



博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思

# 高效毛细管电泳

## Capillary Electrophoresis

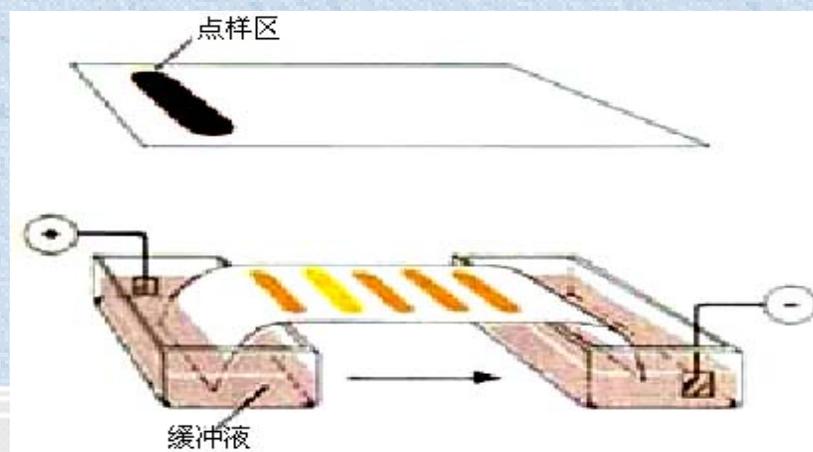
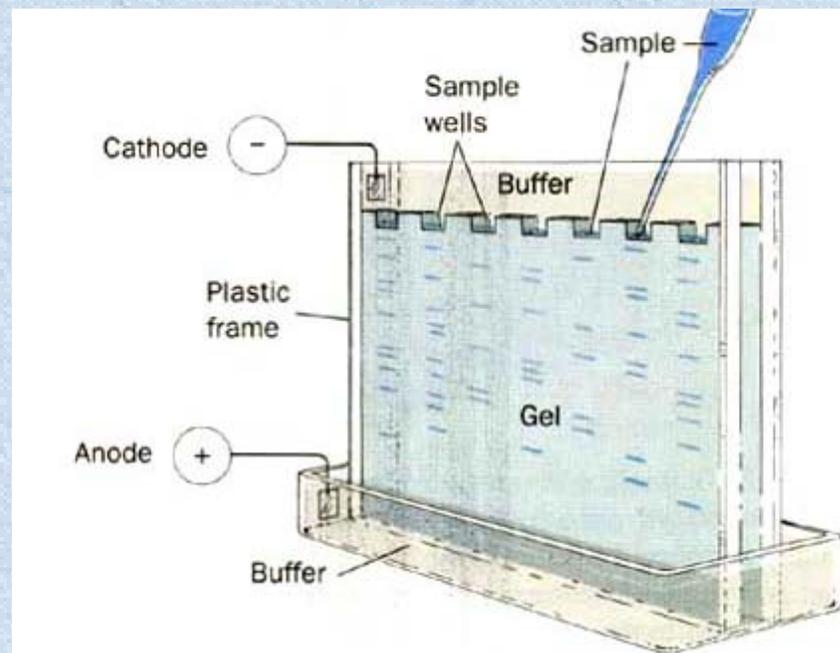
复旦大学 化学教学实验中心

雷 杰



# 一、电泳 (electrophoresis)：带电粒子在电场中的定向移动。

- 1937年，瑞典科学家蒂塞利乌斯 (Tiselius) 设计了世界上第一台电泳仪，建立了移界电泳法，并于1948年荣获诺贝尔化学奖。多年以来，电泳技术围绕制胶、电泳、染色三个技术环节，不断改进，以实现下列目标：
  - 1、提高分辨率及灵敏度。
  - 2、简化操作，缩短电泳时间。
  - 3、扩大应用范围。
- 各类电泳技术已广泛应用于生命科学各个领域。





## 蒂塞利乌斯

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902-1971)



1902年8月10日生于斯德哥尔摩,1971年10月29日卒于同地。他4岁时随家移居哥德堡。1921年入乌普萨拉大学,就读于物理化学家T.斯韦德贝里。1924年获化学、物理和数学三个硕士学位,1930年获博士学位。后任乌普萨拉大学化学讲师、副教授。在此期间曾先后两次赴美国威斯康星大学和普林斯顿大学从事研究和进修,1938年任教授。

