谨以此文庆贺张玉奎院士七十华诞

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00816

毛细管电泳在线聚焦原理、技术及应用

刘胜权, 汪海林*

(中国科学院生态环境研究中心,环境化学与生态毒理学国家重点实验室,北京 100085)

摘要:毛细管电泳以其分析速度快、分离效率高、操作简便、能够实现高通量而获得了广泛的应用,但由于检测窗口 小而导致其检测灵敏度低。为了提高检测灵敏度,目前已发展了多种毛细管电泳在线聚焦和样品预浓缩技术,如 场放大样品堆积、pH调节浓缩、胶束电动毛细管色谱、等速电泳等。这些技术由于能够在毛细管内同时实现样品 的聚焦和分离、操作简便而获得了广泛的兴趣和关注。本文针对毛细管电泳的在线聚焦的原理、技术和应用做一 简要的介绍和总结。

Principle, technique and applications of on-line focusing in capillary electrophoresis

LIU Shengquan, WANG Hailin*

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract:: Capillary electrophoresis (CE) has wide applications in many fields because of its extraordinary advantages, such as high efficiency of separation, high speed, and high throughput. However, the detection sensitivity is relatively low due to short detection window and short optical length. To improve the detection sensitivity, a number of on-line sample focusing and stacking modes have been developed, such as field-amplified sample stacking, pH gradient preconcentration, micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), isotachophoresis (ITP). These on-line focusing techniques have been of intensive interest because of the ease of operation and simultaneous focusing during capillary electrophoresis separation. Here, we review the principle, advanced techniques and latest applications of on-line capillary electrophoresis focusing.

Key words: capillary electrophoresis (CE); on-line focusing; preconcentration; stacking; review

毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是 20世纪80年代发展起来的一项分离技术,它以高 压电场为驱动力,以弹性石英熔融毛细管或微流孔 道为微分离通道,实现分析物的定性、定量分析。因 其分析速度快、分离效率高、操作简便,具有高通量 分析的潜力,而应用范围十分广泛,它可以实现从无 机离子^[1-3]、小分子^[4]、氨基酸和多肽^[5]、手性物 质^[6,7]到生物大分子如蛋白质^[8]、脱氧核糖核酸 (DNA)^[9],甚至单细胞水平^[10,11]的分析,在食品^[12]、 药物^[7,13-15]、法医^[16]、环境^[17-19]、生命科学^[20]等领 域获得了极为广泛的应用。 但由于毛细管内径一般为 $20 \sim 100 \ \mu m$,且检测 光程短,相应的检测体积一般在 nL 级,只有液相色 谱的检测池(μ L 级)的 1/100,因此在最常用的紫外 检测器(UV)中,检出限只能达到 10^{-5} mol/L 级。

针对其检测灵敏度低的问题,目前主要有 3 种 解决方法:一是采用 Z 形池(Z-type cell)或泡状池 (bubble cell)等增加检测窗口的宽度;二是采用高灵 敏的激光诱导荧光检测器(LIF)用于毛细管中样品 的检测;三是对样品进行预处理或预浓缩(preconcentration),然后对分析物进行电泳分离分析。其 中,样品前处理技术主要包括固相萃取(SPE)和液-

^{*} 通讯联系人:汪海林,研究员,博士,博士生导师,研究方向主要包括高灵敏生物分离分析、生物分子相互作用研究和 DNA 损伤的检测及修复机制研究. Tel: (010)62849600, E-mail: hlwang@rcees.ac.cn.

基金项目:国家"973计划"支持项目(No. 2007CB407305)和国家自然科学基金项目(Nos. 20737003, 20877091). 收稿日期:2011-08-22

液萃取(LLE)等,这在分析生物或环境等复杂组成 的样品中起着重要的作用。而毛细管电泳在线预浓 缩技术由于易于调控,可同时实现样品的堆积与分 离,操作相对简便,能够显著提高检测灵敏度,而受 到大家的青睐。

目前常用的样品在线预浓缩^[21-24]或堆积技术 主要包括以下几类:场强放大样品堆积(field-amplified sample stacking, FASS)技术,pH 调节聚 焦^[25-27],基于胶束电动毛细管色谱(micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)的堆积 (stacking)技术^[28,29]和吹扫(sweeping)技术^[28,30,31], 等速电泳(isotachophoresis, ITP)聚焦^[32]等。本文 将对这些毛细管在线聚焦的原理、技术和应用及其 最新进展做简要介绍。

1 场强放大样品堆积

FASS 技术是经典且操作最为简便的聚焦模式。 它采用高电导率的电泳缓冲液和低电导率的样品溶 液构建场强梯度实现堆积,但电渗流会使毛细管中 形成不均一的局部梯度,导致聚焦样品弥散,同时, 如果进样体积过大也会降低分离度和聚焦效率,因 此进样量一般不超过毛细管总体积的5%。FASS 技 术既可以压力进样,也可以电动进样。在电动进样 中,通过毛细管进样端的水柱形成高场强,实现进样 堆积。但这种方法只能对带一种电荷的离子聚焦。 Hou 等^[33]采用双向电动进样实现了对正、负离子同 时聚焦,对阴离子(苦参碱、氧化苦参碱)和阳离子 (5-磺基水杨酸)的检测灵敏度分别达到 0.2、0.2、 0.06 ng/mL,富集倍数为 1003~1380 倍。

FASS 技术也可与固相微萃取(SPME)等前处 理技术及其他在线聚焦技术联用以进一步提高检测 灵敏度。He 等^[34]采用整体柱微萃取样品前处理结 合 FASS 技术对鸡肉中 9 种喹啉类抗生素进行检 测,灵敏度能够达到 2.4~34.0 ng/g。Li 等^[35]采用 FASS 技术对人血清中三己芬迪对映异构体进行检 测,检出限达到 0.92 ng/mL。Yu 等^[36]将 FASS 技 术与 MEKC 联用,对异喹啉基生物碱的检测灵敏度 在无盐溶液中能够达到 0.2 ng/mL,在高盐溶液中 能够达到 62 ng/mL。

目前,FASS 技术已用于生物大分子(DNA 和蛋白质)、多肽、氨基酸、血浆及尿液中的药物和代谢产物,以及环境污染物如除草剂等的毛细管电泳检测。 Zinellu等^[37]采用 FASS 技术分析了 DNA 最重要的 表观遗传形式—— DNA 甲基化的整体水平。DNA 酶解为单个核苷并在毛细管中分离,5-甲基胞嘧啶 经 FASS 聚焦后,检出限能够达到 0. 1 nmol/L,灵敏 度提高了 400 倍。他们^[38] 对肌肽多肽的检测灵敏 度能够达到 0. 4~0. 5 nmol/L,富集倍数为 500 倍。 连东升等^[39] 对 DNA 的检出限达到 80 ng/mL,富集 倍数为 94. 4 倍。Yeh 等^[40] 采用 FASS 技术检测血 浆中的多奈哌齐,检测灵敏度能够达到 0. 1 ng/mL。 Li 等^[41] 对人尿液中的马钱子碱和二甲马钱子碱的 检测灵敏度能够达到 2~2. 5 ng/mL。Zheng 等^[42] 对尿液中的利尿剂含量的检测灵敏度能够达到 1. 5 ~20 ng/mL,富集倍数约为 220 倍。Weng 等^[43] 对 尿液中的一元胺类的检测灵敏度提高了 50 倍,能够 达到 0. 6 nmol/L。Xu 等^[44] 采用中空纤维滤膜微萃 取样品前处理结合 FASS 技术,对除草剂的检测灵 敏度能够达到 0. 08~0. 14 ng/mL。

针对 FASS 技术中进样体积小的问题,人们又 发展了大体积样品堆积(large volume sample stacking, LVSS)技术。LVSS 能够实现对大体积(占毛 细管总体积的 70%~80%)低离子强度样品粒子的 堆积,在保证不损失分离效率的前提下实现聚焦作 用。LVSS 一般限于分析与电渗流运动方向相反的 样品离子,在电场下样品粒子逐渐被压缩至毛细管 的进样端,最后在区带电泳模式下样品离子实现分 离。在此过程中,既可转换电极,也可不转换电极, 前者主要通过电流的改变监控,后者主要通过加入 电渗流调节剂逐渐改变电渗流大小实现。

Honegr 等^[45] 对 8 种多酚类物质的检测灵敏度 提高了 90 倍,能够达到 9~16 ng/mL。Bailón-Pérez 等^[46]采用 LVSS 技术对 β -乳胺类抗生素的检 测灵敏度能够达到 10 μ g/L。

目前,LVSS 技术也与样品前处理技术及其他 在线聚焦技术联用获得了更高的检测灵敏度。Li 等[47] 采用中空纤维液-液-液微萃取结合 LVSS 技术 分析了生物样品中的有机汞类污染物,检出限能够 达到 0. 03 ~ 0. 14 μ g/L,富集倍数为 2 610 ~ 4 580 倍。Herrera-Herrera 等^[48] 采用氧化态多壁碳纳米 管作吸附材料进行固相微萃取前处理,结合 LVSS 技术分析了 11 种喹啉类抗生素,检测灵敏度能够达 到 28~94 ng/L。李云等^[49]将瞬时等速电泳和大体 积电动进样结合对普萘洛尔和美托洛尔的检测灵敏 度分别达到 2 μ g/L 和 8 μ g/L,富集倍数达到 280 倍。Kitagawa 等^[50]以含有 50 mmol/L 四乙基铵高 氯酸盐的乙腈为电泳溶液,4种血管紧缩素的进样 体积占毛细管有效体积的 80%,高氯酸盐类似胶束 携带分析物向进样端运动,同时又与4种血管紧缩 素具有不同的亲和力,在 LVSS 和吹扫技术的共同

作用下,对4种分析物的检测灵敏度提高了 $100 \sim 200$ 倍,不需要转换电极,操作比较简便。Zhu等^[51] 采用 LVSS 与吹扫技术联用,对谷胱甘肽和氧化性 谷胱甘肽的检出限能够达到 $26.5 \sim 55.8 \text{ ng/mL}$,富 集倍数为 $9 \sim 33$ 倍。Zhang 等^[52]采用强酸调节电 渗流结合胶束形成堆积边界,在边界上既有 pH 的 急剧变化,又有胶束的捕获作用,从而使堆积界面相 对静止,实现了超大体积进样,对苦参碱和氧化苦参 碱的检测灵敏度提高了1410倍,检出限分别达到 0.18和0.81 ng/mL。

