

第十五章 高效毛细管电泳

Capillary Electrophoresis, CE

一、定义

- 电泳：是电介质中带电粒子在电场作用下以不同的速度向电荷相反方向迁移的现象，利用这种现象对化学或生物化学组分进行分离分析的技术称之为电泳技术。

二、分类

1. **按使用载体分类**：自由溶液电泳、琼脂电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、滤纸电泳等；
2. **以电泳支持物的形状或位置**：U型电泳、柱状电泳、板状电泳等；
3. **按原理命名**：等电聚焦电泳、等速电泳、免疫电泳等；
4. **毛细管电泳泛指在极细的毛细管内实现的一大类电泳技术。**

概述

电泳技术是1937年由瑞典科学家A. Tiselius首先提出的，第一次从人的血清中分离出白蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白和 γ -球蛋白，建立了移动界面电泳，将电泳发展成分离技术，因此获得1948年诺贝尔化学奖。



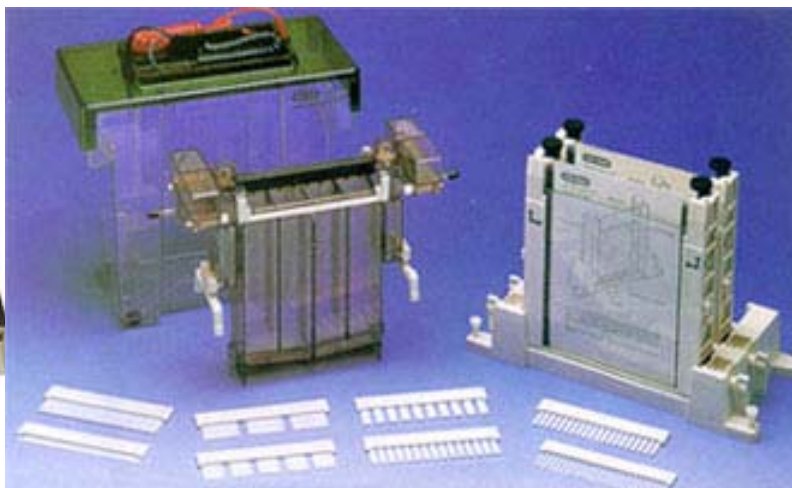
- 1967年，Hjerten最先提出在高电场强度，直径为3mm的毛细管中作自由溶液的区带电泳。
- 1974年，Virtanen提出用200-500 μm 内径的毛细管作电泳分离。尽管没有能完全克服经典电泳的弊端，但确实大大缩短了其和现代电泳的距离。
- 1981年，Jorgenson和Lukacs使用75 μm 内径的毛细管柱，用荧光检测器进行在线检测，对不同的对象实现了高效分离，同时还就分离机理、高电场和小内径对高效的决定性影响等问题进行了讨论。**实验上和理论上为毛细管电泳的发展奠定了基础。**
- 1984年Terabe的等提出了胶束毛细管电动学色谱。1987年Hjerten提出了毛细管等电聚焦。Cohen和Karger提出了毛细管凝胶电泳。

上一世纪后二十多年分析化学领域中发展最迅速的分离分析方法。

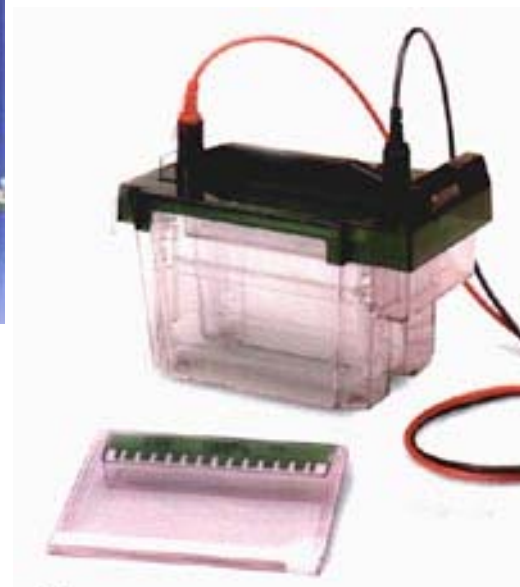
三、传统电泳的局限性

难以克服由两端的高电压所引起的电介质离子流的自热，或称焦耳热，这种焦耳热会引起载板从中心到两侧或管子内部径向的温度梯度、粘度梯度和速度梯度，从而导致区带展宽，影响迁移，降低效率，这种影响还会由于电场强度的增大迅速加剧，因此极大地限制了高压的使用，当然也就难以加快这个过程的速度。

