛细管 (reaction capillary), 19 cm × 75 μm I.D.; 分离缓冲液 (separation buffer), 50 mmol/L 乙酸盐(sodium acetate)-0.5 mmol/L CTAB(pH 5.0); 衍生试剂(derivatization reagent), 1.0 mmol/L NDA, 8.0 mmol/L 2-ME, 35 mmol/L 四硼酸盐缓冲液(sodium tetraborate buffer)的 30% (methanol, v/v) 甲醇溶液 (pH 10.0); 卡那霉素类浓度(concentration of each kanamycin), 6×10^{-3} g/L; 进样(sample injection), 10 cm 高差(height difference), 10 s; 分离电压(separation voltage), -15 kV。1, 阿米卡星 (amikacin); 2, 卡那霉素 A (kanamycin A); 3 妥布霉素 (tobramycin)。

采用本法对牛肉、猪肉、鱼肉、鸡肉、鸡肾几种动物组织进行测定，标准加入法对样品峰定性，所有样品均未发现卡那霉素类抗生素残留。在牛肉样品中，加标法测定卡那霉素类抗生素回收率时，加入 6.0×10^{-4} g/L 和 6.0×10^{-3} g/L 浓度水平，回收率分别在 90.2%~93.6%和 92.9%~95.3%范围，RSD 分别小于 7.2%和 6.8% (n=4)，结果见表 4.4。

Table 4.4 牛肉中卡那霉素不同浓度水平的回收率

卡那霉素	Level 1 ^(a)		Level 2 ^(b)	
	回收率(%)	RSD (%)	回收率(%)	RSD (%)
阿米卡星	93.6	5.0	95.3	4.6
卡那霉素 A	91.3	6.2	93.1	5.5
妥布霉素	90.2	7.2	92.9	6.8

注：(a) Spiked concentration of 6.0×10^{-4} g/L each AG.

(b) Spiked concentration of 6.0×10^{-3} g/L each AG.

4.4 本章小结

本文提出一种毛细管电泳柱后衍生激光诱导荧光测定卡那霉素类抗生素方法。分离缓冲液和衍生基体溶液采用不同的缓冲体系，用乙酸钠盐缓冲液、反向电渗流和负高压分离卡那霉素类抗生素，再与衍生试剂萘二醛/2-巯基乙醇于 pH 10.0 缓冲液中反应后检测，避免了柱前衍生出现多重峰的现象。荧光衰减曲线研究表明，使用 5 mm 反应距离的共轴-间隙式柱后反应器适合于卡那霉素类抗生素的柱后测定。本方法测定卡那霉素类抗生素易于操作，具有较低检出限和宽线性范围，可用于食用动物组织中卡那霉素类抗生素残留测定。

参考文献

- [1] Hardman J G, Limbird L E (Eds.). 2001. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Ed. New York: McGraw-Hill, p. 1219.
- [2] Stead D A. 2000. J. Chromatogr. B 747:69-93.
- [3] Roets E, Adams E, Muriithi I G, et al. 1995. J. Chromatogr. A 696:131-138.

- [4] Preu M, Guyot D, Petz M. 1998. *J. Chromatogr. A* 818:95-108.
- [5] Serrano J M, Silva M. 2006. *J. Chromatogr. B* 843:20-24.
- [6] Guo M X, Wrisley L, Maygoo E. 2006. *Anal. Chim. Acta* 571:12-16.
- [7] Bogialli S, Curini R, Corcia Di A, et al. 2005. *J. Chromatogr. A* 1067:93-100.
- [8] Ackermans M T, Everaerts F M, Beekers J L. 1992. *J. Chromatogr.* 606:229-235.
- [9] Flurer C L. 1995. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13:809-816.
- [10] Wienen F, Holzgrabe U. 2003. *Electrophoresis* 24:2948-2957.
- [11] Yeh H H, Lin S J, Ko J Y, et al. 2005. *Electrophoresis* 26:947-953.
- [12] Kaale E, Leonard S, Van Schepdael A, et al. 2000. *J. Chromatogr. A* 895:67-79.
- [13] Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, et al. 2001. *J. Chromatogr. A* 924:451-458.
- [14] Kaale E, Van Goidsenhoven E, Van Schepdael A, et al. 2001. *Electrophoresis* 22:2746-2754.
- [15] Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, et al. 2003. *Electrophoresis* 24:1119-1125.
- [16] Yuan L L, Wei H P, Li S F Y. 2005. *Electrophoresis* 26:196-201.
- [17] Yuan L L, Wei H P, Feng H T, et al. 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 385:1575-1579.
- [18] Law W S, Kuban P, Yuan L L, et al. 2006. *Electrophoresis* 27:1932-1938.
- [19] Fang X M, Ye J N, Fang Y Z. 1996. *Anal. Chim. Acta* 329:49-55.
- [20] Voegel P D, Baldwin R P. 1997. *Electroanalysis* 9:1145-1151.
- [21] Yang W C, Yu A M, Chen H Y. 2001. *J. Chromatogr. A* 905:309-318.
- [22] Oguri S, Miki Y. 1996. *J. Chromatogr. B* 686:205-210.
- [23] Serrano J M, Silva M. 2006. *Electrophoresis* 27:4703-4710.
- [24] Nickerson B, Jorgenson J W. 1989. *J. Chromatogr.* 480:157.
- [25] Rose Jr D J, Jorgenson J W. 1988. *J. Chromatogr.* 447:117.
- [26] Albin M, Weinberger R, Sapp E, et al. 1991. *Anal. Chem.* 63:417.
- [27] Zhu R, Kok W T. 1995. *J. Chromatogr. A* 716:123-133.
- [28] Zhang L, Yeung E S. 1996. *J. Chromatogr. A* 734:331-337.
- [29] Oldenburg K E, Xi X, Sweedler J V. 1997. *Analyst* 122:1581.
- [30] Kostel K L, Lunte S M. 1997. *J. Chromatogr. B* 695:27-38.
- [31] Wei H, Li S F Y. 1998. *Anal. Chem.* 70:5097-5102.
- [32] Feltus A, Hentz N G, Daunert S. 2001. *J. Chromatogr. A* 918:381-392.
- [33] Rezenom Y H, Lancaster J M III, Pittman J L, et al. 2002. *Anal. Chem.* 74:1572-1577.
- [34] Ye M, Hu S, Quigley W W C, et al. 2004. *J. Chromatogr. A* 1022:201-206.
- [35] Ye M, Hu S, Schoenherr R M, et al. 2004. *Electrophoresis* 25:1319-1326.
- [36] Nirode W F, Staller T D, Cole R O, et al. 1998. *Anal. Chem.* 70:182-186.
- [37] Sieben V J, Backhouse C J. 2005. *Electrophoresis* 26:4729-4742.