2 pH 调节浓缩

两性电解质如蛋白质、多肽等在不同 pH 值下 呈现不同的带电状态,而在不同带电状态的离子下 又具有显著差异的电泳淌度,因而通过构建 pH 梯 度的电解质区带,能够实现待分析物在 pH 边界的 堆积。这种技术主要包括等电聚焦、pH 调节堆积、 动态 pH 连接聚焦、移动反应边界等。

2.1 等电聚焦

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是一种经 典的聚焦技术,具有高效的分离能力,被广泛用于蛋 白质或多肽等两性物质的聚焦和分离,也适合用于 生物样品如微生物、病毒、细胞等的分析,在蛋白质 组学和多肽组学分析中起着重要的作用。这种技术 是利用两性电解质载体上构建的 pH 梯度,具有不 同等电点(pI)的两性组分在电场下向相应方向迁 移,在其 pI 处不再带有净电荷,从而聚焦在狭窄条 带,它能够实现对 pI 值相差 0. 01 pH 的两性电解质 的分离和聚焦。

目前常用的两性载体一般为商品化产品。同时 为了提高分离度,一般采用线性聚丙烯酰胺和 N-烯 丙酰胺丙醇(N-acryloylaminopropanol)等共价涂层 的毛细管或阴极电解液抑制电渗流。但毛细管等电 聚焦也存在着一些问题,如两性载体的带迁移导致 的样品流失,载体中的气泡对分离的干扰,以及蛋白 质或多肽在毛细管中的吸附或沉淀等。前者可以通 过采用新的两性载体、优化等电聚焦的条件或性能 更好的涂层;而针对蛋白质的吸附,可以在电泳缓冲 液中加入添加剂如表面活性剂、短链的线性丙烯酰 胺或尿素以克服这一问题。Zhang 等^[53] 在毛细管 两端加入醋酸纤维素膜接头,防止等电聚焦过程中 两性载体的带迁移和气泡干扰,同时结合基质辅助 激光解吸/离子化-傅里叶变换质谱(MALDI-FTMS) 分析神经多肽复合物,实现了神经多肽的更宽检测 范围,并且提高了质谱的响应信号。Ramsay 等^[54]

采用 N-烯丙酰胺丙醇和 Grignard 试剂涂层键合毛 细管并在溶液中加入尿素、Tween 20 和 Triton-X 100 抑制蛋白质的吸附。

增大对蛋白质的分离能力,增强低丰度蛋白质 的聚焦效果对蛋白质组学、蛋白的转录后修饰及生 物体内生命功能实现的研究等都具有重要意义。目 前等电聚焦一般通过合理设计的接口与其他聚焦技 术联用进行多维分离来实现这一目的。Mohan 等[55]采用等电聚焦与等速电泳联用,通过微透析接 口建立二维分离体系,等电聚焦中的载体电解质在 等速电泳中起到前导电解质作用,对低丰度蛋白质 的富集系数提高了 50~100 倍,最大峰容量达到 1 600 左右。Wang 等^[56] 采用将载体电解质修饰到 整体柱上制备整体固定 pH 梯度柱实现等速电泳, 并与区带电泳通过全刻蚀多孔接口联用,实现了对 6种标准蛋白质的聚焦和分离,检测灵敏度能够达 到 0. 2 μg/mL。Wei 等^[57]将等电聚焦通过阀接口 与毛细管电色谱联用,分析了蛋白质和多肽谱。Liu 等[58]采用等电聚焦与毛细管无胶筛分电泳联用,以 中空纤维膜为微透析接口,成功地用于血红蛋白和 小鼠肺癌细胞提取蛋白质的分离。韩彬等[59]利用 键合两性电解质的整体材料在芯片自由流电泳中对 甘氨酸、脯氨酸和赖氨酸实现了聚焦和分离。

此外,采用等电聚焦技术对其他物质的检测也 有所报道,并出现了一些很有意思的新技术。Lin 等^[60]采用 5%的两性电解质载体 Pharmalyte (pH 8 ~10. 5)和1%的 Pharmalyte (pH 3~10)的混合物 构建等电聚焦的 pH 梯度,并检测碱性单克隆抗体 中的不同带电组分,极大地提高了这些非均一组分 的分离效率。Weiss 等^[61]在单个液滴上实现了等电 聚焦并用于分析肌球素,样品液滴组成为2%(w/v) Ampholyte pH 3~10 和 0. 25 mg/mL 的肌球素,液 滴大小为 $50 \sim 200 \ \mu L$,在正负环形电极间拉伸到 0. 5~2 cm,形成 pH 3~10 的梯度;在液滴上加高压 后蛋白质在液滴上聚焦,在单个液滴上实现了单分 子分离。Egatz-Gomez 等^[62]采用白蛋白、铁蛋白、肌 球素、细胞色素 c 为模型蛋白质在 12 μL 的液滴上 进行等电聚焦,同时采用计算机模拟动态 pH 梯度 的形成过程,并用数字可视显微镜成像以 pH 指示 剂指示这一过程,聚焦结束后将样品风干、重溶,在 凝胶电泳上证实了蛋白质基于 pI 值迁移的过程。 这一技术能够实现对感兴趣样品的纯化,同时简单、 快速、方便,易于与电化学检测或质谱技术联用,具 有较好的前景。

2.2 pH 调节堆积

pH调节堆积(pH mediated stacking)^[63]根据待 分析物为阳离子或阴离子可分为酸堆积(acid stacking)和碱堆积(base stacking)两种^[63,64]。它以弱酸 盐或弱碱盐为电泳缓冲液,利用随后进入的强酸或 强碱通过酸碱中和高离子强度的样品溶液降低样品 区带的电导率而形成场强梯度,从而实现场强放大 和样品堆积。这一技术最早由 Zhao 和 Lunte 等^[63,64]提出。他们采用碱堆积模式分析阴离子组 分,OH⁻滴定弱碱性阳离子形成低电导率样品区带 实现场强放大和样品堆积。但由于 pH 调节堆积需 要大体积进样,因而导致可用于分离的毛细管部分 过短,这一问题可以采用两根毛细管通过接口技术 解决,前者实现 pH 调节堆积,后者实现分离。

由于 pH 调节堆积无需对样品进行除盐、稀释 等前处理过程,因而简单方便,对生物样品如氨基 酸、药物及代谢物等的分析具有很大的优势。 Hoque等^[65]采用 pH 调节碱堆积对小鼠肝脏微透析 样品中的谷胱甘肽和氧化谷胱甘肽进行检测,检出 限分别能够达到 0.75 μ mol/L 和 0.25 μ mol/L,检 测灵敏度提高了 26 倍。Gillogly 等^[66]采用 pH 调节 酸堆积结合反向气压对阳离子药物聚焦,减少了由 于大体积进样而导致的聚焦效果的降低程度,在单 根毛细管内实现聚焦,检测灵敏度提高了 60 倍。 Wang 等^[67]采用 pH 调节酸堆积检测了膀胱癌症病 人尿液中的氨基酸谱。

pH调节堆积技术也常与其他技术联用提高检测灵敏度。Wu 等^[68]采用 pH调节酸堆积与胶束电动毛细管色谱联用检测人体血清中的免疫抗体 (IgG)含量,检测灵敏度提高了 40.3 倍,检出限能够达到 0.1 mg/L。Baidoo 等^[69]采用 pH调节堆积与等速电泳联用结合傅里叶变换-离子回旋加速器共振质谱(FT-ICR-MS)对氨基酸进行检测,检测灵敏度能够达到 0.1~2 μ mol/L。

2.3 动态 pH 连接

动态 pH 连接聚焦是另一种操作简便、应用广 泛的 pH 调节聚焦技术。由于两性物质、弱酸或弱 碱等在不同 pH 条件下带电状态不同(电荷的增多 或减少),在其经过 pH 边界时,电泳淌度会发生明 显的 降低,从而在边界堆积。该技术最早是由 Aebersold 和 Morrison^[25]提出,Britz-McKibbin 等^[26,27]对其进行了发展。

Ye 等^[70]结合毛细管电泳-电喷雾质谱(CE-ESI-MS)分析了尿液中的4种具有相近等电点的多肽L-Ala-L-Ala(pI=5.57)、L-Leu-D-Leu(pI=5.52)、Gly-D-Phe(pI=5.52)、Gly-Gly-L-Leu(pI=5.52),电泳 缓冲液为 0.5 mol/L 叶酸(pH 2.15),样品缓冲液为 50 mmol/L 醋酸铵(pH 7.5),检测灵敏度能够达到 0.2~2.0 nmol/L。Kazarian 等^[71]在聚二甲基二烯 丙基氯化铵(PDADMAC)/聚苯乙烯硫酸钠(PSS)双 重涂层的微流控芯片上采用动态 pH 连接聚焦检测 了单糖和多糖类化合物,检测灵敏度能够达到 790 nmol/L,与他们在丙烯酰胺涂层的毛细管中得到的 结果相当。Jaafar 等^[72]采用动态 pH 连接聚焦对食 品添加剂 3-硝基-4-羟基-苯胂酸及其可能的代谢产 物进行检测,检测灵敏度提高了 100~800 倍,电泳 缓冲液为 pH 10.5 的磷酸盐,样品缓冲液为 15 mmol/L 的乙酸。Zhang 等^[73]对安息香酸和山梨酸 的检测灵敏度能够达到 0.02~0.03 mg/L,样品溶 液为 20 mmol/L 的磷酸(pH 2.5),电泳缓冲液为 50 mmol/L 硼酸(pH 9.0)。

为了提高检测灵敏度,动态 pH 连接聚焦技术 也逐渐与其他技术联用。Arnett 等^[74]采用 pH 调节 堆积与动态 pH 连接聚焦联用检测 8-羟基-2'-脱氧 鸟苷(8-OH-dG)、2'-脱氧鸟苷(dG)、胸腺嘧啶核甙 (dT),检测灵敏度提高约 20~24 倍。Hasan 等^[75] 采用动态 pH 连接聚焦与 LVSS 联用分析 5 种多肽, 检测电泳缓冲液为1 mol/L 叶酸(pH 2.0),样品缓 **冲液为** 100 mmol/L 的硼酸(pH 10. 0)(含有 50% (v/v)乙腈),在进样长度25 cm的大体积进样时,富 集倍数为 4 000~11 000 倍。Yu 等^[76] 联用动态 pH 连接聚焦和吹扫技术对中草药中的4种毒性吡啶生 物碱进行分析,检出限达到了 30 ppb,灵敏度提高了 23. 8~90. 0 倍, 电泳缓冲液为 20 mmol/L 硼酸-30 mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS)-20% 甲醇 (pH 9.1),样品缓冲液为含有 20%甲醇的 10 mmol/L 磷 酸盐(pH 4.0)。

