中国科学: 化学 2010 年 第 40 卷 第 10 期: 1478 ~ 1486
SCIENTIA SINICA Chimica www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

评 述

# 电泳技术在纳米颗粒分离中的应用

马晓澈[①], 车志军[②], 刘艳华[②], 郭天宇[②], 梁兴杰[①*]

① 国家纳米科学中心; 纳米材料生物医学效应和纳米安全中科院重点实验室, 北京 100190
② 北京出入境检验检疫局, 北京 100026
*通讯作者, E-mail: liangxj@nanoctr.cn

收稿日期: 2010-03-12; 接受日期: 2010-05-17

**摘要** 合成纳米颗粒常在尺寸和形状方面具有广泛分布. 在很多实验中, 需要利用一定大小及形状的纳米颗粒的独特物理化学性质, 因此, 简便快速的纳米颗粒分离技术越来越受到诸多科学领域的重视. 电泳技术以其高分辨率, 被广泛用于多种生物大分子如核酸、蛋白质等的分离纯化. 纳米颗粒在尺寸上与生物体中的蛋白复合物、细胞器和微生物等十分接近, 考虑到带电纳米颗粒与生物分子在电场中的运动行为的相似性, 运用电泳技术进行纳米颗粒的鉴定、分离和纯化是一种新的思路, 并取得了良好的实验结果. 本文主要介绍了琼脂糖凝胶电泳、毛细管电泳以及其他一些电泳技术在纳米颗粒分离中的研究进展.

**关键词**
纳米颗粒
电泳
分离
琼脂糖凝胶电泳
毛细管电泳

## 1 引言

随着纳米技术的快速发展, 种类繁多的纳米颗粒被不断合成出来并广泛应用于材料、化工、生物、医药等研究领域. 纳米颗粒具有诸多独特的物理化学性质, 如量子限域效应、等离子共振效应, 以及生物学效应, 如穿越体内屏障、引起炎症反应、免疫反应、器官毒性等, 这些性质都与其尺度变化密切相关, 这使得纳米颗粒的尺度分析在纳米科学研究中有着广泛而重要的应用, 对纳米颗粒的分离分析也越来越引起人们的关注[1~4]. 研究纳米颗粒尺度分布的方法很多, 但传统方法通常要借助扫描电子显微镜、透射电子显微镜、原子力显微镜、激光粒度仪等专用性强、对操作者技能要求高且价格昂贵的仪器. 电子显微镜观察是目前研究纳米颗粒尺寸分布最直接、最常用的方法. 但是, 电子显微镜观察到的样品区域是十分有限的, 用电子显微镜观察时很难对颗粒的形状分布、大小分布和平均直径等做出准确估计. 同时, 实验者观察时的主观误差, 以及制样过程中对样品性质的改变(如在干燥过程中颗粒的团聚)等也是重要影响因素.

合成纳米颗粒的尺寸和形状分布广泛, 不仅能由单一物质组成, 也可能由多种无机或有机的化合物共同组成, 表面可以被各种功能化基团修饰, 并具有不同的光学、磁学和电学特性. 所有上述特征参数决定了纳米颗粒的物理化学性质, 为纳米颗粒的分离、分析提供了依据[5]. 在生物化学研究中, 常将纳米颗粒与其他一些生物大分子, 如蛋白质[6]、核酸片段[7]等结合, 以协助这些生物大分子的分离, 或将纳米颗粒作为高效柱填料应用于生物分子的毛细管电泳[8, 9]分离中. 然而, 纳米颗粒本身在尺寸上与生物体中的蛋白复合物、细胞器和微生物等十分接近, 考虑到带电纳米颗粒与生物分子在电场中运动行为的相似性, 能否使用生物化学研究中常用的分析分离技术, 如分离蛋白质、核酸时常用的电泳技术将纳米颗粒本身分离纯化呢? 答案是肯定的. 本文着重综述了应用电泳技术分离纳米颗粒的相关研究, 可以为需要在实验中对纳米颗粒进行分离的研究者提供新的视角.

## 2 电泳技术概述

1740 年印度科学家 G.M.Bose 首次发现, 在电场的作用下, 带电颗粒将向着与其电性相反的电极方向移动, 使具有不同迁移速度的物质分离成狭窄区带, 这一现象称为电泳. 1937 年, Arne Tiselius 教授首次建立了高重现性的血清蛋白移动界面电泳分离体系. 电泳技术作为一项有效的分离和分析技术发展迅速, 并被广泛应用于蛋白质、多肽、核酸和其他生物分子的分析、分离、制备和鉴定, 成为生物学、医学和药学等领域研究中不可缺少的手段之一. 自 20 世纪 50 年代以来, 各种电泳技术及仪器相继问世, 建立了琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳、等速电泳、双向电泳、脉冲电场凝胶电泳、印迹转移电泳、免疫电泳等一系列高分辨电泳体系. 特别是 20 世纪 80 年代后期迅速发展起来的高效毛细管电泳技术, 具有高灵敏度、低检测限、快速、重复性好、应用范围广、可进行定量分析和自动化程度高等显著特点, 将电泳技术推向一个新的阶段[10].

