

厦门大学



高等仪器分析

色谱与分离科学

主讲: 张博

bozhang@xmu.edu.cn

0592-2188691, 15960817368

化学楼554房间

高等仪器分析

高效毛细管电泳

电泳与电泳分析

在外加电场作用下，带正电的化合物分子向电场负极移动，带负电的化合物分子向电场正极移动。利用这种现象对物质进行分离分析和性质研究的技术称之为**电泳技术**。

生命大分子如蛋白质、核酸、多糖等常以颗粒分散在溶液中，它们的净电荷取决于介质的pH或与其他大分子的相互作用。**电泳法大量地用于生物、生化样品中带电荷组分的分离分析。**

毛细管电泳（CE），又称**高效毛细管电泳（HPCE）**，统指以高压电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据样品中个组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术。

高效毛细管电泳是在经典电泳分离法于**20世纪、九十年代**快速发展起来的新技术。

毛细管电泳发展简史

电泳起源于1900s初

Arne Tiselius于1937年通过移界电泳技术分离几种血清蛋白质，标志着电泳成为一种分离分析技术。

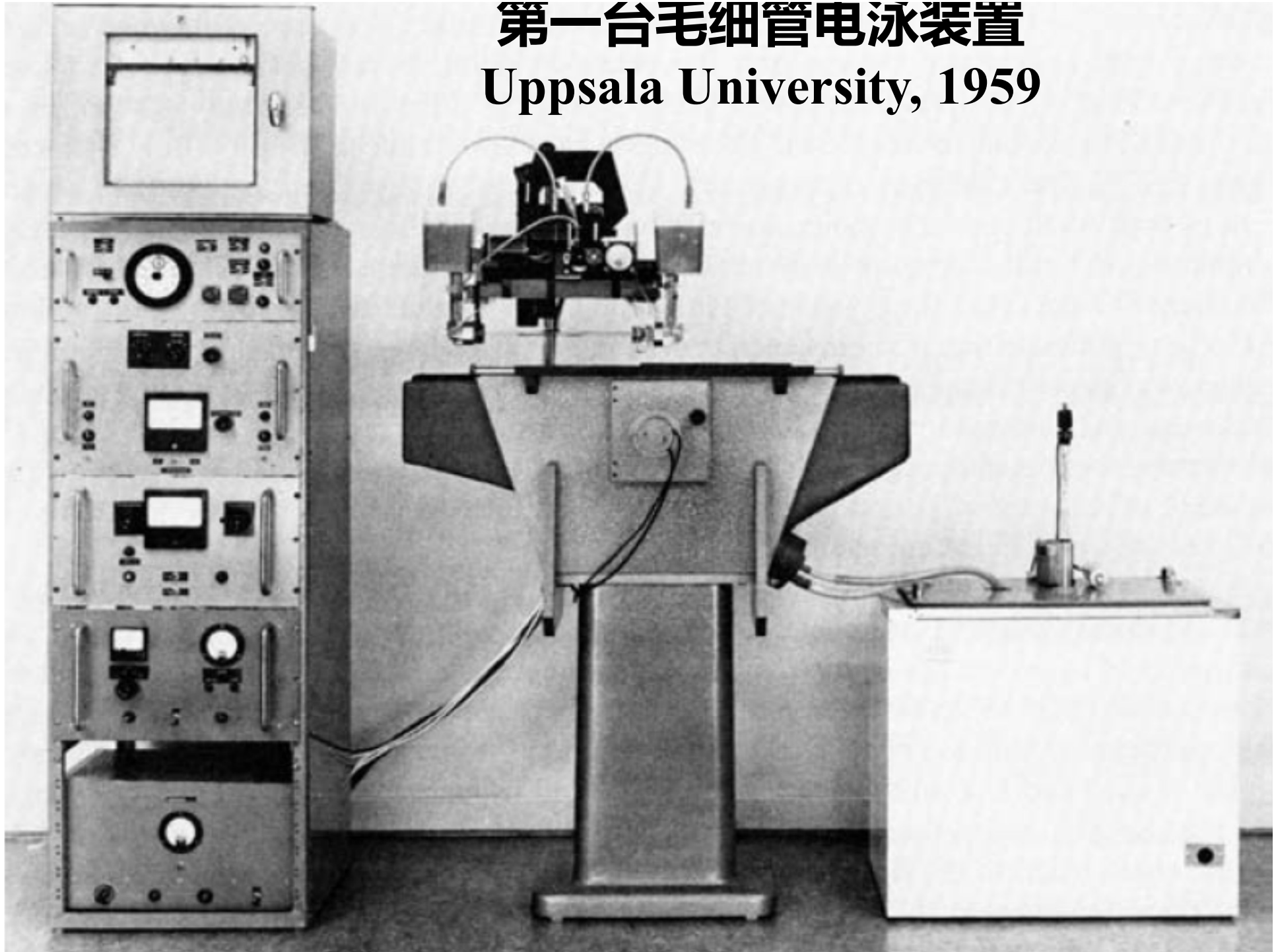
Stellan Hjerten于1967年建立了第一台“毛细管（3mm i.d.）”电泳装置并进行了最初的实验。

James Jorgenson于1981年报道了真正的毛细管电泳以及生物分子的高效分离。



第一台毛细管电泳装置

Uppsala University, 1959





UPPSALA
UNIVERSITET

Research
Search Research



På svenska | Map | Staff Department Web
Listen |

[Startpage](#) | [Education](#) | [Research](#) | [Cooperation](#) | [About UU](#) | [Contact](#)

Separation Science

A condition for the determination of the structure and function of a given substance is that it is pure, i.e., not contaminated by other components. If the sample is not pure the parameters mentioned will represent the properties of the mixture and will not be interpretable. The development of new, efficient techniques to separate different types of substances is, accordingly, a research area of high priority, in which Uppsala University, since the days of The Svedberg and Arne Tiselius (both Nobel laureates in Chemistry), has played an internationally important role. As a "fresh" example it may be mentioned that several of the methods developed at Uppsala Separation School were a prerequisite for the successful completion of the Human Genome Project.

Particularly within life sciences there is a great need for efficient and rapid separation methods on both the analytical and preparative scale in order to solve many intricate problems in basic as well as applied research. For instance, the development of a new drug requires laboratories equipped with apparatus based on the latest achievements in the field of separation science. A general trend within this field is to develop microtechniques permitting analysis of extremely small amounts of material (below 0.000001 gram) in a short time (less than one minute) and with extremely high resolution. These analyses are often performed in (quartz) capillaries with inside diameters in the range 0.025-0.3 mm or in microchips with still narrower channels. A rational development of these microtechniques requires close cooperation among several research groups within the Faculty, as does the teaching in this important field.

The separations can be based on

- (1) Electrophoresis (the sample substances migrate in an electrical field; the positively charged substances migrate toward the negative pole and the negatively charged toward the positive pole; the higher the charge, the higher the migration velocity).
- (2) Chromatography (the substances are pumped through a tube filled with a solid phase, such as beads, onto which they become adsorbed; The stronger (weaker) they bind, the later (earlier) they will leave the column tube. By affinity methods, for instance the recently introduced artificial antibodies in the form of gel particles, a given protein, virus or bacterium can be "fished out" selectively from a mixture consisting of a great number of different substances.

Jorgenson获得的首张高效毛细管电泳图

1300 • ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 53, NO. 8, JULY 1981