2.4 移动反应边界

移动反应边界 (Moving reaction boundary, MRB)技术是由 Cao 等^[77-79]提出,其原理也是基于 两性物质在高 pH 下带负电,向正极运动,在其经过 pH 边界后在低 pH 下带正电,向负极运动,但由于 pH 边界是由 H⁺和 OH⁻的相互作用形成的,在电泳 过程中具有一定的速度,因而被称为移动反应边界。 为了实现浓缩效果,首先必须保证两性分析物完全 电离,其 pI 值应在两个区带的 pH 之间。同时,样 品在低 pH 的电泳缓冲液时的速度 V_2^{α} 应大于移动 边界的速度 V^{α} ,如式(2)所示,否则无法聚焦^[78]。

$0 < V^{lphaeta} \leq V^{lpha}_z$

(2)

这种堆积技术在含盐离子的溶液中也能实现聚 焦,这对于生物或环境等样品的测定具有一定的优

势。Cao 等^[80] 采用 MRB 测定了小鼠血浆中氧化苦 参碱($pK_a = 7.72$)和苦参碱($pK_a = 5.77$)的含量,电 泳缓冲液为 100 mmol/L 甲酸-甲酸钠(pH 4.80),样 品缓冲液为 20 mmol/L 甲酸(pH 10.70),堆积缓 冲液为 40 mmol/L 甲酸-甲酸钠(pH 2.60),富集倍 数能够达到 60 倍。他们^[81]采用这种技术也考察了 人尿液样品中的 lovastatin,样品缓冲液为 20 mmol/L 的 Gly-HCl(pH 4.93),电泳缓冲液为 100 mmol/L 的 Gly-NaOH(pH 11.52),检测灵敏度提高 了 26 倍。同时他们^[82]还检测了人体尿液中巴比妥 ($pK_a = 7.45$)、苯巴比妥($pK_a = 7.63$)、金纳巴比妥 ($pK_a = 7.81$)的含量,电泳缓冲液为 60 mmol/L Gly-NaOH(pH 11.0),样品缓冲液为 10 mmol/L Gly-HCl(pH 5.5),检测灵敏度分别提高了 20.5 和 22.6 倍。

3 胶束电动毛细管色谱

1982年,Terabe 等^[83]最早将胶束引入到毛细 管电泳的自由溶液中,发明了 MEKC 技术,并于 1984年发表了第一篇关于 MEKC 的文章。这是一 种基于色谱和电泳原理相结合的技术,胶束在电泳 溶液中起到准固定相的作用,由于样品离子或中性 分子在溶液和胶束间的分配作用及自身的泳动淌度 不同,从而实现待分析物的聚焦和分离。

目前,基于胶束的准固定相作用,人们发展了多种 MEKC 模式,吹扫技术(sweeping)是应用最为广 泛的一种,在此基础上,学者们还发展了选择性耗 尽-吹扫技术、部分填充胶束电动色谱及最近两年提 出的新技术和联用技术等,这些模式在提高检测灵 敏度、拓展 MEKC 的应用范围等方面起到了重要 作用。

3.1 吹扫技术

吹扫技术是基于胶束和样品离子间的高亲和力 作用,待分析离子或中性分子会被胶束捕获向出口 端运动,胶束起到类似吹扫作用,从而实现大体积样 品分子的富集。虽然对其机理仍在探究,但其已获 得了极为广泛的应用。其中,形成胶束最常用的表 面活性剂是阴离子型的 SDS,根据待分析组分的电 荷性质,其他阳离子型、非离子型、两性和非离子表 面活性剂也有一定的应用。Shen 等^[84]对比研究了 阴离子型表面活性剂 SDS、琥珀酸辛酯磺酸钠 (DOSS)、十二烷基聚氧乙烯醚(Brij)和阳离子型表 面活性剂十四烷基三甲基溴化铵(TTAB)、正辛基 三甲基溴化铵(OTAB)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)在分析6种类固醇时的检测效果。虽然单 种表面活性剂的使用仍是主流,但两种表面活性剂 如阴离子型和非离子型、阴离子和阳离子型在吹扫 技术中同时使用也有学者进行了研究,如 Cao 等^[85] 采用 SDS 和十二烷基三甲基氯化铵(DTAC)两种表 面活性剂以增加洗脱窗口和提高分离度,Chen 等^[86]使用 SDS 和 Brij-35 分析 4 种二肽等。

吹扫技术广泛用于食品、药物、环境污染物及小 分子染料等的检测,学者们同时对实际生物环境样 品进行样品前处理,如固相萃取,液液微萃取等,结 合吹扫技术得到了更高的检测灵敏度。Wang 等^[87] 对中药中马钱子生物碱的检出限能够达到 0.05~ $0.07 \ \mu g/mL$,富集倍数为 100 倍,结合中空纤维液 相萃取后检出限能够达到 $1 \sim 2 \text{ ng/mL}$ 。Liu 等^[88] 采用金纳米颗粒键合硅胶固相萃取柱结合吹扫技术 **对**3种中性生物碱的检出限分别为1.59、1.20、 1. 15 $\mu g/L$, 富集倍数为 700 ~ 1 100 倍。Wang 等^[89]对人血浆和药片中酰胺咪嗪的检出限达到了 $0.1 \,\mu g/mL$,富集倍数为 100 倍。Lin 等^[90] 对伏立 康唑的检测灵敏度能够达到 0. 075 μ g/mL。Huang 等[91]采用吹扫技术对氟硝西泮及其代谢产物 7-氨 基氟硝西泮和 N-去甲基氟硝西泮的检测灵敏度分 别能够达到 13.4,5.6,12.0 ng/mL,富集倍数为 110~200 倍。李利军等^[92]对中药穿心莲中脱水穿 心莲内酯和穿心莲内酯的富集倍数达到了 200 倍。 闫永娜等^[93]对多粘菌素 E 药物中的 E1 和 E2 进行 了聚焦和分离。Aranas 等^[94] 实现了对废水中三环 抗抑郁药类及 β -阻断剂同时检测,检出限达到 7~ 27 ng/mL,富集倍数达到 305 倍。Zhang 等将弥散 液液微萃取结合吹扫技术用于土壤中的磺酰脲除草 剂的检测,检出限达到 0. $5 \sim 1.0 \text{ ng/g}$,富集倍数为 3 000~5 000 倍[95];对苹果上的氨基甲酸盐类杀虫 剂进行检测,检出限达到 $2\sim3$ ng/g,富集倍数达到 481~1 834 倍^[96]。孙娟等^[97]对蔬菜中 3 种氯化烟 碱类农药的检测灵敏度达到 2.5 \sim 5.6 μ g/kg,富集 倍数达到 433~788 倍。王全等^[98] 对面粉中的增白 剂过氧化苯甲酰的检出限能够达到 2 mg/L。Tsai 等将吹扫技术与拉曼散射检测结合用于分析孔雀石 绿,检测灵敏度达到 10 ppm^[99];对水中的孔雀石绿 的检出限能够达到 5.3 nmol/L^{100]}。Kitagawa 等[101] 将吹扫技术与界面芯片和热透镜显微镜结 合,对含氮染料的富集倍数为 3.9×10^6 倍。张良 等^[102]对红曲米中的莫纳可林 K 的检测灵敏度达到 0.13 mg/L。干宁等^[103]对鱼肉中的7种生物胺类 的检测灵敏度达到 $5 \sim 15 \ \mu g/g$ 。

对于中性、带电荷的憎水性物质而言,它们与胶

束等具有较强的相互作用,故吹扫聚焦能达到比较 好的效果,而寡核苷酸、DNA、核糖核酸(RNA)等亲 水性生物大分子,因与胶束的亲和力弱,吹扫技术对 其的富集效率较差。Gong等^[104]用阳离子表面活性 剂十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)吹扫 DNA 寡核 苷酸链,发现 DTAB 在低于临界胶束浓度(CMC)时 有利于浓缩,而高于 CMC 时则有利于憎水性小分子 的富集,检测灵敏度提高了 112 倍。

增大进样体积是有效提高检测灵敏度的方法。 Zhang 等^[105]提出了一种电渗流控制的吹扫技术,他 们首先在毛细管内充满 SDS,在电压下带负电荷的 SDS 向进样端运动,电渗流与之方向相反,控制电渗 流使两者在进样端处速度相同,从而构建了静止界 面;而进样端的样品离子在电渗流的作用下向负极 运动,被胶束捕获而停留在胶束中,因而可以实现连 续进样。他们采用 18 kV 电压进样 70 min 后对根 皮苷和栎素的富集倍数分别能够达到 2.3×10⁴ 和 2.1×10⁴ 倍,从而能够实现对尿液中痕量根皮苷和 栎素的测定。同样的,Gong 等^[106]发展了一种无限 体积电动堆积进样吹扫聚焦的新模式,他们采用阳 离子表面活性剂 DTAB 动态涂覆毛细管,使电渗流 逆向,在负高压下进样,随着样品的进入,结合在 Si-OH 表面的 DTAB 逐渐脱落并形成胶束,这既降低 了电渗流,又使样品组分被胶束捕获,胶束速度与电 渗流相等时达到稳态,从而实现无限体积进样。他 们以 20.1 kV 进样 60 min, 对羧基荧光素(5-FAM) 和荧光素钠(FL)的理论进样长度分别达到 836 和 729 cm, 检测灵敏度提高了 4.5×10³ 和 4.0×10³ 倍。

3.2 选择性耗尽进样-吹扫技术

选择性耗尽进样-吹扫技术(selective exhaustive injection-sweeping, SEI-sweeping)是场强放大 样品堆积与吹扫技术的一种在线聚焦模式,可分为 阳离子选择性耗尽进样(CSEI)和阴离子选择性耗 尽进样(ASEI)。这种技术最早是由 Quirino 和 Terabe 提出^[107],他们将这项技术用于 *N*-甲基四氢罂 粟碱和萘胺的检测,检测灵敏度提高了约 100 万倍。 阳离子选择性耗尽进样-吹扫模式是基于阳离子会 在水柱形成的高场强下快速向阴极运动,并在水柱 末端边界堆积,然后胶束吹扫样品实现阳离子富集。 阴离子选择性堆积模式与之相反,它在负高压下进 样,正高压下吹扫阴离子组分实现聚焦。

