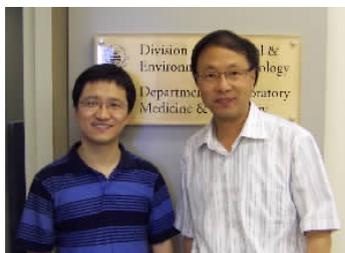


色谱研究的最新进展

赵 强¹, X. Chris LE (乐晓春)²

(1. 山西大学环境科学与工程研究中心, 山西 太原 030006;
2. University of Alberta, Edmonton, Canada T6G 2G3)



赵 强(左):毕业于北京大学化学与分子工程学院,分别于2000年和2005年获得学士和博士学位,2005-2009年在加拿大 Alberta 大学 X. Chris Le 教授小组作博士后工作。现在山西大学环境科学与工程研究中心从事分析化学研究工作。

乐晓春(X. Chris Le)(右):加拿大 Alberta 大学教授,分析和环境毒理研究分部主任,加拿大生物分析技术和环境健康领域的 Canada Research Chair,同时担任医学院病理和实验医学系、化学系和公共健康系的教授。任北京大学、武汉大学、浙江大学客座教授,中国科学院大连化学物理研究所和中国科学院生态环境研究中心客座研究员。担任四个期刊的编委及包括加拿大、美国、英国、奥地利、新加坡、中国国家基金委及中国科技部等十多家基金会的基金评委,并为多家科研和政府机构提供咨询和顾问工作。主要从事生物分析化学、环境化学、毒理和人体健康等方面的研究工作。承担了 DNA 损伤和修复、DNA 与蛋白质的相互作用、微量元素的形态分析和代谢过程及环境毒物对人体健康的影响等方面的相关课题。

作为本期《色谱》的聚焦专栏评述,笔者主要介绍国内外学者在2010年3月和4月间发表的一些研究工作^[1-9],内容集中在色谱研究和应用的两个方面:新型色谱材料和方法技术的开发^[1-5],色谱在蛋白质组学分析中的新应用^[6,7]。另外,近期也有不少关于微流控分析应用的具有特色的工作^[8],由于篇幅限制就不在这里详细介绍。

1 交替共聚物反相色谱分离同分异构体

同分异构体的结构类似,但常常表现出不同的物理化学性质和生物活性,如何有效分离同分异构体是分析化学工作者面临的众多挑战之一。交替共聚物是两种单体单元在聚合物链上严格交替排列(相间排列)的一种聚合物。采用具有相应官能团的单体分子,交替共聚物可以使具有某种弱相互作用性质的官能团沿高分子主链定向排列,利用这种特殊的交替结构,可与分析物产生多位点相互作用,因而可作为色谱固定相用于多种同分异构体的高选择性分离。日本 Kumamoto 大学的 Ihara 教授研究小组^[1]采用高分子交替聚合物反应,将丙烯酸十八醇酯和 *N*-十八烷基马来酰亚胺的交替共聚物嫁接在二氧化硅上,制成用于色谱分离的固定相。通过增强的 π - π 相互作用和偶极相互作用,这种新型固定相具有独特的空间结构选择性,使其区别于传统的 C18 反相色谱固定相。利用这种新型的色谱固定相,该研究小组实现了多环芳烃化合物的等度洗脱分离,实现了对 16 种多环芳烃标准品混合物的分离。 β -胡萝卜素和生育酚(维生素 E)具有重要的生物功能,分离它们的同分异构体具有重要的生物学意义。然而这两种物质的同分异构体在传统的反相色谱柱上很难实现分离,但在以高分子交替共聚物固定相制成的色谱柱上两者的同分异构体都得到了高效的分离,其中 β -生育酚和 γ -生育酚的基线分离还是第一次报道。这种新型固定相在分离中所具有的高选择性主要归结于两个方面:丙烯酸十八醇酯和 *N*-十八烷基马来酰亚胺的交替共聚物填料提供了丰富的羰基官能团,使得羰基和 π 共轭体系的相互作用得到增强;长烷基碳链的相对有序性提供了利于分子间多点 π - π 相互作用的微环境。

