

文章编号:1000-582x(2000)04-0149-05

·研究综述·

749-153

毛细管电泳的进样方法及其应用

孙冠芸, 夏之宁, 杨玉书

(重庆大学 环境与化学化工学院, 重庆 400044)

摘要:对毛细管电泳的电动力、流体力学进样等方法进行了综述,包括这些方法的原理、仪器技术及应用,并且评价了它们各自的特点。对一些最新的进样技术,例如组分无歧视电渗流动力进样等进行了重点介绍与展望。引用文献31篇。

关键词:进样; 毛细管电泳; 电渗; 微区

中图分类号: O 646.54

文献标识码: A

0552.921

毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)从八十年代发展至今以其高效的分离性能倍受人们关注,已成为分析化学大家族的重要成员。该技术在发展的早期,使用的毛细管内径较大;并且研究对象较为普通,对进样的要求不高。为了提高分离效率,人们采用了内径更小的分离毛细管,所以进样量也相对减少,最小可达纳升(nl)级。这固然可以满足分析微量试样的要求,但也就给进样技术提出了更高的要求。首先要求准确度高,即进样量的大小要控制准确;同时要求重现性好,分析同一样品时,每次所进入的样品量要相等,使相对偏差尽量小;还要求进入毛细管的样品组成要与原样品一致,避免样品失真。计算机自动控制进样在某些方面可以部分满足进样的要求,是进样技术的发展和进步必不可少的手段。毛细管电泳所需样品量少,分离毛细管一端可直接作为进样端,且其分离效率高,分析范围广,速度快,可实现在线分析,为一些较复杂的微区环境分析提供了一个很好的分析手段。

按照进样所采用的动力原理分类,常用的进样方式有:虹吸进样,压力进样,真空进样和电动力进样。早期采用的还有使用微量注射器通过进样阀将样品注入毛细管顶端的方法,但由于该方法存在死体积和泄漏等问题,并且只能用于内径大于100 μm的毛细管,目前采用这一方法的报道已很少。除了常规进样方法,另外一些进样方法有如电渗驱动流体动力进

样^[1],电分流进样^[2],以及扩散进样^[3]等。针对毛细管电泳进样量少、毛细管的一端即为进样口、分离效率高、分析范围广等特性,可将其运用到一些微区的现场在线分析,例如目前应用较多的单个细胞的分析^[4-10]和电化学扩散层微区分析。

1 进样误差

毛细管区带电泳组分区带的展宽是影响分离度的重要因素,其总方差(σ^2)为: $\sigma^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_{heat}^2$,式中 σ_{inj}^2 , σ_{det}^2 , σ_{dif}^2 , σ_{heat}^2 分别为进样区带长度、检测窗宽度、扩散和焦耳热对 σ^2 的贡献,其中 $\sigma_{inj}^2 = L^2/12$, L 为进样区带长度,因此控制进样量成为控制整个分析误差的重要因素。样品的过载会直接引起区带展宽。进样中压力带来的方差问题曾被讨论过,并证明样品节如果是高斯剖面其方差为 $L^2/16$,若为塞状剖面误差才为 $L^2/12$ ^[11]。由此可知,保持进样区带长度的 L 精确和一致是控制电泳总方差 σ^2 的主要手段之一。另外,重现性是影响分析准确性的重要因素,多次进样量的大小是否一致直接关系到重现性的优劣,因此,在进样技术的定量上,人们是通过控制压力、真空度、位差、电压与时间等影响进样量的参数来达到准确定量进样区带长度 L 的目的。目前,对于重现性而言,电迁移进样的相对标准偏差可达到4.1%,流体力

· 收稿日期:1999-10-18

基金项目:国家自然科学基金(29775035)和教育部优秀青年教师基金资助项目(教人司[1996]486)

作者简介:孙冠芸(1974-),女,浙江余姚人,重庆大学硕士生。从事毛细管电泳研究工作。

学进样的相对标准偏差可达到2.9%^[12]。

2 进样器

在仪器的发展上,毛细管电泳仪的进样装置大量地借鉴了其它的分析仪器,也使用多样品试样盘自动进样装置。进样器的设计遵循的原则是进样准确、重现性好、便于操作,并且经济。有人完全利用液相色谱仪旋转进样阀的原理开发了毛细管电泳仪旋转阀型进样器^[13],这种进样器的进样体积准确、自动操作简便且易更换样品溶液,但进样体积偏高。Tehrani设计了一种可以对进样量进行度量的新颖的进样技术,分流进样装置配合灵敏度特高的紫外吸光度检测器用于毛细管加样中,其样品进入体积可通过改变分流管道系统的长度和内径来控制^[14]。