## 3 纳米颗粒概述

纳米材料是指三维空间尺度至少有一维处于纳米量级(1~100 nm)的材料. 纳米材料极小的尺寸使其具备了许多宏观材料不具备的独特物理化学性质, 包括表面效应、量子尺寸效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等. 对纳米颗粒的尺寸、结构、形状、表面修饰、表面电荷等施以改变, 可以使得纳米材料表现出传统材料所不具备的光、电、磁、热、声、力等物理性质, 以及特殊的化学、生物学性质等. 常见的纳米颗粒可以划分为两类: 以有机分子为构造单位的粒子(如脂质体、分子胶束、树枝状大分子、聚合物纳米颗粒等)和以无机分子为构造单位的粒子(如二氧化硅纳米颗粒、贵金属纳米颗粒、金属氧化物纳米颗粒、半导体量子点、富勒烯、碳纳米管等).

纳米颗粒的电泳分离主要基于颗粒的大小、形状及表面化学修饰. 表面未经化学修饰的纳米颗粒所带电荷来自于对溶液中离子的吸附, 其电泳分离主要取决于颗粒大小. 表面连接了功能化基团的纳米颗粒在电泳分离时受电荷因素影响较大, 需考虑颗粒表面化学基团的种类、数量以及电离度等[5]. 组成不同的纳米颗粒会有不同的电泳行为, 与生物分子如细菌、生物素、核酸、抗体的结合等也会影响纳米颗粒在电场中的迁移.

## 4 凝胶电泳分离纳米颗粒

凝胶电泳是在电场作用下, 利用物理性质不同的物质在具备分子筛效应的凝胶介质中迁移行为的差别进行分离的技术. 在纳米颗粒的凝胶电泳分离中, 琼脂糖凝胶得到了广泛应用, 相比聚丙烯酰胺凝胶(孔径在几纳米间变化), 琼脂糖凝胶的孔径更大(可以在几十到几百纳米间变化), 且孔径均一度更好、制备方便, 可以被用于更广尺度范围纳米颗粒的分离. 金属纳米颗粒的电学和光学性质与颗粒大小、形状十分相关, 可以被用作纳米颗粒分离的判断依据. Hanauer 等人[11]利用琼脂糖凝胶电泳分离了大小和形状不同的被聚合物 SH-PEG-COOH 包裹稳定而带负电的圆形、棒状和三角形的金纳米颗粒和银纳米颗粒. 由于金、银纳米颗粒的等离子共振效应使得这些纳米颗粒的颜色随颗粒大小和形状的不同而变化, 所以它们的分离情况可以直接从胶上的彩色条带看到, 不需要染色(见图 1). 在电泳过程中, 棒状银纳米颗粒泳动得最慢, 且纵横比越高, 泳动得越慢, 球形银纳米颗粒泳动得快些, 三角形银纳米颗粒泳动得最快. Xu 等人[12]在孔径约为 100 nm 左右的琼脂糖凝胶电泳柱中, 分离了 5、15、20 nm 尺度下, 表面经 11-巯基十一烷酸修饰的大小、形状和电荷有差异的金纳米材料(见图 2). 金纳米颗粒表面羧酸根的引入不仅使颗粒带负电荷在电场中向正极泳动, 还增加了颗粒间的斥力, 从而稳定了金纳米颗粒. 应用 Xu 等人提供的方法, 通过电泳, 金纳米球、金纳米片和金纳米棒可以得到有效的分离, 这是常规的离心分离和体积排阻色谱技术很难达到的.

除了用于金属纳米颗粒的分离外, Vetcher 等人[13]将单壁碳纳米管 (SWNTs) 与 RNA 或 DNA 复合后, 对其进行 0.4%的琼脂糖凝胶电泳, 虽然与不同类型核酸结合的碳管的迁移过程有所差别, 但是不同直径、弯曲度和长度的碳管都以较高分辨率条带的形式在胶中得到了分离. 拉曼光谱结果显示光学性质不同的碳管在电泳时具有不同的迁移率, 半导体性质的碳管/DNA 复合物比金属性质的碳管/DNA 复合物在电场中具有更大的电泳迁移率. Heller[14]等人用琼脂糖凝胶电泳分离了胆酸钠表面活性剂分散

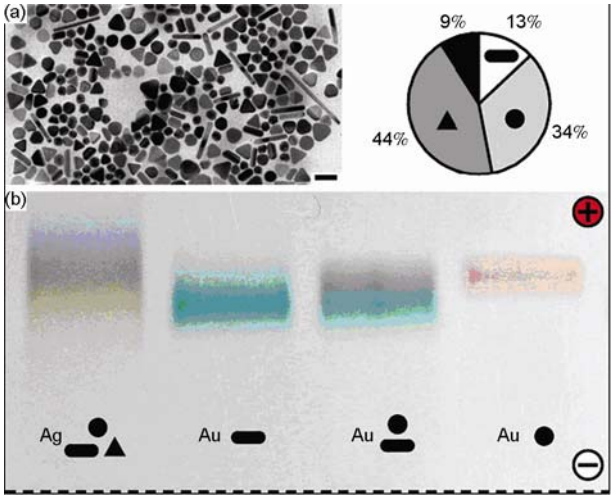


**图 1** 琼脂糖凝胶电泳分离不同形状的金、银纳米颗粒[11]. (a) 未分离前的银纳米颗粒样品透射电子显微镜图片及各种形状银纳米颗粒的比例: 球形纳米颗粒占 34%, 棒状纳米颗粒占 13%, 三角形纳米颗粒占 44%, 其他形状的纳米颗粒占 9%; (b) 电泳分离得到的纳米颗粒条带, 从左到右分别是银纳米颗粒、棒状金纳米颗粒、分离前预混和的棒状和球状金纳米颗粒、球状金纳米颗粒. 不同形状的金、银纳米颗粒在琼脂糖凝胶中显示为不同颜色的条带, 得到很好的分离.

