

毛细管电泳-电化学发光技术及其在临床中的应用

郭 炫¹综述, 李建平²审校

(1. 西安交通大学医学院附属第一医院检验科 710061; 2. 陕西省西安市中心医院检验科 710003)

关键词: 电泳, 毛细管; 电化学; 电泳, 微芯片

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0057-03

电化学发光技术具有简单、原位和高灵敏度的特点,使其能与毛细管电泳、微芯片毛细管电泳检测器联合运用,并逐渐应用于生命科学领域。本文结合近年的研究,总结了毛细管电泳-电化学发光技术以及在临床研究中的应用,并综述如下。

1 毛细管电泳-电化学发光技术

1.1 毛细管电泳的基本原理与研究进展 毛细管电泳是分析科学中继高效液相色谱后的又一大进展。毛细管电泳的基本原理是一类以毛细管作为分离的通道,以高压直流电场为驱动力,依据样品中各组分或各粒子之间的迁移速度的差异而实现分离的一类液相分离技术。在电解质溶液中,带电粒子在电场作用下,以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移的现象称为电泳。各个组分按照迁移速度的大小先后顺序,依次到达检测器的时间也不同,得到按时间分布的电泳谱图。根据谱峰的迁移时间和峰面积或峰高即可进行定性和定量分析。

几年前应用最广泛的是二极管阵列(PDA)检测器、激光光热(LIP)和荧光(FL)检测。近几年来,还产生了灵敏度达到 $10\sim 14\text{ mol/L}$ 的激光诱导荧光(LIF)、有良好选择性的安培(EC)、通用性很好的电导(CD)和可以获得结构信息的质谱(MS)等多种检测器。与高效液相色谱相比,毛细管电泳具有高效、快速、微量和便于自动化的特点,它的出现使分析科学进入纳升水平,为小体积样品分析提供可能。毛细管电泳因其独有的特性被广泛应用于化学、生物、医药、食品安全、环境、蛋白以及多肽的分析检测,而药物分析以及兽药的检测是其中很重要的一个方面。药物分析大致分为2个部分:一是原料药定性定量和相关物质的测定,药物制剂的分析以及稳定性的评价;二是对液体中的药物进行分析^[1-2]。

但是由于毛细管的特性限制(管内径极小,通常 $25\sim 100\ \mu\text{m}$,有效光程短以及纳升级的进样量,对检测器的灵敏度要求很高)和检测技术上的难度,其稳定性还需要进一步的提高,因此要选用高灵敏度的检测器与其联用。

1.2 电化学发光的基本原理与研究进展 电化学发光(ECL),又称电致化学发光,是化学发光与电化学相结合的产物。是通过施加一定的电压进行电化学反应,在电极表面产生一些电生的物质,然后这些电生物质之间或电生物质与体系中某些组分之间通过电子传递形成激发态,由激发态返回到基态而产生的一种发光现象。ECL的本质是在一定电位激发下产生的化学发光过程。因此,ECL过程除要求对电极施加一定

的电化学信号使电化学反应发生外,还必须提供一定的条件使随后的化学发光反应发生^[3-4]。利用脉冲电压研究铂电极鲁米诺的电化学发光动力学及其发光机制,使人们对电化学发光,以及电化学发光的机制有了进一步的认识和了解。随着研究工作的不断进展,电化学发光开始进入实际应用中,电化学发光的理论和研究的技术手段也得到了进一步的发展和提高^[5]。20世纪90年代之后,电化学发光的应用范围延伸到免疫分析、PCR分析、DNA单分子检测、药物分析、生物活性物质分析等领域。21世纪,电化学发光越来越成为1个比较活跃的研究领域。电化学发光技术还继续研究应用于微流控分析系统、微阵列光化学传感器、电化学发光成像和量子点电化学发光等领域^[6]。

ECL主要有以下几方面的特点:(1)灵敏度高,线性范围宽;(2)反应可控性、重复性好;(3)仪器简单,分析速度快,节约试剂;(4)可以获得多种信息,有利于研究快速发光反应和发光反应机制,分析的应用范围很广。电化学发光已广泛用于草酸、有机胺、葡萄糖、蛋白质、氨基酸、核酸、药物、免疫等分析和其他物质的测定。