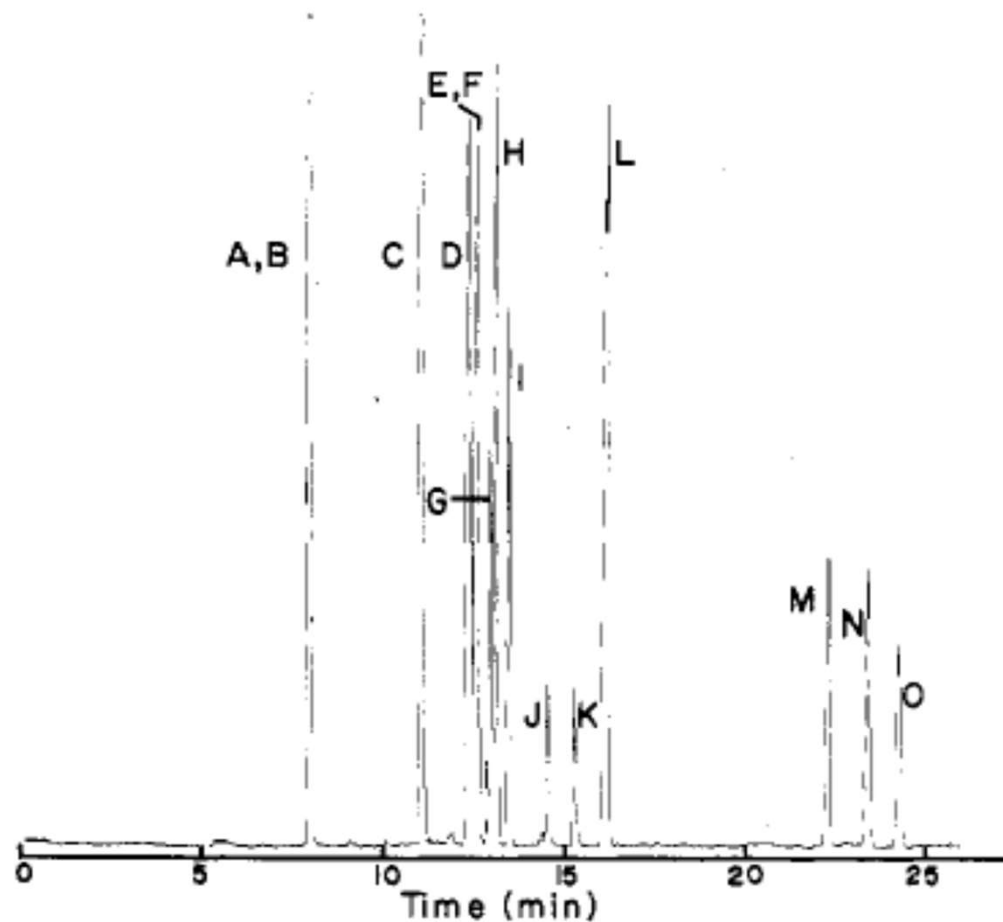


Figure 1. Zone electrophoretic separation of dansyl amino acids:

采用75 μm (Pyrex) 玻璃毛细管做CZE, 利用电迁移进样和在线荧光检测, 在30kV电压下分离丹酰化氨基酸样品, 获得400,000塔板/米的高柱效。

预言: 毛细管电泳技术会为大分子的分离分析带来巨大而深刻的变化, 具有潜在的应用前景。

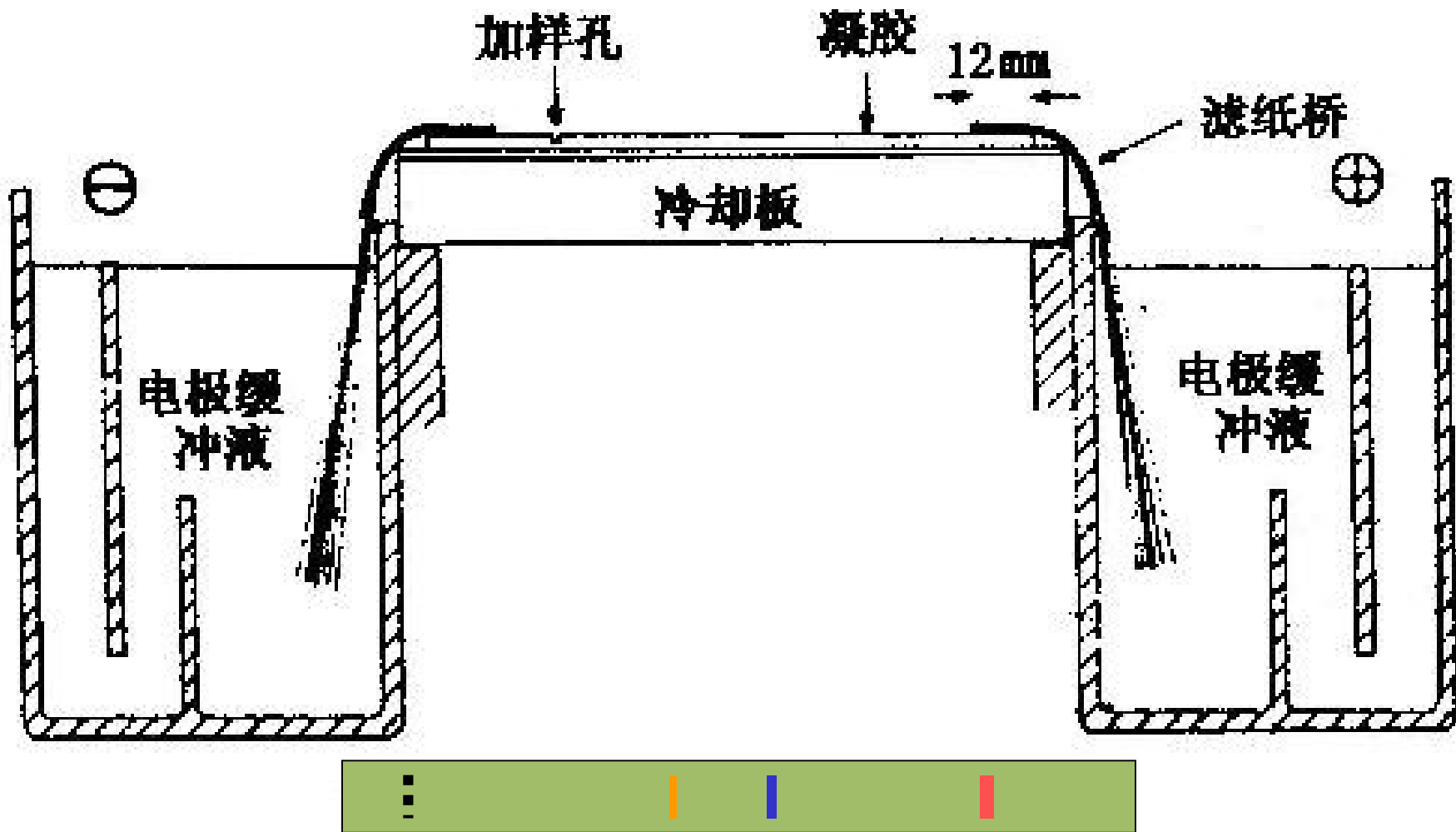


图4.12 使用滤纸桥的水平电泳

早在一百多年以前，人们就开始进行电泳实验。在一个盛有溶液的U型管中，在两端电极加上几百伏电压后，实现了对毒素和抗毒素的分离。后来，为了防止电泳完成后的溶液，再次发生对流混合，进一步采用各种稳定介质，如琼脂、纤维粉、玻璃丝、硅胶和聚丙烯酰胺等进行电泳分离。

为什么毛细管电泳：经典平板胶电泳的缺点

经典平板电泳：

分离速度与分离柱效：低

焦耳热：低电场

人工操作：

制胶、上样、电泳分离、染色等
重现性

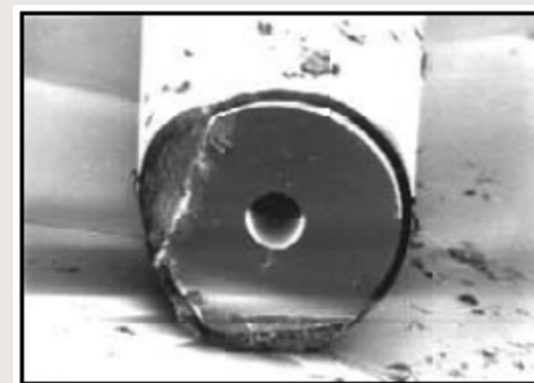
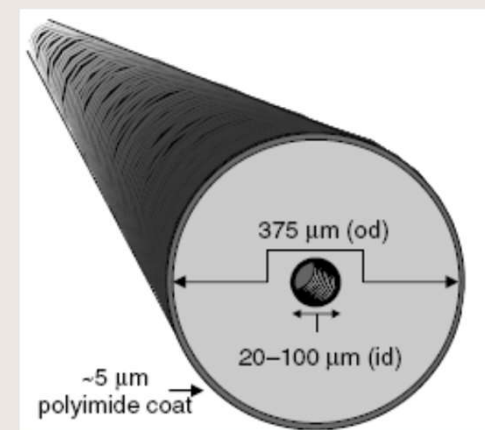
毛细管电泳

内径：20–100 μm (375 μm 外径)

长度：20–100 cm

外部涂层：聚酰亚胺

高比表面积有利于散热，可以使用高电压（30千伏）



毛细管相对于平板胶的优势：比表面积

TABLE 1.1

A Comparison of Surface-to-Volume Ratios for an Analytical Slab Gel and a 57 cm Capillary Having a Varied Internal Diameter

| | Surface Area (mm ²) | Volume (μL) | Surface-to-Volume Ratio |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------------|
| Slab gel (14 × 11.5 × 0.15 cm) | 32,200 | 24,150 | 1.3 |
| 20 mm i.d. capillary | 35.81 | 0.179 | 200 |
| 50 mm i.d. capillary | 89.53 | 1.119 | 80 |
| 75 mm i.d. capillary | 134.3 | 2.518 | 53 |
| 100 mm i.d. capillary | 179.1 | 4.477 | 40 |
| 200 mm i.d. capillary | 258.1 | 17.907 | 20 |

平板胶电场≈15–40 V/cm

毛细管柱电场： 800 V/cm

可施加电压： 30,000 V

毛细管电泳的其它优势

溶剂消耗量：极低（微升级）

样品需求量：极低（纳升级）

分析速度：几秒-几分钟

分析自动化，高重现性

90年代毛细管电泳的大发展

三个关键因素：

高灵敏度的检测器

自动化的仪器

高质量的细内径毛细管

商品化仪器的出现：

Beckman Coulter MDQ CE

Hewlett Packard/Agilent HP3D

Waters Quanta CE

Thermo...