的 SWNTs, 在分离碳管前, 先对其进行超声处理, 并发现超声会影响碳管长度和直径的分布, 超声时间的增长会增加短碳管的比例, 从而使得碳管在胶中迁移得更快. 超声处理后, 在短碳管中集聚着大直径的碳管, 而在长碳管中集聚着小直径的碳管, 胶的拉曼光谱和荧光光谱都显示短碳管倾向于与大直径碳管一起泳动, 所以对不同直径碳管的分离是与不同长度碳管的分离相伴发生的.

此外, 琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳也可用于判断纳米颗粒与其他受体的结合情况, 如 CdSe/ZnS 量子点与牛血清白蛋白的共价结合[15], 碲化铬量子点与 2,4-二氯苯氧基乙酸碱性磷酸酶的结合[16], 二氧化硅纳米颗粒与 DNA 的静电结合[17]等. 未结合受体的纳米颗粒与结合了受体的纳米颗粒呈现出不同的电泳行为和迁移率. 凝胶电泳也可用于检测组装形成的复合分子的组装情况、稳定性和纯度等. Hartnagel[18]等人用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测了一系列的聚阳离子树枝状富勒烯羧化物和阴离子卟啉通过静电作用组装形成的聚合物, 不同比例富勒烯和卟啉形成的复合物在大小和总电荷上存在差异, 电泳时具有不同的迁移速度, 反映在电泳条带的差别上. 凝胶电泳还可以被用于检测纳米颗粒表面功能化修饰是否成功, 经过良好表面功能化修饰的纳米颗粒能迅速进入凝胶中并形成窄而清晰的条带.

## 5 毛细管电泳分离纳米颗粒

毛细管电泳是以弹性石英毛细管为分离通道, 以高压直流电场为驱动力, 依据样品中各组分在电场力作用下迁移速度和分配行为的差异而实现分离的液相分离技术. 由于凝胶粘滞性对纳米颗粒在电场中的泳动会产生一定不利影响, 所以限制了常规凝胶电泳的分辨率. 在纳米颗粒的分离中, 作为经典电泳技术和现代微柱分离技术相结合的产物—毛细管电泳的应用是一项突破性的进展. 毛细管电泳可使用缓冲溶液或凝胶作为支持介质, 并采用高分离电压, 能产生比电泳速度大一个数量级的平面形状的高电渗流, 正是电渗作用使得所有的粒子, 无论带正电、负电或不带电, 均可从毛细管一端流出, 在毛细管电泳的一次操作中可以同时完成各种样品

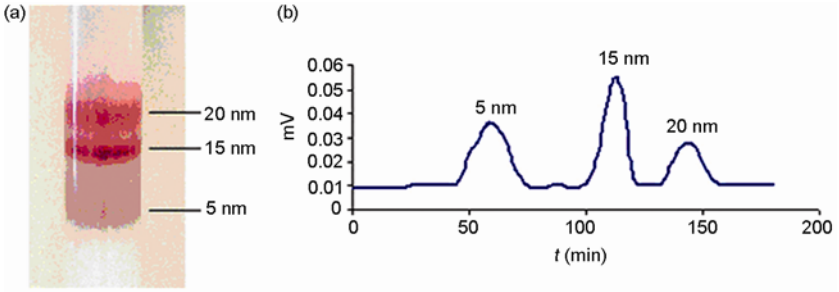


**图 2** 在凝胶柱中电泳分离 5 nm, 15 nm 和 20 nm 尺度下的金纳米材料[12]. 通过比较电泳条带和电泳图谱可以发现, 样品中 5 nm 和 20 nm 尺度的金纳米材料比 15 nm 尺度的金纳米材料的电泳条带更宽, 说明这三个尺度下的金纳米材料中, 15 nm 尺度的材料粒径均一性最好.

组分的分离测定, 具有比常规凝胶电泳更高的分辨率和分离效率.