毛细管电泳和传统电泳的根本区别在于前者设法使电泳过程在散热效率极高的毛细管内进行，从而确保引入高的电场强度，全面改善分离质量。



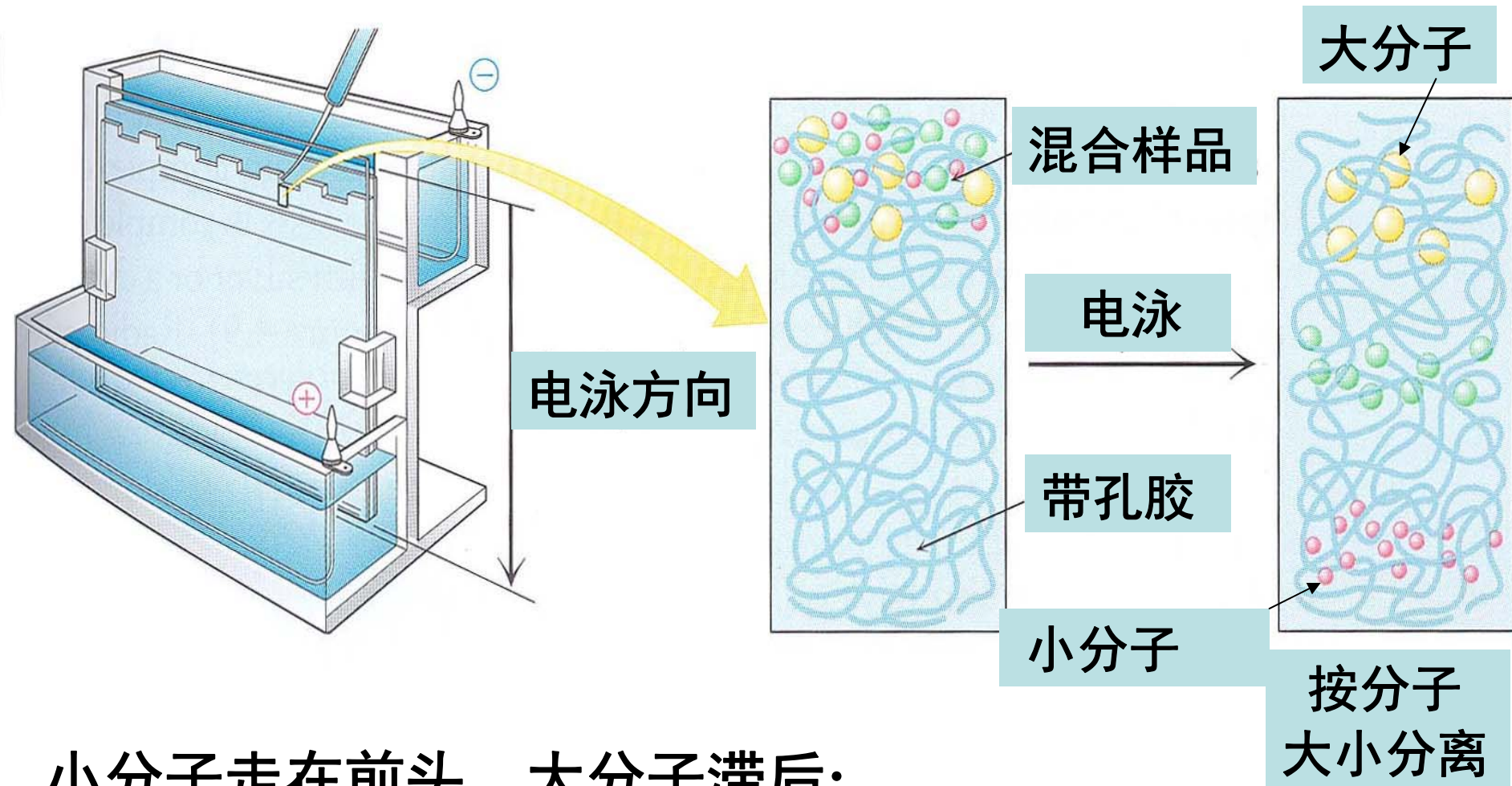
水平板式电泳槽



垂直板式电泳槽