1.3 毛细管电泳-电化学发光检测体系的研究进展 毛细管电泳-电化学发光联用检测技术,简称CE-ECL。是毛细管电泳与化学发光及电化学发光的相互结合,兼备了分析灵敏度高和分离能力强的特点,已经逐渐开始成为分析化学新的研究热点之一。

三联吡啶钌电化学发光技术通过把电能转化为光辐射能,应用于衡量样品的分析,成为1种灵敏度高、选择性好、极具应用潜力的检测技术。分离出的被测物与工作电极表面电化学氧化产生的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 在电极的扩散层区域发生均相ECL反应,产生的光子作为电泳峰记录下来。被测物(例如有机胺)也会接触电极表面发生电化学氧化,产生的自由基与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 反应,但是该途径对ECL反应的贡献就CE-ECL体系而言可以忽略,因为检测池的毛细管与工作电极界面区域的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与被测物的相对浓度较大。显然,CE-ECL采用的是离柱检测的方式,从毛细管中泳出的部分被测物在未达到电极之前由于扩散或对流作用而进入检测池中,不能接触到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ 进行ECL反应。这种现象类似于电化学安培检测中遇到的库仑效率的问题。影响发光强度和分离效率的因素主要有发光反应的量子效率和反应速率,较慢的反应动力学导致

较差的分离效率,这是 CE-ECL 的 1 个特点。而决定量子效率和反应速率的因素有溶液的 pH 值、反应物的浓度、反应物的分子结构(即 ECL 活性),以及电泳分离高压、进样量、电极材料和尺寸等。

CE-ECL 检测技术的关键在于如何设计电化学发光的检测池。在设计过程中,主要考虑以下几种因素:如何提高 Ru(bpy) 3^{2+} 试剂,如何消除毛细管电泳高压电场对电化学发光过程的影响,以及如何有效提高电化学发光的检测效率。

最先有研发者设计了 1 种柱端液槽,在毛细管电泳物质的溶出端液槽中含有 Ru(bpy) 3^{2+} ,以及 Ru(bpy) 3^{2+} 氧化所需的工作电极、参比电极基和辅助电极,使得液槽中的溶液一直含有生的 Ru(bpy) 3^{2+} ,当被分离组分进入液槽时产生电化学发光^[7]。Ru(bpy) 3^{2+} 电化学发光检测池的设计逐渐趋于多功能化发展。有研究者设计了毛细管电泳与流动注射分析通用的电化学发光流通检测池,可通过更换电泳分离毛细管和流动注射进样管切换工作模式^[8]。之后的研发者用聚二甲基硅氧烷材料研究了 1 种快速制作检测池的方法,采用预制模板,经模塑成型即可得到适用于毛细管电泳的电化学发光、电化学检测的多功能检测池^[9]。

电化学发光检测、毛细管电泳技术和微流控芯片等分析方法,是近年发展起来的新的检测方法,具有灵敏度高、分离效率高、利于微型化等优点,在基础科学研究尤其是生物及临床分析中有很好的应用前景。但目前相关专利技术一直把持在国外大型公司手中,所生产的专用仪器价格昂贵。目前,国内外尝试用该技术进行有关的基础理论与分析应用的研究工作刚刚初步展开,这 2 年逐渐呈现出加速发展的趋势,其中以长春应用化学研究所汪尔康院士领导的研究小组所做的工作在此领域居领先地位。他们在现有的毛细管电泳-电化学发光技术研究基础上,将电化学发光、点化学等检测技术与毛细管电泳、微流控芯片等分析手段有机结合,研发了毛细管电泳电化学发光综合分析仪^[10]。