在纳米颗粒的制备过程中, 电解质溶液中的带电离子会吸附到纳米颗粒的表面并形成一个双电荷层. 在加有电压的毛细管柱中, 不同大小的颗粒具有不同的荷质比, 在电泳时具有不同的迁移率, 从而得到分离. Liu 等人[19]探究了不同大小、形状银纳米颗粒的毛细管电泳分离条件. 在缓冲体系中加入阳离子表面活性剂十二烷基磺酸钠(SDS)后能有效阻止柠檬酸盐体系下制备的银纳米颗粒的团聚现象, 增强银颗粒间的静电排斥作用, 提高毛细管电泳的分离效率. 对于直径在 17.0~49.7 nm 范围的银颗粒, 添加终浓度 20 mM 的 SDS 时会得到最佳分离效果. 不同形状的银纳米颗粒呈现出不同频率的表面等离子共振带, 因此在不同分离时间会相应地从毛细管电泳系统中的二极管阵列检测器中读出不同的紫外-可见吸收变化. Liu 等人[20]还在 20 kV 电压下, 用 SDS 与 3-(环己胺)-1-丙磺酸盐形成的 pH 9.7 的混合缓冲溶液体系, 在毛细管中成功实现了对核壳结构铜/银纳米颗粒的有效分离, 并发现尺度在 25 到 90 nm 之间的核壳结构铜/银纳米颗粒的电泳迁移率与颗粒大小呈线性相关. 纳米颗粒的表面等离子共振峰的红移程度与颗粒的银壳、金核比例变化直接相关, 并反映在纳米颗粒的紫外-可见区吸收变化上. 因此所使用的二极管阵列检测器在提供检测颗粒分离情况的同时还能够给出颗粒表面的化学特征信息.

SWNTs 不仅表面积大、重量轻、硬度高, 而且在已知的材料中具有最高的抗拉强度、熔点以及良好的力学性能. 束状碳纳米碳管只有在被分离成单独碳管时, 才能表现出这些良好的机械性质[21]. Doorn 等人[22]第一次用毛细管电泳以 SDS 溶液作为背景电解质溶液分离了由 SDS 分散的 75 nm 至 2 μm 尺度下的 SWNTs. 毛细管电泳不仅能将不同长度的碳管分离开, 还能在分离过程中除去体系中的非碳管物质. 但是上述方法对于同一样品的重复性和对于不同批次样品的重现性欠佳. 作为上述方法的改进, Suarez 等人[21]在用 SDS 分散碳管样品前, 先将少量聚合物羟丙基甲基纤维素加到样品中, 使得由范德华力引起的碳管团聚现象减少, 得到了均一稳定的溶液. 他们首次在毛细管电泳时除去了背景电解质溶液中的 SDS, 同时将 0.025% (w/v)的羟丙基甲基纤维素作为起稳定作用的胶体加入其中, 实验表明, SDS 包裹的碳管在这种无表面活性剂的背景电解质中是稳定的. 经过这些处理后再进行毛细管电泳实验时, 基线稳定且测定重复性得到提高(见图 3). Lopez-Pastor 等人[23]首次使用离子液体作为碳纳米管的分散剂, 并提出了一种简单的用毛细管电泳方法鉴定束状 SWNTs 的方法: 首先在温和超声条件下将 SWNTs 分散于 1-丁基-3-甲基咪唑啉四氟硼酸离子液体中, 离子液体在保持碳管完整性的同时能防止碳管间团聚以及形成碳管束. 然后将碳管表面包裹表面活性剂 SDS, 最后用毛细管电泳仪鉴定样品. 由于离子液体分散的 SWNTs 与毛细管内壁有强烈的相互作用, 为了减少峰的展宽、重叠和基线不稳所导致的实验可重复性差, Lopez-Pastor 等人转换了毛细管电泳系统的极性, 并在体系中加入酸性电泳背景电解质以消除电渗流. 相比直接在 SDS 中分散的 SWNTs, 先在离子液体中分散, 再在 SDS 中分散的 SWNTs 由于团聚现象减少, 在毛细管电泳中得到分离度更高的电泳峰(见图 4).

大部分毛细管电泳分离纳米材料的实验中采用的是毛细管区带电泳, 以缓冲液作为分离介质. Song 等人[24]首次将毛细管凝胶电泳应用于纳米颗粒的

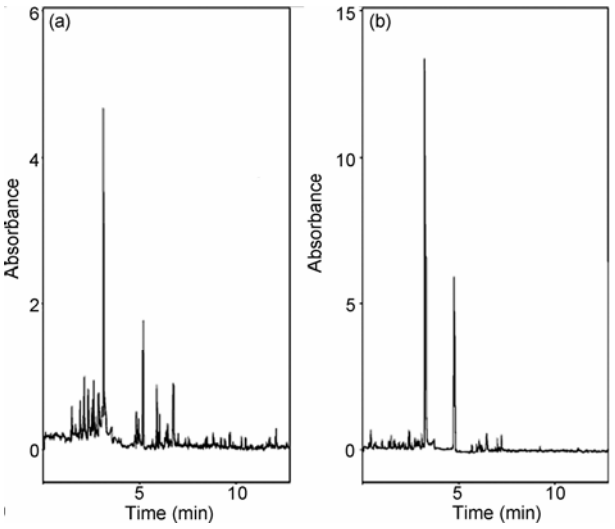


**图 3** SDS 分散(a)与羟丙基甲基纤维素和 SDS 共同分散(b)的多壁碳管的毛细管电泳图谱比较[21]. 仅用 SDS 分散多壁碳管样品时, 碳管团聚严重, 在电泳图谱中形成数目众多的峰; 将羟丙基甲基纤维素与 SDS 共同用于分散多壁碳管时, 减少了碳管的团聚, 电泳图谱中由于团聚形成的峰减少, 同时, 碳管特征峰的吸收强度增加. 图中的两个分离峰分别对应于单分散的碳管和由 2 到 3 根碳管形成的聚集体, 是样品中的主要两种碳管类型.