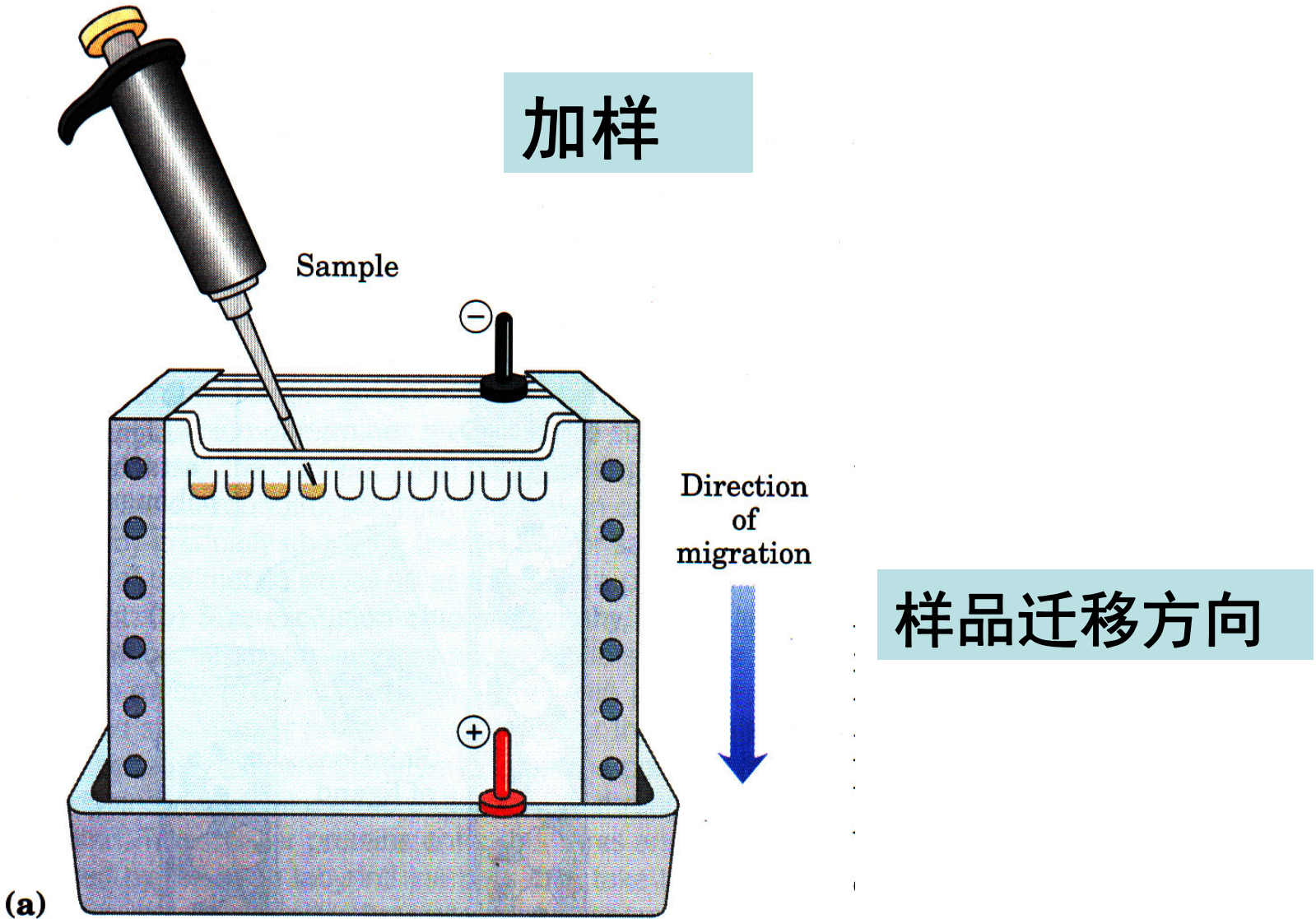
电泳过程中分子迁移的规律



小分子走在前头，大分子滞后；

电泳凝胶相当于凝胶过滤中的一个带孔胶粒。

垂直板电泳装置