SEI-sweeping 在药物、食品、环境检测等领域也 获得了广泛的应用。Fang 等^[108]采用耗尽电动进样 结合吹扫技术对胺类药物进行检测,检出限达到 6

 $\sim 8 \text{ pg/mL}$,富集倍数为几千倍。Maijo 等^[109]采用 ASEI-sweeping-MEKC 模式对河水中消炎类药物的 检出限达到 $29 \sim 58 \text{ ng/mL}$ 。Cheng 等^[110] 对尿液中 甲基苯丙胺及其代谢产物的检出限能够达到 15~ 20 ng/mL,这一结果与荧光偏振免疫分析和气相色 谱-质谱(GC-MS)的测定结果一致。Huang 等^[111]采 用 CSEI-sweeping-微乳液电动色谱对烟草中的生物 碱进行富集,富集倍数达到 $180 \sim 540$ 倍。Yang 等^[112]采用 CSEI-sweeping-MEKC 模式分析了香烟 烟草中特有的4种亚硝胺类物质,检测灵敏度提高 了 6 000 ~ 15 000 倍。Huang 等^[113] 采用 ASEF sweeping一微乳液电动色谱检测食物中的两种酚类 物质,富集倍数为 96 000 和 238 000 倍,对食品中的 镓酸和儿茶酚检出限达到 3 ng/g。Li 等^[114]采用 CSEI-sweeping-MEKC 模式分析了牛奶中的环丙胺 嗪和三聚氰胺,检测灵敏度分别可以达到 23.4 和 43.7 pg/mL。Lin 等采用 CSEI-sweeping-MEKC 对 人尿液中的违禁药物吗啡、可待因、可卡因、噻吡二 胺含量进行检测,检测灵敏度能够达到 $5 \sim 15$ ng/mL,对噻吡二胺的富集倍数为 6 000 倍^[115];对 头发中的这些违禁药物的检出限能够达到 100~ 200 pg/g^[116]。他们^[117]采用这种技术对吗啡及其 4 种代谢产物的检出限能够达到 10~35 ng/mL,富集 效率提高了 2 500 倍。陈新等^[118]采用 ASEI-sweeping-MEKC 在线聚焦测定了 3 种甘草黄酮类化合物 (异甘草素、甘草素和甘草苷),检出限分别达到 0.015、0.014、0.011 mg/L, 富集倍数分别提高了 110、120、300 倍。

3.3 部分填充胶束电动毛细管色谱

由于胶束可能会有紫外吸收,或由于难挥发进 入质谱后抑制待分析物的离子化,从而会造成背景 信号升高或对离子源等的污染。为了使电泳溶液中 的胶束不随样品离子同时流出而进入检测器分析, 部分填充胶束电动毛细管色谱技术 (partial-filling MEKC, PF-MEKC) 应运而生。它是由 Valtcheva 等^[119]于1993年手性分离β-阻断剂时最先使用的。 这种模式是在毛细管中首先充满不含胶束的电泳缓 冲液,然后充入一段胶束溶液,之后进样。分析物在 电渗流的作用下向出口端运动,进入胶束区带后实 现富集;当样品移出胶束后,在电泳缓冲液中分离, 从而保证胶束只停留在毛细管中而不会随样品离子 流出。Sueyoshi 等^[120]认为部分填充毛细管色谱的 聚焦机理与吹扫技术不同,并提出了瞬时捕获 (transient trapping)模式来解释 PF-MEKC,样品富 集不是由于样品离子被胶束捕获在两相间分配引起

的,而是由于分析物在样品/胶束边界上的数秒钟, 胶束浓度在电泳过程中逐渐减小,释放出样品离子 引起的,因而这种模式被称为瞬时捕获。目前这一 技术具有一定的应用前景和潜在价值。Quirino^[121] 采用 PF-MEKC 结合 ESI-MS 检测中性分子烷基邻 苯二甲酸,灵敏度提高了 100 倍。Ge 等^[122]采用 PF-MEKC 结合 MS 对椰汁中的赤霉素的检测灵敏 度能够达到 0.8~1.9 μ mol/L;他们^[123]还采用这种 技术对 13 种结构类似的细胞分裂素进行了分析。 Huang 等^[124]采用两性表面活性剂(3-磺丙基十六烷 基二甲基铵,PAPS)和中性表面活性剂(Brij-35)混 合胶束和 PF-MEKC 考察了胰岛素对牛血清白蛋白 (BSA)酶解后的多肽谱。

3.4 胶束电动毛细管色谱新技术

近年来,学者们利用胶束的准固定相作用又发展了一些新技术,主要包括胶束到溶剂堆积技术 (micelle to solvent stacking, MSS)、胶束碰撞分析 物聚焦技术(analyte focusing by micelle collapse, AFMC)等。

MSS 是 Quirino 等^[125]于 2009 年提出的一种新 的胶束电动色谱模式。这种模式构建了有机溶剂 含有胶束的样品--有机溶剂区带,在有机溶剂-含有 胶束样品之间形成胶束到溶剂堆积边界(micelle to solvent stacking boundary, MSSB),样品被捕获在 胶束中逆电场方向向 MSSB 运动,在 MSSB 边界上, 样品离子会分配到有机溶剂中,但由于待分析离子 与胶束带相反电荷,待分析离子又会沿电场方向进 入到胶束中,从而在 MSSB 上堆积,最终捕获在胶束 中的样品离子在区带电泳模式下分离。这一模式更 类似于边界堆积,与胶束和样品离子的相互作用无 关,因而与吹扫技术有所不同。他们采用 SDS 与甲 醇或乙腈形成 MSSB,对有机阳离子——两种心血 管舒张药物心得乐和美托洛尔的检测灵敏度提高了 10 倍,检出限分别能够达到 0. 03 和 0. 01 μ g/mL。 随后 Guidote 等^[126]考察了这一模式的原理,建立了 理论模型,以阳离子型表面活性剂十六烷基三甲基 铵与甲醇形成 MSSB,对有机阴离子——3 种降血脂 药物检测灵敏度提高了 10 倍。然后他们[127,128]又 将胶束到 MSS 与吹扫技术联用,发展了一种两步聚 焦提高检测灵敏度的办法,通过构建有机溶剂-样 品-胶束-有机溶剂区带,样品进入胶束区带被捕获 而聚焦,聚焦后的样品在胶束和有机溶剂构成的 MSSB 上二次聚焦。对有机阳离子——4种 β-阻断 剂和两种三环抗抑郁药物的检测灵敏度提高了约 20~50 倍;对有机阴离子——3 种降血脂药物的检 测灵敏度达到了 0. $05 \sim 0.55 \ \mu g/mL$,灵敏度提高了 约 20 倍。

AFMC 是由 Quirino 和 Haddad^[129]于 2008 年提 出的,它实现了中性分子从憎水性阴离子胶束内核 中转移、释放、累积到亲水相中。其主要原理为当样 品分子被胶束捕获后,共同进入到高盐浓度的区带 时,胶束碰撞解离为表面活性剂,从而将捕获的样品 分子快速释放实现堆积作用。Quirino 等^[130]将 AFMC 与 PF-MEKC 技术联用,结合 ESI-MS 对中性 物质烷基苯基酮和二羟基钛酸盐进行检测,检测灵 敏度提高了 100 倍。

3.5 联用技术

胶束电动毛细管色谱与多种在线聚焦技术联用 以提高检测灵敏度在最近几年的文章中也有诸多报 道。Britz-McKibbin 等^[131]采用动态 pH 连接与吹扫 技术在线分析 3 种黄素衍生物,检测灵敏度提高了 1 200 倍,检出限达到 pmol/L 级;Zhu 等^[132]采用单 滴液-液-液微萃取结合 LVSS 与吹扫技术联用以提 高腺嘌呤的检测灵敏度,电泳缓冲液为 10 mmol/L 四硼酸盐(含有 30%(v/v)的 ethylene glycol)和 50 mmol/L SDS。萃取时间为 10 min, 腺嘌呤的检测灵 敏度提高 550 倍,萃取时间为 30 min 和 60 min 时 可以使检测灵敏度提高 760 和 1 030 倍。在整个过 程中不需要电极转向,操作相对简便。Zhang 等^[133] 采用 LVSS 与吹扫技术结合对 5 种多酚类的富集倍 数为 18~26 倍,整个过程无需电极转向,操作简便。 Jin 等^[134]采用 LVSS 和选择性耗尽吹扫技术联用测 定三聚氰胺及其衍生物三聚氰胺二酰胺、氰尿酰胺、 三聚氰酸在牛奶中的含量,检测灵敏度能够达到 0. 01~0. 05 ng/mL。Cheng 等^[135] 采用动态 pH 连 接和 LVSS 及吹扫技术联用,同时结合固相萃取浓 缩来检测甲氨蝶呤及其 8 种代谢产物,检出限可以 达到 0. 1~0. 3 µmol/L。Luo 等^[136]利用浊点萃取-CSEI-sweeping-MEKC 联用分析孔雀石绿,他们以 含有 100 mmol/L SDS 的 50 mmol/L 柠檬酸(pH 2. 2) 为电泳缓冲液,以 250 g/L 的 Triton X-100 为 萃取剂,检测灵敏度可以达到 69.6 pg/mL;与毛细 管区带电泳(CZE)相比,孔雀石绿的检测灵敏度可 以提高 19 000 倍。Zhang 等^[137]提出了单根毛细管 中进行二维毛细管电泳的操作模式,样品首先经过 吹扫技术和电动进样浓缩,在 MEKC 模式下分离, 然后采用 AFMC 技术从胶束中释放粒子到溶液中, 目标部分转移到二维毛细管电泳在 CZE 模式下分 离。进样时间为 60 min,对黄酮类化合物的检出限 能够达到 7.3~36.4 ng/L,灵敏度提高了 6 000 倍。

张效伟等^[138]采用动态 pH 连接-吹扫技术结合 CZE 和 MEKC 的二维毛细管电泳平台实现了鼠尿中的 4 种药物及其对映体的聚焦和分离,检出限达到 $0.015\sim0.052 \text{ mg/L}_{\circ}$

4 等速电泳

等速电泳是将带同种电荷但电泳淌度分别比待 分析物高和低的电解质置于样品区带的前端和后 端,在外加电场下,样品离子受到 Kohlrausch 调整 函数、欧姆定律(Ohm's Law)及移动边界理论 (moving boundary theory)的调节^[139],在毛细管内 形成电场强度梯度,待分析离子在样品与前导电解 质(LE)边界上速度减慢而堆积,而后置电解质(TE) 会压缩样品区带,达到稳态后,3 个区带紧密相连, 最终以相同速度运动。