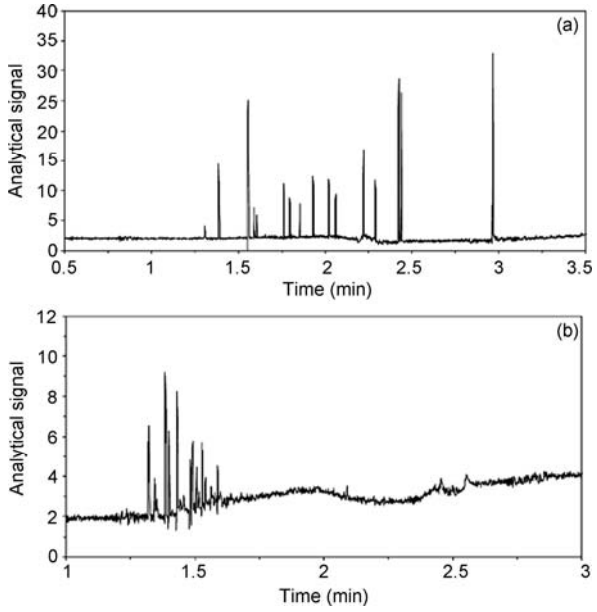


**图 4** 先在离子液体中分散, 再在 SDS 中分散的单壁碳管(a)、直接在 SDS 中分散的单壁碳管(b)的毛细管电泳图谱[23]

分离. 他们分离了不同大小的表面由 3-巯基丙酸修饰稳定的 CdTe 量子点. 经过实验比较, 他们从分离蛋白质和 DNA 片段时常用的三种聚合物(聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、羟基丙酮酸磷酸)中选择了线形聚丙烯酰胺作为分离介质, 并获得了最为对称和尖锐的分离峰. 为了达到更好的分离效果, 可以先将量子点与生物大分子结合后, 再对量子点进行毛细管电泳分离. 与量子点结合的生物分子既影响纳米颗粒的质量, 也影响其所带电荷, 从而使不同生物分子结合的量子点会呈现出不同的电泳行为. Huang 等人[25]用毛细管电泳-激光诱导荧光检测装置分别分离了与辣根过氧化物酶共价结合的 CdTe 量子点和未与生物分子结合的 CdTe 量子点, 以及与牛血清白蛋白静电结合的 CdTe 量子点和未与生物分子结合的 CdTe 量子点. Vicente 等人[26]用毛细管电泳-激光诱导荧光检测装置分离了分别与生物素、链球菌和免疫球蛋白 G 结合的 CdSe/ZnS 量子点. 将聚氧乙烯加入到电泳缓冲溶液中能够减小电渗流, 并增大与生物分子结合的量子点电泳迁移时间之间的差别, 提高电泳分辨率.

纳米颗粒在缓冲溶液中的分散情况直接影响毛细管电泳的分离可重复性, 分散性好的样品的分离效果高于形成悬浊液或有沉淀物的样品. 待分离纳米颗粒的水溶性也直接影响着对不同类型毛细管电泳方法的选择, 对于水溶性差的样品需要选择相应的非水毛细管电泳方法. 此外, 还需要考虑纳米颗粒是否会与毛细管内壁发生吸附等相互作用, 若有此类相互作用, 需要在使用前对毛细管内壁进行处理(如用硅烷化试剂涂层)或改变所用缓冲液的 pH 值、离子强度、极性、向其中添加添加剂等. 对于尺寸相对较大的纳米颗粒, 可以采用有筛分作用的毛细管凝胶电泳代替普通的自由溶液中的毛细管区带电泳进行分离.

## 6 其他电泳技术分离纳米颗粒

除了使用琼脂糖凝胶电泳、毛细管电泳进行纳米颗粒的分离, 利用载体两性电解质在凝胶内制造的 pH 梯度或固相 pH 梯度分离等电点不同的蛋白质的等电聚焦电泳技术, 现在也被用于纳米颗粒的分离. Arnaud 等人[27]使用聚丙烯酰胺 pH 梯度凝胶分离了不同大小表面经巯基琥珀酸修饰的金纳米颗粒. 金纳米颗粒越大, 表面结合的巯基琥珀酸分子数目越多, 并具有越多的负电荷和更高的等电点, 比如, 当金纳米颗粒的尺寸从 1.7 nm 变化到 4.9 nm 时, 相应的等电点也从 4.5 变化到 5.5. 等电点不同的金纳米颗粒在进行等电聚焦电泳时会迁移到凝胶中与其等电点相同的位置上, 得到分离.

因为在水相中合成的纳米颗粒的粒径分布比在有机相中合成的纳米颗粒更宽, 所以对水相中合成的纳米颗粒的分离更加困难. 自由流电泳是在一种在无支持介质的薄的矩形分离腔中, 用缓冲液作为分离介质的较温和的高通量、高灵敏度的连续电泳分离过程, 一般不使用有机溶剂. Ho 等人[28]应用此技术在对水溶液中的 CdTe 纳米颗粒一步快速分离的同时, 保持了其荧光强度. 经过自由流电泳分离后的 CdTe 纳米颗粒的荧光峰的半峰宽减小了 51%, 颗粒的单分散性增强. CdTe 纳米颗粒在电泳过程中不仅保持了原有的化学性质, 还得到了纯化, 去除了过量的稳定剂、未反应的前体物质和杂质(包括团聚物)等.