1.4 毛细管电泳-电化学发光微流控生物芯片技术 毛细管电泳-电化学发光微流控生物芯片是基于毛细管电泳芯片的电化学和电化学发光同时检测的技术^[11]。在此芯片系统中,三联吡啶 Ru(bpy) 3^{2+} 既作为电化学发光(ECL)检测所需的发光试剂与被分析物反应,生成激发态的 Ru(bpy) 3^{2+} ,从而产生电化学发光信号;又具有催化作用参与电极表面的电化学反应,从而得到增强的电流响应。电化学信号与电化学发光信号同时产生并被分别纪录,从而实现了电化学和电化学发光的同时检测。此芯片由两部分构成,分别是带有分离和进样通道的聚二甲基硅氧烷(PDMS)层和 ITO 作电极底片,PDMS 层与 ITO 电极底片采用可逆键合的方式组成芯片,该芯片大大简化了操作过程,提高了发光信号的采集效率。

2 毛细管电泳-电化学发光技术在生命科学中的应用

毛细管电泳和电化学发光技术的结合可以成为 1 种低成本、低成本及简便快速的分离分析技术。CE-ECL 技术目前主要应用于对生物大分子的研究和用于草酸、有机胺、葡萄糖、蛋白质、氨基酸、核酸、药物、免疫等分析和其他物质的测定。

2.1 毛细管电泳-电化学发光技术在药物分析中的应用 目前新药研究的一个发展趋势是研制和生产光学纯药物。因此,在药物研发过程中,手性药物分离和分析已成为分析化学领域研究的热点。其中,毛细管电泳是手性药物分离中最有效的分离手段之一。而吡啶钌电化学发光体系具有检测灵敏度高、线性范围宽等优点,能够满足手性毛细管电泳高灵敏度的要求。

研究提出,腐蚀接头毛细管电泳电化学发光系统,即通过腐蚀毛细管以提供电泳的电路从而有效地解决电泳高压电场对电化学发光过程的影响^[12]。此法分析氧氟沙星和力多卡因的迁移时间精密度、峰高精密度、检出限均效果良好。采用毛细管电泳——钉联吡啶电化学发光法检测制剂中富马酸酮替芬的含量,该方法已成功用于富马酸酮替芬片及胶囊含量的测定。此外,研究发现盐酸帕罗西汀能增强钉联吡啶的电化学发光信号,并已用于盐酸帕罗西汀片剂的测定^[13]。目前,毛细管电泳-电化学发光技术还用于吩噻嗪类药物、琥乙红霉素、红霉素、诺氟沙星、马来酸依那普利、盐酸哌嗪嗪等的检测^[14]。

由于人体体液中残留有种药物,分离和检测较为复杂,一般检测手段难以完成。探索其分析应用体系,研究新技术和新方法,建立应用于代谢体液中残留药物、中草药活性成分的检测技术就成为当前生命科学的热点。毛细管电泳-电化学发光技术在低费用、低成本及简便快速的分离分析技术和高灵敏、利于微型化等各方面的优势,使这一技术应用于体液残留药物的检测^[15]。

2.2 毛细管电泳-电化学发光技术在蛋白质、氨基酸、核酸测定中的应用 蛋白质是生物体的主要组成物质及生命活动的基础,是由约 20 种氨基酸彼此以肽键的形式连接起来的具有复杂结构的生物大分子。那些具有催化作用的酶、具有免疫功能的抗体、起运输作用的血红蛋白,以及某些激素、毒素等都是蛋白质。CE-ECL 兼备了毛细管电泳分离效率高和化学发光灵敏度高的优点,直接用于复杂样品中微量组分的分离与测定,可同时解决选择性差和灵敏度低的问题,成为完全自动化分析蛋白质的最有效的手段之一。杨秀荣等基于电化学、压电阻抗以及 UV-vis 等多种技术表征了中草药诱导下 DNA 和蛋白质的相互作用过程;应用毛细管电泳电化学检测 21 个、39 个、80 个碱基的靶 DNA,成功实现了同时进行多个单链 DNA 的分离检测,并检测小分子化合物腺苷及腺苷。