蒂塞利乌斯1925年从事胶体溶液中悬浮蛋白质的电泳分离研究。曾自制超速离心机测定蛋白质分子的大小和形状,并与斯韦德贝里合作发表了第一篇论文,报导了测定蛋白质淌度的新方法。1930年他进一步改进实验手段和装置,发表了关于色谱法和吸附的论文。1935年从美国回国后,重新改建原有电泳装置,发展了区带电泳法,大大提高了效率和分辨率。1940年他用自己设计的新电泳装置成功地分离了血清中蛋白质的4个组分,分别命名为:白蛋白、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、和 $\gamma$ 球蛋白。该法迅速应用于分离和鉴定各种复杂蛋白质及其他天然物质的混合物的组成。

他因对电泳分析和吸附方法的研究,特别是发现了血清蛋白的组分而获得1948年诺贝尔化学奖。



## 二、毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis)

- 毛细管电泳(CE)又称高效毛细管电泳(HPCE), 是指离子或带电粒子以毛细管为分离介质, 以高压直流电场为驱动力, 依据样品中各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的液相分离分析技术。由于毛细管内径小, 表面积和体积的比值大, 易于散热, 因此毛细管电泳可以减少焦耳热的产生, 这是CE和传统电泳技术的根本区别。
  - 采用了0.05 mm内径的毛细管;
  - 采用了高达数千伏的电压。



## 三、毛细管电泳基本原理

### (一) 基本概念

毛细管总长度 ( $L$ , cm)

毛细管有效长度 ( $l$ , cm) 毛细管的入口端到检测窗口的距离;

迁移时间 ( $t$ , min) 带电粒子在电场作用下做定向移动的时间;

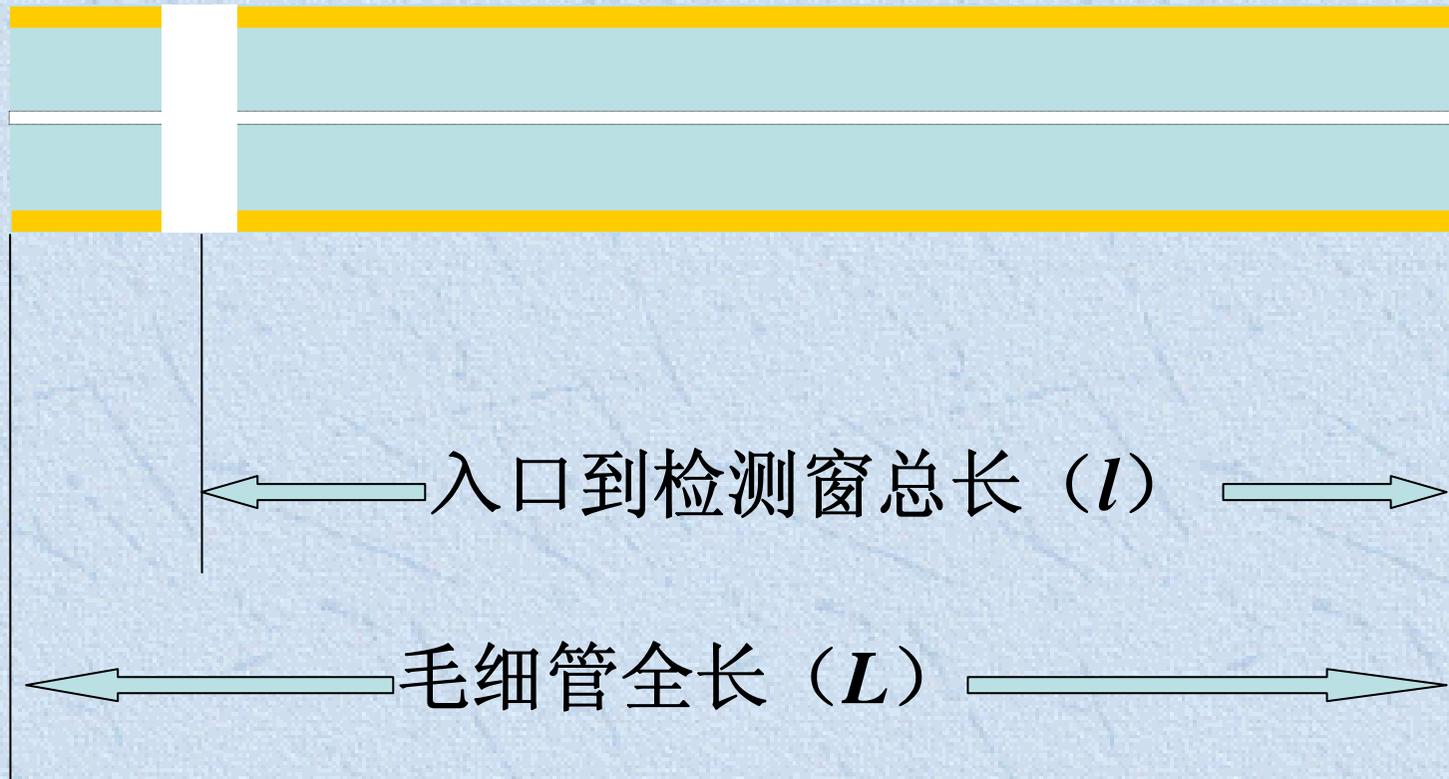
电场强度 ( $E$ , V/cm) 电场强度/毛细管总长度;