各种相关技术不断涌现：

毛细管涂层技术，胶束电动色谱，毛细管等电聚焦，毛细管凝胶电泳，无胶筛分，二维毛细管电泳



毛细管电泳家族

Modes Used for Analysis of Various Classes of Analytes

| CZE | MEKC | CEC | CIEF | CGE |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------|---------------|
| Ions | Small molecules | Small molecules | Peptides | Nucleic acids |
| Small molecules | Peptides | Peptides | Proteins | |
| Peptides | | Proteins | | |
| Proteins | | Carbohydrates | | |
| Carbohydrates | | | | |

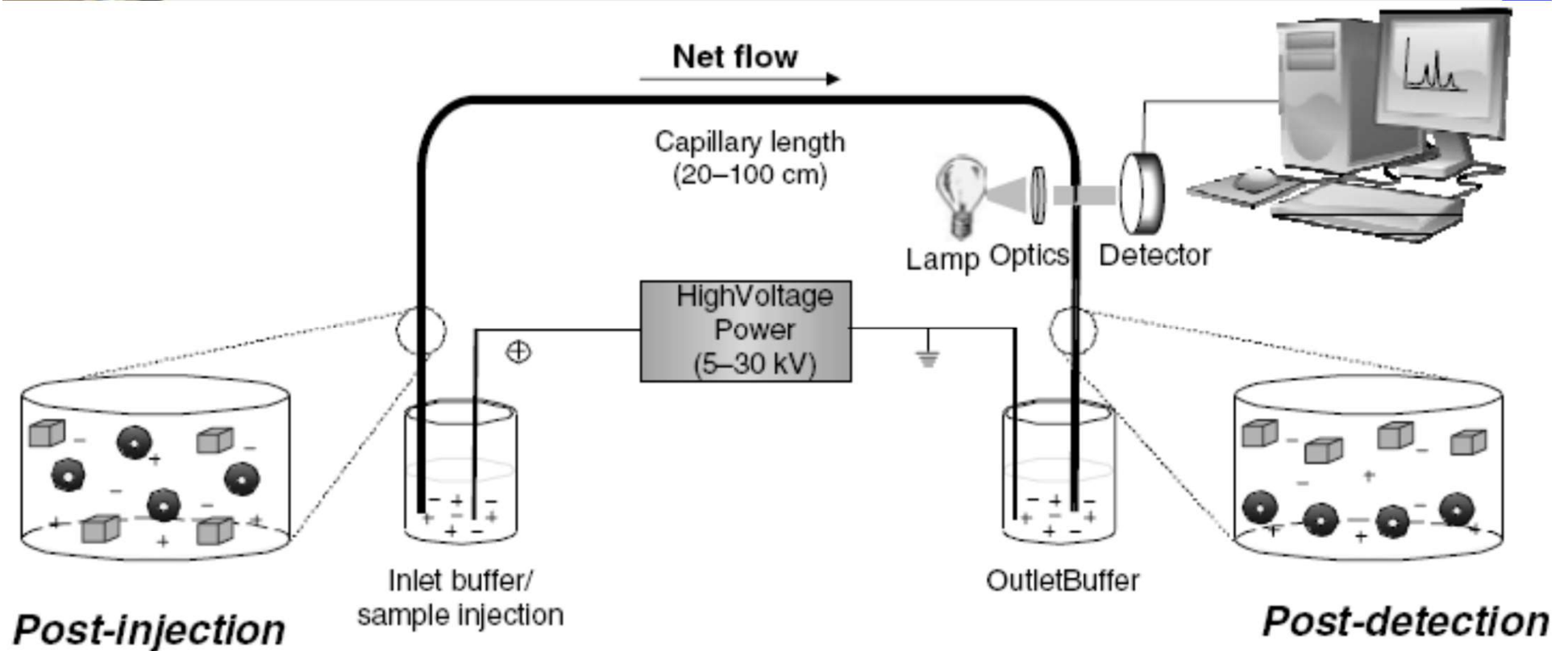
CZE: 最简单、最常用

加入表面活性剂: MEKC

加入两性电解质: CIEF

加入筛分胶: CGE

毛细管电泳仪器与运行

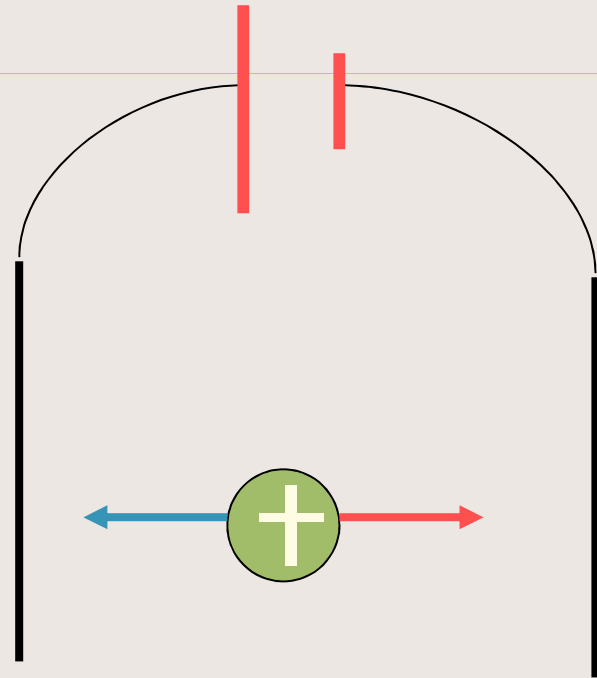


恒温系统：液冷体系（Beckman Coulter），气冷体系（Agilent）。
加压系统：空气泵1-100 psi（Beckman Coulter），外挂（N₂）气体钢瓶1-12 bar（Agilent）。
电泳的“正向”（Normal Polarity）：入口端（+），出口端（-）。

基本电泳理论

一、电泳与淌度

在外加电场中，带电质点受到的电场力作用，会沿着支持介质向相反电性的电极方向移动。在很稀的溶液中，带电质点所受的电场力等于所带净电荷与电场强度的乘积：



$$F_{\text{电场力}} = E \cdot q$$

在泳动过程中，带电质点会受到一个相反方向的摩擦力：

$$F_{\text{摩擦力}} = v \cdot f$$

对于小的球型质点，摩擦系数为：

$$f = -6\pi\eta r$$

当电泳达到平衡 ($<10^{-11}\text{s}$) 时，质点的泳动速度是恒定的：

$$F_{\text{电场力}} = -F_{\text{摩擦力}}$$

$$E \cdot q = 6\pi\eta r v$$

迁移速度为：

$$v = \frac{E \cdot q}{6\pi\eta r}$$

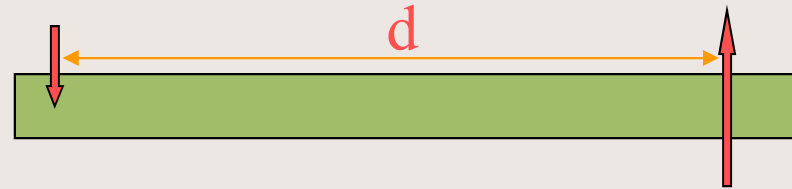
在电泳技术中，带电物质在电场中的移动行为常以迁移率或淌度（**mobility**）表示，电泳淌度定义为单位电场强度下带电质点的迁移速度：

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

通过实验可以测定 μ ：

式中， d 为带电质点迁移的距离 (cm)， L 为支持物具有的有效长度 (cm)， t 为通电时间(s)， V 为施加在支持物两端的实际电压 (V)。

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{t}{\frac{L}{V}} = \frac{d \cdot L}{V \cdot t}$$