- [38] Yu C Z, He Y Z, Han F, et al. 2007. *J. Chromatogr. A* 1171:133-139.
- [39] Perrin D D, Dempsey B. 1974. *Buffers for pH and Metal Ion Control*. 1st Ed. London: Chapman and Hall, Appendix II p. 156.
- [40] Kane R S, Glink P T, Chapman R G, et al. 2001. *Anal. Chem.* 73:4028-4036.

第五章 毛细管电泳激光诱导荧光无窗式检测

5.1 引言

毛细管电泳是一种高效的分离技术,广泛地应用于生物、化学、环境和医学领域。由于毛细管光程短和样品体积小,紫外-可见检测灵敏度往往不能令人满意,因此,灵敏的检测方法或预富集技术常常应用到毛细管电泳分析中[1]。另外,试图增加毛细管吸收光程也是一种途径,如采用矩形毛细管[2],Z形检测池[3,4],U形池[5,6],泡形池[7-9],套形池[10,11]等检测池,或采用轴向入射方式[12,13]增加吸收光程。荧光检测和UV检测相比是一种高灵敏的检测方法,荧光检测也是一种光学检测技术,遵从Lambert-Beer定律,但是荧光强度对光程的依赖性没有吸收检测的显得更为重要。另一方面,检测信号愈大或背景噪音愈小,检测器灵敏度愈高,因而通过提高检测信号或减小背景噪音也能够提高检测灵敏度。在荧光检测中,毛细管壁、光学器件和室内光线引起的杂散光是产生噪音水平的一个重要因素。用于柱后荧光检测器的鞘流池能出色地减少背景光的散射[14,15]。传统的在柱光学检测池如果管壁附着较多杂质,会产生很多的杂散光,噪音增大;另外管壁如有少量样品的吸附,产生基线漂移。在液相色谱系统中采用液滴作为无窗检测池[16],通过将激光束聚焦到液滴中心,防止激光散射进入光学检测器,可解决检测池的荧光散射多和荧光背景高的问题,和传统的光学检测池相比,液滴自身用作光学检测池。

无窗检测池拓宽了检测模式并满足了不同检测方法的需求[17-26]。但到目前为止,无窗检测还没有应用于CE。根据前人研究,无窗检测模式通常是可更新的液滴在柱端形成检测池,由于在电泳过程中需要在毛细管两端施加持续的高电压,设计没有检测窗的CE检测系统存在一定的困难,因为这种设计对毛细管的电接口具有较高的要求。文献曾报道采用很小距离($\sim 1\ \mu\text{m}$)的流体间隙在柱后电化学检测器用作紧密的电接口[27],以及采用更大的间隙(20-100 μm)作为激光诱导荧光柱后反应器接口[28-36],而且还通过毛细管间隙接口处电泳的成像分析描述了间隙接口的样品的传质行为[37]。尽管上述间隙接口是浸在溶液中,理论和实验似乎已经显示在间隙没有浸入溶液时,狭窄的液体间隙也具有进行持续的传质能力。

在设计间隙式无窗检测池时,准直两根毛细管是首要的考虑因素之一。由于在显微镜下准直两根毛细管操作繁琐耗时,用金属细线作为向导从毛细管内穿过可以有效地准直两根毛细管[28, 35],但是对于较长且内径较小的毛细管具有一

定的操作难度。一种塑料固定套圈和聚四氟乙烯管[29, 32], 多孔聚四氟乙烯管[31]和聚丙烯腈微透析膜[33]也相继精确地准直两根毛细管, 这些套管的内径与毛细管的外径愈匹配, 毛细管的准直精度愈高, 然而这些符合尺寸的细管或半透膜便不容易获得。聚酰亚胺涂层套管内径与毛细管石英尺寸非常匹配, 能够精确地准直两根毛细管[38]。

本文描述了一种采用液体间隙接口作为毛细管电泳激光诱导荧光无窗检测池。在准直的两根毛细管之间形成一个很小的间隙, 高电压电泳时在间隙处形成稳定的持续液流, 显微成像监测不同电压以及不同间隙距离对无窗池形状的影响, 并以具有天然荧光的黄素类化合物为样品比较了无窗式检测和在线检测的性能。

5.2 实验部分

5.2.1 仪器

1229 型毛细管电泳仪 (北京新技术应用研究所), 采用共线光学结构的自制激光诱导荧光检测系统[38], 25×物镜用 10×物镜 (重庆光电仪器有限公司) 代替, 其它光学器件未变。MBL-10 二极管泵浦固体激光器 (DPSSL, 473nm, 10mW, 长春新产业光电技术有限公司), GD-1 型微光测量仪 (西安瑞科电子设备有限公司) 和 N-2000 双通道色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所)。石英毛细管购自河北邯郸市鑫诺光纤色谱有限公司, 其中分离毛细管为 60 cm 60 × 50 μm I.D. × 365 μm O.D., 出口端毛细管为 20 cm × 50 μm I.D. × 365 μm O.D.。显微镜 (XSZ-G, 重庆光电仪器有限公司)。

5.2.2 试剂

黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)购自 Alfa Aeser (英国 Lancaster, A Johnson Matthey Company), 核黄素(RF)和其它所有试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯。黄素类化合物 RF、FMN 和 FAD 的化学结构见图 5.1。用去离子水 (合肥蓝蓝水业) 配制溶液。

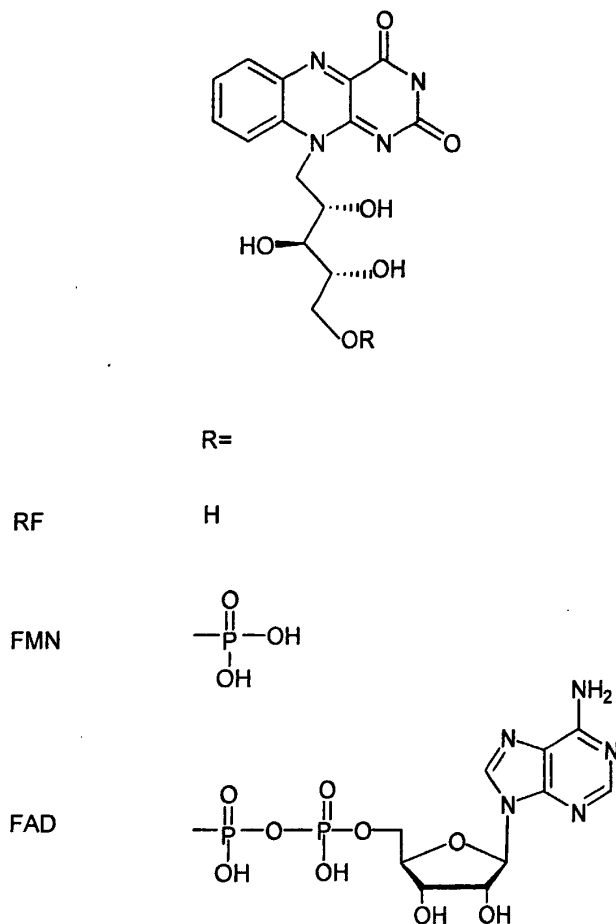


图 5.1 黄素类化合物的化学结构

1.0×10^{-4} mol/L 黄素类化合物标准贮备液于 4°C 保存, 混合标准液用水稀释而成。电泳工作溶液为 50 mmol/L 硼酸钠盐缓冲液 (pH 8.5), 使用前用 S-2200 超声清洗仪 (120 W, 35 kHz, 上海杰理科技有限公司) 脱气。