为了将毛细管电泳用于微区分析或一些特殊的场合,在进样器微型化方面的研究也有不少报道。Wallingford和Ewing开发了用于细胞组分分析的微进样技术,它是在进样端的毛细管上镀上或附上一微小电极,以之作为电泳(电渗)驱动的电极之一,并采取电动力方式进样。这种技术能够将毛细管穿过细胞壁插入到细胞活体中实现现场在线分析^[15],从而为许多生物分析提供了有效途径。另一种微型进样系统是使样品以微滴形式进入毛细管,如果微滴的直径为60 μm ,其体积仅为113 pl ,进样微滴的标准偏差可小于1%^[16]。另外,用玻璃和硅材料经加工制成的微片进样器,将玻璃或硅片上的微槽与毛细管相连,可实现高效液相色谱和毛细管电泳的超微量进样^[17]。

3 进样动力方式

3.1 流体力学进样

利用流体力学原理进样的技术通常有虹吸进样法、毛细管进样端加压进样法和毛细管尾端抽真空进样法三种形式。进样量大小的控制是通过改变毛细管进出两管口之间的位差或压差,以及作用时间来实现的。但压力的大小受温度和机械精度的影响,很难准确控制,这会造成进样的精确度与重现性不高。相对来说,虹吸进样法利用的是重力因素,可用机械装置使毛细管的进样端与检测端口之间的位差得以准确控制,故其进样量的重现性要比用压差的方法高一些。计算机控制的固定有毛细管进样端的升降器,可使得操作更简便和准确^[12]。Hewlett-Packard公司早期开发的压力进样装置是将压力差控制器与分离毛细管两端都相连,这样就可以更精确控制毛细管两端的压力差和施加压差的时间,进样的重现性可达到体积相

对偏差5%,最好的能达到1%以下^[18]。压力进样会引起拖尾峰而带来误差也会在另一方面增加分析误差^[11]。

目前,流体力学进样手段仍是各种毛细管电泳仪中最常具备的。但这种技术也存在局限性,尤其对于粘度高的样品和电泳缓冲液。例如在毛细管凝胶电泳和毛细管电色谱分析中,由于电泳缓冲液加入了胶束、凝胶物质或增加阻力的色谱填充料,流体力学进样方式就不适用了。虽然,随着仪器的进步,该种方式在定量上的精确度有所提高,但由于方法本身的限制,使得很难进一步提高进样量的准确性。另外,流体力学进样所用的装置较复杂,设备体积重量大,成本较高。

3.2 电动力进样

电动力进样是依据电泳与电渗流原理而被普遍应用于CE进样的一种方式,其进样量与电泳淌度 μ_{ep} ,电渗淌度 μ_{eo} ,电位梯度 E 和进样时间 t 有关。一般通过控制进样电压与施加电压的时间来控制进样,对于电压的精确较易实现。为了进一步提高电动力进样精确度, Lee等人采取电流对时间的积分来修正进样量^[19]。 μ_{ep} , μ_{eo} 是影响进样量的两个主要因素。 μ_{eo} 控制了样品区带长度,但由于试样各组分具有不同的 μ_{ep} ,淌度大的组分进入毛细管内的质量要比淌度小的组分多,因此导致了电渗进样方式的最大一个不足之处,就是进样时存在组分歧视。电动力进样的动力来源于电泳介质本身,因此可用于高粘度样品的分析,从而扩展了分析样品类型的范围,且所需要的进样装置较简单,因为采用电压控制,操作灵敏度也增加了。但该方法存在组分歧视,使得分析结果失真,至少不能采用归一化法对各组分的相对含量进行估测。通常有两种形式的歧视^[20],其一,由于各组分的淌度不同,淌度大的组分被引入的量要多于淌度小的组分,于是产生组分歧视。其二,由于试样或标准溶液的电导与管内缓冲液电导差异而产生的试样歧视。