在转基因研究过程中,关于转基因食品(GMF)的安全性问题已经受到世界各国政府及人民的广泛关注。以核酸为检测对象的各种 PCR 技术及以蛋白为检测对象的各种免疫分析技术是 GMF 检测的主流方法。然而这些方法间及各个实验室间的重现性问题一直没有得到很好的解决。毛细管电泳技术与普通平板凝胶电泳相比,具有更高的分离效率和更快的分离速度,近年来在 GMF 检测方面得到了较快的发展。由于本方法中用到的 ECL 试剂在较宽的 pH 值及温度范围内均可以保持结构稳定,因此可以在 PCR 反应之前对引物进行 ECL 标记,标记后的引物稳定性好,可以实现 1 次标志多次使用。

2.3 在生物碱、有机胺测定方面的应用 生物碱是许多药用植物的有效成分,但传统的分离方法能耗大、杂质多、效率低、分离后样品的测定困难。毛细管电泳具有高效的分离能力,将它与高灵敏的电化学发光方法相结合,并用于包括生物碱在内的复杂样品的分离分析已引起人们极大的兴趣。目前,CE-ECL 分离及检测技术的研究在国内外都刚刚起步,尤其是将该技术直接用于尿样及植物提取液中活性成分的分离测定具有一定的发展空间和实际应用价值。西北师范大学博士生周敏利用电化学聚合法制备了稀土钨离子(III)掺杂的类普鲁士蓝膜(Eu-PB)修饰的铂工作电极,并在此基础上建立了一系列基于 Ru(bpy) 3^{2+} 体系的 CE-ECL 联用的分析方法,实现了植物提取液及人体尿样中青藤碱、阿托品、樟柳碱和山莨菪碱等几种生物碱的分离与检测,有助于进一步拓展生物碱类物质的分离和检测方法以及扩大 CE-ECL 分析方法的应用范围。近

年来,吸毒和药物滥用对人类生活以及社会安定构成了极大的威胁。因此,发展准确、灵敏、快捷的检测毒品类生物碱分析技术具有重要意义^[16]。

2.4 在临床医学分析中的应用和发展 CE-ECL 技术目前主要应用于对生物大分子的研究和用于草酸、有机胺、葡萄糖、蛋白质、氨基酸、核酸、药物、免疫等分析和其他物质的测定,但在临床检验诊断中尚无全面的报道。随着肿瘤分子生物学和免疫学及人类基因组计划的进展,这个领域已成为肿瘤基础研究和临床应用的热点。目前,关于临床检测的研究主要有重庆医科大学的丁敏应用 CE-ECL 检测系统测定了血清总胆汁酸。研究结果显示,该方法灵敏度高、线性范围宽、简单快速、成本低廉,适用于临床测定且与酶循环法具有较好的相关性。在 CE-ECL 检测系统光泽精系在正电位氧化有较明显的电化学发光现象,肾上腺素对这一反应有增敏作用。从而建立了 1 种测定肾上腺素的新方法。丙吡胺(DP)是 1 种有效地预防和治疗抗心律失常的药物。对药物蛋白的结合作用的研究有着重要的临床价值,因为游离药物的浓度会影响药物分布以及药物效应。药物蛋白结合率是药物动力学的重要参数之一。利用透析袋平衡透析、CE-ECL 电化学发光检测技术测定丙吡胺和入血浆蛋白的结合率,效果良好。

另外,微型阵列 ECL 检测芯片技术也正在研发当中,利用微机电加工技术制作出带有阵列微型腔体的芯片,硅烷化处理,固定 Ru(bpy)₃²⁺ 衍生物标志的抗体或单链 DNA,进行免疫反应或杂交,施加电位,进行 ECL 检测^[17]。该工作有望进一步提高疾病诊断、肿瘤标志物筛选和检测的速度,在分子生物学和临床医学研究领域将颇有应用前景。

3 存在的问题

有关 Ru(bpy)₃²⁺ ECL 已经有了较多的研究。这些方法具有灵敏度高、分辨率强、利于微型化等优点。在基础科学尤其是生物及临床分析中有很好的应用前景。但目前相关专利技术一直把持在国外大型公司手中,所生产的专用仪器和封闭试剂价格昂贵,难于在生命科学实践中普及。