等速电泳聚焦一般与毛细管区带电泳联用实现 样品的在线浓缩和分离,这既可以通过两根毛细管 联用和柱切换实现,也可以在单根毛细管中构建等 速电泳区带实现。在后一种情况中,前导离子和后 置离子既可以存在于样品区带中,也可以位于电泳 缓冲液中,具有多种操作模式^[140]。在完成等速电 泳聚焦后,电泳缓冲液破坏等速电泳聚焦的条件,在 区带电泳条件下实现分离,又被称为瞬时等速电泳 (t-ITP)。而当前导离子在样品溶液中时,如生物或 环境样品中含有的浓度很高的盐类如 NaCl 等,也能 够实现等速电泳聚焦作用[141,142],因而被称为"样品 自聚焦"(sample self-stacking)^[143]。由于这些样品 即使稀释很高倍数也无法采用场强放大样品堆积等 技术而聚焦,等速电泳因而呈现出独特的优势。由 于等速电泳也采用不连续的电解质,在泳道内会存 在泳动淌度和电荷密度梯度,从而会形成电场强度 梯度以及电渗流梯度,同时不同种类的电解质由于 电导率和浓度不同也会影响毛细管表面局部的 Zata 电势。泳道内局部电渗流的差异会形成压力梯度, 导致样品区带的弥散,降低浓缩效率。因而在 ITP 中一般采用抑制电渗流的模式,如采用酸性背景缓 冲液(pH 2~3),在电泳溶液中加入阳离子表面活性 剂对毛细管表面改性,或高分子聚合物(聚乙烯吡咯 烷酮(PVP)、羟乙基纤维素(HEC)等),以及提高背 景缓冲液的离子强度等。

等速电泳聚焦需要提前了解待分析离子在选定 电泳缓冲液条件下的电泳淌度。为了实现较好的聚 焦效果,可以通过优化实验条件或选择合适的前导 和后置离子种类来实现。目前可以采用计算机软件 和数值计算等方式对实验条件及各种参数进行模 拟,考察其对聚焦的影响,从而简化实验并对实验设 计进行指导,因此在等速电泳中也获得广泛的应用。

为了提高等速电泳的聚焦效果,选择合适的前 导和后置离子的种类和浓度、电渗流及进样时间等 都显得十分重要。Jung 等^[144]在微流控芯片上基于 非弥散一维模型考察了初始样品离子浓度、前导离 子和后置离子的浓度等参数对等速电泳聚焦效果的 影响,发现浓缩样品离子的浓度与前导离子的浓度 成正比,而后置离子浓度降低会增强电场强度,从而 提高样品堆积的速率;电渗流会增加样品的弥散。 因而在高浓度前导离子、低浓度后置离子及抑制电 渗流时,检测灵敏度会有很大的提高,采用落射式倒 置荧光显微镜对小分子有机染料 Alexa Fluor 488 的检出限(信噪比(*S/N*) = 11)可以达到 100 fmol/L,富集倍数为 200 万倍。

为了提高检测灵敏度和聚焦效果,增加样品的 进样量是简单有效的方法,但它同时会导致聚焦不 完全、缩短分离窗口、降低分离效率等问题。为了克 服弥散和保证分离度,学者们采用水流或电渗流来 平衡待分析物的运动离子的运动,从而得到很高的 富集倍数。Yan 等^[145]在等速电泳中以电渗流为反 向推动力,压缩等速聚焦的谷胱甘肽和氧化态谷胱 甘肽至进样端,反转电极,最终在区带电泳模式下分 离,对谷胱甘肽和氧化态谷胱甘肽的富集倍数分别 为 320 和 280 倍。Breadmore^[146]构建了静止等速电 泳界面(前导离子为 Cl⁻,后置离子为 2-吗啉乙磺酸 (MES)),实现样品离子在静止边界的堆积。静止边 界在进样 5 min 后形成,前导电解质的 pH 只能改变 静止边界在毛细管中的位置,可以稳定 60 min 左 10 000 倍,检出限达到了 0. 05~0. 66 ppb。

Shackman 等^[147]采用电渗流和水流来平衡样品 离子,实现连续进样,发展了梯度洗脱等速电泳技术 (gradient elution isotachophoresis, GEITP)。毛细 管内充满的前导电解质在水流和电渗流的共同作用 下被推出毛细管的进样端口,溶于后置电解质中的 样品离子由于等速电泳作用而在进样端聚焦,控制 水流速度使聚焦界面静止,从而实现连续进样;降低 水流速度后,聚焦的样品离子进入到毛细管在区带 电泳模式下分离。由于这种技术在毛细管外实现聚 焦,聚焦效果几乎不受进样体积的限制,因而毛细管 长度仅为3 cm,且聚焦效率很高,2 min 内对有机小 分子染料、氨基酸、蛋白质及 DNA 的富集效率均能 够高于 10 000 倍,8 min 内对羧基荧光素的富集倍 数甚至可以达到 100 000 倍。Mamunooru 等^[148]对

色氨酸和酪氨酸的检测灵敏度分别达到 51 和 215 nmol/L,富集倍数为 860 和 1 900 倍。针对 GEITP 分离能力较差的问题,Davis 等^[149] 又将其与 CZE 结合,通过调控低压水流来调节分离度,方法比较简单、方便,11 min 内对 6 种氨基酸的检测灵敏度达到 200 fmol/L。Vyas 等^[150] 采用 GEITP 对谷氨酸和天冬氨酸进行检测,检出限分别达到 120 和 180 nmol/L。

电动进样与等速电泳结合发展的超负荷电动供 给技术(electrokinetic supercharging, EKS)在增加 进样量、提高检测灵敏度方面也起到了重要作用。 它于 2003 年由 Hirokawa 等^[151]提出并命名,充分稀 释的样品经电动大体积进入毛细管中,前后两端分 别充入前导离子和后置离子,加电压后在等速电泳 的作用下实现聚焦。近年来该技术获得了较快的发 展,已广泛用于多种类型分析物的预浓缩。Dawod 等[152]采用反流 EKS 检测非甾体抗炎药等,浓缩因 子达到 11 800 倍,检出限达到 10.7~47.0 ng/L。 徐中其等[153]采用超负荷电动供给技术在微流控芯 片上实现了对不同片段长度的 DNA 的聚焦和分离, DNA 在 260 nm 检测波长下的检出限达到 0.07 mg/L。Xu 等^[154]发现在毛细管进样端采用环形电 极及搅拌样品溶液能够得到更高的富集效率和检测 灵敏度,采用 EKS 对 7 种稀有金属的富集效率可以 提高 500 000 倍,检测灵敏度能够达到 1 ng/L。这 是因为环形电极与金属丝相比在相同电压下场强会 明显增加,而搅拌样品则能够使进入样品的浓度分 布更均匀,使样品池中进入毛细管中而损失的部分 得到补充,从而增大进样量。他们[155]采用进样过 程中 H⁺ 浓度增加构成后置离子区带实现对稀有元 素的聚焦,检测灵敏度达到 ppt 级。他们^[156]采用浮 点超负荷电动供给技术在多弯道的微流控芯片上抑 制样品区带弥散,对 50 bp DNA 片段的检测灵敏度 达到 0. 23 μg/mL,富集倍数达到 100 倍。Lu 等^[157] 采用 EKS 在非水毛细管电泳(NACE)中对 7 种酚类 物质的检测灵敏度提高了 1 333 和 3 440 倍。Hirokawa 等^[158]采用 EKS 用于 DNA 片段的分离分析。 Busnel 等^[159]对胰岛素酶解 β -乳球蛋白形成的多肽 的检测灵敏度达到 nmol/L 级,富集倍数达到 1 000 $\sim 10\ 000$ 倍。

毛细管电泳的管道形状和尺寸大小及进样方式 也会对 ITP 的聚焦效果有影响。学者们设计了多 种微流控泳道以提高富集效率。Bottenus 等^[160]设 计了总长为 3.9 cm 的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA) 微流控系统,通道长度为 3.3 cm,其中包括长度为 11 mm,宽度为 1 mm,深度为 100 μ m 的进样管道和 宽度为 1 mm,深度由 100 μ m 逐渐减小至 20 μ m 及 宽度为 100 μ m,深度为 20 μ m 的 3 个区段。进样端 到出口端管道尺寸逐渐减小,在 ITP 聚焦和管道收 缩的共同作用下,对生物标志物强心剂肌钙蛋白 I 的富集系数能够达到 10 000 倍。Bahga 等^[161] 也发 现在微流控系统中采用尺寸强烈收缩的泳道比常用 的尺寸一致的泳道能够明显地提高检测灵敏度,他 们基于电泳-扩散传质平衡建立了自由扩散模型,并 采用计算机模拟和实验考察了改变泳道长度、尺寸、 几何形状时在 ITP 条件下检测灵敏度的增强作用, 发现 对 Bis-Tris 的 检测 灵 敏 度 能 够 达 到 100 nmol/L。

Shihabi^[162,163]提出了一种以有机溶剂为后置电 解质实现等速电泳的模式,并将其命名为准等速电 泳(pseudo-tITP)。由于有机溶剂不需要调节 pH 和 浓度,且焦耳热很小,操作简便,因而在聚焦中具有 一定的优势,成为非常特色的一类等速电泳技术。 他采用乙腈为后置电解质分析酪胺和去甲肾上腺 素,极大地提高了检测灵敏度,同时由于需要用乙腈 沉淀蛋白,因而无需前处理过程,简单方便。目前在 准等速电泳中常用的有机溶剂是乙腈、丙酮及乙醇 等。Chen 等^[164] 以 Cl⁻ 为前导离子, 以 70%(v/v)甲 醇为后置电解质,进样量达到毛细管总体积的 50% 时,对多肽激素的检出限可以达到 $0.04 \sim 0.2$ nmol/L,浓缩效率提高了 100 倍。Botello 等^[165]以 Cl⁻为前导离子,以 0.1%NaCl/乙腈(30:70, v/v) 为后置电解质,对非甾体抗炎药检测灵敏度达到 0.07 mg/L,富集倍数为 45 倍。

