

补充讲义 毛细管电泳实验

一、目的要求

- 1、熟悉毛细管电泳的基本原理和基本概念。
- 2、了解毛细管电泳仪的组成，熟练掌握毛细管电泳仪的使用方法。

二、内容提要

电泳(electrophoresis)作为一类分离技术，是依据溶质在电场中不同的迁移速率来进行的。其中，毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是泛指在内径小于100 μm的毛细管内实现的一类电泳技术。一般认为毛细管电泳里程碑式的工作是由Jorgenson和Lukacs在1981年完成的，他们使用75 μm的毛细管柱，用电迁移进样和荧光检测器对多种组分实现了分离。毛细管电泳是经典电泳技术与现代微柱分离相结合的产物，实际上包含电泳、色谱及其交叉内容，是分析科学中继高效液相色谱之后的又一重大进展，它使分析科学得以从微升水平进入纳升水平。

在缓冲液中，带电粒子在直流电场的作用下，以不同的速度向其所带电荷极性相反方向移动，这就是电迁移，通常称为电泳。单位电场(E)下的电泳速度(v/E)通常称为淌度或者电迁移率，记作 μ_{eff} 。我们在物理化学手册中可以查到的离子淌度常数是绝对淌度，在电泳实验中测定的值往往与此不同，我们将实验值称为有效淌度(μ_{eff})。

在水溶液中多数固体表面根据材料性质的不同带有过剩的负电荷或正电荷，以石英毛细管柱为例，当它与电解质溶液接触时，在pH>3的情况下，其内表面上的硅羟基解离并产生表面负电荷，此负电荷随即吸引溶液中的正离子，形成双电层。双电层中溶液一侧的正离子浓度高于溶液本体中，并呈衰减分布(见图1)，此衰减层还可以进一步分为吸附层和扩散层，前者在电泳过程中不会移动，后者在高压电场的作用下，由于带正电荷而向负极方向移动形成电渗流(electroosmotic flow, EOF)，电渗流的大小可以也用淌度(或称为电渗流系数)来表示， $\mu_{\text{eo}} = v/E$ ， v 为电渗流速度、 E 为电场强度。

带电粒子在毛细管缓冲液中的迁移速度等于电泳淌度和电渗淌度的矢量和，称为表观淌度(apparent mobility)，即 $\mu_{\text{ap}} = \mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{eo}}$ 。一般情况下，电渗流的速度比电泳速度快5~7倍，故当离子的电泳淌度方向与电渗流方向相反时，仍然可以使其沿电渗流方向迁移。各种粒子由于所带电荷多少、质量、体积以及形状等因素引起迁移速度不同而实现分离。

电渗是推动样品迁移的一个重要动力，电渗流的一个重要特性是具有平面流型。由于引起流动的推动力在毛细管的径向上均匀分布，所以管内各处流速接近相等。其优点是径向扩散对谱带扩展的影响非常小，如图2所示。与此形成鲜明对照的是高压泵驱动的抛物线流型(如在HPLC中)，由于管内径向上各处的流速不同，使得谱带峰形变宽。这也是与HPLC相比，CE具有更高分离效率的一个重要原因。

毛细管区带电泳(CZE)是最简单的CE模式，因为毛细管中的分离介质只是缓冲液。

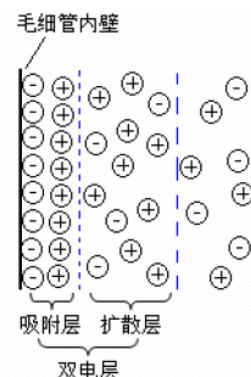


图1 毛细管壁双电层结构示意图

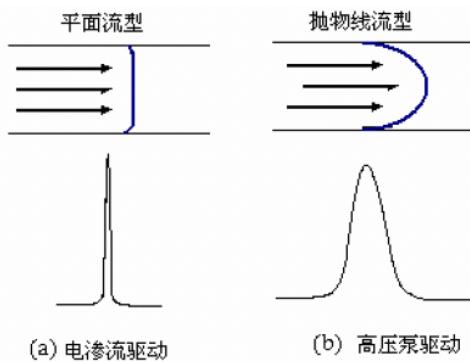


图2 不同驱动力的流型(上)和相应的谱带峰形(下)