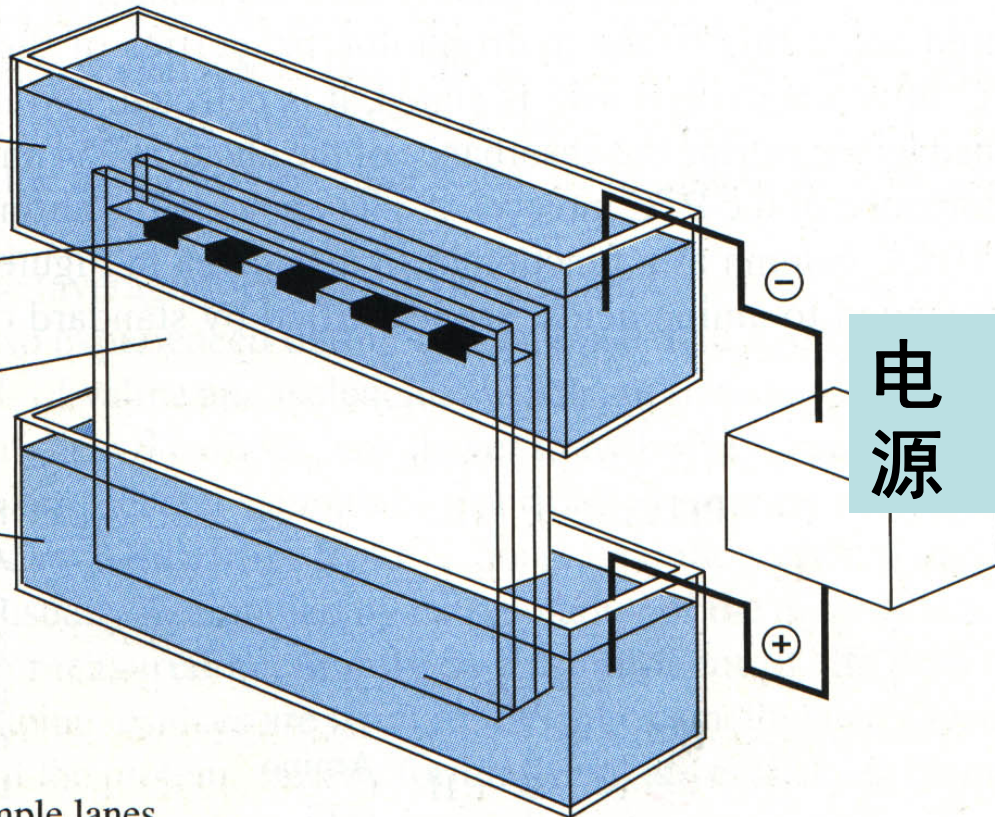
(a)

电泳缓冲液

加在槽中的经
SDS处理的样品

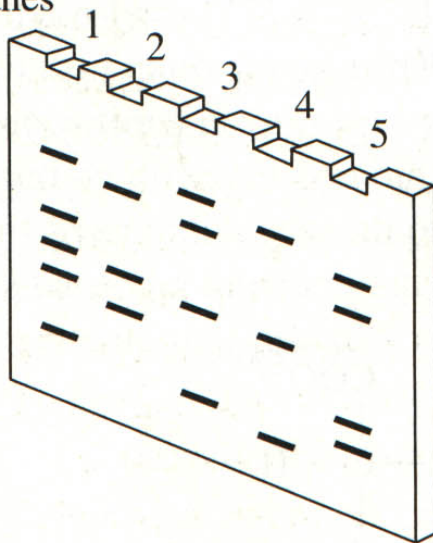
夹在两块玻璃板之
间的凝胶

电泳缓冲液



(b)