2 具有亚微米级塔板高度的二氧化硅胶体晶毛细管电色谱

根据 Van Deemter 的速率理论,采用小粒径颗粒(例如 2 μm 硅胶颗粒)作为反相色谱填料,可以有效提高分离效率和提升分离速度。然而,由于减小固定相填充物的粒径会导致色谱柱填充的不均匀性,增大了涡流扩散项(A),从而影响色谱柱的分离效率。二氧化硅胶体晶可以自组装形成面心立方点阵的紧密堆积,且排布非常均一,可以被用作分离介质。最近,Purdue 大学的 Wirth 教授研究小组^[2]在直径为 330 nm 的二氧化硅胶体表面上修饰了含 18 个碳的饱和烷基链,然后将其填充到毛细管中制成色谱柱,整个填充过程并不需要利用压力,只需将毛细管浸到二

氧化硅胶体颗粒的悬浮液中,借助毛细作用就可实现。由于胶体晶的紧密堆积,所填充的毛细管柱可以不用在柱端制备塞子(内径为 100 μm 的这种硅胶晶体填充柱可以承受至少 85.4 MPa(12 400 psi)的柱压)。光学显微图像中的布拉格衍射、扫描电镜结果和测定的孔隙率都表明毛细管内的硅胶颗粒自组装形成面心立方晶体点阵紧密堆积,整个填充柱具有晶体的高度有序特性,这与传统的填充柱显著不同。研究者应用细胞膜红色探针 DiI (1,1-didodecyl-3,3,3-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate)对这种新型填充色谱柱的分离效果进行了详细的测评。结果表明其塔板高度为 0.23 μm ,折合板高仅为 0.7 涡流扩散项 $A = (0 \pm 20)$ nm。该研究证实提高色谱柱填充的均一性可以有效地提高小粒径填料色谱柱的分离效率。

最近,加拿大 Alberta 大学的 Harrison 小组^[3]将二氧化硅胶体晶自组装在微流控通道中用于分离脱氧核糖核酸(DNA)。胶体晶的紧密堆积形成高度有序的纳米孔阵列,当采用直径 100 nm 的硅胶颗粒时,纳米孔径大小可以降至 15 nm,小于 DNA 的构象保持长度(50 nm)。在非对称脉冲电场电泳模式下,他们研究了 DNA 在这种高度有序的纳米孔阵列中的动力学行为和 DNA 分离机理,发现当纳米孔的空间限制小于 DNA 的构象保持长度时, DNA 在分离过程中处于完全伸展的构象,可以提高分离效率。

3 乳胶纳米颗粒作为准固定相的胶束电动色谱新方法

日本的 Tarabe 教授发明的胶束电动色谱法,通过引入准固定相,可以用于分离离子和非离子的化合物,其应用广泛。最近,澳大利亚 Tasmania 大学的 Palmer 和 Haddad 小组^[4]将直径为 63 nm 的乳胶颗粒作为电动色谱的准固定相,发明了一种新型胶束电动色谱分离法。纳米乳胶颗粒通过乳液聚合反应合成得到。这种合成的乳胶纳米颗粒具有疏水的核和带有离子的壳层。通过疏水相互作用,乳胶纳米颗粒体可以对分析物进行分离。由于乳胶纳米颗粒对于紫外检测、分离电流、质谱接口、离子化效率没有显著影响,因而紫外和质谱都可以作为这种新型电动色谱的检测器。利用电动色谱的 Sweeping 功能,可以实现对样品的富集,特别是对疏水性样品,采用质谱检测,检出限可以降至 10×10^{-9} (10 ppb)。