影响电泳大小的因素

$$v = \frac{E \cdot q}{6\pi\eta r}$$

● 带电质点的性质：带电质点的直径、形状以及所带的净电荷量对泳动速度有较大的影响。一般的说，净电荷量大，分子半径小和越接近球形，其淌度越大。

● 电场强度：又称电位梯度。电场强度越高，电泳速度越快，分离时间越短。

◆ 常规电泳：**< 500V**，**E为2~10V/cm**

◆ 毛细管电泳：**10 ~ 40 kV**，**E为20 ~ 200V/cm**

• 溶液性质

pH值：决定物质的离解程度，即溶质所带的净电荷量。

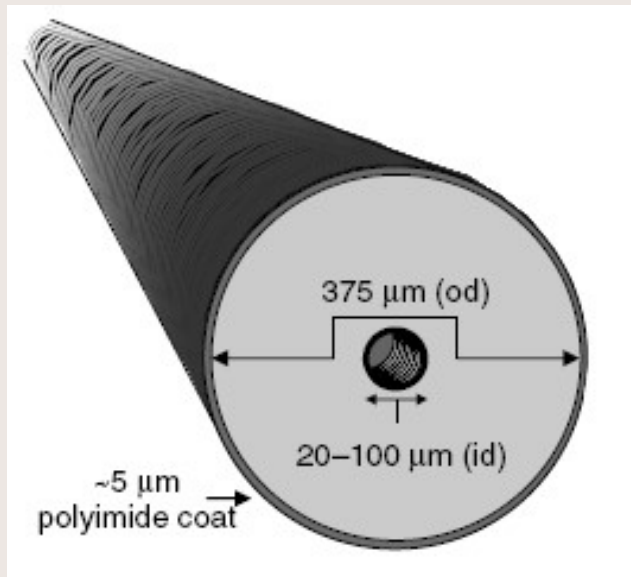
在电泳实验中，不仅要使用缓冲溶液保持稳定介质的pH，而且要根据样品性质，控制合适的pH值。例如蛋白质或氨基酸往往有一等电点，这时它们的静电荷为零。pH越远离pI，它们的静电荷越大。

离子强度：一般控制在0.02-0.2之间。离子强度越大，泳动速度越慢。若离子强度过低，则缓冲能力差，往往会因为溶液pH值变化而影响泳动的速度。

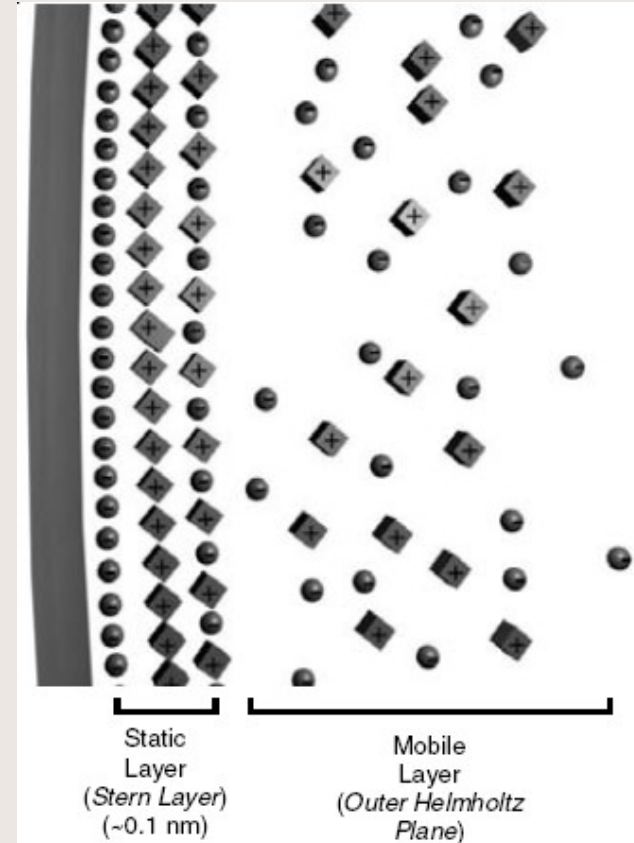
溶液粘度：淌度与粘度成反比

电渗流 (Electroosmotic flow, EOF)

Late 1800s, Helmholtz进行了最初的研究
玻璃管中电解液在电场下发生定向移动
电渗流是毛细管电泳中最重要和最基本的现象之一



pKa range (4–6) 硅醇键
双电层：致密层, 扩散层
定向液流：电渗流的“泵”效应



EOF在CE分离中具有重要的意义

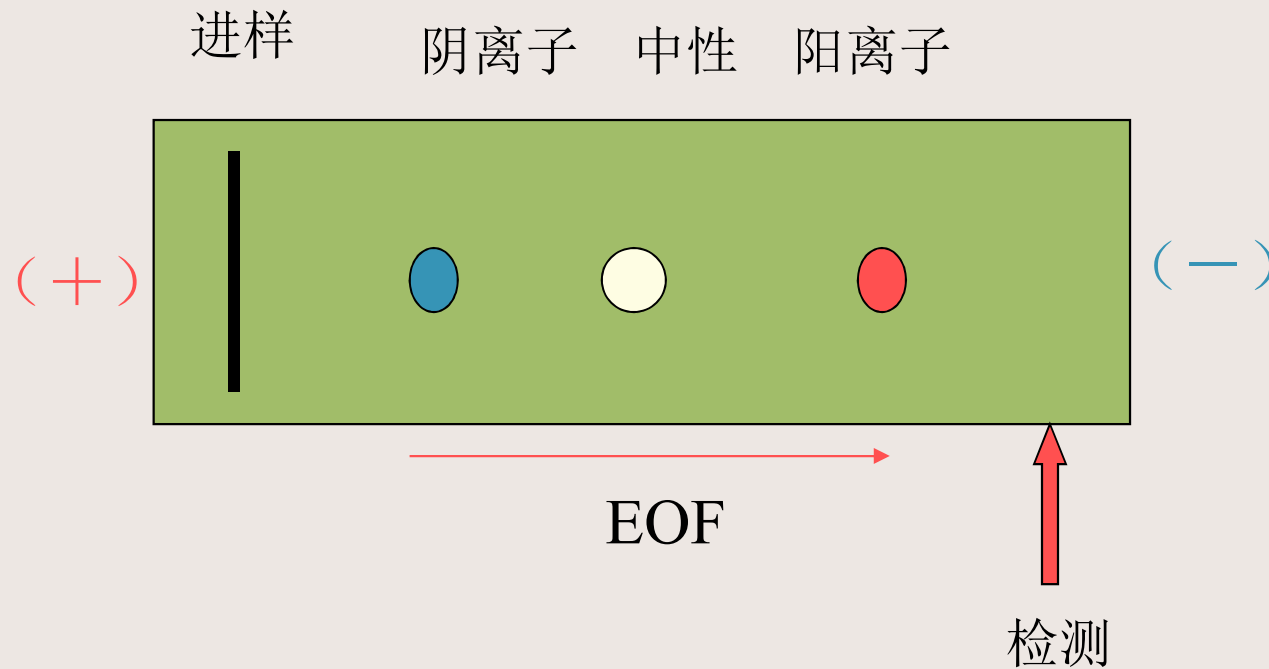
在多数水溶液情况下，EOF速度比电泳速度快5~7倍。因此，CE可进行正、负离子和中性化合物的同时分离。注意此时的中性化合物总是与电渗流同速，但中性化合物之间不能分离（加入胶束、固定相等可以使中性化合物迁移发生变化，从而产生分离）。

在一般情况下，玻璃类毛细管内壁表面常带负电荷，电渗流方向朝向负极。电性物质在毛细管中的迁移速度：

$$v^+ = v_{eo} + v_{ep}$$

$$v = v_{eo}$$

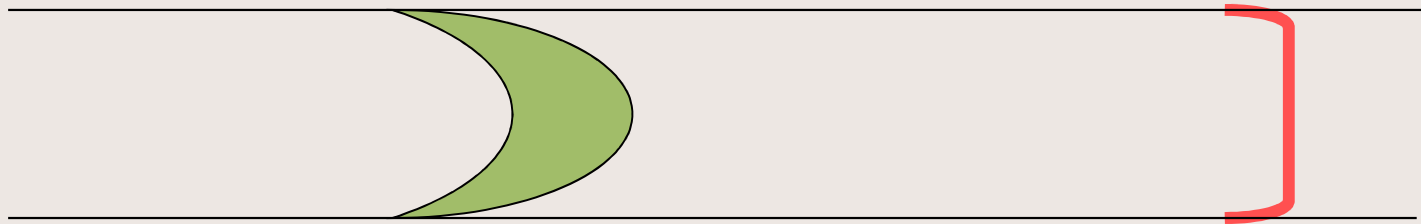
$$v^- = v_{eo} - v_{ep}$$



EOF的高效性

压力流

电渗流



抛物线状的层流

扁平流或称塞流

电渗流速度

毛细管内的电渗流的线速度为：

$$v_{EO} = \mu_{EO} \cdot E = \frac{\varepsilon \xi}{\eta} \cdot E$$

式中， μ_{EO} 是电渗迁移率，即在单位电场强度下，电渗流的线速度。Zeta电位可表示为：

$$\xi = 4\pi\delta\rho / \varepsilon$$

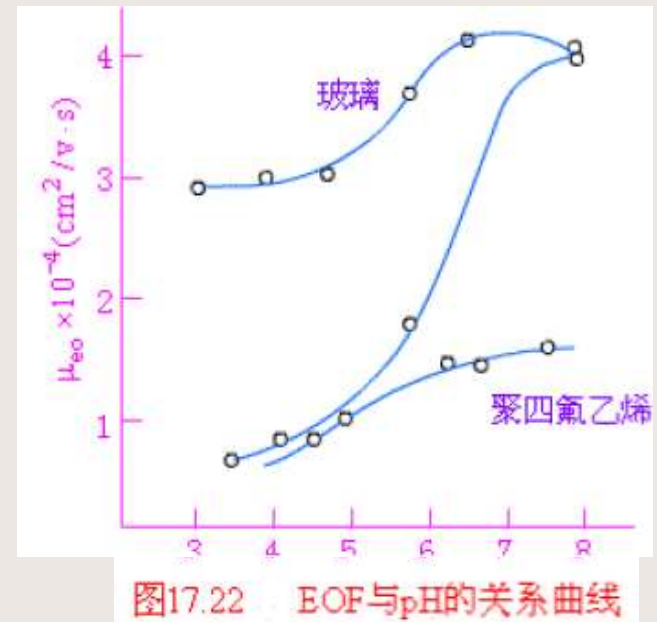
式中， ρ 是毛细管表面电荷密度， δ 为双电层厚度。按电化学理论， δ 等于 $1/K$ ，因此有