Sample lanes

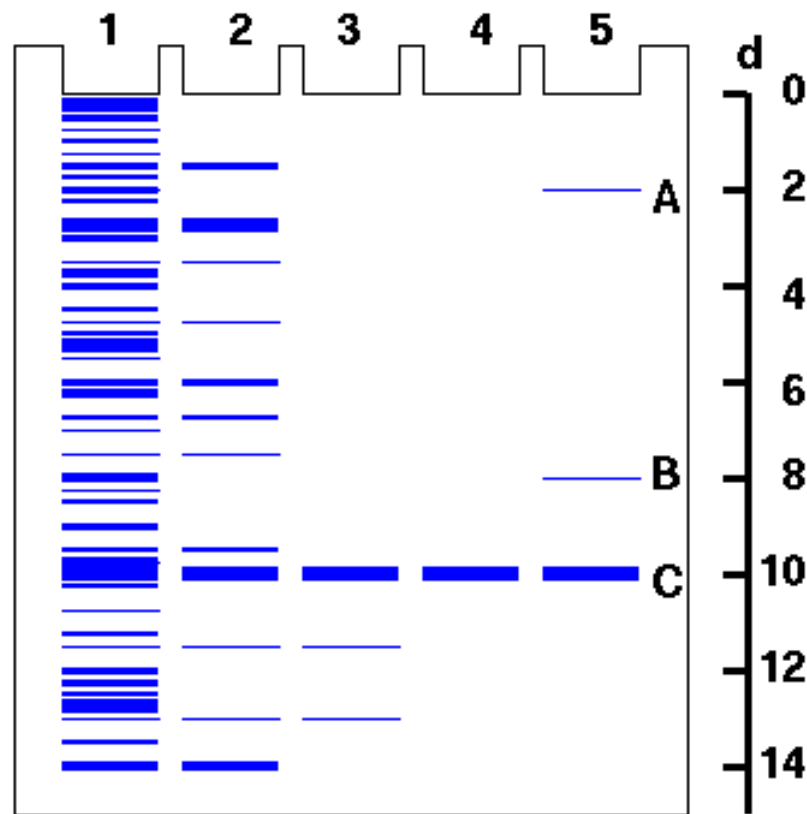
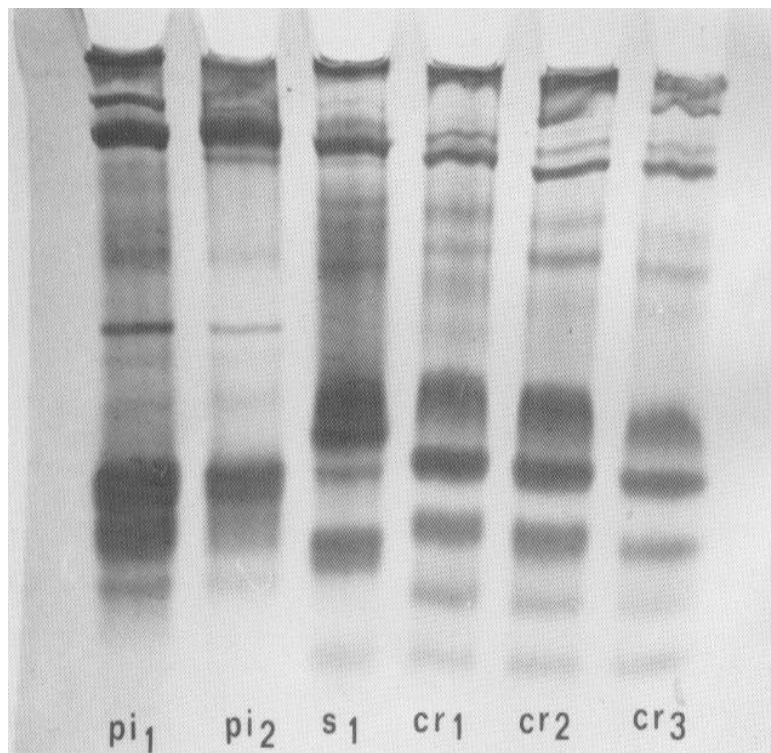


分子量
大

Decreasing
molecular
weight

分子量
小

考马斯亮兰染色后电泳



电泳条带

2. 高效毛细管电泳技术上的重要突破

高效毛细管电泳在技术上采取了两项重要改进：

一是采用了0.05mm内径的毛细管，；

二是采用了高达数千伏的电压。

- 毛细管的采用使产生的热量能够较快散发，大大减小了温度效应，使电场电压可以很高。
- 电压升高，电场推动力大，又可进一步使柱径变小，柱长增加，
- 高效毛细管电泳的柱效远高于高效液相色谱，理论塔板数高达几十万块/米，特殊柱子可以达到数百万。

四、特点

- 高效

柱效一般为每米几十万理论塔板，高的可达每米100万以上，而在凝胶电泳中可达几百万甚至上千万。

- 快速

分析时间通常不超过30min。

- 微量

在采用电流检测器时，最底检测极限可达 10^{-19}mol 。即使采用紫外检测器，也可达 $10^{-13}\text{--}10^{-15}\text{mol}$ 。因此，样品用量仅为纳升。