由于电渗流的作用，正负离子均可以实现分离。在正极进样的情况下，正离子首先流出毛细管，负离子最后流出。中性物质在电场中不迁移，只是随电渗流一起流出毛细管，故得不到分离。

在 CZE 中，影响分离的因素主要有缓冲液的种类、浓度和 pH 值、添加剂、分析电压、温度、毛细管的尺寸和内壁改性等。缓冲液种类的选择主要考虑其 pKa 值要与分析所用 pH 匹配，另外，有的缓冲液与样品组分之间有特殊的相互作用，可提高分析选择性。比如，分析多羟基化合物时，多用硼酸缓冲液，因为硼酸根可与羟基形成络合物，有利于提高分离效率。增大缓冲液的浓度一般可以改善分离，但电渗流会降低，因而延长了分析时间，过高的盐浓度还会增加焦耳热。缓冲液的 pH 主要影响电渗流的大小和被分析物的解离情况，进而影响被分析物的淌度，是 CZE 分析中最重要的操作参数之一。缓冲液添加剂多为有机试剂，如甲醇、乙腈、尿素、三乙胺等，其作用主要是增加样品在缓冲液中的溶解度，抑制样品组分在毛细管壁的吸附，改善峰形。提高分析电压有利于提高分离效率和缩短分析时间，但可能造成过大的焦耳热。温度的变化可以改变缓冲液的粘度，从而影响电渗流。毛细管内径越小，分离效率越高，但样品容量越低；增加毛细管长度可提高分离效率，但延长了分析时间。有时为了改善分离，要对毛细管内壁进行改性，比如采用涂层技术。

CZE 模式下，淌度的计算公式为：

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{l}{tE} = \frac{IL}{tV} \quad (\text{单位: } \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1})$$

其中， l 即被分析物质从进样口迁移到检测点所经过的距离，又称毛细管的有效长度； L 为毛细管总长度； V 为所施加的电压； t 为样品的保留时间。实验中可以采用一种中性化化合物，如二甲亚砜、丙酮或甲醇等，来单独测定电渗淌度，然后求得被分析物的表观淌度。

1983 年 Hjerten 首次将丙烯酰胺在 150 μm 的玻璃毛细管中聚合，以消除毛细管内壁对蛋白质的吸附，并利用这种方法对多种蛋白质进行了分离，发展了毛细管凝胶电泳 (capillary gel electrophoresis, CGE)。1984 年 Terabe 将 SDS 胶束引入毛细管电泳来分离中性组分，开创了毛细管电泳的重要分支：胶束电动毛细管色谱 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)。1985 年，Hjerten 和 Zhu 把传统的等电聚焦过程转移到毛细管内进行，发展了毛细管等电聚焦电泳 (Capillary isoelectric focusing electrophoresis, CIEF)，等电聚焦具有很高的分辨率，pH 相差 0.01 的物质便可能得到分离。近年来，将液相色谱的固定相引入毛细管电泳中，又发展了毛细管电色谱 (Capillary electrochromatography)，进一步扩大了电泳的应用范围。

截至目前，常见的电泳基本模式如下表所示。

表 1. 八种 CE 分离模式

分离模式	分离依据	说明
毛细管区带电泳 (CZE)	溶质在自由溶液中的淌度差异	毛细管内只填充缓冲液
胶束电动毛细管色谱 (MEKC)	溶质在胶束与水相间分配系数的差异	在 CZE 缓冲液中加入表面活性剂使成胶束
微乳液电动毛细管色谱 (EEKC)	溶质在小液滴与水相间分配系数的差异	使用水包油缓冲液体系
毛细管凝胶电泳 (CGE)	溶质分子大小与电荷/质量比差异	管内填充聚丙烯酰胺等凝胶
毛细管等电聚焦 (CIEF)	等电点差异	管内填充 pH 梯度的介质
毛细管等速电泳 (CITP)	溶质在电场梯度下的分布差异 (移动界面)	通常采用不连续 (自由溶液) 电泳介质