电泳速度 ( $v$  cm/s) 在单位时间内, 带电粒子定向移动的距离;

电泳淌度 ( $\mu$  cm<sup>2</sup>/(V·s)) 带电粒子在毛细管中定向移动的速度与所在电场强度之比;



# 毛细管 (内径 $50\ \mu\text{m}$ , 外径 $375\ \mu\text{m}$ )



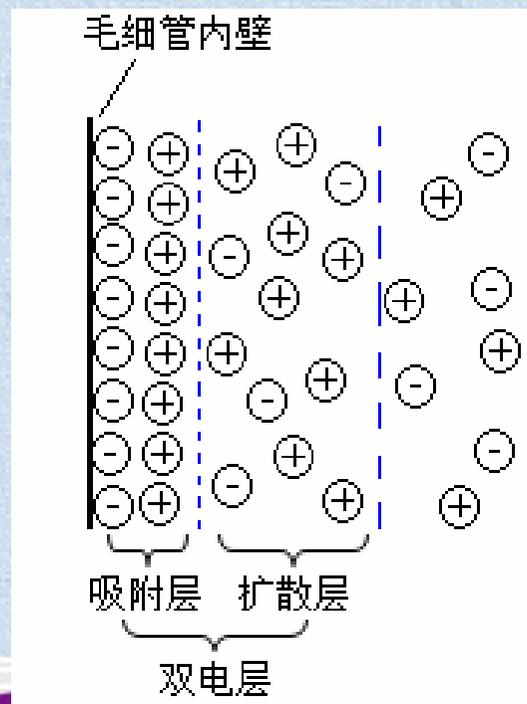


## (二) 电渗现象与电渗流 (electroosmosis and electroosmotic flow)

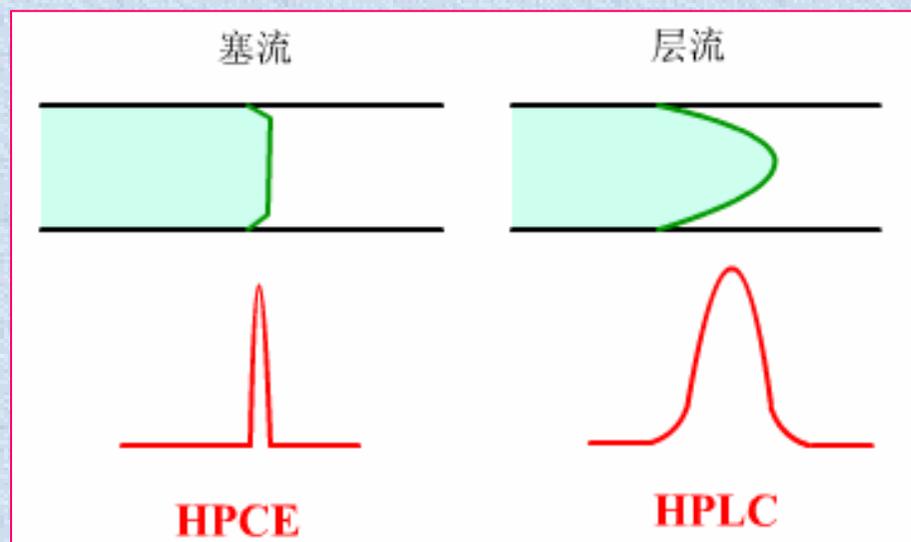
当固体与液体接触时，固体表面带一种电荷，因静电引力使其周围液体带有相反电荷，在液-固界面形成双电层。