$$\xi = 4\pi\rho / K \cdot \varepsilon \propto 1 / \sqrt{I}$$

式中， K 为德拜-休格尔常数； I 为溶液的离子强度。由此可见，增大电解质的离子强度，将降低Zeta电位和电渗流。

影响电渗流的因素

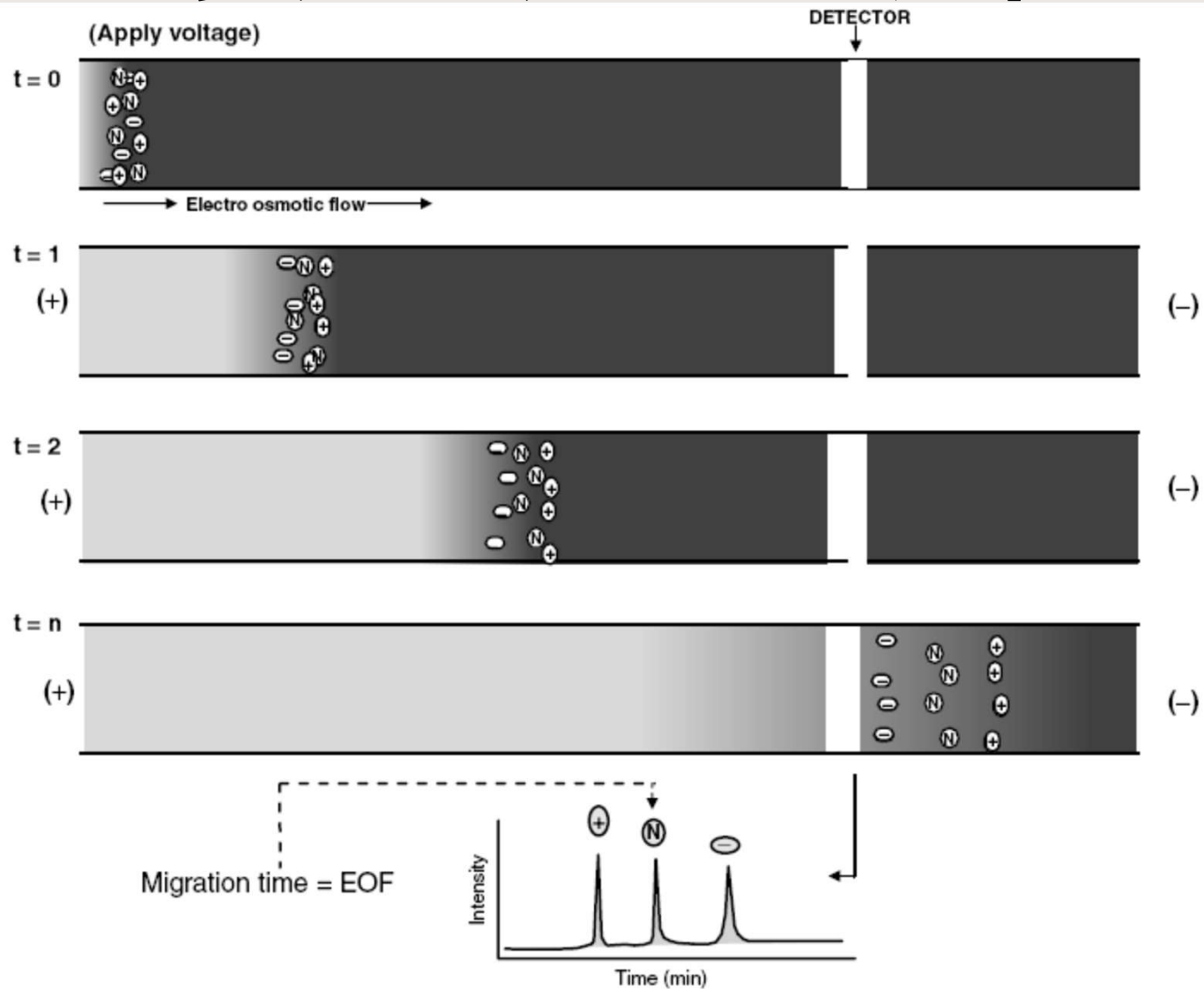
- (1) 电场强度
- (2) 毛细管材料
- (3) 溶液的pH: 影响毛细管壁的电荷特性, 进而影响电动电位、电渗流大小。
- (4) 电解质溶液成分与浓度
- (5) 添加剂
- (6) 温度



电渗流的控制

- 对毛细管内壁进行适当的化学修饰，以减少管壁对溶质的吸附；
- 调节缓冲液的pH值及缓冲液浓度。降低缓冲液浓度可降低电流强度，减少管内溶液的温差；
- 加入表面活性剂或手性试剂（如环糊精）；
- 加入适量的有机溶剂以降低电渗速度。

电渗流驱动的电泳过程



电渗流的特点

分析物的迁移：电泳+电渗 $v_i = \mu_{app} E = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E$

CE的电渗泵与HPLC的高压机械泵对比，

EOF驱动液流简单

EOF对实验条件敏感，如pH。

对分离的影响：正电，中性，负电

EOF标志物

中性标志物 (Neutral marker)

dimethyl formamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO)

带电标志物 (Frontal marker)

毛细管电泳中的一个经典问题：如何控制电渗流？

电泳分离柱效

理论塔板数

$$N = 5.54(L/w_{1/2})^2$$

峰展宽的因素

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{diff}^2 + \sigma_T^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{wall}^2$$

焦耳热

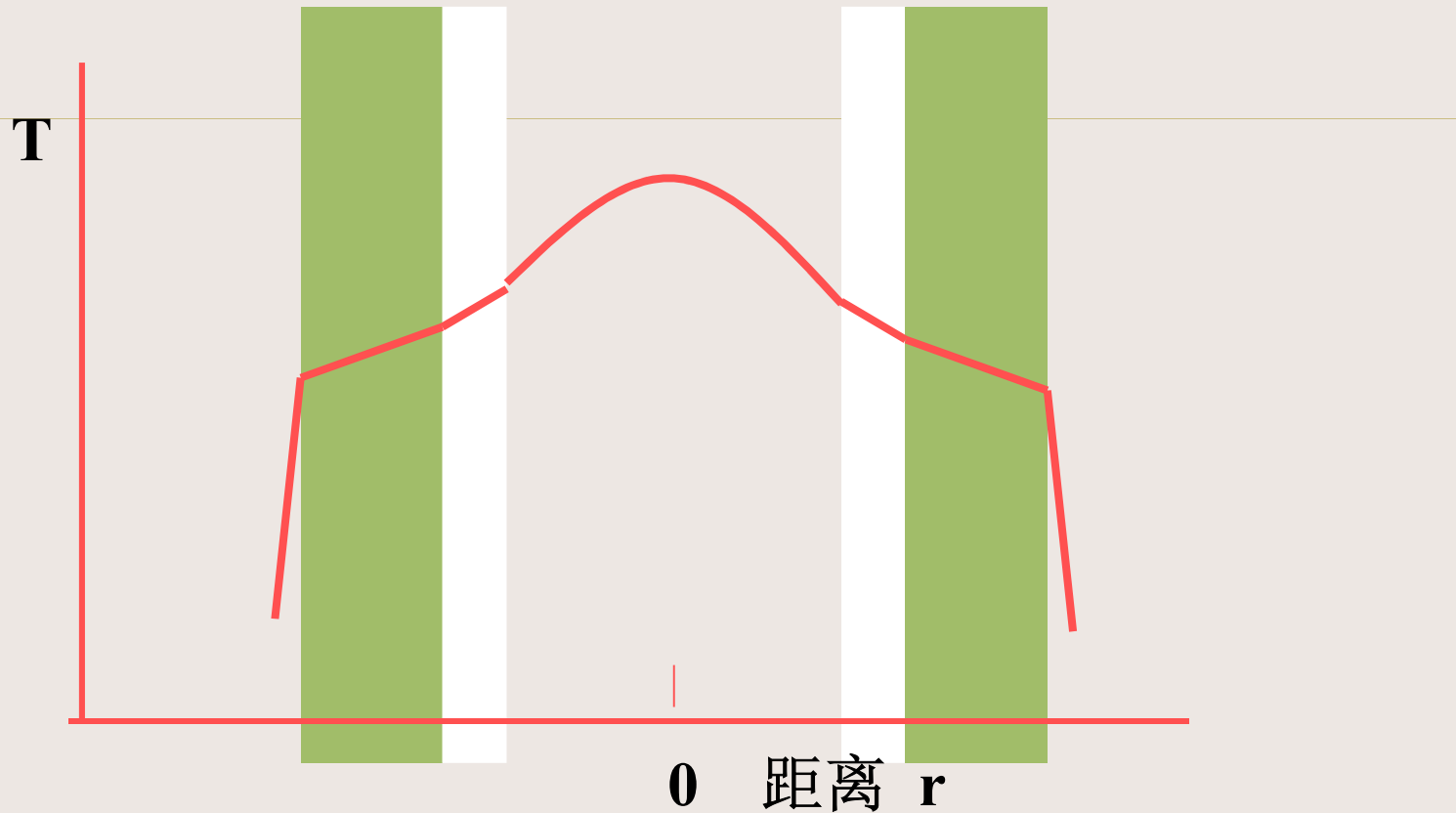
因电流通过而产生的热称为焦耳热。在电泳实验中，焦耳热会引起分离系统温度的变化，降低分辨率。电泳过程的焦耳热为：