毛细管电色谱 (CEC)	电渗流驱动的色谱分离机制	毛细管内填充或者内壁涂有各种色谱固定相，其余同 CZE
--------------	--------------	-----------------------------

需要指出的是，关于毛细管电泳的分类并无严格规定，比如可以按照溶剂的性质分为水和非水毛细管电泳；按照毛细管数目的多寡，分为（单根）毛细管电泳和阵列毛细管电泳；按照在实验操作中是否加压，还有加压毛细管电色谱等。另外毛细管电泳还可以于质谱、核磁共振等等连用。

国内关于毛细管电泳的研究首先由竺安、林炳承等教授于上世纪八十年代开始，1993年，由中科院化学研究所和大连化学物理研究所共同组织，在北京召开了第一届全国毛细管电泳学术研讨会，此后，每两年举行一次。

CE 的检出灵敏度和精密度不及 HPLC，但 CE 具有如下优点。

(1) 高效：从理论上推得 CE 的理论塔板高度和溶质的扩散系数成正比，对扩散系数小的生物大分子而言，其柱效就要比 HPLC 高得多，每米理论塔板数为几十万，高者可达几百万乃至几千万，而 HPLC 一般为几千到几万。

(2) 高速：CE 用迁移时间取代 HPLC 中的保留时间，CE 的分析时间通常不超过 30 min，比 HPLC 所需的时间短；最快可在 60 s 内完成分离，例如有在 250 s 内分离 10 种蛋白质，1.7 min 内分离 19 种阳离子及 3 min 内分离 30 种阴离子的报道。

(3) 微量：CE 需要的样品量为纳升量级，而 HPLC 所需样品量为微升量级，仅为 HPLC 的千分之一。

(4) 操作模式多，分离方法开发容易：CE 只需要换毛细管内填充溶液的种类、浓度、酸度或添加剂等，就可用同一台仪器实现多种分离模式。

(5) 低消耗：CE 流动相用量一般一个工作日只需几毫升，而 HPLC 流动相则需几百毫升乃至更多。由于以上优点以及分离生物大分子的能力，使 CE 成为近年来发展最迅速的分离分析方法之一。

早期的毛细管电泳仪未曾商品化，都是各个实验室自己装配的。1989 年贝克曼库尔特公司（当时的贝克曼仪器）推出了第一套全自动化毛细管电泳系统 P/ACE™ 2000，随后安捷伦、刘梅克斯和通微技术股份有限公司等相继推出了自己的产品。最近，北京彩陆科学仪器有限公司推出了国产化的系列毛细管电泳仪。

CE 最基本的仪器包括高压直流电源(0~±30kV)、毛细管（有熔融石英、玻璃和聚四氟乙烯等各种材质）和检测器（目前主要有紫外-可见光度、激光诱导荧光、电化学和质谱检测器等）。本实验采用 50 μm 内径的熔融石英毛细管和紫外-可见光度监测器。

毛细管电泳在生命科学、药物、食品化学、环境化学等领域都有广泛的应用，可以用来分离有机化合物、无机离子、蛋白质、氨基酸等等。本实验选择有机小分子和无机阴离子为检测对象。

阴离子 (Cl⁻、Br⁻、CO₃²⁻ 等) 对紫外光几乎没有吸收能力，因此需要使用间接紫外检测法检出这些离子。在实验中选用对紫外光具有较强吸收能力的 CrO₄²⁻ 作为缓冲剂，一方面是因为铬酸根可提供强紫外吸收背景，当没有紫外吸收能力的待测离子取代了带有相同电荷的铬酸根时，就会相应地检测到一个倒峰；另一方面是因为其淌度与待测离子的淌度接近，因而可得到比较对称的电泳峰。