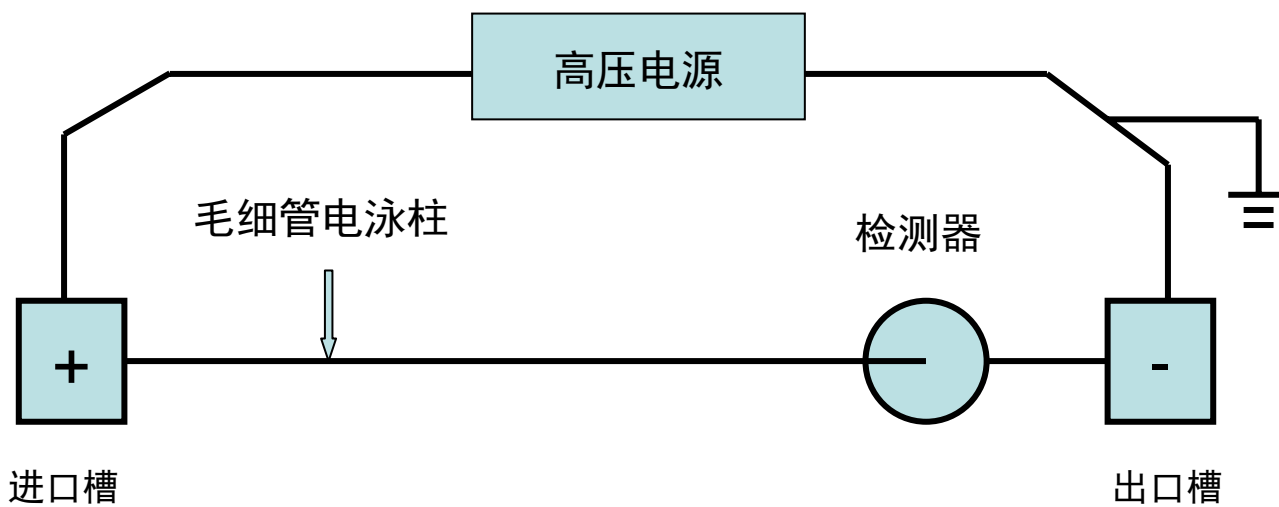
- 可以自动化

五、CE与HPLC的比较

- CE和HPLC同是液相分离技术，它们遵循不同的分离机理，都有许多的分离模式，因此在很大程度上CE和HPLC可以互为补充。但是无论从效率、速度、样品用量和成本来说，CE都显示了一定的优势。
- 与HPLC相比，CE的柱效更高一些，速度更快一些，同时，它几乎不消耗溶剂，而样品用量仅为HPLC几百分之一。
- CE没有泵运输系统，因此成本相对较低，通过改变操作模式和缓冲液的成分，CE有很大的选择性，可以根据不同的分子性质(如大小、电荷数、手性、疏水性等)对极广泛的样品进行有效的分离。相比之下，为达到类似目的，HPLC要消耗许多价格昂贵的柱子和溶剂。

六、仪器结构

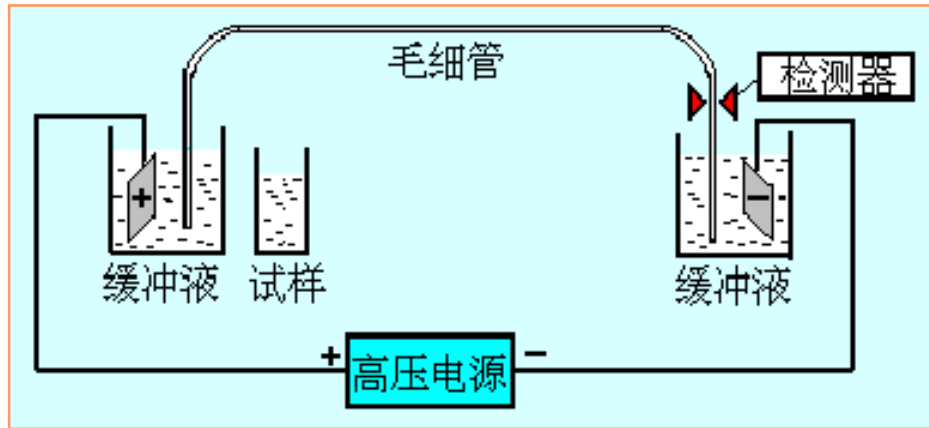
- 高压电源
- 毛细管
- 检测器
- 两个供毛细管两端插入且可和电源相连的缓冲液贮槽。
- 记录仪或工作站