4 纳米金修饰的高分子整体柱用于捕获和分离含硫醇的多肽

蛋白质组分析中降低样品的复杂性一直是重要的研究课题。纳米金可以与硫醇反应,利用这一反应特性,美国 California 大学 Berkeley 分校的 Fréchet 教授研究小组^[5]最近将金纳米粒子修饰到高分子整体柱的表面,制备了一种新型的色谱固定相,其可以选择性地捕获含有半胱氨酸的多肽,从而降低蛋白质组 bottom-up(自下而上)定量分析法中多肽混合物的复杂性。制备纳米金修饰的整体柱时,首先将半胱胺与高分子整体柱表面的基团反应,使整体柱表面衍生上硫醇官能团;然后在整体柱上原位还原氯金酸,生成金纳米粒子;最后金纳米粒子与整体柱表面的硫醇反应而固定在整体柱上。虽然修饰了金纳米粒子,但这种新型的色谱固定相仍然保留了高分子整体柱优良的流体力学特性。含有半胱氨酸的多肽,由于自由硫醇官能团与纳米金表面有很强的亲和力,因而被保留,从而实现与其他多肽的分离;被保留的多肽可以通过 2-巯基乙醇将其从纳米金上洗脱。

5 集在线进样、样品同位素标记和多维分离为一体的全自动蛋白质组定量分析技术

采用液相色谱结合串联质谱对蛋白质组进行定量分析在生物研究和疾病诊断中具有重要的意义。定量分析中对样品进行同位素标记可以保证质谱测定的准确性,但往往增加了分析过程的复杂性。中国科学院大连化学物理研究所的邹汉法教授研究小组^[6]发展了一种全自动化系统,实现了对蛋白质组样品的在线进样、样品的在线二甲基同位素标记和在线多维分离。该系统主要包括自动进样系统、14 cm 长的两相捕获柱(7 cm 的 C18 反相色谱填充柱和 7 cm 的强阳离子交换色谱整体柱)、转换阀、15 cm 长的 C18 反相色谱分离柱和质谱仪。测定中,样品在两相柱中的反相色谱柱部分完成富集和在线同位素标记,在两相柱中的强阳离子交换色谱柱部分和反相色谱分离中实现在线多维分离,最后进入质谱仪进行测定。这种新型蛋白质组分析技术具有全自动化、分离分析快速、样品用量少、蛋白质覆盖率大和灵敏度高等特点,提高了定量分析的重现性和准确性。1 000 多种蛋白质的定量分析可以在 30 h 内完成,蛋白质样品用量仅需 30 μg 。他们采用这种全自动分析技术分析检测了肝癌细胞和正常肝组织细胞的蛋白质表达的差异性,结果表明 94 种蛋白质具有上调性,而 249 种蛋白质具有下调性。

最近两个月国际上有很多出色的研究论文发表^[1-9]。为了保持《色谱》前面 4 期聚焦专栏的风格^[10-13],在本期的专栏中笔者只是从中选择了几篇有代表的论文进行评述,以飨读者。

参考文献 :

- [1] Mallik A K , Sawada T , Takafuji M , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 3320
- [2] Malkin D S , Wei B , Fogiel A J , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 2175
- [3] Nazemifard N , Bhattacharjee S , Masliyah J H , et al. Angew Chem Int Ed , 2010 , 49 : 1
- [4] Palmer C P , Hilder E F , Quirino J P , et al. Anal Chem , DOI : 10. 1021 ac902922u , Published Online April 19 , 2010
- [5] Xu Y , Cao Q , Svec F , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 3352
- [6] Wang F , Chen R , Zhu J , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 3007
- [7] Xue H , Lü B , Zhang J , et al. J Proteome Res , 2010 , 9 : 545
- [8] Zeng Y , Novak R , Shuga J , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 3183
- [9] Woodward S D , Urbanova I , Nurok D , et al. Anal Chem , 2010 , 82 : 3445
- [10] Zou H F. Chinese Journal of Chromatography (邹汉法. 色谱) , 2010 , 28(1) : 100
- [11] Liu H W. Chinese Journal of Chromatography (刘虎威. 色谱) , 2010 , 28(2) : 221
- [12] Kang J W. Chinese Journal of Chromatography (康经武. 色谱) , 2010 , 28(3) : 223
- [13] Yan C. Chinese Journal of Chromatography (阎超. 色谱) , 2010 , 28(4) : 327