用毛细管电泳分离阴离子时，若采用正极进样、负极端检测时，电渗流方向与阴离子运动方向相反，致使一些电泳淌度大的阴离子无法达到检测端。为了解决这个问题，在缓冲溶液中加入少量的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 作为电渗流改性剂，通过 CTAB 在毛细管上的吸附，使原本由正极流向负极的电渗流的方向变为由负极流向正极，这样可以提高分析速度，并得到较好的峰形。阴离子的实际淌度通常不受缓冲溶液的 pH 值和电渗流改性剂浓度的影响，但其大小与缓冲溶液离子强度有关。

三. 仪器和试剂

仪器：CL1020 高效毛细管电泳仪，配有正负可调稳压电源（北京彩陆科学仪器有限公司）
石英毛细管（50 μm i.d., 360 μm o.d., 有效长度 41 cm 实际长度 50 cm; 河北永年锐沣色谱
器件有限公司）

1 mL、100 μL 移液器

试剂：

0.1 mol/L NaOH 溶液、0.1 mol/L HCl 溶液

步骤（一）所用试剂：

0.02 mol/L NaH_2PO_4 、0.02 mol/L Na_2HPO_4 ; 学生需按照下表配制不同 pH 值的缓冲液。

pH	5.9	6.4	6.9	7.4	7.9
0.2 mol/L Na_2HPO_4 (mL)	10.0	26.5	55.0	81.0	93.0
0.2 mol/L NaH_2PO_4 (mL)	90.0	73.5	45.0	19.0	7.0

1 mg/mL 邻硝基苯酚、1 mg/mL 间硝基苯酚、1 mg/mL 对硝基苯酚

步骤（二）所用试剂：

缓冲溶液：含 20 mmol/L 硼砂、20 mmol/L 铬酸钾和 0.1 mmol/L CTAB

0.5 mol/L 的 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 储备液

待测样品：自来水、矿泉水等

四. 实验步骤

（一）有机化合物的毛细管区带电泳（CZE）定性分析

- 打开电脑及 HW-3000 软件，打开监测器开关、柱箱风扇开关和高压电源开关；设定检测波长为 254 nm。分离电压 20 kV（正极进样）。
- 在每次分离之前，分别用 0.1 M NaOH、蒸馏水、0.1 M HCl、蒸馏水清洗毛细管 2 min，再用分离缓冲液平衡毛细管 5 min；冲洗过程中毛细管出口对准废液瓶。
- 用 pH 7.9 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液做电泳缓冲液，分别对邻硝基苯酚、间硝基苯酚和对硝基苯酚进样分析，进样时间：5 s（重力进样），确定各组分的保留时间。
- 配制并分析混合样。
- 依次改变分离电压为 10、15、20、25 kV，考察分离电压的改变对保留时间的影响。
- 分离电压 20 kV 的条件下，依次改变电泳缓冲液的 pH 值为 5.9、6.4、6.9、7.4、7.9，考察 pH 值对保留时间的影响。（注：**酸形无色**）

（二）无机阴离子的毛细管电泳分析（间接紫外检测法）

- 打开电脑及 HW-3000 软件，打开监测器开关、柱箱风扇开关和高压电源开关；设定检测波长为 254 nm。分离电压 20 kV（负极进样）。
- 在每次分离之前，分别用 0.1 M NaOH、蒸馏水、0.1 M HCl、蒸馏水清洗毛细管 2 min，再用分离缓冲液平衡毛细管 5 min；冲洗过程中毛细管出口对准废液瓶。
- 分别移取储备液 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mL 至 50 mL 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，配得各离子浓度分别为 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 mmol/L 的系列标准液，用于测定标准曲线。（**需要内标物质，如何解决？**）
- 用 20 mmol/L 硼砂（含 20 mmol/L 铬酸钾和 0.1 mmol/L CTAB）做电泳缓冲液，分别对系列标准液进样分析，进样时间：5 s（重力进样），确定各组分的保留时间，并绘制标准曲线。
- 取自来水样进行分析。

五、数据处理

- 记录毛细管电泳的操作条件。包括：仪器型号、检测器类型、柱类型、柱长、分离电压、保留时间等。
- 绘制 pH 值对邻硝基苯酚、间硝基苯酚和对硝基苯酚有效淌度的影响曲线。
- 绘制 Cl^- 、 Br^- 、 CO_3^{2-} 等离子的标准曲线，求出自来水中离子的浓度。