$$Q = \frac{VI}{\pi r^2 L} = \lambda C_b E^2$$

0.5 ~ 5W/m； 径向温度梯度

在电泳实验中，焦耳热是影响分离效率和分离速度的主要因素之一。焦耳热与外加电压，毛细管内径和缓冲液浓度有关。采用细毛细管可以降低焦耳热，同时缩短传惹路径，增加散热面积。加上一定的冷却技术，使得毛细管电泳的焦耳热影响大大降低，为高效分离创造必要的条件。

毛细管电泳过程中焦耳热-温度曲线



焦耳热的“危害”（温度效应）

● 分离度 ● 数据重现性

CE需要好的恒温（冷却）装置

毛细管的准备

毛细管的切割：瓷片，专业切管器，玻璃片

检测窗口的制备：直接烧除，热酸或热碱溶去，透明毛细管

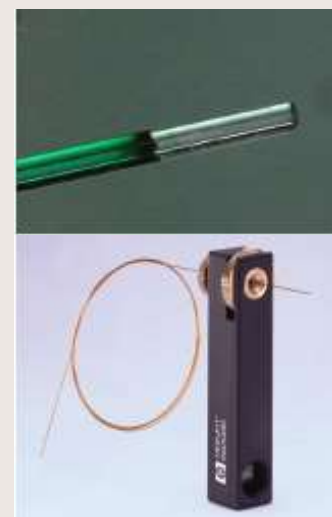
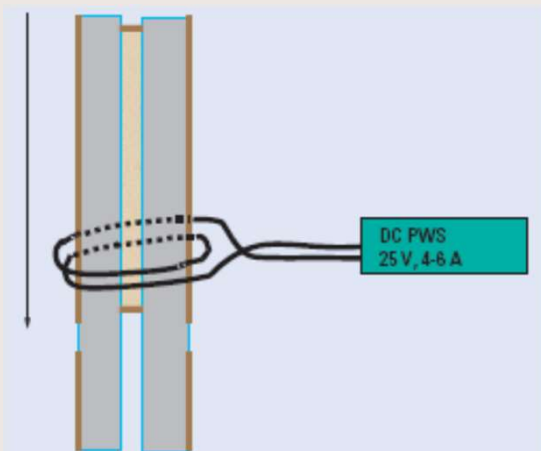
注意：窗口处非常脆，易折断！！