同时,Ru(bpy)₃²⁺ ECL 和 CE 联合应用的文献数量较少。从已有报道来看,无论从检测器设计、检测灵敏度、分离效率等方面都还存在一些技术上的薄弱之处。例如,怎样设计毛细管与工作电极的界面,以提高分离效率。由于毛细管电泳的进样量很小,因此对检测灵敏度提出了很高的要求。如何对 ECL 非活性的物质进行分离检测等。最近几年非研究性质的毛细管电泳-电化学发光检测器逐渐问世,使得现代毛细管电泳技术在对生物大分子如氨基酸、蛋白质、核酸、维生素、激素、酶、抗原、抗体、活性氧等高度分离的基础上具有了更强的检测能力。然而不足的是,检测器的工作电极易发生吸附毒化,影响发光效率及测定的稳定性,因此利用化学修饰电极改善分离与分析,在 CE-ECL 领域具有重要的研究价值。可以预言,随着上述问题的不断改善,此方法以其快速、高效、灵敏、经济等诸多方面的优势,必将成为 1 个具有实际应用价值的高灵敏度的分离检测方法。

参考文献

[1] 周晓光,由天艳,汪尔康. 毛细管电泳安培检测法在中草

药分析中的应用[J]. 化学进展,2006,18(2,3):331-335.
 [2] 施爱红,李林秋,邓必阳. 毛细管电泳-电化学发光法研究阿莫西林在人尿中的药代动力学[J]. 分析科学学报,2008,24(5):502-506.
 [3] Zhao SL, Song Y, Liu YM. A novel capillary electrophoresis method for the determination of d-serine in neural samples[J]. Talanta, 2005, 67: 212-216.
 [4] 华文浩,常保利,杨晓苹,等. 电化学发光免疫分析定量检测血清抗-HBs 的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(1):30-32.
 [5] 游娟,丁世家. 电化学发光免疫分析及在临床检验中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(8):727-729.
 [6] Yin XB, Wang EK. Capillary electrophoresis coupling with electrochemi-luminescence detection; a review[J]. Anal Chim Acta, 2005, 533: 113-120.
 [7] Xua YH, Gao Y, Wei H, et al. Field-amplified sample stacking capillary electrophoresis with electrochemiluminescence applied to the determination of illicit drugs on banknotes[J]. J Chromatogr A, 2006, 1115: 260-266.
 [8] Hsieh YC, Whang CW. Analysis of ethambutol and methoxyphenamine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1122: 279-282.
 [9] Kraly J, Fazal MA, Schoenherr RM, et al. Bioanalytical Applications of capillary Electrophoresis[J]. Anal Chem, 2006, 78: 4097-4110.
 [10] 刘继锋,汪尔康. 毛细管电泳柱端电化学发光检测池[P]. 中国发明专利(CN01133351.0),2002-04-03.
 [11] 杨秀荣,邱海波,严吉林,等. 微芯片毛细管电泳电化学/电化学发光同时检测药物分子[J]. 高等学校化学学报,2004,25(4):99-100.
 [12] 尹学博,汪尔康. 腐蚀接头毛细管电泳电化学发光系统用于临床药物的快速检测[J]. 高等学校化学学报,2004,25(4):106-110.
 [13] 熊凤梅,唐玉海州,孙四娟,等. 毛细管电泳电化学发光法测定盐酸帕罗西汀的研究[J]. 分析试验室,2008,27(10):63-65.
 [14] 谭贵良,李向丽,江迎鸿,等. 毛细管电泳-电化学发光联用测定琥乙红霉素[J]. 中山大学学报:自然科学版,2009,48(5):82-85.
 [15] 李林秋,施爱红,邓必阳. 毛细管电泳与电致化学发光结合用于人尿中甲磺酸培氟沙星的测定研究[J]. 分析测试学报,2008,27(7):718-720.
 [16] 孙汉文,问海芳,苏明,等. 毛细管电泳-吡啶钌电化学发光法对血浆中丁卡因与普鲁卡因的同时测定[J]. 分析测试学报,2009,28(2):168-172.
 [17] 尹学博,杨秀荣,汪尔康. 毛细管电泳-电化学/电化学发光及其微芯片技术[J]. 化学进展,2005,17(2):181-185.

(收稿日期:2010-07-08)