5.2.3 无窗池的制作

1.0 cm 长的聚酰亚胺涂层套的制作参见文献[38]。取两根毛细管, 在一端分别将其断面切割垂直光滑后, 分别截取 60 cm 和 20 cm, 将两根毛细管的平滑断面一端除去 0.6 cm 涂层, 再将两根毛细管将插入聚酰亚胺套, 在显微镜下仔细调节两管间隙距离 $\sim 140 \mu\text{m}$, 在距离间隙 0.6 cm 处用环氧树脂胶将两根毛细管平行固定在一个绝缘体上 (该绝缘体事先打孔以便光线通过), 待树脂胶完全固化后再将涂层套灼烧除去, 最后固定无窗检测池于三维调节平台。

5.2.4 电泳过程

每天使用前在两根毛细管的进样端和出口端依次用 0.1 mol/L 盐酸、水、0.1 mol/L 氢氧化钠和水清洗，最后用缓冲液平衡 10 min，两次电泳间歇用缓冲液冲洗 2 min，冲洗结束后除去间隙处的残留液滴。电泳时保持进样端缓冲液液面与出口端液面以及间隙窗口水平。高差 10 cm 进样 10s，电泳电压 15 kV。标准加入法确认样品峰。

5.2.5 无窗检测池成像

将无窗检测池置于显微镜下，以 50 mmol/L 硼酸钠盐溶液 (pH 8.5) 为分离缓冲液电泳，放大 100 倍 (目镜 10×，物镜 10×) 观察无窗检测池的形态，用 130 万像素手机 (K-Touch A933，北京天宇朗通通信设备有限责任公司) 数码成像。

5.2.6 样品处理

菠菜和莴苣样品购自超市，样品处理参照文献[39,40]。取少许菜叶，洗净晾干切细，称取 1.0 g 样品置于 15 ml 离心管，加入 3.8 ml 甲醇/二氯甲烷(9:10, v/v)，漩涡混合 1 min，再加入 0.1mol/L 乙酸铵(pH 6.0) 1.8 ml，漩涡 1 min，再于 3500 rpm 离心 20 min，取上清液，用 0.45 μm 滤膜过滤，滤液用蒸馏水稀释，或直接进样。操作过程尽量采取避光措施。

5.3 结果与讨论

5.3.1 在柱分离检测

在黄素类化合物具有天然荧光，最大荧光激发波长在 450 nm 附近，最大荧光发射波长~530 nm [41]。由于黄素类化合物的荧光强度受到 pH 的影响，为了获得较高的灵敏度，应避免使用 $\text{pH} \geq 10.0$ 的碱性背景溶液[42]。RF 的 pK_a 值为 10.2，FMN 和 FAD 的 pK_a 值分别为 1.3 和 6.5 [41]，因而可以利用它们带电荷数的不同进行分离。

因为硼砂和邻羟基基团可以形成硼砂复合物，提高了分离的选择性，所以实验中选择硼酸钠盐溶液作为分离缓冲液进行优化。先考察了 pH 对分离检测的影响，图 5.2 所示为 50 mmol/L 硼酸钠盐缓冲液 pH 分别为 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 时的电泳谱图。pH 8.0，FAD 出现了两个未分离的峰，可能是因为 FAD 的两个磷酸根

离子具有不同的电荷数，但是在 pH 9.0 和 9.5 时，分析物的荧光强度显著下降，而且分离时间也明显延长，黄素化合物在缓冲液 pH 8.5 均基线分离而且荧光强度较强。

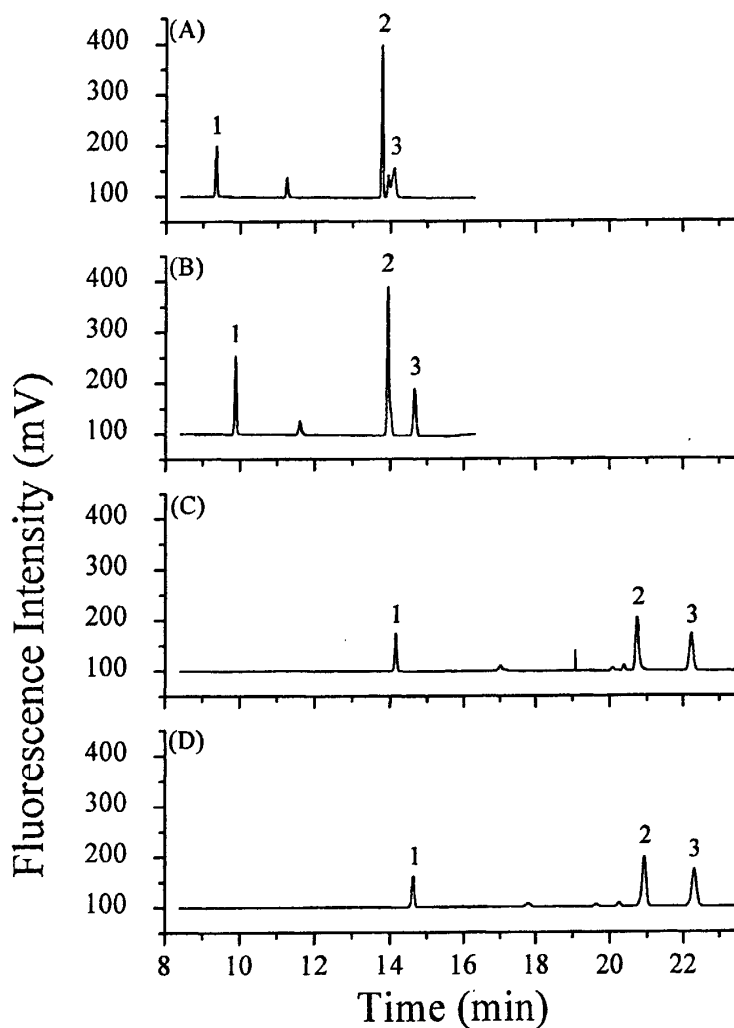


图 5.2 硼酸钠盐缓冲液 pH 对分离的影响

图注：其中(A) pH 8.0, (B) pH 8.5, (C) pH 9.0, (D) pH 9.5。实验条件：毛细管，75/18 cm \times 50 μ m I.D.；50 mmol/L 硼酸钠盐工作缓冲液；进样，10 cm, 10 s；分离电压，15 kV。样品：(1) 1.0×10^{-6} mol/L RF, (2) 5.0×10^{-6} mol/L FMN, (3) 5.0×10^{-6} mol/L FAD。