当液体两端施加电压时，就会发生液体相对于固体表面的移动，这种现象叫电渗现象。

电渗现象中整体移动着的液体叫电渗流（electroosmotic flow，简称EOF）。



石英毛细管柱，内充液  
 $\text{pH} > 3$ 时，表面电离成 $-\text{SiO}^-$   
 ，管内壁带负电荷，形成  
 双电层后，电渗流方向为  
 由正极到负极。



毛细管电泳中，溶液整体移动，电渗流的流动为平流，  
 塞式流动，谱带展宽很小；

液相色谱中的溶液流动为层流，抛物线流型，管壁处流  
 速为零，管中心处的速度为平均速度的2倍，引起谱带展宽  
 较大。



电渗流的速度约等于一般离子电泳速度的5~7倍；

各种电性离子在毛细管柱中的迁移速度为：

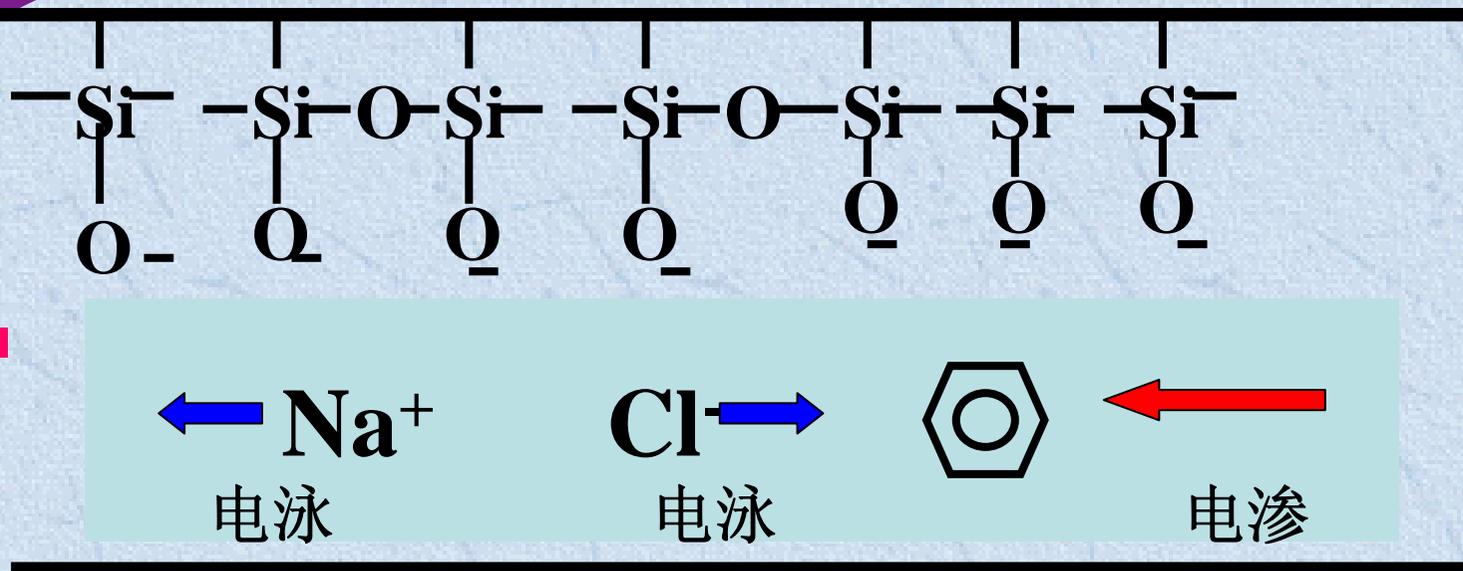
$V_+ = V_{\text{电渗流}} + V_{+ef}$  阳离子运动方向与电渗流一致；

$V_- = V_{\text{电渗流}} - V_{-ef}$  阴离子运动方向与电渗流相反；

$V_0 = V_{\text{电渗流}}$  中性粒子运动方向与电渗流一致；

- (1) 可一次完成阳离子、阴离子、中性粒子的分离；
- (2) 改变电渗流的大小和方向可改变分离效率和选择性，如同改变LC中的流速；
- (3) 电渗流的微小变化影响结果的重现性；