目前,等速电泳在药物、食品、环境科学及生命 科学等领域获得了广泛的应用。等速电泳可以根据 目标离子的电泳淌度选择合适的前导和后置离子确 定淌度范围,实现对目标离子的选择性聚焦,因而对 复杂生物样品中的 DNA、RNA、蛋白质、多肽及药物 和代谢产物等的分析中具有独特的优势。我们[166] 利用 t-ITP 技术发展了 DNA 驱动聚焦技术 (DNA driven focusing)可应用于 DNA 损伤免疫分析及适 配体的亲和分析。我们采用淌度不同的不连续电解 质(高电泳淌度的 Ac^- 、 Cl^- 、 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} 和低电 泳淌度的 glycine⁻),在强电渗流作用下发现无论采 用 16 mer (~4.8 kDa),90 mer 的寡核苷酸链还是 细胞内 DNA 均能引导实现 7,8-二醇-9,10-环氧苯 并芘(BPDE)-DNA 加合物与荧光标记的抗体(\sim 156 kDa)结合形成的免疫复合物的聚焦,在 LIF 检 测条件下,对 BPDE-DNA 加合物的理论塔板数达到

 $10^5/m$,检测灵敏度能够达到 1 pmol/L,富集倍数为 30~70 倍;对适配体-蛋白复合物的富集效率为 70 ~120 倍。同时我们将毛细管表面共价键合线性聚 丙烯酰胺涂层,在抑制电渗流条件下应用 DNA 驱动 聚焦技术,并采用高荧光量子产率的量子点(quantum dots)标记抗体与 BPDE-DNA 结合^[167],在 LIF 检测时,对 BPDE-DNA 加合物的检测灵敏度能够达 到 120 fmol/L,这比传统的³²P 后标记检测方法的检 测灵敏度要高 5 400 倍,从而能够实现生物体内痕 量的 DNA 加合物的分析。我们^[168] 又将这种 DNA 驱动聚焦技术应用到生物体最重要的表观遗传修饰 形式 DNA 甲基化的免疫分析(高电泳淌度离子为 Ac^- ,低电泳淌度离子为 glycine⁻),检出限能够达 到 0. 3 nmol/L, 而且具有很高的特异性。我们^[169] 基于 t-ITP 技术采用离子对 TG(Tris⁺, glycine⁻)-TGA(Tris⁺, glycine⁻, Ac⁻)聚焦小分子有机染料 POPO-3 嵌合标记的 ct DNA(3.5 kbp),无论在抑制 电渗流还是强电渗流条件下,聚焦效果都有明显的 提高,检测灵敏度达到 7.9 fmol/L,并采用这种技术 与无胶筛分技术联用实现了 6 种不同片段的 DNA 的聚焦和分离,理论塔板数能够达到 1.8×10⁶/m。

Wang $\mathbb{P}^{[170]}$ 在 PMMA 的十字微流控芯片上采 用等速电泳(前导离子为 Cl^- ,后置离子为 $glycine^-$)实现了对凝血酶适配体及其与凝血酶的复合 物聚焦和分离,对适配体和凝血酶的复合物的检测 灵敏度提高了 1 100 倍,检出限达到 0.5 amol。 Persat $\mathbb{P}^{[171]}$ 在微流控芯片上采用等速电泳选择性 抽提、分离和纯化 nL 级全血样品中的 DNA,全血样 品经 Triton X-100 裂解和 4 μ L 蛋白酶 K 酶解后在 芯片上利用等速电泳(前导离子为 Cl^- ,后置离子为 4-羟乙基呱嗪乙磺酸(HEPES))的选择性聚焦作用 纯化 DNA,纯化后的 DNA 样品可以直接用于聚合 酶链反应(PCR)扩增;同时,他们从 2.5 nL 的血样 中提取出(44±9) pg 的 DNA 样品,具有较高的提取 效率,也表明了等速电泳在分离分析复杂样品基质 上的高效能力。

Xu 等^[172]采用毛细管凝胶电泳(CGE)结合等速 电泳聚焦实现了对不同片段长度 DNA 的聚焦和分 离,他们用 50 bp 不同长度的 DNA 片段和 φ X174/ HaeIII digest 等 DNA 标准样品评价这一效果,其中 对信号最弱的 72 bp 的 DNA 片段的检测灵敏度也 能够达到 0. 09 ng/mL。Liu 等^[173]采用 CGE 与 tITP 结合对 PCR 产物的 DNA 进行聚焦和分离, PCR 溶液中的 Cl⁻ 为前导离子,电泳溶液中的 HEPES 为后置离子,在激光共聚焦显微镜上对 DNA 片段的检测灵敏度达到了 1.1 ng/mL,富集倍数为 20 倍。Liu 等^[174]在微流控芯片上进行等速电泳结 合 PCR 扩增对肝炎病毒 B(HVB)的基因型进行了 聚焦和分离分析,平均检测灵敏度达到了 0.0021 pg/μ L,他们采用这一技术对 200 多例病人的 HVB 基因型进行了分析。

Santiago 等^[175]选择性聚焦了 miRNA 并对其定 量。他们以 92.5% (v/v)的叶酸-5 mmol/L Tris-2.5 mmol/L 己酸为 TE,同时设计了 $3 \land \text{LE}$ 区带 LE1、LE2 和 LE3,每个区带中含有不同浓度的筛分 介质(PVP, 相对分子质量为1000000)、变性剂(尿 素)及 Cl^- , 22 nt 的 miRNA 和 40~60 nt 的 RNA 在 $LE1(高 Cl^- 浓度, \mathbb{K} PVP 浓度) 中均被聚焦, 在 LE2$ 中降低了前导离子 Cl⁻浓度同时增大筛分介质 PVP 的浓度, ϕ 22 nt 的 miRNA 淌度略高于 TE, π 40~ 60 nt 的长链 RNA 淌度则低于 TE,从而实现对 22 nt 的 miRNA 的选择性聚焦。基于此,他们^[176]对人 肾脏细胞中的短链 RNA 进行选择性抽提、分离、纯 化,排除了大于 60 nt 的长链 RNA 的干扰,这对研 究 RNA 在生物体内的功能有重要意义。在此基础 上,他们^[177]又采用分子信标与 miRNA-122 配对,对 其进行荧光标记同时改变电泳淌度,在等速电泳条 件下聚焦已配对的 miRNA-122 与弥散未配对的分 子信标,并对人体肝脏和肾脏中的 miRNA 的含量进 行了定量检测。然后将这种技术用于细菌细胞中丰 度较高(5.5%)的 16S rRNA(1542 nt)含量的检 测[178],以此计算细菌的数目,并对病人尿液中的大 肠杆菌的数量进行了测定,含量约为 $10^6 \sim 10^8$ cfu/ mL.

Wang 等[179] 将等速电泳(前导离子为 Cl⁻,后置 离子为丙氨酸)用于分析血清脂蛋白,在6 min 内实 现了9种亚型的聚焦和分离,结果与传统方法具有 较好的一致性;根据高密度、中间密度、低密度脂蛋 白等的定量和相对比值分析了脂质代谢酶活性及肾 病综合征病人的脂质代谢特征。Medina-Casanellas 等[180]将等速电泳结合固相萃取一飞行时间质谱 (SPE-ITP-TOF-MS)用于人血浆中多肽的分析,检 测灵敏度能够达到 0. 01 \sim 0. 1 ng/mL。Xia 等^[181] 采用等速电泳结合电喷雾质谱(ITP-ESI-MS)对脑 和肠中的多肽激素进行检测,检测灵敏度达到 0. 01 μmol/L,提高了 40~230 倍。Gupta 等^[182]采用等速 电泳实现了基因改良后甘蔗表达的纤维素酶的聚 焦,而果汁中其他干扰物质则被除去。这种方法与 超滤等方法相比,分析时间更短且有效蛋白质的损 失更少。

Ranc 等^[183]采用等速电泳和表面增强拉曼散射 (SERS)对尿液中的布舍瑞林进行分析,估算的检测 灵敏度能够达到 10 pmol/L。等速电泳聚焦显示了 很强的抗复杂生物样品基质的能力,在临床分析中 具有潜在的价值。Marak 等^[184]采用等速电泳对尿 液进行预处理,结合直接进样纳流电喷雾质谱(ITP-DI-nESI-MS)分析其中的布舍瑞林, Na⁺为前导离 子,β-丙氨酸为后置离子,检测灵敏度能够达到 10 $\mu g/L$ 。Pantuckova 等^[185]采用等速电泳和区带电泳 柱切换技术结合分析了人血液、血清和尿液中的 5-甲基四氢叶酸的含量,3类样品中目标物的检测灵 敏度分别能够达到 4. 2×10^{-7} 、1. 1×10^{-7} 、4. $7 \times$ 10^{-6} mol/L。Mikus 等^[186]采用等速电泳分析人尿液 中的氨氯地平。Zheng 等^[187]采用等速电泳结合安 培检测对甲基麻黄素、celiprolol、sotalol、indapamide 等的检测灵敏度分别能够达到 4. 2×10^{-14} 、6. $3 \times$ 10^{-13} 、5. 8×10⁻¹⁴、9. 5×10⁻¹³ mol/L,富集倍数为 5 500 倍。Novakova 等^[188] 采用等速电泳与区带电 泳结合对从血清中的对乙基葡糖苷酸的检测灵敏度 能够达到 9.8 nmol/L。Knob 等^[189]采用等速电泳 与区带电泳联用分析了水样中的溴化苯酚,检测灵 敏度能够达到 10 nmol/L。Kosobucki 等^[190] 以离子 液体为终止电解质用于分析水体中的金属阳离子。

同时,等速电泳与诸多其他毛细管在线聚焦技 术联用以提高检测灵敏度。Quirino^[191]报道了碱诱 导的瞬时等速电泳技术(base induced t-isotachophoresis, BI t-ITP)用于弱酸性药物的分析。这 种方法结合了动态 pH 连接和 t-ITP 的优势,对降血 脂类等药物的检测灵敏度提高了 $19 \sim 37$ 倍。 Huang 等^[192]将 FASS 与 t-ITP 联用,以 β-环糊精为 手性添加剂,浓缩并分离了β-受体激动剂类对映异 构体,检测灵敏度提高了 250 倍。Zhang 等^[193]将 FASS 与准等速电泳联用,对生物碱的检测灵敏度达 到 0. 1 \sim 0. 3 ng/mL, 富集倍数达到 1400 倍。 Zhang 等^[194] 采用多种毛细管浓缩技术和二维毛细 管电泳分析尿液中的药物含量。样品采用在 CSEI 技术预浓缩后于第一维的区带电泳中分离,根据淌 度不同先后流出的离子在第二维的胶束电动毛细管 电泳中分离,同时采用动态 pH 连接和吹扫联用,对 样品的富集倍数为 5 000~12 000 倍。