图 5.3 考察了硼酸钠盐缓冲液浓度对分离检测的影响。从图中看出, 20 mmol/L 浓度时, FAD 峰形展宽, 而且计算表明 FAD 和 FMN 峰的分离度仅仅为 1.0, 浓度为 80 mmol/L 时, 分离时间较长。因此, 本文选择 50 mmol/L (pH 8.5) 硼酸钠盐缓冲液作为电泳工作缓冲液。

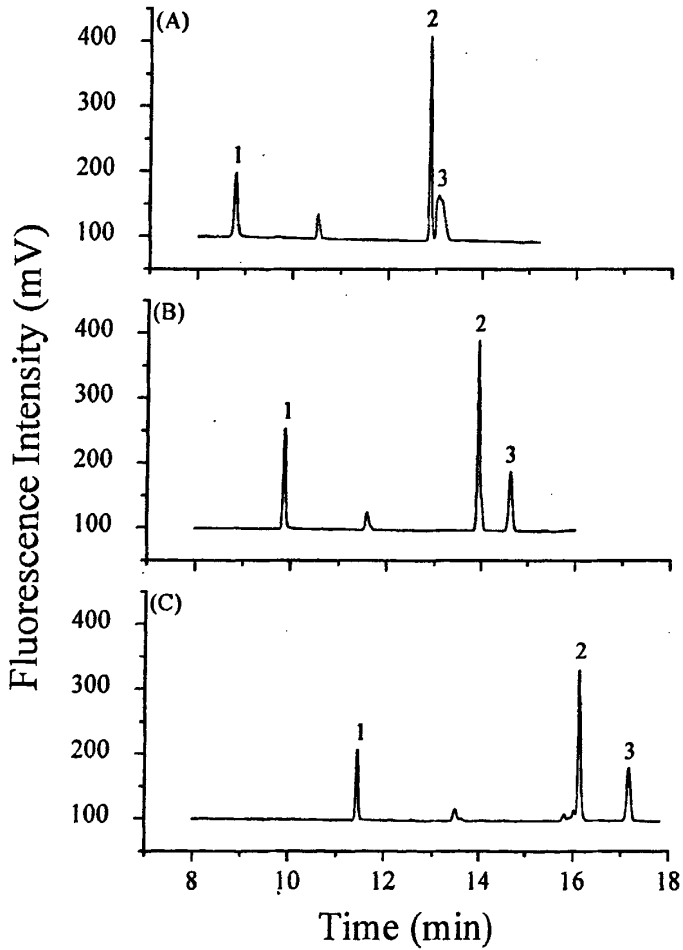


图 5.3 硼酸钠盐缓冲液浓度对分离的影响

图注: (A) 20 mmol/L, (B) 50 mmol/L, (C) 80 mmol/L, 硼酸钠盐工作缓冲液 (pH 8.5), 其它条件同图 5.2。

5.3.2 检测池实时成像

在液体间隙接口处的持续液流中, 荷电为 q 的带电粒子在场强为 \bar{E} 受到电场力 \bar{F} 的作用[37,43]

$$\bar{F} = \frac{q\bar{E}}{4\pi\epsilon r^2} \quad (5.1)$$

其中, ϵ 溶液的介电常数, \bar{r} 为力矩矢量。多个粒子受到的合力

$$\bar{F} = \sum \bar{F}_i = \frac{1}{4\pi\epsilon} \sum \frac{q_i \bar{E}_i}{r_i^2} \quad (5.2)$$

假设场强在液流中保持不变, 连续的荷电粒子受到的作用力可表示为

$$\bar{F} = \frac{\bar{E}}{4\pi\epsilon} \int \frac{dq}{r^2} \quad (5.3)$$

另一方面, 间隙处的液流还受到表面张力的作用, 间隙距离改变, 液体会形成不同曲率半径的曲面, 产生不同的表面张力。对于曲率半径为 R_1 和 R_2 的一个液面, 曲面的附加压强符合杨-拉普拉斯公式

$$p_s = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (5.4)$$

p_s 为表面压力, γ 表面张力系数。曲面面积 S 相应的受力 F 为

$$F = p_s S \quad (5.5)$$

曲面面积 S 可近似表示为

$$S = R_1 \theta_1 R_2 \theta_2 \quad (5.6)$$

其中 θ_1 、 θ_2 分别为曲面中曲率半径为 R_1 和 R_2 相对应的夹角弧度。因而曲面受到的压力

$$F = p_s S = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) R_1 \theta_1 R_2 \theta_2 = \gamma \theta_1 \theta_2 (R_1 + R_2) \quad (5.7)$$

当液体接口浸在溶液中时, 表面附加压力忽略不计, 浓度高的样品溶液会产生自由扩散, 扩散速率遵循爱因斯坦-布朗位移方程:

$$x = (2Dt)^{\frac{1}{2}} \quad (5.8)$$

其中 x 扩散距离, D 扩散系数, t 扩散时间。此时, 间隙接口的电泳行为如文献 [37] 所述。而本文采用液体接口作为无窗检测池时, 液体间隙接口处的液流自身重力忽略不计, 其受到的是电场力和表面张力共同作用结果, 当电场力 \bar{F} 和表面压力 F 相等, 即

$$\gamma\theta_1\theta_2(R_1 + R_2) = \frac{\bar{E}}{4\pi\epsilon} \int_{-r}^2 \frac{dq}{r} \quad (5.9)$$

此时, 可以获得稳定的持续液流。

基于上述分析, 间隙大小和工作电压对检测池的形成以及形状影响较大。太大的间隙导致表面张力过大, 使得液流难以在间隙处形成; 过高的电压也容易造成液流扩散到间隙之外, 样品在间隙外壁产生残留出现严重的拖尾现象。由公式 (5.9) 可知, 随着电场的增加, 曲率半径随之增大, 检测池的形状由凹圆体转为圆柱体, 甚至成为凸圆体。

本文制作了间隙距离分别为 80, 100 和 140 μm 的无窗检测池, 先观测无窗池在不同电压电泳时的形态, 并在显微镜下数码成像, 如图 5.4 所示。图中可见, 间隙距离一定, 随着电压的增大, 液流扩大, 检测池光学路径变长; 电泳电压一定, 随着间隙距离的增大, 液流中段凹陷明显增强, 检测池光学路径变短。无窗池间隙取 80 μm , 在工作电压高于 6 kV 时, 即能形成稳定的液流, 但电压达到 20 kV, 液流会扩散到间隙之外, 形成不稳定的液泡, 检测时基线不稳定, 而且样品出现较大的拖尾峰。当间隙为 100 或 140 μm 时, 在 20 kV 电压, 液流的形状如同毛细管外径大小的液柱, 电泳时间超过数分钟, 液柱有时甚至会进一步形成液泡; 液流在高于 8 kV 电压下就能持续存在而不中断。其中间隙为 140 μm 时, 在 15 kV 电压下通电 4~5 s 即可形成持续的液流, 进而形成稳定的无窗液流池, 该液流池在断电 32~34 s 后中断并逐渐消失。间隙距离在 150 μm 以上, 当电压低于 18 kV 时, 液流不易形成, 或者在开始加压时在间隙处容易引入气泡。综合考虑液流 (检测池) 的光程和稳定性, 本文选择 140 μm 的间隙距离。