在HPCE中，控制电渗流非常重要。



+

迁移速度

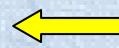
矢量速度

合速度

Na<sup>+</sup>



Cl<sup>-</sup>



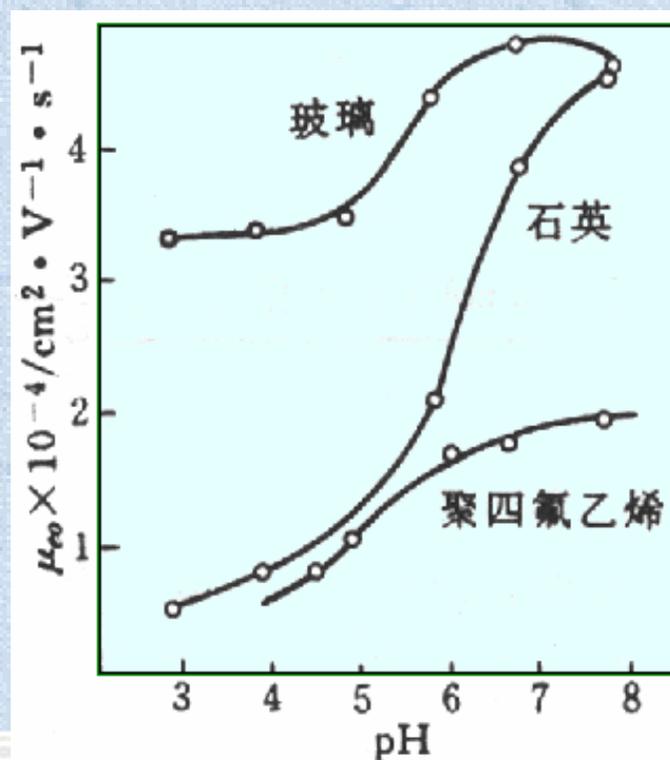
## (三) 影响电渗流的因素

### 1. 电场强度的影响

电渗流速度和电场强度成正比，当毛细管长度一定时，电渗流速度正比于工作电压。

### 2. 毛细管材料的影响

不同材料毛细管的表面电荷特性不同，产生的电渗流大小不同；





### 3. 电解质溶液性质的影响

#### (1) 溶液pH的影响

对于石英毛细管，溶液pH增高时，表面电离多，电荷密度增加，管壁zeta电势增大，电渗流增大，**pH=7，达到最大**；pH<3，完全被氢离子中和，表面电中性，电渗流为零。分析时，采用缓冲溶液来保持pH稳定。