预平衡：**0.1M NaOH, H₂O**, 电泳缓冲液

电平衡：电泳缓冲液+电场

商品化毛细管：疏水涂层，亲水涂层

毛细管内壁改性剂：动态改性，非永久性预涂



毛细管电泳方法建立策略

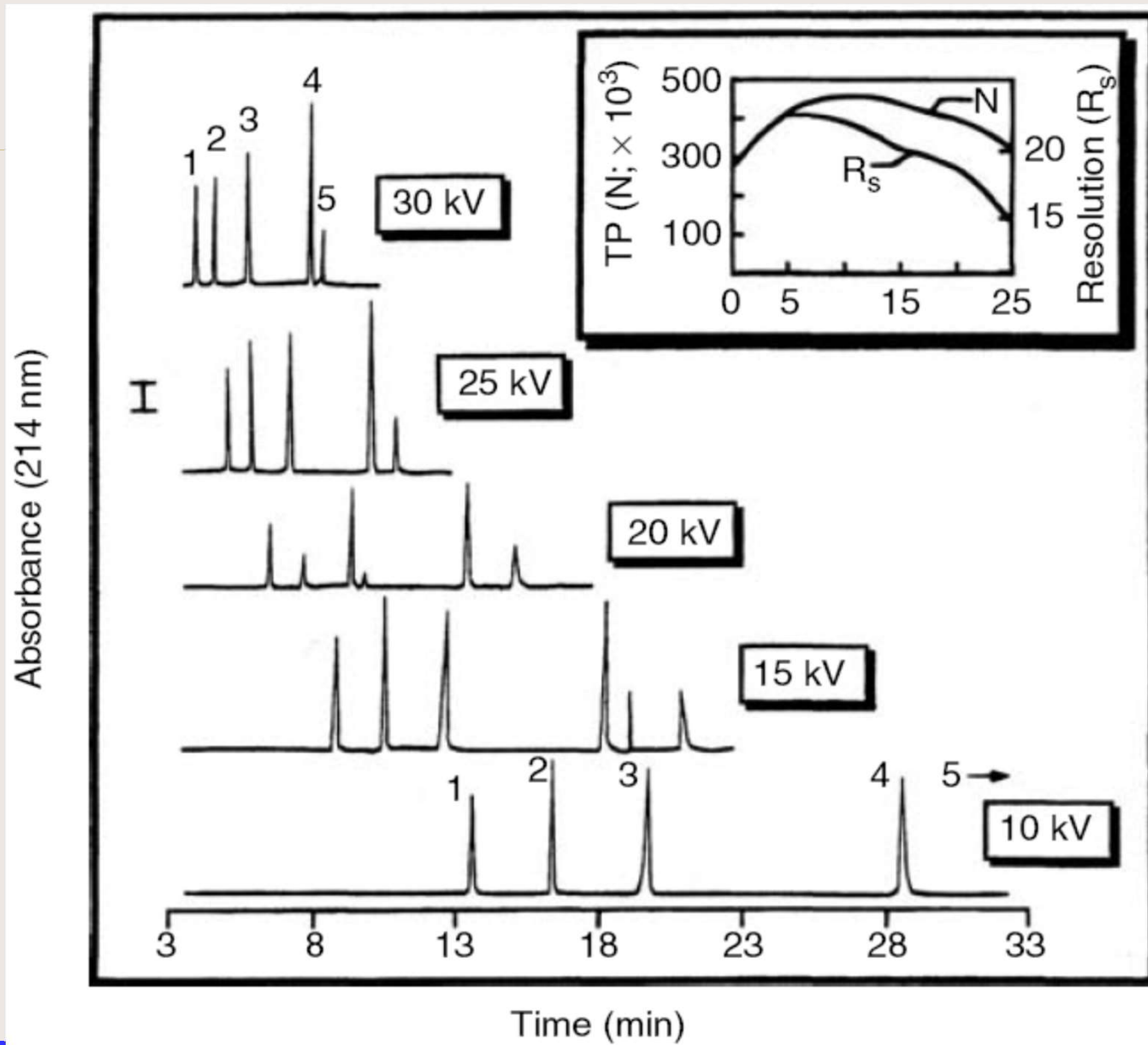


毛细管电泳常用添加剂

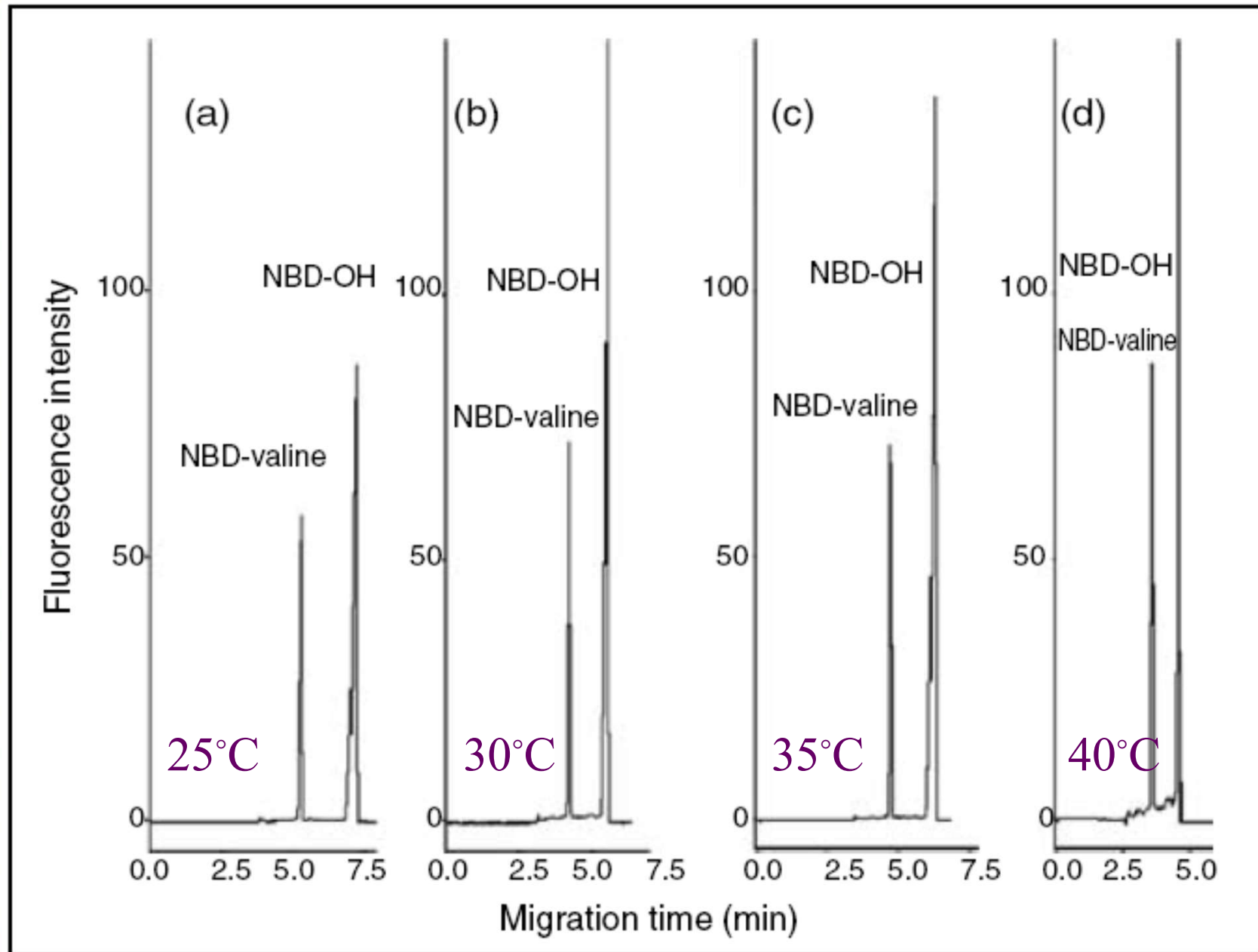
Common Buffer Additives in CE and Their Effects

| Additives | Example | Function |
|------------------------|---|--|
| Inorganic salts | NaCl, CaCl ₂ , K ₂ SO ₄ | Modification of EOF; protein conformational changes; protein hydration |
| Organic solvents | Methanol, acetonitrile, ethylene glycol | Modification of EOF; analyte solubilization; analyte salvation |
| Organic additives | Urea | Modification of EOF; protein solubilization |
| | Pyrenebutanoate | Denaturation of oligonucleotides dynamic modification of protein |
| Inorganic additives | Borate | Complex <i>cis</i> -diols; carbohydrate or glycoprotein separations |
| Zwitterionic additives | Z1-Methyl | Reduce wall interaction; augment EOF |
| Sulfonic acids | hexane, heptane, octane, or nonane analogs | Analyte ion-pairing; hydrophobic interaction |
| Divalent amines | diaminoalkanes; hexamethonium bromide; decamethonium bromide | Modification of EOF; charge neutralization; analyte interaction |
| Cationic surfactants | Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB); cetyltrimethylammonium bromide (CTAB); tetradecyltrimethylammonium chloride (TTAC) | Charge reversal on-capillary wall; hydrophobic interaction |
| Cellulose derivatives | Hydroxyethyl cellulose; methyl cellulose; hydroxypropyl methylcellulose | Reduce EOF; provide sieving medium |
| Miscellaneous polymers | Polyethylene glycol | Protein stability; reduce wall interaction |
| | Dextran | Manipulate the electrophoretic mobilities |
| | Polyvinylpyrrolidone | Enhance resolution of peptides and amino acids |