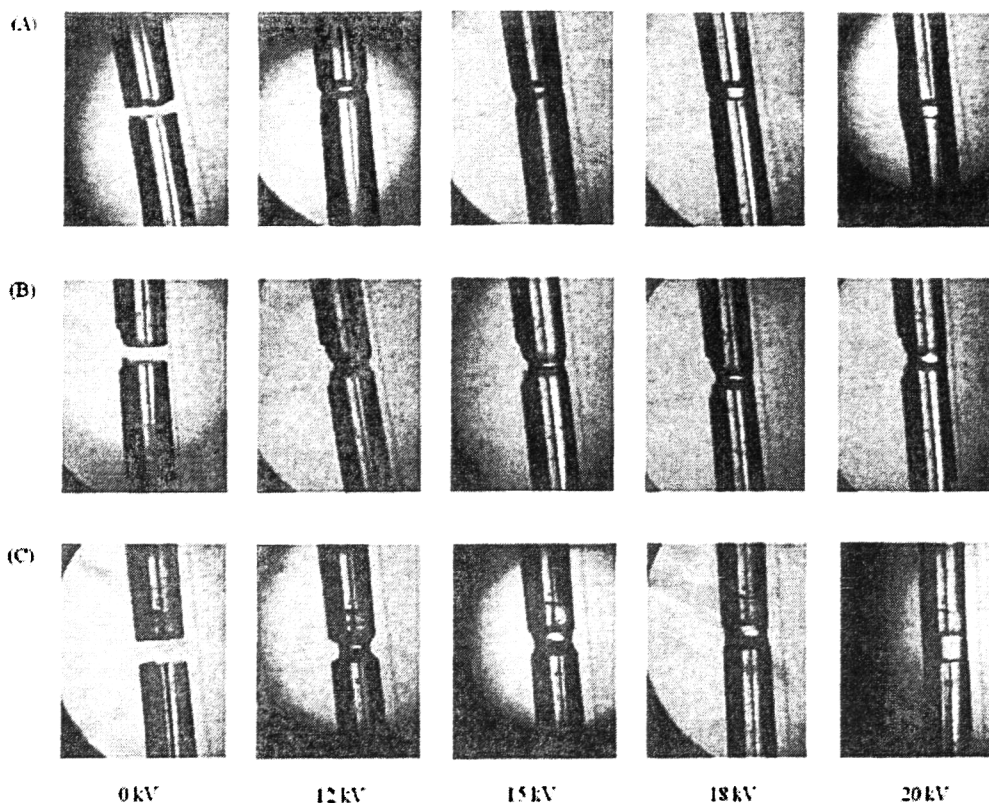


图 5.4 电泳中的不同间隙距离的无窗池：(A) 80 μm (B) 100 μm (C) 140 μm

注：电泳缓冲液, 50 mmol/L 硼酸钠盐缓冲液(pH 8.5)。

5.3.3 电压对检测池的影响

一定的间隙距离, 液体在间隙距离之间形成的曲面, 如果液体曲面的表面压力不同, 则曲率半径不同。公式 (5.9) 表明, 通过改变电场强度来改变电场力, 进而改变液体的表面压力, 因而可以形成不同曲率半径的曲面, 即得到不同尺寸的检测光程, 如图 5.4 所示。本文选择 140 μm 间隙距离的无窗检测池, 考察了电泳工作电压对电泳谱图的影响, 结果见图 5.5。随着电场增强, 电渗流增大, 完成样品分析时间由 12 kV 时的 22 min 缩减到 18 kV 时的 15 min。12 kV 的平均样品峰面积约为 15 kV 的 85%, 而 18 kV 的平均样品峰面积约为 15 kV 的 110%, 其中 FAD 的峰面积随电压的变化不大, 小于 5%。从图 5.4 可知, 检测池的光程随电压的提高而增加, 荧光信号增强, 但变化趋势逐渐减弱。FAD 荷电相对较多, 因为场强相对于电荷而言, 对电场力的影响较小, 荧光强度的变化也较少。然而在 18 kV, 基线有时出现较大波动, 特别在每次的电泳初始阶段。在 15 kV 电泳基线总体较为平稳, 故而采用 15 kV 作为无窗式检测池的电泳工作电压。

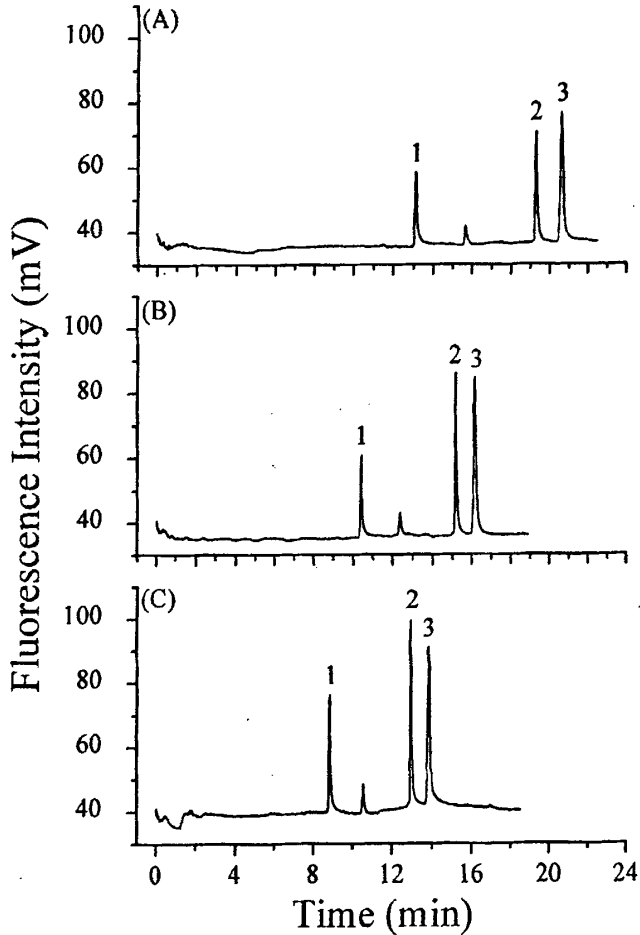


图 5.5 不同电压无窗池电泳谱图: (A) 12 kV (B) 15 kV (C) 18 kV

图注: 实验条件: 毛细管, 80/20 cm \times 50 μ m I.D.; 工作缓冲液, 50 mmol/L 硼酸钠盐缓冲液 (pH 8.5); 进样, 10 cm, 10 s。样品: (1) 1.0×10^{-7} mol/L RF, (2) 5.0×10^{-7} mol/L FMN, (3) 5.0×10^{-7} mol/L FAD。