5 研究展望

综上所述,目前毛细管电泳在线聚焦技术取得 了许多重要的进展,对无机离子、有机分子、氨基酸、 多肽、蛋白质和 DNA 的聚焦和分离发挥了重要作 用,成为医药、食品、环境、生命科学等领域十分重要 的技术手段。多种在线聚焦技术联用实现堆积作 用,提高检测灵敏度成为当前发展的趋势。同时许 多新方法和新技术不断被提出,结合其他领域技术 实现特定样品的分析也拓展了毛细管电泳的应用范 围。这些电泳聚焦技术如何更有效地应用于蛋白 质、DNA 及生物大分子相互作用的分析将成为人们 研究的热点。

参考文献:

谱

- [1] Timerbaev A. J Sep Sci, 2008, 31(11): 2012
- [2] Timerbaev A. Electrophoresis, 2007, 28(19): 3420
- [3] Timerbaev A. Electrophoresis, 2010, 31(1): 192
- [4] Foret F. Electrophoresis, 2009, 30(S1): S34
- [5] Kasicka V. Electrophoresis, 2006, 27(1): 142
- [6] Lu H. Anal Methods, 2011, 3(3): 488
- [7] Prokhorova A, Shapovalova E, Shpigun O. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(5): 1170
- [8] Fonslow B R, Yates J R. J Sep Sci, 2009, 32(8): 1175
- [9] Kleparnik K, Bocek P. Chem Rev, 2007, 107(11): 5279
- [10] Subirats X, Blaas D, Kenndler E. Electrophoresis, 2011, 32 (13): 1579
- [11] Huang W, Ai F, Wang Z, et al. J Chromatogr B, 2008, 866 (1/2): 104
- [12] Garcia-Canas V, Cifuentes A. Electrophoresis, 2008, 29(1): 294
- [13] Suntornsuk L. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(1): 29
- [14] Ha P, Hoogmartens J, Van Schepdael A. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(1): 1
- [15] Scriba G K E. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(4): 688
- [16] Tagliaro F, Pascali J, Fanigliulo A, et al. Electrophoresis, 2010, 31(1): 251
- [17] Ali I, Gupta V, Aboul-Enein H. Crit Rev Anal Chem, 2008, 38(3): 132
- [18] Mahugo S C, Sosa F Z, Torres P M, et al. Molecules, 2009, 14(1): 298
- [19] Tankiewicz M, Fenik J, Biziuk M. Trac-Trend Anal Chem, 2010, 29(9): 1050
- [20] Kleparnik K, Bocek P. BioEssays, 2010, 32(3): 218
- [21] Breadmore M, Thabano J, Dawod M, et al. Electrophoresis, 2009, 30(1): 230
- [22] Sueyoshi K, Kitagawa F, Otsuka K. J Sep Sci, 2008, 31(14): 2650
- [23] Mala Z, Gebauer P, Bocek P. Electrophoresis, 2011, 32(1): 116
- [24] Simpson S, Quirino J, Terabe S. J Chromatogr A, 2008, 1184 (1/2): 504
- [25] Aebersold R, Morrison H. J Chromatogr A, 1990, 516(1): 79
- [26] Britz-McKibbin P, Chen D. Anal Chem, 2000, 72(6): 1242
- [27] Britz-McKibbin P, Bebault G, Chen D. Anal Chem, 2000, 72
 (8): 1729
- [28] Silva M. Electrophoresis, 2011, 32(1): 149
- [29] Silva M. Electrophoresis, 2009, 30(1): 50
- [30] Aranas A, Guidote A, Quirino J. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(1): 175
- [31] Quirino J P, Kim J B, Terabe S. J Chromatogr A, 2002, 965

(1/2): 357

- [32] Gebauer P, Mala Z, Bocek P. Electrophoresis, 2011, 32(1): 83
- [33] Hou X L, Deng D L, Wu X, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(35): 5622
- [34] He H, Lv X, Yu Q, et al. Talanta, 2010, 82(4): 1562
- [35] Li H, Wang P H, Li C, et al. Microchem J, 2008, 89(1): 34
- [36] Yu L S, Xu X Q, Huang L, et al. Electrophoresis, 2009, 30 (4): 661
- [37] Zinellu A, Sotgia S, Murtas V D, et al. Anal Bioanal Chem, 2011, 399(3): 1181
- [38] Zinellu A, Sotgia S, Campesi I, et al. Talanta, 2011, 84(3): 931
- [39] Lian D S, Zhao S J. Biotechnology (连冬生,赵树进. 生物技术), 2009, 19(6): 57
- [40] Yeh H, Yang Y, Ko J, et al. Electrophoresis, 2008, 29(17): 3649
- [41] Li J, Jiang Y. Biomed Chromatogr, 2010, 24(2): 186
- [42] Zheng X, Lu M, Zhang L, et al. Talanta, 2008, 76(1): 15
- [43] Weng Q F, Xu G W, Yuan K L, et al. J Chromatogr B, 2006, 835(1/2): 55
- [44] Xu L, Basheer C, Lee H K. J Chromatogr A, 2010, 1217 (39): 6036
- [45] Honegr J, Safra J, Polasek M, et al. Chromatographia, 2010, 72(9/10): 885
- [46] Bailón-Pérez M I, García-Campaña A M, Cruces-Blanco C, et al. Electrophoresis, 2007, 28(22): 4082
- [47] Li P, Duan J, Hu B. Electrophoresis, 2008, 29(14): 3081
- [48] Herrera-Herrera A V, Ravelo-Perez L M, Hernandez-Borges J, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(31): 5352
- [49] Li Y, He Y Z. Chinese Journal of Chromatography (李云,何 友昭. 色谱), 2005, 23(1): 100
- [50] Kitagawa S, Noji A, Matushita N, et al. Electrophoresis, 2011, 32(12): 1480
- [51] Zhu Z F, Yan N, Zhou X, et al. J Sep Sci, 2009, 32(20): 3481
- [52] Zhang Z X, Zhang X W, Wang J J, et al. Anal Bioanal Chem, 2008, 390(6): 1645
- [53] Zhang Z C, Wang J H, Hui L M, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(31): 5336
- [54] Ramsay L M, Cermak N, Dada O O, et al. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(7): 2025
- [55] Mohan D, Lee C S. Electrophoresis, 2002, 23(18), 3160
- [56] Wang T T, Ma J F, Wu S B, et al. J Chromatogr B, 2011, 879(11/12): 804
- [57] Wei J A, Gu X, Wang Y, et al. Electrophoresis, 2011, 32 (2): 230
- [58] Liu H C, Yang C, Yang Q, et al. J Chromatogr B, 2005, 817(1): 119
- [59] Han B, Wang PL, Zhang LH, et al. Chinese Journal of Chromatography (韩彬,王平利,张丽华,等. 色谱), 2009, 27 (4): 383
- [60] Lin J, Tan Q, Wang S. J Sep Sci, 2011, 34(14): 1696
- [61] Weiss N, Hayes M, Garcia A, et al. Langmuir, 2011, 27(1): 494
- [62] Egatz-Gomez A, Thormann W. Electrophoresis, 2011, 32 (12): 1433
- [63] Zhao Y, Lunte C. Anal Chem, 1999, 71(18): 3985
- [64] Arnett S, Lunte C. Electrophoresis, 2003, 24(11): 1745

- [65] Hoque M E, Amett S D, Lunte C E. J Chromatogr B, 2005, 827(1): 51
- [66] Gillogly J A, Lunte C E. Electrophoresis, 2005, 26(3): 633
- [67] Wang S, Yang P, Zhao X. Chromatographia, 2009, 70(9/ 10): 1479
- [68] Wu Y, Liu J, Deng Z, et al. J Sep Sci, 2010, 33(19): 3068
- [69] Baidoo E E K, Benket P I, Neususs C, et al. Anal Chem, 2008, 80(9): 3112
- [70] Ye H, Xia S, Lin W, et al. Electrophoresis, 2010, 31(20): 3400
- [71] Kazarian A A, Hilder E F, Breadmore M C. Analyst, 2010, 135(8): 1970
- [72] Jaafar J, Irwan Z, Ahamad R, et al. J Sep Sci, 2007, 30(3):
 391
- [73] Zhang X, Xu S, Sun Y, et al. Chromatographia, 2011, 73 (11/12): 1217
- [74] Arnett S, Lunte C. Electrophoresis, 2007, 28(20): 3786
- [75] Hasan M, Park S, Oh E, et al. J Sep Sci, 2010, 33(23/24): 3701
- [76] Yu L J, Li S F Y. Electrophoresis, 2005, 26(22): 4360
- [77] Cao C X, Fan L Y, Zhang W. Analyst, 2008, 133(9); 1139
- [78] Cao C X, Zhang W, Qin W H, et al. Anal Chem, 2005, 77 (4): 955
- [79] Cao C X, He Y Z, Li M, et al. Anal Chem, 2002, 74(16): 4167
- [80] Wang X, Zhang W, Fan L Y, et al. Anal Chim Acta, 2007, 594(2): 290
- [81] Li M, Fan L Y, Zhang W, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(8): 2719
- [82] Wang Q L, Fan L Y, Zhang W, et al. Anal Chim Acta, 2006, 580(2): 200
- [83] Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, et al. Anal Chem, 1984, 56(1): 111
- [84] Shen H J, Lin C H. Electrophoresis, 2006, 27(5/6): 1255
- [85] Cao J, Dun W. Talanta, 2011, 84(1): 155
- [86] Chen Y, Zhang L, Cai Z, et al. Analyst, 2011, 136(9): 1852
- [87] Wang C, Han D, Wang Z, et al. Anal Chim Acta, 2006, 572(2): 190
- [88] Liu F K. J Chromatogr A, 2008, 1215(1/2): 194
- [89] Wang C, Wang Z, Han D D, et al. Anal Lett, 2006, 39(9): 1927
- [90] Lin S C, Lin S W, Chen J M, et al. Talanta, 2010, 82(2): 653
- [91] Huang C W, Jen H P, Wang R D, et al. J Chromatogr A, 2006, 1110(1/2): 240
- [92] Li L J, Wu F M, Yu L B, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (李利军, 吴峰敏, 喻来波, 等. 分析试验室), 2008, 27(12): 55
- [93] Yan Y N, Wang L J, Yang G L, et al. Chinese Journal of Chromatography (闫永娜,王利娟,杨更亮,等. 色谱), 2009, 27(6): 860
- [94] Aranas A T, Guidote A M Jr, Haddad P R, et al. Talanta, 2011, 85(1): 86
- [95] Zhang S, Yin X, Yang Q, et al. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(3): 1071
- [96] Zhang S, Li C, Song S, et al. Anal Methods, 2010, 2(1): 54
- [97] Sun J, Chen G H, Wang K, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (孙娟,陈冠华,王坤,等. 分析化学), 2010, 38(8): 1151