在分析一些含量极小的组分时,为了提高分析的灵敏度通常采用了场放大进样技术,这是电动力进样的扩展。该方法是将样品溶于电导较小的缓冲液,当进样时,在离子强度低的稀缓冲液中的组分,就处于电场强度较高的状态,运动比在管内大部分高电导的缓冲液中要快许多。于是,样品中的阳离子(如果进样端为正极时)就会迅速迁移至样品液与缓冲液的边界上,随后速度开始下降,阳离子便堆积在这一界面上形成一个被浓缩了的区带,中性离子仍分布于整个样品液,而阴离子则浓缩在样品液的尾部与后续缓冲液的界面附近。如果在进样前先引入一小节电导更小的去离子

水,样品会得到更大程度的浓缩,因为去离子水的离子强度很低,所得到的电场强度就很大,离子通过的速度就会很快。设原样品的缓冲液的浓度与管中缓冲液的浓度比为 γ ,场放大的进样后,组分的宽度与 γ 成正比^[21]。如果两者浓度差越大,则分析峰越窄,该方法也是解决区带展宽、浓缩组分的一个行之有效的办法。

在电力进样的实际应用方面, Ross 和 Andrew 最初设计了微电极直接同分离毛细管相连形成一微进样器从而进行单个细胞进样在线分析操作过程,即在一微操纵器的控制下,将毛细管的管口与已分离的某个特定细胞对齐通过电迁移将单个细胞移入管内。微电极电力进样目前已应用于多种细胞的分析^[21]。

3.3 电渗驱动的流体动力学进样

断口电渗进样是由 Linhares 和 Kissinger 提出的^[1]。如图 1 所示,将距毛细管进样端大约 5 cm 处烧掉一小段聚酰亚胺层,并用环氧树脂将其固定在载玻片上。再用利器将该处切断,然后放入盛有缓冲液的塑料瓶中,在瓶中插入 Pt 电极作为进样的阳极,进样端伸出。进样时,首先将进样端与出口端放置在同一水平以避免虹吸产生,然后将进样端(A)插入样品池中,在断口处(B)的电极与出口端(C)的阴极间加一进样电压,此时这一段毛细管内产生了从 B 流向 C 的电渗流,从而带动了 AB 段内的溶液由 A 流向 B,即将样品吸入。移去样品池,换成缓冲液池,在池中插入电泳驱动的阳极,然后施加电压进行样品的电泳分离。该进样方式综合了流体力学与电力进样两种方式的优点。其实质是将毛细管中的电渗流作为一微型泵,应用电渗流的拉力将样品引入。因此,也称该方式为“电驱动流体力学进样”^[23]。这种方法不存在组分歧视。但最近也有人认为这种方法仍存在一定的组分歧视^[20]。据认为,当在断口处电极上加上正电位时,进样口缓冲液的电势尚为零,于是两者间存在电势差,

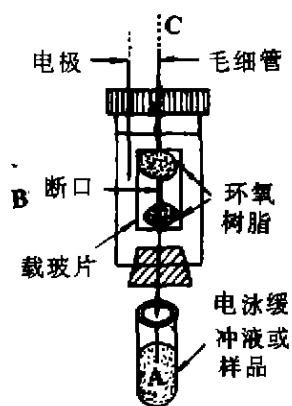


图 1 断口进样装置简图

形成了一个近似电容器的环境,从而导致低淌度

的溶质进入的量多于高淌度物质。若将断口处的电极与样品池中电极相连,消除电势差,这样可在很大程度上减少组分歧视。

3.4 扩散进样

扩散进样方式通过调整样品池高度,使其液面与毛细管出口端的液面严格水平,利用进样端管口处样品溶质与毛细管中电解质缓冲液存在浓度梯度的原理使样品组分直接扩散进入管内^[3]。因为该进样方法不采用电压,所以在一定程度上,克服了因淌度不同产生的组分歧视。并且该方法具有较好的定量特性,较强的抗样品基质干扰和一定的抗区带电场畸变的能力。同时,也可用于毛细管凝胶电泳及电色谱进样。但该种扩散方法使得工作效率大大减慢了,该方法应用得并不普遍。

3.5 微注射器进样及其它进样方式

微注射器压力进样方式的做法是在一只微注射器上连接一个非常细小的移液管尖,移液管的尖端的直径比毛细管的内径还小,可直接插入分离毛细管管口^[4]。Chiu 等人^[24]将毛细管端口加工成锥形,能达到渺升级(10^{-18})以及毫微微升(10^{-15})级直接进样的目的,甚至可达单分子进样。实验研究了细胞大小的囊泡、微细胞状的有机囊泡、以及 DNA 分子的进样,并将其同电力和流体力学进样相比较,认为更易控制并且进样的重现性更高。