5.3.4 线性范围和检出限

采用在柱检测, 黄素类化合物 (1×10^{-6} mol/L RF, 5×10^{-6} mol/L FMN/FAD) 的迁移时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD, $n=5$) 分别低于 1.4% 和 2.8% (日内差), 1.9% 和 4.3% (日间差)。其线性范围、检出限 ($S/N=3$) 和分离效率列于表 5.1。采

用无窗式检测, 以 1×10^{-7} mol/L RF 和 5×10^{-7} mol/L FMN/FAD 的标准样品, RF、FMN 和 FAD 峰面积的 RSD ($n=5$) 分别为 3.7%、4.2% 和 5.8%。RF 的线性范围为 $5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L, FMN 和 FAD 的线性范围为 $3.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-6}$ mol/L, 线性响应范围略小于在柱检测; 相关系数为 0.998~0.999, 和在柱检测相当; 斜率比在柱检测大, 显示荧光信号随浓度的变化更为灵敏。采用无窗池检测, 由于没有经过石英池壁的光折射, 荧光信号不仅增强, 而且背景噪音降低, 无窗池检测的噪音约为在柱检测的二分之一。RF 的检出限为 1.2×10^{-9} mol/L, FMN 和 FAD 检出限均为 7.0×10^{-9} mol/L, RF、FMN 和 FAD 的检测灵敏度分别为在柱检测的 15、6 和 9 倍。无窗检测由于样品在检测池处产生较大的径向扩散, 分离效率相对在柱检测明显下降, 但是也超过 1.0×10^5 理论塔板数, FMN 的柱效甚至达到 2.4×10^5 理论塔板数。

表 5.1 无窗式检测和在柱检测的性能比较

Flavins	Linear range		slope		LOD		Column efficiency ^(a)	
	(mol/L)		[mV·s / (nmol/L)]		($\times 10^{-8}$ mol/L)		($\times 10^5$ plates)	
	on-column	windowless	on-column	windowless	on-column	windowless	on-column	windowless
RF	$7.0 \times 10^{-8} \sim 2.0 \times 10^{-5}$	$5.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-6}$	0.41	1.5	1.8	0.12	2.2	1.1
FMN	$1.5 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-6}$	0.31	0.65	4.2	0.7	3.7	2.4
FAD	$2.5 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-6}$	0.24	1.0	6.5	0.7	1.8	1.0

表注: (a) 在柱检测的样品为 1×10^{-6} mol/L RF, 5×10^{-6} mol/L FMN/FAD; 无窗检测的样品为 1×10^{-7} mol/L RF, 5×10^{-7} mol/L FMN/FAD。

5.3.5 实际样品分析

图 5.6 为无窗检测的实际样品电泳谱图。样品按照 (5.2.6) 小节处理, 滤液用去离子水稀释 5 倍, 标准加入法确定样品峰。莼苣叶样品组分中检测到的荧光物质主要为 RF、FMN 和 FAD 三种黄素类化合物, 其它荧光化合物较少而且荧光强度很弱, 谱图基线平稳。用校正曲线法测定 RF、FMN 和 FAD 的含量, 结果分别为 $4.50 \pm 0.19 \times 10^{-10}$ mol/g、 $1.87 \pm 0.08 \times 10^{-9}$ mol/g 和 $2.16 \pm 0.14 \times 10^{-9}$ mol/g, RSD ($n=3$) 在 3.7%~5.8% 范围。含量测定结果和回收率见表 5.2。

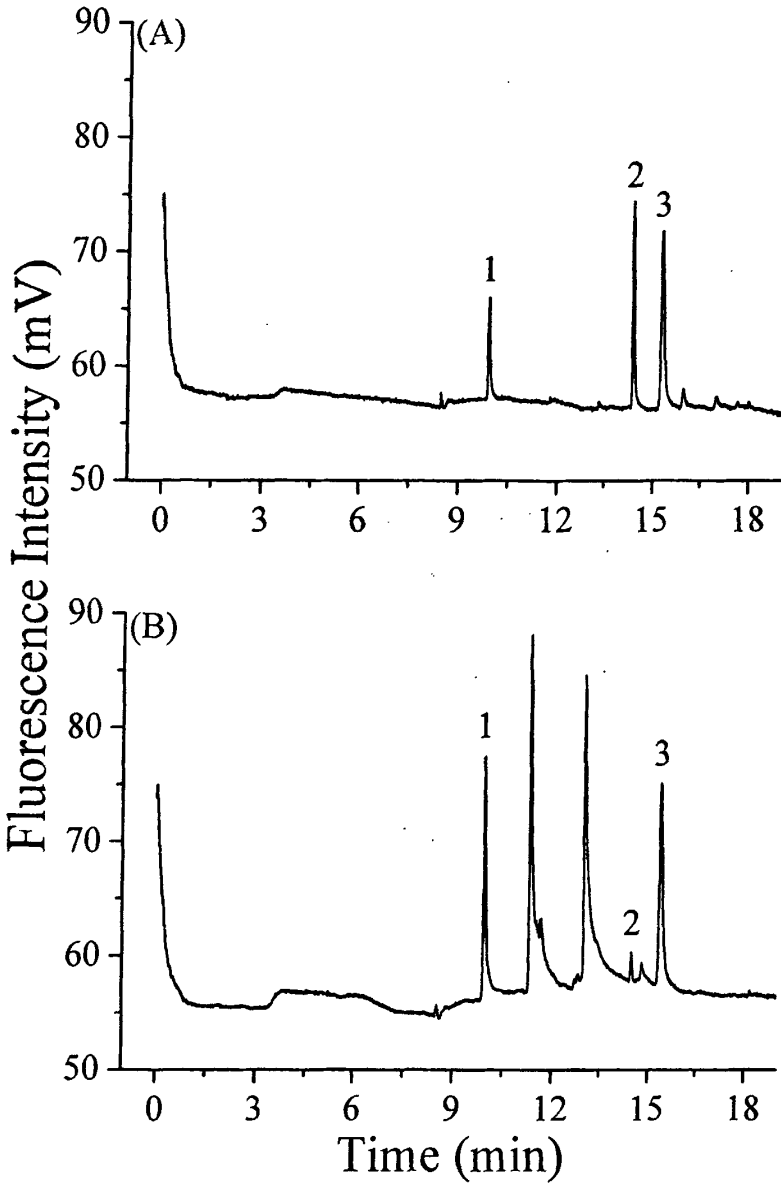


图 5.6 无窗检测的样品电泳谱图：(A) 莒荳叶 (B) 菠菜

图注：实验条件同图 5.5B。

表 5.2 样品中黄素类化合物的含量及回收率

样品	含量($\times 10^{-9}$ mol/g)	RSD% (n=3)	回收率(%)	RSD% (n=3)	
RF	0.45 \pm 0.02	4.2	98.6	4.7	
莴苣叶	FMN	1.87 \pm 0.08	4.3	101.4	5.0
	FAD	2.16 \pm 0.14	6.4	97.1	5.5
RF	1.42 \pm 0.05	3.7	97.3	5.3	
菠菜	FMN	0.29 \pm 0.01	4.8	96.9	6.0
	FAD	2.66 \pm 0.16	5.8	98.9	4.9