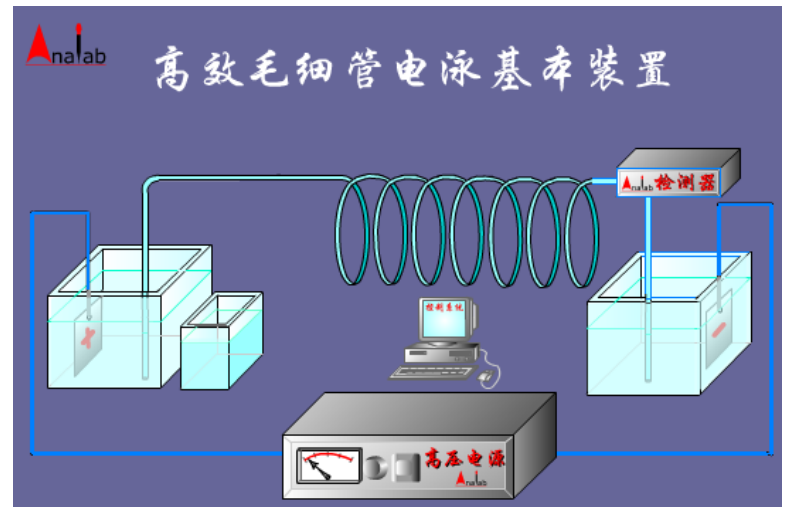
毛细管电泳示意图

二、仪器流程与主要部件

process and main assembly



- 电压：0~30kV；
 - 分离柱不涂敷任何固定液；
 - 紫外或激光诱导荧光检测器；
- (可检测到： $10^{-19} \sim 10^{-21}$ mol/L)



毛细管电泳仪



毛细管电泳仪



毛细管电泳仪

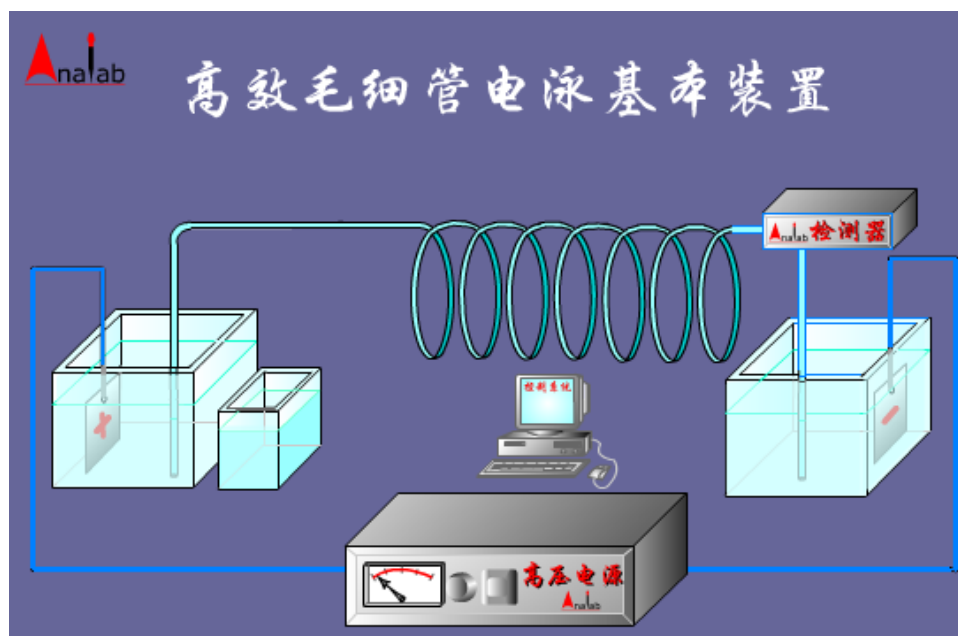
1. 高压电源

- (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%；
- (5) 电源极性易转换；

2. 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 μm ，外径350~400 μm ；长度 $\leq 1\text{m}$