#### (2) 阴离子的影响

在其他条件相同，浓度相同而阴离子不同时，毛细管中的电流有较大差别，产生的焦耳热不同。

缓冲溶液离子强度，影响双电层的厚度、溶液黏度和工作电流，明显影响电渗流大小。缓冲溶液离子强度增加，电渗流下降。



## 4. 温度的影响

毛细管内温度的升高，使溶液的黏度下降，电渗流增大。温度变化来自于“焦耳热”；

**焦耳热：**毛细管溶液中有电流通过时，产生的热量；

CE中的焦耳热与背景电解质的摩尔电导、浓度及电场强度成正比。

温度每变化1，将引起背景电解质溶液黏度变化2%~3%；

## 5. 添加剂的影响

(1) 加入浓度较大的中性盐，如 $K_2SO_4$ ，溶液离子强度增大，使溶液的黏度增大，电渗流减小。

(2) 加入表面活性剂，可改变电渗流的大小和方向；

加入不同阳离子表面活性剂可控制电渗流。

加入阴离子表面活性剂，如十二烷基硫酸钠（SDS），可以使壁表面负电荷增加，zeta电势增大，电渗流增大；

(3) 加入有机溶剂如甲醇、乙腈，使电渗流减小。

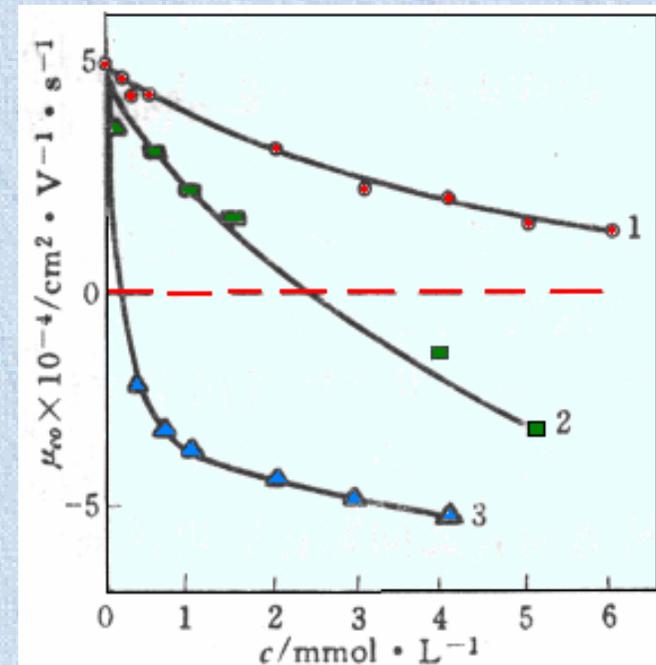


图 阳离子表面活性剂的浓度和种类对电渗流的影响

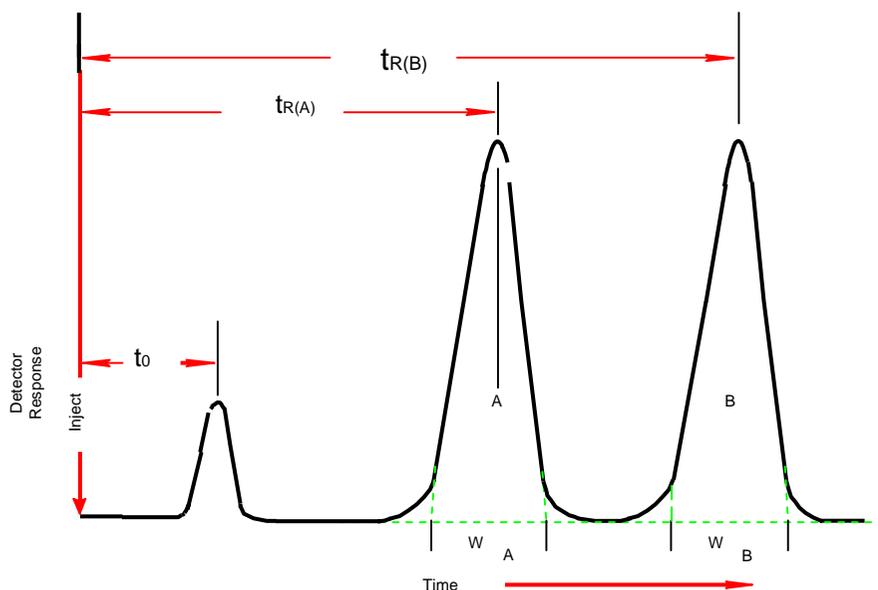
- — 癸烷基三甲基溴化铵；
- — 十二烷基三甲基溴化铵；
- ▲ — 十四烷基三甲基溴化铵。

# (四) 色谱参数

博学而笃志

切问而近思

## 一定性和定量：保留时间和峰面积（峰高）



$t_R$  = 保留时间  
 $t_0$  = 死时间  
 $W$  = 峰底宽度

分离度  $R = 2 \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{W_A + W_B} = 1.176 \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{W_{1/2A} + W_{1/2B}}$

容量因子  $K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

色谱过程热力学



## 色谱过程动力学 之 塔板理论

$$\text{理论塔板数 } n = 16 \left( \frac{V_R}{W_b} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