菠菜中检测到的 RF 和 FAD 两种黄素类化合物含量较高, 分别为 $1.42 \pm 0.05 \times 10^{-9}$ mol/g 和 $2.66 \pm 0.16 \times 10^{-9}$ mol/g。另外, 菠菜样品中还有两种未知的具有高荧光强度的化合物。从实际样品电泳谱图中还可发现, 在 RF 之前有一个很弱的分析物峰, 从电泳分离的机理可知此化合物在分离缓冲液中带正电荷, 即该化合物可能存在含氮原子的基团, 或许这也是一个令人感兴趣的具有生物活性的化合物。

5.4 本章小结

本文描述了一种毛细管电泳激光诱导荧光无窗式检测方法。利用聚酰亚胺涂层套准直毛细管制作了无窗检测池, 利用显微成像监测检测池间隙距离和电泳分离电压对无窗检测池外形的影响, 考察了分离电压对荧光检测信号的影响, 实验验证了从理论上分析无窗检测池的可行性。在优化的实验条件下, 用三种黄素类化合物比较了无窗式检测和在柱检测的性能, 结果表明采用无窗检测池, 荧光信号增强, 背景噪音减小, 检出限降低, 其中 RF 的检测灵敏度甚至提高了 15 倍。线性范围也达到两个数量级, 而且相关性很好。无窗检测相对于在柱检测, 分离效率明显下降, 但是理论塔板数也达到 1.0×10^5 以上, 基本保留了毛细管电泳高效分离的优点。无窗式检测方法成功测定了实际样品菠菜和莴苣叶中 RF、FMN 和 FAD 的含量。鉴于无窗检测池易于制作, 没有在柱检测管壁出现吸附污染的缺点, 无窗式检测方法在毛细管电泳分析中具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] Hempel G. 2000. *Electrophoresis* 21:691-698.
- [2] Tsuda T, Sweedler JV, Zare RN. 1990. *Anal. Chem.* 62:2149-2152.
- [3] Chervet JP, Van Soest REJ, Ursem M. 1991. *J. Chromatogr.* 543: 439-449.
- [4] Moring SE, Reel RT, Van Soest REJ. 1993. *Anal. Chem.* 65: 3454-3459.
- [5] Bruin GJM, Stegeman G, Van Asten AC, et al. 1991. *J. Chromatogr.* 559:163-81.
- [6] Liang Z, Chiem N, Ocvirk G, et al. 1996. *Anal. Chem.* 68:1040-046.
- [7] Hewlett-Packard Company. 1993. *Peak* 2:11.
- [8] Xue Y, Yeung ES. 1994. *Anal. Chem.* 66:3575-3580.
- [9] Tseng WL, Lin YW, Chen KC, et al. 2002. *Electrophoresis* 23:2477-2484.
- [10] Djordjevic NM, Widder M, Kuhn R. 1997. *J. High Resolut. Chromatogr.* 20:189-192.
- [11] Lord GA, Gordon DB, Myers P, et al. 1997. *J. Chromatogr. A* 768:9-16.
- [12] Xue Y, Yeung ES. 1993. *Anal. Chem.* 65:1988-1993.
- [13] Xue Y, Yeung ES. 1993. *Anal. Chem.* 65:2923-2927.
- [14] Wu S, Dovichi NJ. 1989. *J. Chromatogr.* 480:141-155.
- [15] Chen DY, Swerdlow HP, Harke HR, et al. 1991. *J. Chromatogr.* 559:237-246.
- [16] Diebold GJ, Zare RN. 1977. *Science* 196:1439-1441.
- [17] Liu H, Dasgupta PK. 1997. *Microchemical J.* 57:127-136.
- [18] Miller KE, Synovec RE. 2000. *Talanta* 51:921-933.
- [19] Liu H, Dasgupta PK. 1995. *Anal. Chem.* 67:4221-4228.
- [20] Liu H, Dasgupta PK. 1996. *Anal. Chim. Acta* 326:13-22.
- [21] Cabalin LM, Ruperez A, Laserna JJ. 1996. *Anal. Chim. Acta* 318:203-210.
- [22] Yang RH, Wang KM, Xiao D, et al. 2000. *Analyst* 125:877-882.
- [23] Yang RH, Wang KM, Xiao D, et al. 2001. *Anal. Chim. Acta* 432:135-141.
- [24] Feng F, Wang K, Chen Z, et al. 2004. *Anal. Chim. Acta.* 527:187-193.
- [25] Chen PC, Joyner CC, Patrick ST, et al. 2003. *Anal. Chem.* 75:3066-3072.
- [26] Xu J, Yang BC, Tian HZ, et al. 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384:1590-1593.
- [27] Cassidy RM, Lu W, Tse VP. 1994. *Anal. Chem.* 66:2578-2583.
- [28] Pentoney Jr SL, Huang X, Burgi DS, et al. 1988. *Anal. Chem.* 60:2625-2629.
- [29] Albin M, Weinberger R, Sapp E, et al. 1991. *Anal. Chem.* 63:417-422.
- [30] Emmer A, Roeraade J. 1994. *Chromatographia* 39:271-278.
- [31] Zhu R, Kok WT. 1995. *J. Chromatogr. A* 716:123-133.
- [32] Abler JK, Reddy KR, Lee CS. 1997. *J. Chromatogr. A* 759:139-147.

- [33] Kostel KL, Lunte SM. 1997. *J. Chromatogr. B* 695:27-38.
- [34] Wei H, Li SFY. 1998. *Anal. Chem.* 70:5097-5102.
- [35] Hardy S, Jones P, Riviello JM, et al. 1999. *J. Chromatogr. A* 834:309-320.
- [36] Rezenom YH, Lancaster III JM, Pittman JL, et al. 2002. *Anal. Chem.* 74:1572-1577.
- [37] Kuhr WG, Licklider L, Amankwa L. 1993. *Anal. Chem.* 65:277-282.
- [38] Yu CZ, He YZ, Han F, et al. 2007. *J. Chromatogr. A* 1171:133-139.
- [39] Gliszczynska-Swiglo A, Koziolowa A. 2000. *J. Chromatogr. A* 881:285-297.
- [40] Cataldi TRI, Nardiello D, Carrara V, et al. 2003. *Food Chemistry.* 82:309-314.
- [41] Cataldi TRI, Nardiello D, De Benedetto GE, et al. 2002. *J. Chromatogr. A* 968:229-239.
- [42] Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Sanz A, et al. 2001. *Electrophoresis* 22:1170-1174.
- [43] Alonso M, Finn EJ. 1967. *Fundamental University Physics.* Menlo Park, CA:Addison-Wesley, p. 442-446.