悬浮液中的中性颗粒在非均匀电场中受到极化效应产生的力作用后, 做定向运动的现象被称为介电电泳. 颗粒所受介电电泳力的大小和方向与颗粒的尺寸、形状、带电情况以及电场频率、分离介质的介电常数等相关, 因此可以用特定频率的电场选择性地排列和操纵电场中的介电颗粒. 介电电泳技术

除了被广泛用于在电极间排列纳米材料[29~31]之外, 也可以作为纳米材料的分离、富集手段. Shin 等人[32]第一次用介电电泳在微流控装置中对金属性质和半导体性质的单壁碳管进行了高灵敏度、高产率的分离. 分离过程主要基于正介电电泳力和液体的粘滞力对碳管的作用. 在微流管道中, 交流信号幅值 *V*pp 为 10 V, 交流信号频率为 10 MHz 的条件下, 两种碳管在电场中的极化程度不同, 但都受到正介电电泳力的作用. 金属性质 SWNTs 受到大于迟滞阻力的介电电泳力作用, 而半导体性质 SWNTs 受到小于迟滞阻力的介电电泳力作用, 两种碳管向相反方向运动, 逐渐分离(见图 5). Froude 等人[33]在研究中比较了外表面分别由氨基化的 20 nm 胶体颗粒不均匀包被的脂质体和磷酸钙均一包被的脂质体在非均匀交变电场中的介电电泳行为. 发现具有磷酸钙外壳的脂质体的临界频率(正负介电电泳过渡区域的频段)显著低于未经任何修饰的脂质体. 而与此不同, 虽然外表面不均匀吸附带相反电荷纳米颗粒的脂质体表面的电导率会随纳米颗粒吸附数目的增加而降低, 但是其临界频率与未经修饰的脂质体相比, 并没有显著变化. 由此发现, 影响壳层结构颗粒介电电泳行为的关键因素不是其表面电导率, 而在于颗粒表面的组成.

## 7　总结与展望

本文介绍了应用凝胶电泳、毛细管电泳等方法对不同大小、形状和电荷分布的纳米颗粒进行分离的相关研究进展. 电泳是纳米颗粒分离分析中一种直观和高度可控的方法, 无论凝胶电泳还是毛细管电泳,

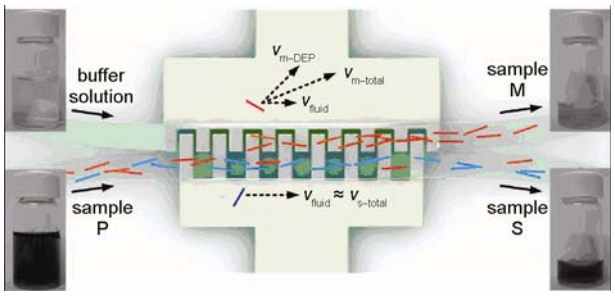


**图 5**　在微流控装置中利用介电电泳分离金属性质单壁碳管和半导体性质单壁碳管[32]. 利用金属性质和半导体性质的单壁碳管介电电泳行为的差异, 单壁碳管样品悬液经过介电电泳分离后得到样品 M 和样品 S, 其中: 样品 M 为金属性质碳管纯品; 样品 S 为半导体性质碳管大量富集的样品.

都可以利用纳米颗粒本身在紫外/可见光区的吸收和发出的荧光等, 对其分离过程进行实时监测. 凝胶电泳操作简便, 对纳米颗粒样品的分离量较大, 且在同一块胶上可以同时测定多个样品, 但分辨率不及毛细管电泳, 适用于对纳米颗粒进行粗分, 对凝胶电泳分离效果的评价可以将分离条带中的纳米颗粒提取出来并通过扫描电子显微镜、透射电子显微镜和动态光散射等方法观察. 毛细管电泳的分离速度快、自动化程度高, 可以在短时间内对多个样品进行分离, 而且所需样品量很少, 被更广泛的用于纳米颗粒的分离, 尤其是较为珍贵的纳米颗粒样品的分离分析中. 毛细管电泳还提供了多样的检测手段, 如紫外/可见吸收、二级管阵列、激光光热和荧光检测等. 但是, 由于毛细管电泳的分离量少, 不能进行大量分离样品的收集, 给已分离颗粒的进一步检测分析造成了一定不便.

在电泳前, 对纳米颗粒的前处理过程很大程度上影响着电泳分辨率的高低. 纳米颗粒样品的分散是电泳前的关键步骤, 分散不充分, 如形成团聚块等会直接影响电泳结果的准确性. 为了保证被分离纳米颗粒的形状和固有性质无变化, 纳米颗粒的分散和稳定都应以表面活性剂体系提供的非共价稳定作用为主. 凝胶电泳中电泳条带的弥散情况、毛细管电泳中分离峰形的宽窄、重叠等都与纳米颗粒的均一程度直接相关. 所以, 当分离较复杂的样品时, 为了提高电泳分辨率, 可以在电泳前先将纳米颗粒进行离心或凝胶层析, 或者使纳米颗粒带上一定量的电荷, 用离子交换层析的方法进行初步分离等预处理. 同时要注意在不同缓冲体系中纳米颗粒的稳定性是不同的, 所选择的缓冲溶液中的离子应对纳米颗粒的表面化学修饰和颗粒的分离不产生影响. 溶液中的纳米颗粒的性质和形态随时间增长可能会发生一定变化, 如被氧化、团聚等, 所以最好使用新制备的搅拌均匀的纳米颗粒稀溶液作为电泳样品, 且在电泳时要注意控制条件, 除了加入一些起稳定作用的抗氧化剂、表面活性剂等, 背景电解质溶液的 pH 值是一项重要指标, 因为介质 pH 的改变会影响电渗流速度, 并影响纳米颗粒表面吸附的表面活性剂分子数目和表面电荷多少, 改变颗粒的有效电泳速度. 因此最好保持分散纳米颗粒的溶剂的 pH 值与电泳背景电解质溶液的 pH 值相同或同时改变.