$$\text{塔板高度 } H = L/n$$

$t_R$  为样品的保留时间； $W_b$  为峰底宽； $t_R'$  为调整保留时间； $L$  色谱柱长度。



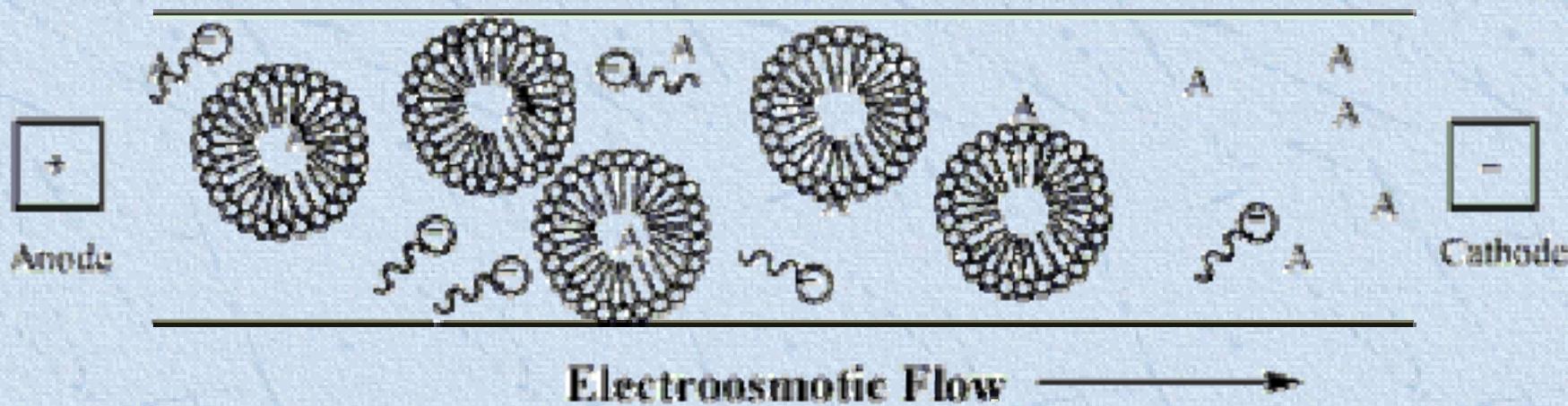
## 四、毛细管电泳分离模式

- 毛细管区带电泳 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)
- 毛细管胶束电动色谱 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MEKC, MECC)
- 毛细管凝胶电泳 (Capillary Gel Electrophoresis, CGE)
- 毛细管等电聚焦 (Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)
- 毛细管等速电泳 (Capillary Isotachopheresis, CITP)
- 毛细管电动色谱 (Capillary Electrokinetic Chromatography, CEC)



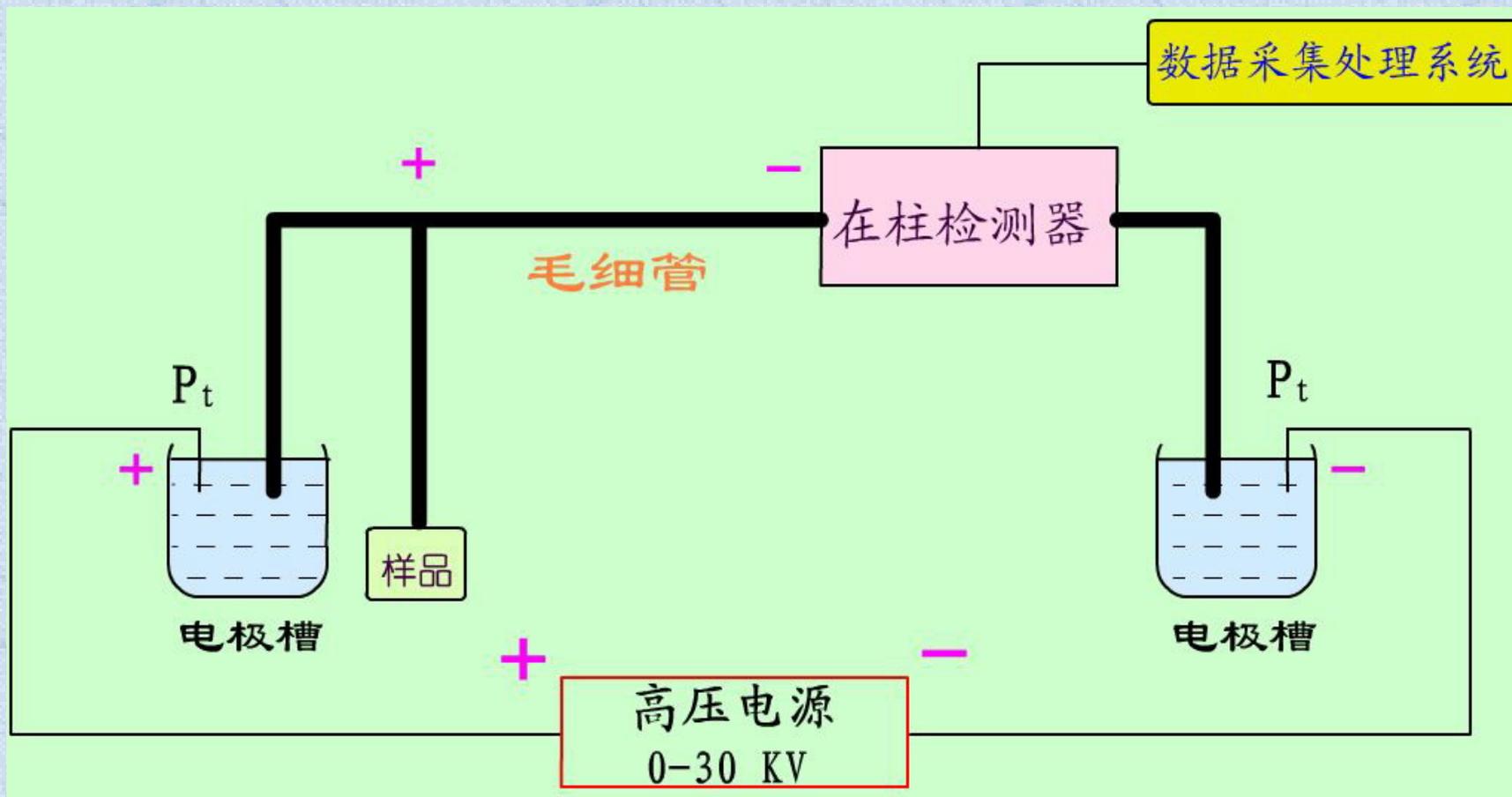
博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思