六、附录

（一）仪器使用的注意事项：

1. 高压电源：首先根据实验要求选择正极或负极进样，在电源后插座线上选择相应的插槽并选择相应电机按钮，开启电源之后右上角会亮起正极或负极的灯，表示相应的电极可以进样工作。之后设置相应电压条件，选择一个“组次”，设定相应的电压、时间和最大电流量，设置好按下“确定”。按下“选择”，选择刚才设置好的“组次”，电压准备就绪。
2. 毛细管电泳检测池：打开仓门，可以看到内部的样品池和紫外检测区。先打开仓门下部的风扇，尽量驱散毛细管安培热的影响。在注射器内加入 NaOH 溶液或者缓冲液，用注射的方法可以清洗毛细管。高压检测时要注意使电极和毛细管深入缓冲液面以下。虹吸进样的样品槽在里面的支架上。只有关闭仓门，高压电源才可以正常工作。
3. 紫外检测器：开机需要预热，主要用到的功能是选择紫外检测器的波长，按“WL”键选择相应的波长，按“ENTER”。注意每次重新开机，波长都会回到初始值 254 nm。
4. 色谱工作站软件 HW-2000：打开数据采集器的开关，之后打开色谱工作站软件 HW-2000(通用版)。当高压电源打开之后，一般忽略开始的 10 s，之后运行软件，可以按下连接在数据采集器上的绿色按钮，也可以在色谱工作站软件界面中点击绿色开始按钮。随着电泳曲线的出现，出现了全部的峰后，直到基线走平没有残留物质，则可以停止检测、关闭高压。
5. 进出口端装有缓冲液的试剂瓶中液面要求平齐，避免给分析带来人为的液压差。
6. 实验结束后，用去离子水清洗毛细管 5 min，再用空气冲洗 5 min，以免残留的缓冲液堵塞毛细管。

（二）可能遇到的问题：

- a. 电流显示过小。往往电流显示小于 10 μ A，就很可能是毛细管内部堵塞，这样就需要重新用 0.1 mol/L NaOH 溶液等清洗毛细管。注意这些问题的出现，往往和实验结束没有用 NaOH 溶液洗涤毛细管或者进样液体没有充分过滤有关，注意相关操作。
- b. 更换毛细管。首先要将新管子开窗，以便于紫外检测。开窗方法如下：用标尺选定毛细管的有效长度，划个简单的记号，然后在记号处用火焰小心烧一下，然后用纸巾擦拭表面，这样毛细管的窗口处就变成无色透明。然后将毛细管小心伸入紫外检测器的零件中，对光观察是否毛细管窗口处正好对准检测器的透光口，对准之后安装好仪器就可以使用了。

七、思考题

- 1、根据邻硝基苯酚、间硝基苯酚和对硝基苯酚的酸碱解离常数，解释其出峰次序。
- 2、简述毛细管电泳与高效液相色谱的特点和应用范围。
- 3、毛细管电泳如需分离蛋白质类样品，试预测将会面临什么问题，试提出解决方案。

参考资料

- [1] Jorgenson J.W., Lukacs K.D., *Anal. Chem.*, 1981, 53: 1298.
- [2] Hjerten S., *J. Chromatogr.*, 1983, 270:1-6
- [3] Terabe,S., Tsuka, K., Ichikawa, K., et al., *Anal. Chem.*, 1984, 56(1): 111-113.
- [4] Hjerten S., Zhu M. D., *J. Chromatogr.*, 1985, 346: 265-270
- [5] 陈义，《毛细管电泳技术及应用(第二版)》，北京：化学工业出版社，2006.
- [6] 张祥民，《现代色谱分析》，上海：复旦大学出版社，2004.
- [7] 陈培榕，李景虹，邓勃，《现代仪器分析实验与技术(第二版)》，北京：清华大学出版社，2006.
- [8] 卢鹏，学士论文，高效毛细管电泳的教学实验设计，上海：复旦大学，2009.

实验仍在完善中，请大家多提宝贵意见，谢谢！

雷杰

20100205