全文总结

在国家自然科学基金和学校重点项目基金的资助下,本课题对毛细管电泳激光诱导荧光检测技术进行了深入研究。研制了简单、低廉的毛细管电泳激光诱导荧光检测系统,在此基础上,发展了一种简单易制的 CE-LIF 柱后反应器,并应用于牛奶和动物样品中卡那霉素类抗生素残留的分析检测,设计了衍生反应池的加压及冲洗装置,从而解决了柱后衍生反应通道堵塞的问题。另外还提出 CE 无窗式检测的新方法。本论文通过深入的理论研究和实验分析,得出了如下的结论:

1、采用共线型光学结构组装了一台毛细管电泳激光诱导荧光检测系统。利用核黄素作为分析样品,对影响系统检测性能的光学器件如光阑孔径、光电倍增管的工作电压条件进行了优化。核黄素的浓度检出限达到 9.0×10^{-9} mol/L (3.4×10^{-6} g/L),质量检出限为 18 amol,在 $3.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内成良好的线性关系,方法的相对标准偏差(RSD)为 2.4%。

2、共轴一间隙柱后反应器可以完成毛细管电泳激光诱导荧光检测柱后反应的要求。该反应器结构简单,易于制作,无需显微操作,可以采用短的反应距离适用于快速不稳定的衍生反应。在毛细管电泳分析中,毛细管的准直耦合以及在柱试剂引入方面将会具有广泛的应用前景。采用毛细管聚酰亚胺涂层套对接和准直分离管和反应管,衍生试剂从涂层套和分离管之间的环隙,以及两根毛细管之间的间隙引入反应管中,实现高效分离和快速衍生于一体。另外,设计的衍生反应池的加压及冲洗装置,解决了柱后衍生反应通道堵塞的问题。氨基酸的检出限为 $8 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L,在两个多数量级范围成线性关系,分离效率 $1.35 \times 10^5 \sim 1.67 \times 10^5$ 理论塔板数,并成功地应用于香醋样品中的游离氨基酸的测定。

3、毛细管电泳激光诱导荧光柱后衍生方法用于测定卡那霉素类抗生素,适用于牛奶和动物组织中的卡那霉素类抗生素残留的测定。利用共轴一间隙柱后反应器,以酸性乙酸钠盐缓冲液,在反向电渗流和负高压下分离卡那霉素类抗生素,再与衍生试剂于碱性硼酸钠盐缓冲液中柱后衍生,激光诱导荧光检测。该柱后反应衍生方法避免了分离缓冲液和衍生缓冲液两种不同缓冲体系的相互干扰,避免了柱前衍生出现的多重标记现象,提高了分离度和检测灵敏度。氨基糖苷的检出

限为 $3.6 \times 10^{-5} \sim 5.2 \times 10^{-5}$ g/L, 线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ g/L。该法用于牛奶和动物组织中的卡那霉素类抗生素残留的测定, 回收率为 81.6%~95.3% (n=4)。

4、利用聚酰亚胺涂层套准直毛细管制作了无窗检测池, 提出一种毛细管电泳激光诱导荧光无窗式检测方法。利用显微成像监测检测池间隙距离和电泳分离电压对无窗检测池外形的影响, 考察了分离电压对荧光检测信号的影响, 理论分析和实验验证了进行无窗检测的方法可行性。在优化的实验条件下, 比较了无窗式检测和在线检测的性能, 结果表明采用无窗检测池, 荧光信号增强, 背景噪音减小, 检出限降低, 其中核黄素的检测灵敏度甚至提高了 15 倍。线性范围达到两个数量级, 无窗检测分离效率为 $1.0 \times 10^5 \sim 2.4 \times 10^5$ 理论塔板数, RSD (n=5) 在 3.7~5.8% 范围。无窗式检测方法成功测定了实际样品菠菜和莴苣叶中三种黄素类化合物的含量。鉴于无窗检测池易于制作, 没有在线检测管壁出现吸附污染的缺点, 无窗式检测方法在毛细管电泳分析中具有一定的应用价值。

致 谢

本论文是在导师何友昭教授的严格要求和悉心指导下完成的。何老师深厚扎实的学术功底、严谨求是的治学态度、诲人不倦的学者风范，使我终身受益。何老师在科研方面对我的论文选题、方案设计和论文成文等方面给予了全面指导，在生活方面对我也倍加关心。在此，谨向何老师致以最衷心的感谢。

感谢滄五二老师和化学物理系的张立敏教授对我的实验工作提出宝贵的建议，感谢安徽中医学院的马凤余老师、谢晓梅老师在我学习和生活上给予我的关心、帮助和鼓励，感谢苏庆德教授、邵学广教授等所有教诲和帮助过我的老师。

感谢本实验室的邓宁、许庆平、王蕾、胡艳云、张召香、王晓葵、钱立立、付国妮、韩芳、李连、谢海洋、高勇、凌姐思等同学给予了我极大的帮助和支持，也感谢其他同学和朋友，是他们陪我度过了在科大最令人难忘的岁月。

感谢我的家人，特别感谢我的岳父岳母和爱人，在我求学期间他们对我生活上的关心和精神上的激励，让我不断地克服困难，向前迈进，没有他们的支持，论文的完成是不可想象的。感谢我的儿子，他的聪明可爱给我紧张的生活带来了轻松和快乐。他们永远是我前进的动力和精神支柱。

最后，向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、亲人和朋友致以深深的感谢和崇高的敬意。

余长柱

2008年4月29日于中国科学技术大学

博士期间完成的论文

1. **Chang-Zhu Yu**, You-Zhao He, Fang Han, Guo-Ni Fu, Post-column reactor of coaxial-gap mode for laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2007, 1171: 133-139.
2. **Chang-Zhu Yu**, You-Zhao He, Guo-Ni Fu, Hai-Yang Xie, Wu-Er Gan, Determination of amikacin kanamycin A, and tobramycin in milk by capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. (*J. Chromatogr. B*, revised)
3. 余长柱, 何友昭, 李连, 韩芳, 淦五二, 毛细管电泳柱后衍生激光诱导荧光检测肉制品中卡那霉素同系物抗生素残留 (分析化学, 已录用)
4. **Chang-Zhu Yu**, You-Zhao He, Hai-Yang Xie, Lian Li, Wu-Er Gan. Windowless detection with laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.
5. Fang Han, You-Zhao He, **Chang-Zhu Yu**. On-line pretreatment and determination of parabens in cosmetic products by combination of flow injection analysis, solid phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. *Talanta* 2008, 74: 1371-1377.
6. Guo-Ni Fu, You-Zhao He, **Chang-Zhu Yu**. Automated On-line Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Preconcentration and Determination of Carbamate Pesticide Residues in Vegetables by Electrokinetic Flow Analysis System. (submitted)