# 五、毛细管电泳仪器





## (一) 进样系统

**进样量：** 进样长度必须控制在毛细管总长度的1%~2%，否则将影响分离效率； **纳升级；**

### 1. 流体力学进样方式

- (1) 进样端加压
- (2) 出口端抽真空
- (3) 虹吸进样



## 2. 电动进样方式

毛细管一端插入样品瓶，加电压；

进样不均：电歧视现象，淌度大的离子比淌度小的进样量大；

离子丢失：淌度大且与电渗流方向相反的离子可能进不去；

特别适合黏度大的试样

## 3. 扩散进样

试样通过扩散作用进入分离柱端口处。



## (二) 分离系统

### 高压电源

- (1) 0~30 kV 稳定、连续可调的直流电源；
- (2) 具有恒压、恒流、恒功率输出；
- (3) 电场强度程序控制系统；
- (4) 电压稳定性：0.1%；电源极性易转换；

### 毛细管柱

- (1) 材料：石英：各项性能好；玻璃：光学、机械性能差；
- (2) 规格：内径20~75  $\mu\text{m}$ ，外径350~400  $\mu\text{m}$ ；长度 $\leq 1$  m



### (三) 检测系统

- 常用的检测方式是紫外-可见光吸收。检测器位于距进样端约毛细管总长的 $2/3 \sim 4/5$ 处；
- 此外，电化学、荧光、激光诱导荧光、质谱等检测方法也被应用于毛细管电泳；
- 优势互补。



博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思



Experimental Center for Chemical education, FDU

復旦大學

化学教学实验中心



博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思



Experimental Center for Chemical education, FDU

復旦大學

化学教学实验中心

## Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System

**Agilent Technologies  
introduces the  
Next Generation  
Capillary Electrophoresis  
System**





博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思

# TriSep™-2010GV pCEC System



Ex



Unimicro Technologies

MODE FLOW RATE TIMER  
C.F 0.000 OFF  
6.7 15.0 0.0  
PRESS MPa MAX MIN  
MODE PAUSE PRGM  
7 8 9 ▲ CLEAR  
4 5 6 ▼ MODE  
1 2 3 CLEAR PRGM RUN  
0 - EDIENTER PUMP

Unimicro Technologies

MODE FLOW RATE TIMER  
C.F 0.003 OFF  
6.8 15.0 0.0  
PRESS MPa MAX MIN  
MODE PAUSE PRGM  
7 8 9 ▲ CLEAR  
4 5 6 ▼ MODE  
1 2 3 CLEAR PRGM RUN  
0 - EDIENTER PUMP

Unimicro Technologies

POWER ON/OFF  
INJECT

Unimicro Technologies

TriSep™ 2010GV  
Detection Module

ABSORBANCE  
-0033  
254 (nm)  
MODE RANGE  
MODE RANGE  
MODE RANGE

Unimicro Technologies

TriSep™ 2010GV  
High Voltage Module

MODE  
ENTER MODE RUN  
ENTER MODE RUN

而 笃 志 切 问 而 近 思



移液器（又名微量加样器，Pipette）使用时的注意事项：

量程的调节

枪头（吸液嘴）的装配

移液的方法



博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思

## 六、实验内容

- 见补充讲义。

1870