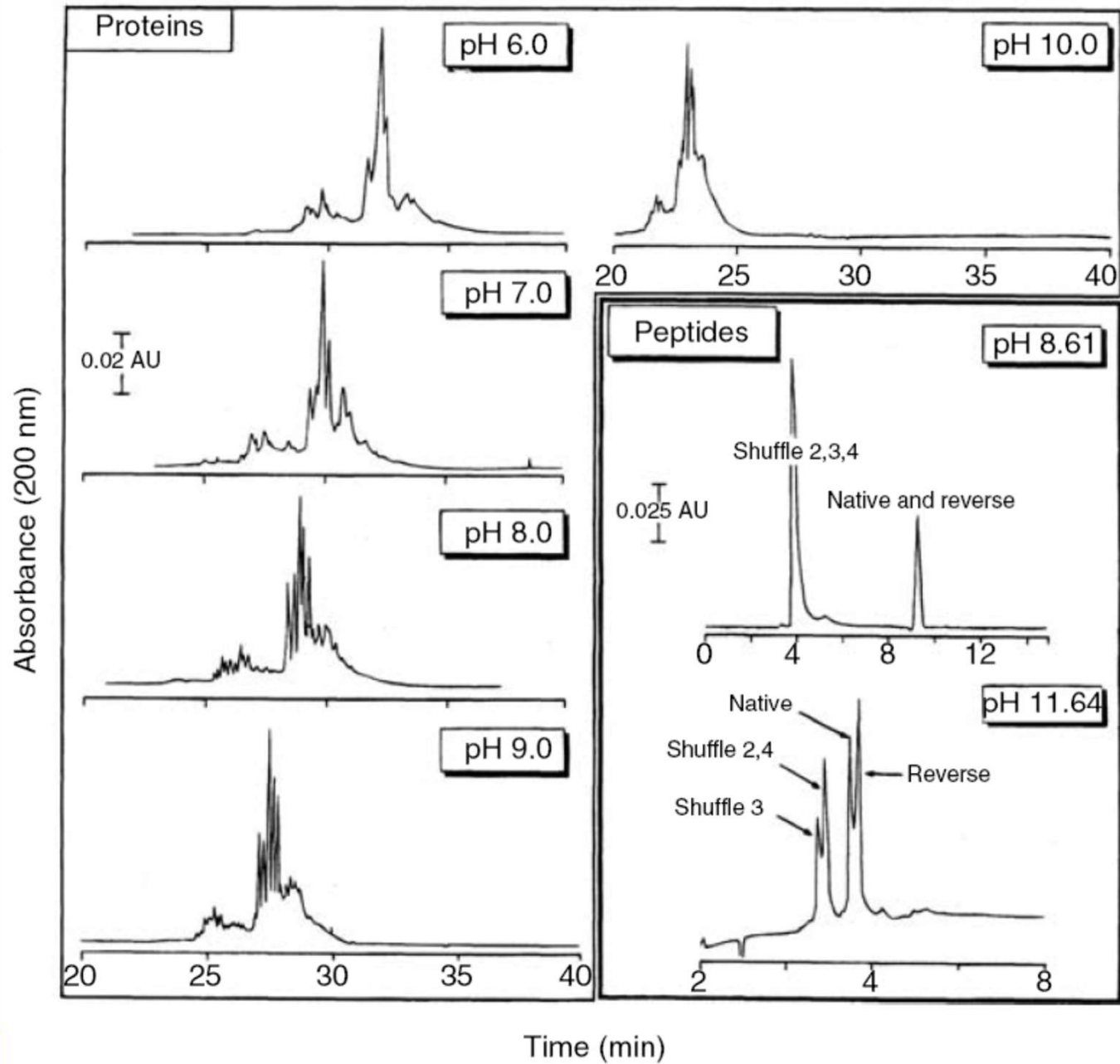
施加电压的优化



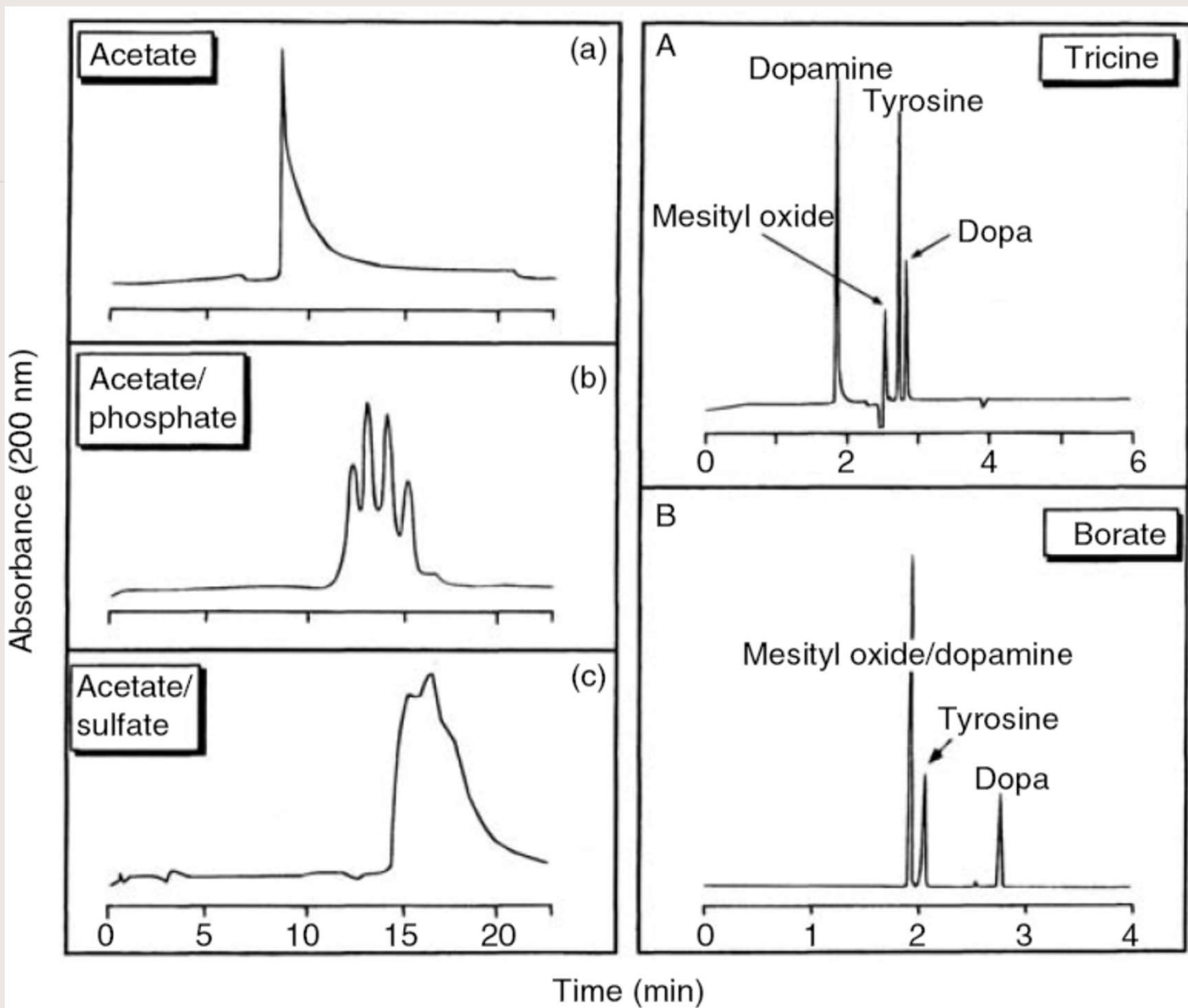
温度的优化



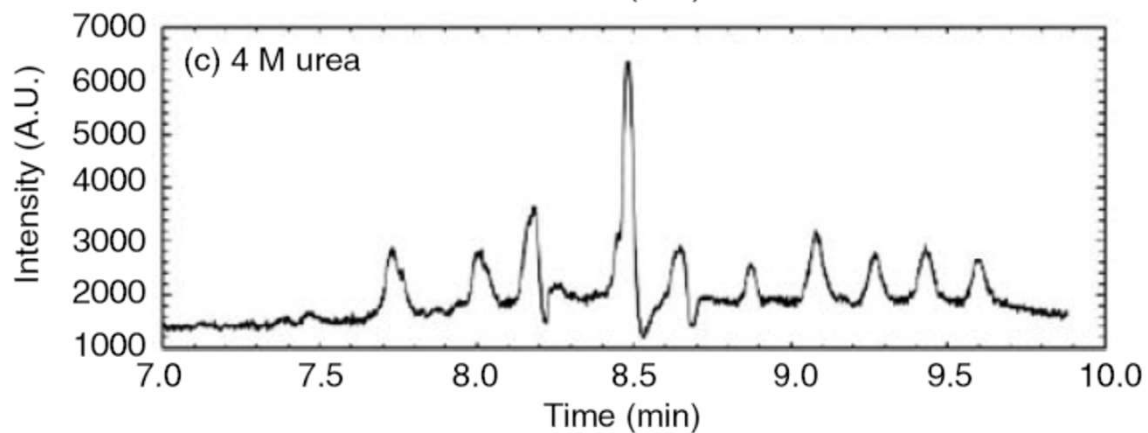
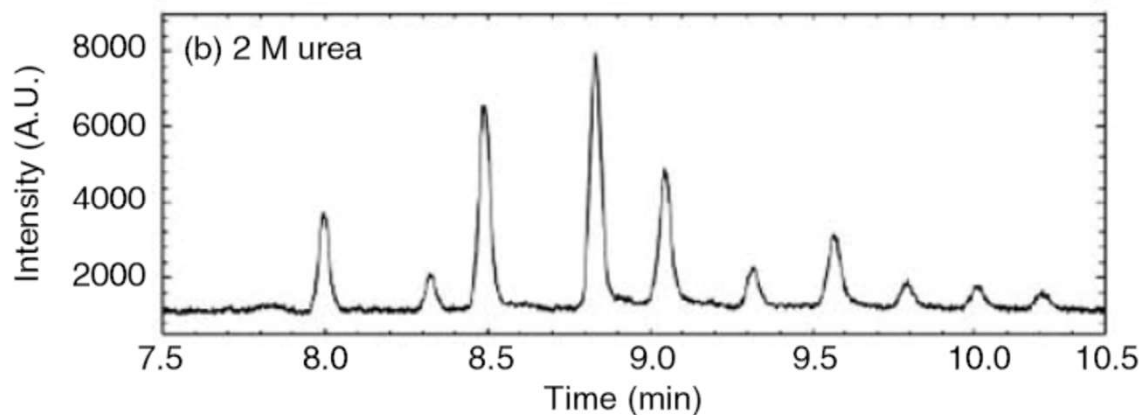
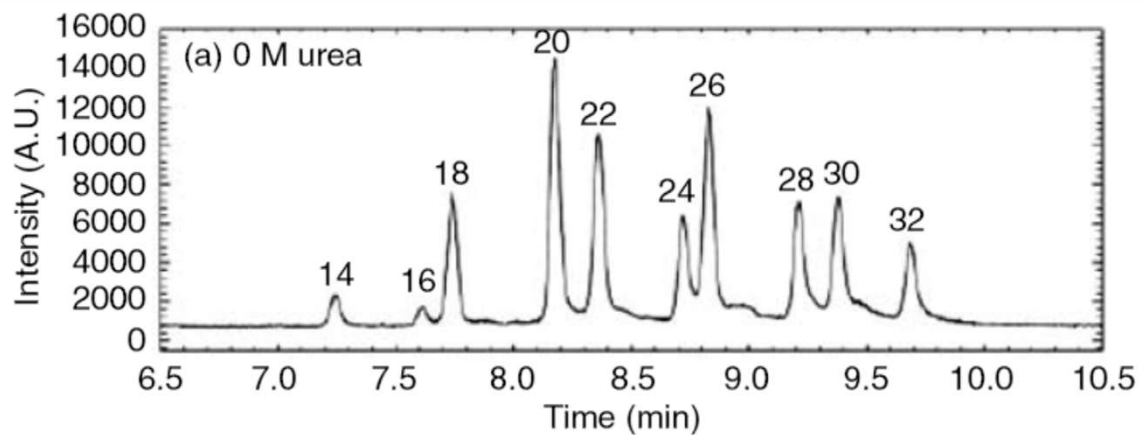
pH的优化



缓冲液体系的优化



背景盐的影响



毛细管电泳与高效液相色谱对比

电泳和色谱分离原理不同，是两类最重要的液相分离分析技术。

- ◆ 相同的差速分离过程。
- ◆ 相同的物质传输理论来描述。

生物大分子的分离

色谱：

两相分离过程，回收率差

扩散系数小导致低效

电泳：

单相过程，回收率好

扩散系数小导致高效

分离的柱效：色谱几万塔片每米；电泳几十万到几百万

分离成本：色谱高；电泳低

仪器成本：色谱高；电泳低

毛细管电色谱