微渗析取样是一种对活体动物进行直接取样的技术,应用在毛细管电泳分析的取样方法上,分析离线的微渗析样品,它是在样品收集后,用毛细管电泳进行间接分析^[25,26]。直接将微渗析取样同分离毛细管连接在一起,作为毛细管电泳的取样方式是由 Hogan 和 Lunte 实现的^[27],可视为活体直接分离分析的新途径。

为了避免进样方法给定量分析带来的误差,也可以采用辅助手段来修正。通过加入一种或两种内标的修正是解决问题的例子^[28-31]。但内标的选择同样较复杂。为此有人在进样和分离中通过控制电泳流的方法来提高定量精度^[19]。

4 结语

笔者对毛细管电泳的各种进样方法作了综述评论。流体力学进样方式具有一般的进样精度,但进样装置较复杂,不易操作,重现性较差。电力进样较易控制,附加设备少,成本低,在毛细管电泳分析中被普遍采用,但不可避免地存在组分歧视,会给分析结果带来误差。电渗驱动的流体力学进样综合了上述两种方法的优点,是一种较新颖的进样方法,有望提高分析精

度。进行一些专用型进样装置的研制,将为以后生命科学的发展起到举足轻重的作用,同时也使毛细管电泳分析在更广范围内的得到应用。

参考文献:

- [1] LINHARES M C, KISSINGER P T. Use of an on-column fracture in capillary zone electrophoresis for sample introduction [J]. *Anal Chem.* 1991, 63(18): 2 076-2 078.
- [2] DEML M, FORET F, BOCEK P. Electric sample splitter for capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr*, 1985, 320 (1): 159-165.
- [3] 陈义,竺安. 高效毛细管电泳的扩散进样[J]. *色谱*, 1991, 9(6): 353-356
- [4] KENNEDY R T, OATES M D, COOPER B R, et al. Microcolumn separations and the analysis of single cells [J]. *Science*, 1989, 246(4926): 57-63.
- [5] OLEFIROWICZ T M, EWING A G. Capillary electrophoresis for sampling single nerve cells [J]. *Chimia*, 1991, 45(4): 106-108.
- [6] GILMAN S D, EWING A G. Analysis of single cells by capillary electrophoresis with on-column derivatization and laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem.* 1995, 67(1): 58-64.
- [7] LEE T T, YEUNG E S. Quantitative determination of native proteins in individual human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem.* 1992, 64(23): 3 045-3 051.
- [8] HOGAN B L, YEUNG E S. Determination of intracellular species at the level of a single erythrocyte via capillary electrophoresis with direct and indirect fluorescence detection [J]. *Anal Chem.* 1992, 64(22): 2 814-2 815.
- [9] XUE Q, YEUNG E S. Indirect fluorescence determination of lactate and pyruvate in single erythrocytes by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr*, 1994, 661(1-2): 287-295.
- [10] EWING A G, WALLINGFORD R A, OLEFIROWICZ T M. Capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem* 1989, 61 (4): 292A.
- [11] PENG X, CHEN D D Y. Variance contributed by pressure induced injection in capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A.* 1997, 767: 205-216.
- [12] ROSE D J, JORGENSEN JR, JORGENSEN J W. Characterization and automation of sample introduction methods for capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem.* 1988, 60 (7): 642.
- [13] TSUDA T, MIZUNO T. Rotary-type injector for capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Chem.* 1987, 59(5): 799-800.
- [14] TEHRANI J, MACOMBER R. An integrated system with a unique split-flow sample introduction mechanism [J]. *J High Resolut Chromatogr*, 1991, 14(1): 10-14
- [15] WALLINGFORD R A, EWING A G. Characterization of a microinjector for capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Chem.* 1987, 59(4): 678-681
- [16] SZIELE D, BRUEGGEMANN O, DOERING M. Adaptation of a microdrop injector to sample in capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 669(1-2): 254-258.
- [17] FINTSCHENKO L. Glass channels and capillary injectors for capillary zone electrophoresis [J]. *Sens Technol Neth Proc Dutch Sens Conf*, 1998, 77-84
- [18] LAUER H H, MCMANIGILL D. Vacuum injection CE [P]. Hewlett-Packard Co. 1991.
- [19] LEE T T, YEUNG E S. Compensating for instrumental and sampling biases accompanying electrokinetic injection in capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Chem.* 1992, 64 (11): 1 226-1 231.
- [20] WEI H, ANG KOON CHYE, LI S F Y. Minimization of sample discrimination introduced by on-column fracture/electrokinetic injection in capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem.* 1998, 70(11): 2 248-2 253.
- [21] LI S F Y. *Capillary Electrophoresis principles, practice and applications* [M]. Znether-lands: Elsevier Science Publishers B V, 1992, 22-23.
- [22] WALLINGFORD R A, EWING A D. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection [J]. *Anal Chem.* 1988, 59(4): 678-681.
- [23] WU XINGZHENG. A sample injection method for capillary electrophoresis utilizing the pulling of the electroosmotic flow [J]. *Bunseki Kagaku*, 1994, 43(8): 609-613
- [24] CHIU D T, HSIAO A, GAGGAR A. Injection of ultra-small samples and single molecules into tapered capillaries [J]. *Anal Chem.* 1997, 69(10): 1 801-1 807
- [25] O'SHEA T J, TELTING-DIAZ M W, LUNTE S M, et al. Capillary electrophoresis electrochemistry of microdialysis samples for pharmacokinetic studies [J]. *Electroanalysis.* 1992, 4: 463-468.
- [26] O'SHEA T J, WEBER P L, BAMMEL B P, et al. Monitoring excitatory, amino acid release in vivo by microdialysis with capillary electrophoresis-electrochemistry [J]. *J Chromatogr*, 1992, 608: 189-195.
- [27] TELLEZ S, FORGES N, ROUSSIN A, et al. Blood-brain barrier permeability to phenobarbital as studies by dual microdialysis coupled to capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr Biomed Appl.* 1992, 581: 257-266
- [28] HOGAN B L, LUNTE S M. On-line coupling of in vivo