电泳技术可以作为检测纳米颗粒溶液组成和均

一性的手段, 用于纳米颗粒的质量控制.利用电泳技术的高分辨率可以将低速、高速离心不能有效分离的纳米颗粒分离开, 而避免频繁使用超速离心机等大型设备. 纳米颗粒的大小、形状和表面化学修饰等直接影响着其在生物体内的效应, 清除速率等, 利用电泳技术可以快捷地鉴别纳米颗粒的性质, 因此电泳技术有望成为纳米毒理学检测中的常规手段. 虽然使用电泳技术对纳米颗粒进行分离已得到了较好的实验结果, 有良好的应用前景, 但目前的电泳分离仅限于组成相对简单的样品, 分离量较小. 要想对更复杂的纳米颗粒样品, 如环境中和工业生产中的纳米颗粒样品等进行高效分离, 还需要对电泳技术进行进一步的优化. 分离中的一大限制是对于各种纳米材料, 没有合适的电泳标准物 marker, 将迁移率或迁移时间与不同纳米颗粒的大小、形状联系起来, 使得操作的重复性难以很好保证. 由于没有统一标准, 不同研究组对各种纳米颗粒的分离建立了种类繁多的电泳方法, 尚未形成统一的体系, 而对分离情况的最终把握也仍需电子显微镜的协助才能完成, 这使得应用电泳技术分离纳米颗粒难以形成规模. 今后使用电泳技术进行纳米颗粒尺度分析的一个完善和发展的方向将是标准化、定量化电泳体系的建立.

**致谢** 感谢审稿专家提出的宝贵意见, 感谢北京工业大学生命科学与生物工程学院王存新教授宝贵的修改建议. 本工作得到中国科学院“百人计划”项目(07165111ZX)、自然科学基金委项目(30970784)、中芬纳米科技合作项目(2008DFA01510)、国家重点基础研究发展计划(2009CB930200)和国家质检总局科研计划(2009IK223)资助, 特此一并致谢.

## 参考文献

1 Chen G, Wang Y, Tan LH, Yang M, Tan LS, Chen Y, Chen H. High-purity separation of gold nanoparticle dimers and trimers. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 4218—4219
2 Lee JS, Seferos DS, Giljohann DA, Mirkin CA. Thermodynamically controlled separation of polyvalent 2-nm gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 5430—5431
3 Sun X, Tabakman SM, Seo WS, Zhang L, Zhang G, Sherlock S, Bai L, Dai H. Separation of nanoparticles in a density gradient: FeCo@C and gold nanocrystals. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 939—942
4 Anand M, Odom LA, Roberts CB. Finely controlled size-selective precipitation and separation of CdSe/ZnS semiconductor nanocrystals using $CO_2$-gas-expanded liquids. *Langmuir*, 2007, 23: 7338—7343
5 Surugau N, Urban PL. Electrophoretic methods for separation of nanoparticles. *J Sep Sci*, 2009, 32: 1889—1906
6 Qin W. Silica nanoparticles as pseudostationary phase for protein separation. *Electrophoresis*, 2007, 28: 3017—3023
7 Maier M, Fritz H, Gerster M, Schewitz J, Bayer E. Quantitation of phosphorothioate oligonucleotides in human blood plasma using a nanoparticle-based method for solid-phase extraction. *Anal Chem*, 1998, 70: 2197—2204
8 Chen YL, Shih CJ, Ferrance J, Chang YS, Chang JG, Wu SM. Genotyping of alpha-thalassemia deletions using multiplex polymerase chain reactions and gold nanoparticle-filled capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1206—1212
9 Lin CY, Liu CH, Chang HC, Tseng WL. Enrichment and separation of acidic and basic proteins using the centrifugal ultrafiltration followed by nanoparticle-filled capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29: 3024—3031
10 Righetti PG. Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes. *J Chromatogr A*, 2005, 1079: 24—40
11 Hanauer M, Pierrat S, Zins I, Lotz A, Sonnichsen C. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Lett*, 2007, 7: 2881—2885
12 Xu X, Caswell KK, Tucker E, Kabisatpathy S, Brodhacker KL, Scrivens WA. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2007, 1167: 35—41
13 Vetcher AA, Srinivasan S, Vetcher IA, Abramov SM. Fractionation of SWNT/nucleic acid complexes by agarose gel electrophoresis. *Nanotechnology*, 2006, 17: 4263—4269
14 Heller DA, Mayrhofer RM, Baik S, Grinkova YV, Usrey ML, Strano MS. Concomitant length and diameter separation of single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 14567—14573
15 Song Z, Shen Y, Yan H, You C, Yu B, Zhang J, Zhang X. Stable water-soluble CdSe/ZnS quantum dots with higher quantum efficiency as fluorescent biological label. *Proc Inst Mech Eng, Part N: J Nanoeng Nanosyst*, 2008, 222: 129—133