- [98] Wang Q, Yang G L, Zhang L. Chinese Journal of Chromatography (王全,杨更亮,张骊. 色谱), 2007, 25(3): 341
- [99] Tsai C H, Chan P H, Lin C H, et al. Electrophoresis, 2006, 27(23): 4688
- [100] Tsai C H, Lin J D, Lin C H. Talanta, 2007, 72(2): 368
- [101] Kitagawa S, Noji A, Matsushita N, et al. Electrophoresis, 2011, 32(12): 1480
- [102] Zhang L, Xu Y, Li Y P. Chinese Journal of Chromatography(张良,许杨,李燕萍. 色谱), 2010, 28(4): 393
- [103] Gan N, Li T H, Wang L Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (干宁,李天华,王鲁雁,等. 色谱), 2007, 25 (6): 934
- [104] Gong M, Wehmeyer K R, Limbach P A. J Chromatogr A, 2006, 1125(2): 263
- [105] Zhang X, Zhang Z. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(2): 330
- [106] Gong M, Wehmeyer K R, Limbach P A, et al. Anal Chem, 2006, 78(17): 6035
- [107] Quirino J, Terabe S. Anal Chem, 2000, 72(6): 1023
- [108] Fang N, Meng P, Zhang H, et al. Analyst, 2007, 132(2): 127
- [109] Maijo I, Borrull F, Aguilar C, et al. Chromatographia, 2011, 73(1/2): 83
- [110] Cheng H L, Jong Y J, Li J H, et al. Electrophoresis, 2006, 27(23): 4711
- [111] Huang H Y, Hsieh S H. J Chromatogr A, 2007, 1164(1/2): 313
- [112] Yang Y, Nie H, Li C, et al. Talanta, 2010, 82(5): 1797
- [113] Huang H Y, Lien W C, Huang I Y. Electrophoresis, 2006, 27(16): 3202
- [114] Li X, Hu J, Han H. J Sep Sci, 2011, 34(3): 323
- [115] Lin Y H, Li J H, Ko W K, et al. J Chromatogr A, 2006, 1130(2): 281
- [116] Lin Y H, Lee M R, Lee R J, et al. J Chromatogr A, 2007, 1145(1/2): 234
- [117] Lin Y H, Chiang J F, Lee M R, et al. Electrophoresis, 2008, 29(11): 2340
- [118] Chen X, Yuan H P, Cao Y H, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈新,袁红萍,曹玉华,等. 色谱), 2010, 28 (9): 889
- [119] Valtcheva L, Mohammad J, Pettersson G, et al. J Chromatogr A, 1993, 638(2): 263
- [120] Sueyoshi K, Kitagawa F, Otsuka K. Anal Chem, 2008, 80(4): 1255
- [121] Quirino J. Electrophoresis, 2011, 32(6/7): 665
- [122] Ge L, Yong J W H, Tan S N, et al. Electrophoresis, 2008, 29(10), 2126
- [123] Ge L, Tan S N, Yong J W H, et al. Electrophoresis, 2008, 29(10): 2024
- [124] Huang J, Kang J. J Chromatogr B, 2007, 846(1/2): 364
- [125] Quirino J. J Chromatogr A, 2009, 1216(2): 294
- [126] Guidote A, Quirino J. J Chromatogr A, 2010, 1217(40): 6290
- [127] Quirino J. J Chromatogr A, 2010, 1217(49): 7776
- [128] Quirino J, Guidote A. J Chromatogr A, 2011, 1218(7): 1004
- [129] Quirino J, Haddad P. Anal Chem, 2008, 80(17): 6824
- [130] Quirino J P, Haddad P R. Electrophoresis, 2009, 30(10): 1670
- [131] Britz-McKibbin P, Otsuka K, Terabe S. Anal Chem, 2002,

74(15): 3736

谱

- [132] Zhu Z, Zhou X, Yan N, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217 (11): 1856
- [133] Zhang H, Zhou L, Chen X. Electrophoresis, 2008, 29(7): 1556
- [134] Jin Y, Meng L C, Li M X, et al. Electrophoresis, 2010, 31 (23/24): 3913
- [135] Cheng H, Chiou S, Liao Y, et al. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(5): 2183
- [136] Luo X, Jiang X, Tu X, et al. Electrophoresis, 2010, 31(4): 688
- [137] Zhang Z, Du X, Li X. Anal Chem, 2011, 83(4): 1291
- [138] Zhang X W, Zhang Z X. Chinese Journal of Chromatography (张效伟,张召香. 色谱), 2010, 28(4); 397
- [139] Beckers J, Boček P. Electrophoresis, 2000, 21(14): 2747
- [140] Urbánek M, Křivánková L, Boček P. Electrophoresis, 2003, 24(3): 466
- [141] Timerbaev A, Hirokawa T. Electrophoresis, 2006, 27(1): 323
- [142] Křivánková L, Pantůčková P, Gebauer P, et al. Electrophoresis, 2003, 24(3): 505
- [143] Petr J, Maier V, Horakova J, et al. J Sep Sci, 2006, 29 (18): 2705
- [144] Jung B, Bharadwaj R, Santiago J. Anal Chem, 2006, 78(7): 2319
- [145] Yan N, Zhu Z, Ding N, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216 (49): 8665
- [146] Breadmore M. Electrophoresis, 2008, 29(5): 1082
- [147] Shackman J, Ross D. Anal Chem, 2007, 79(17): 6641
- [148] Mamunooru M, Jenkins R J, Davis N I, et al. J Chromatogr A, 2008, 1202(2): 203
- [149] Davis N I, Mamunooru M, Vyas C A, et al. Anal Chem, 2009, 81(13): 5452
- [150] Vyas C A, Mamunooru M, Shackman J G. Chromatographia, 2009, 70(1/2): 151
- [151] Hirokawa T, Okamoto H, Gaš B. Electrophoresis, 2003, 24(3): 498
- [152] Dawod M, Breadmore M, Guijt R, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216(15): 3380
- [153] Xu Z Q, Hirokawa T. Chinese Journal of Chromatography (徐中其,广川健. 色谱), 2009, 27(1): 102
- [154] Xu Z, Nakamura K, Timerbaev A, et al. Anal Chem, 2011, 83(1): 398
- [155] Xu Z, Kawahito K, Ye X, et al. Electrophoresis, 2011, 32 (10): 1195
- [156] Xu Z, Murata K, Arai A, et al. Biomicrofluidics, doi: 10. 1063/1. 3366719
- [157] Lu Y, Breadmore M C. J Chromatogr A, 2010, 1217(46): 7282
- [158] Hirokawa T, Takayama Y, Arai A, et al. Electrophoresis, 2008, 29(9): 1829
- [159] Busnel J M, Descroix S, Godfrin D, et al. Electrophoresis, 2006, 27(18): 3591
- [160] Bottenus D, Jubery T, Ouyang Y, et al. Lab Chip, 2011, 11 (5): 890
- [161] Bahga S, Kaigala G, Bercovici M, et al. Electrophoresis, 2011, 32(5): 563
- [162] Shihabi Z. Electrophoresis, 2000, 21(14): 2872
- [163] Shihabi Z. Electrophoresis, 2002, 23(11): 1612

- [164] Chen Y, Xu L, Zhang L, et al. Anal Biochem, 2008, 380 (2): 297
- [165] Botello I, Borrull F, Calull M, et al. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(2): 527
- [166] Wang H L, Lu M L, Le X C. Anal Chem, 2005, 77(15): 4985
- [167] Wang Z X, Lu M L, Wang X L, et al. Anal Chem, 2009, 81 (24): 10285
- [168] Wang X L, Song Y L, Song M Y, et al. Anal Chem, 2009, 81(18): 7885
- [169] Wang Z X, Wang C, Yin J F, et al. Electrophoresis, 2008, 29(22), 4454
- [170] Wang J, Zhang Y, Okamoto Y, et al. Analyst, 2011, 136 (6): 1142
- [171] Persat A, Marshall L A, Santiago J G. Anal Chem, 2009, 81 (22): 9507
- [172] Xu Z, Esumi T, Ikuta N, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216 (17): 3602
- [173] Liu D, Ou Z, Xu M, et al. J Chromatogr A, 2008, 1214(1/ 2): 165
- [174] Liu D, Shi M, Huang H, et al. J Chromatogr B, 2006, 844 (1): 32
- [175] Persat A, Chivukula R, Mendell J, et al. Anal Chem, 2010, 82(23): 9631
- [176] Schoch R B, Ronaghi M, Santiago J G. Lab Chip, 2009, 9 (15): 2145
- [177] Persat A, Santiago J. Anal Chem, 2011, 83(6): 2310
- [178] Bercovici M, Kaigala G, Mach K, et al. Anal Chem, 2011, 83(11): 4110
- [179] Wang Y, Wang H, Ju S, et al. Labmedicine, 2009, 40(9):

544

- [180] Medina-Casanellas S, Benavente F, Barbosa J, et al. Electrophoresis, 2011, 32(13): 1750
- [181] Xia S, Zhang L, Qiu B, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(23): 3719
- [182] Gupta R, Baldock S J, Fielden P R, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(51): 8026
- [183] Ranc V, Stanova A, Marak J, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(2): 205
- [184] Marak J, Stanova A, Gajdostinova S, et al. Electrophoresis, 2011, 32(11): 1273
- [185] Pantuckova P, Krivankova L. Electrophoresis, 2010, 31 (20): 3391
- [186] Mikus P, Marakova K, Marak J, et al. J Chromatogr B, 2008, 875(1): 266
- [187] Zheng L, Zhang L, Tong P, et al. Talanta, 2010, 81(4/5): 1288
- [188] Novakova M, Krivankova L. Electrophoresis, 2008, 29(8): 1694
- [189] Knob R, Marak J, Stanova A, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(20): 3446
- [190] Kosobucki P, Buszewski B. Anal Lett, 2010, 43(16): 2631
- [191] Quirino J. J Sep Sci, 2011, 34(9): 1020
- [192] Huang L, Lin Q, Chen Y, et al. Anal Methods, 2011, 3(2): 294
- [193] Zhang Z X, Zhang X W, Wang J J, et al. Anal Bioanal Chem, 2008, 390(6): 1645
- [194] Zhang Z, Zhang X, Li F. Science China: Chemistry, 2010, 53(5): 1183