- microdialysis sampling with capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 1994, 66(5): 596-602
- [29] HUANG X, LUCKEY J A, GORDON M J, et al. Conductivity detection in capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 1989, 61: 766-770.
- [30] FUJIWARA S, HONDA S. Effect of addition of organic solvent on the separation of positional isomers in high-voltage capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 1987, 59: 2 773-2 776.
- [31] HONDA S, IWASE S, FUJIWARA S. Evaluation of an automatic siphonic sampler for capillary zone electrophoresis [J]. *J Chromatogr*, 1987, 404: 313-320

Injection Techniques and Application in Capillary Electrophoresis

SUN Guan-yun, XIA Zhi-ning, YANG Yu-shu

(College of Environment and Chemistry & Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: A review about the techniques of injection in capillary electrophoresis with 31 references is presented. Advantages and shortage of the techniques which is based on the principles of hydrodynamics and electrokinetics are commented, especially the no-discrimination electrokinetic injection which is expected to have an advance in the capillary electrophoresis in the future.

Key words: capillary electrophoresis; sampling; electroosmosis; micro-area

(责任编辑 张小强)

* * * * *

(上接 148 页)

- [39] SIEGEL J, KRAUT R E, JOHN B E, et al. An Empirical Study of Collaborative Wearable Computer Systems [A]. *Proceedings of the CHI '95: Mosaic of Creativity* [C]. New York, NY, USA: ACM, 1995. 312-313.
- [40] SIEGEL J, KRART R E, MILLER M D, et al. Collaborative Wearable Systems Research and Evaluation *Proceedings of the ACM 1996 Conference on Computer-Supported Cooperative Work* [C]. New York, NY, USA: ACM, 1996. 9-10.
- [41] MATIAS E, MACKENZIE I S, BUXTON W. A Wearable Computer for Use in Microgravity Space and Other Non-Desktop Environments [A]. *Proceedings of the CHI '96 Conference on Human Factors in Computing Systems* [C]. New York, NY, USA: ACM; 69-70.

Evolution and Trend of Wearable Computer (II)

CHEN Dong-yi

(College of Automation, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Wearable Computer (WearComp) is a class of new conceptual personal mobile computing system, it has special requirements for its software system human-machine interaction mode, power, and communication way besides its particular hardware structure. Wearable computer's super-miniature & light, and its other properties make it have unique & wide use, and have huge application prospects. This article is the continuation of [1], widely discusses the above issues, introduce the research contents & development direction of WearComp, and probe into WearComp's use & its prospects in application. The purpose is to arouse Chinese computer researcher's interests in WearComp and to promote the research and development on WearComp in China.

Key words: wearable computer; wearable computing; mobile computing; human-computer interaction; cyborg

(责任编辑 吕赛英)