16 Vinayaka AC, Basheer S, Thakur MS. Bioconjugation of CdTe quantum dot for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by competitive fluoroimmunoassay based biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 1615—1620
17 Roy I, Ohulchanskyy TY, Bharali DJ, Pudavar HE, Mistretta RA, Kaur N, Prasad PN. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 279—284
18 Hartnagel U, Balbinot D, Jux N, Hirsch A. Electrophoresis of electrostatically assembled fullerene-porphyrin conjugates. *Org Biomol Chem*, 2006, 4: 1785—1795
19 Liu FK, Ko FH, Huang PW, Wu CH, Chu TC. Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2005, 1062: 139—145
20 Liu FK, Tsai MH, Hsu YC, Chu TC. Analytical separation of Au/Ag core/shell nanoparticles by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2006, 1133: 340—346
21 Suarez B, Simonet BM, Cardenas S, Valcarcel M. Separation of carbon nanotubes in aqueous medium by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2006, 1128: 282—289
22 Doorn SK, Fields RE 3rd, Hu H, Hamon MA, Haddon RC, Selegue JP, Majidi V. High resolution capillary electrophoresis of carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 3169—3174
23 Lopez-Pastor M, Dominguez-Vidal A, Ayora-Canada MJ, Simonet BM, Lendl B, Valcarcel M. Separation of single-walled carbon nanotubes by use of ionic liquid-aided capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2008, 80: 2672—2679
24 Song X, Li L, Qian H, Fang N, Ren J. Highly efficient size separation of CdTe quantum dots by capillary gel electrophoresis using polymer solution as sieving medium. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1341—1346
25 Huang X, Weng J, Sang F, Song X, Cao C, Ren J. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection. *J Chromatogr A*, 2006, 1113: 251—254
26 Vicente G, Colon LA. Separation of bioconjugated quantum dots using capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 2008, 80: 1988—1994
27 Arnaud I, Abid JP, Roussel C, Girault HH. Size-selective separation of gold nanoparticles using isoelectric focusing electrophoresis (IEF). *Chem Commun (Camb)*, 2005, 787—788
28 Ho SS, Critchley K, Lilly GD, Shim B, Kotov NA. Free flow electrophoresis for the separation of CdTe nanoparticles. *J Mater Chem*, 2009, 19: 1390—1394
29 Padmaraj D, Zagozdzon-Wosik W, Xie LM, Hadjiev VG, Cherukuri P, Wosik J. Parallel and orthogonal E-field alignment of single-walled carbon nanotubes by ac dielectrophoresis. *Nanotechnology*, 2009, 20: 35201
30 Yun JH, Kim J, Park YC, Song JW, Shin DH, Han CS. Highly sensitive carbon nanotube-embedding gas sensors operating at atmospheric pressure. *Nanotechnology*, 2009, 20: 55503
31 Lao CS, Liu J, Gao P, Zhang L, Davidovic D, Tummala R, Wang ZL. ZnO nanobelt/nanowire Schottky diodes formed by dielectrophoresis alignment across au electrodes. *Nano Lett*, 2006, 6: 263—266
32 Shin DH, Kim JE, Shim HC, Song JW, Yoon JH, Kim J, Jeong S, Kang J, Baik S, Han CS. Continuous extraction of highly pure metallic single-walled carbon nanotubes in a microfluidic channel. *Nano Lett*, 2008, 8: 4380—4385
33 Froude VE, Zhu Y. Dielectrophoresis of functionalized lipid unilamellar vesicles (liposomes) with contrasting surface constructs. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 1552—1558

# Application of electrophoresis in the separation of nanoparticles

MA XiaoWei[1], CHE ZhiJun[2], LIU YanHua[2], GUO TianYu[2] & LIANG Xing-Jie[1]

1 CAS Key Laboratory for Biomedical Effects of Nanomaterials and Nanosafety; Division of Nanomedicine and Nanobiology, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China

2 Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China

**Abstract:** Synthetic nanoparticles often bear wide distribution in size and shape. However, it is critical to have nanoparticles with the lowest size and shape dispersion possible in many experiments for their unique size- and/or shape-dependent physiochemical properties. Therefore, quick and handy separation methods of nanoparticles have brought considerable attention in many scientific areas recently. Electrophoresis has been extensively used in the separation and purification of biological molecules such as nucleic acids and proteins with a remarkable resolution. The charged nanoparticles are very close in size to protein complexes, organelles and microorganisms, and share similarity in motion behavior with biological molecules in an electric field. It is a new idea to use electrophoresis technology for nanoparticles' identification, separation and purification, which has achieved favorable results. This review presents recent advances in the separation of nanoparticles by agarose gel electrophoresis, capillary electrophoresis and some other electrophoretic techniques.

**Keywords:** nanoparticle, electrophoresis, separation, agarose gel electrophoresis, capillary electrophoresis