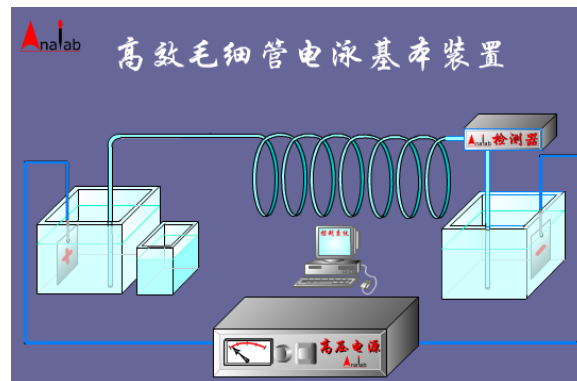
3. 缓冲液池

化学惰性，机械稳定性好；

4. 检测器

要求：具有极高灵敏度，可柱端检测；

检测器、数据采集与计算机数据处理一体化；

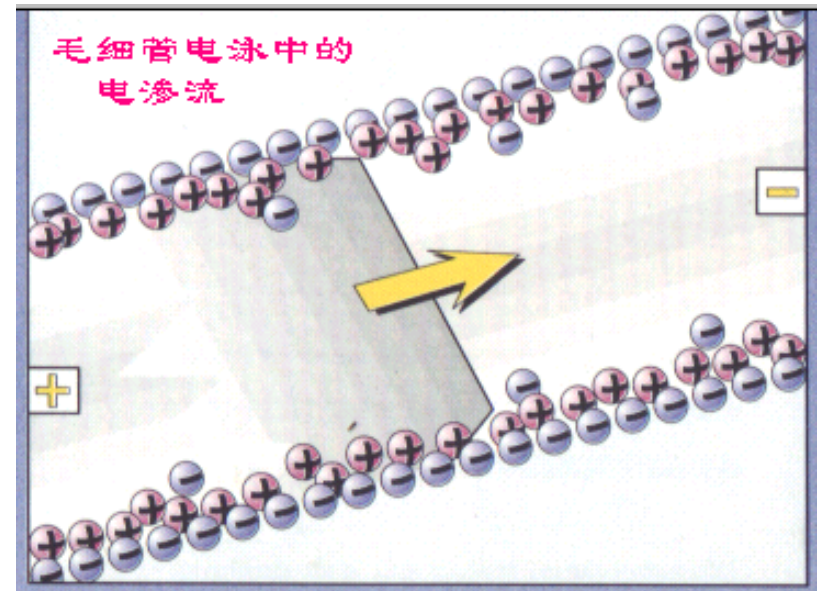
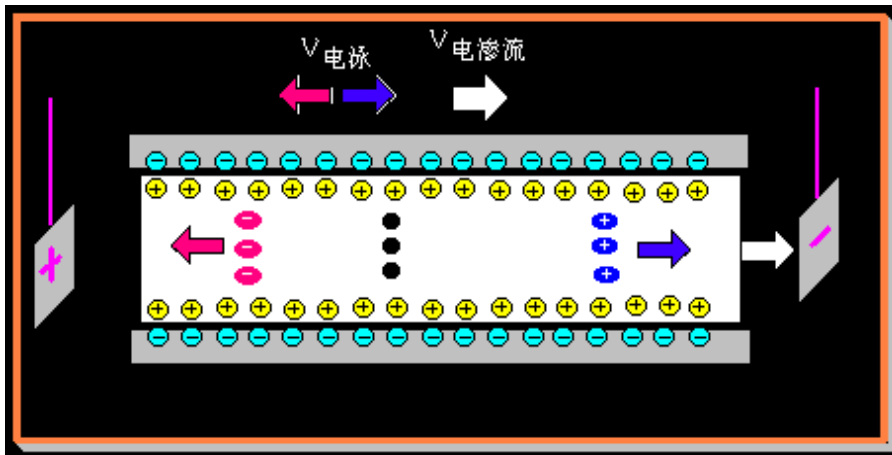


| 类型 | 检测限/mol | 特点 |
|----------|--------------------------|-------------|
| 紫外-可见 | $10^{-13} \sim 10^{-15}$ | 加二极管阵列，光谱信息 |
| 荧光 | $10^{-15} \sim 10^{-17}$ | 灵敏度高，样品需衍生 |
| 激光诱导荧光 | $10^{-18} \sim 10^{-20}$ | 灵敏度极高，样品需衍生 |
| 电导 置； | $10^{-18} \sim 10^{-19}$ | 离子灵敏，需专用的装 |

3. 电泳现象与电渗流现象

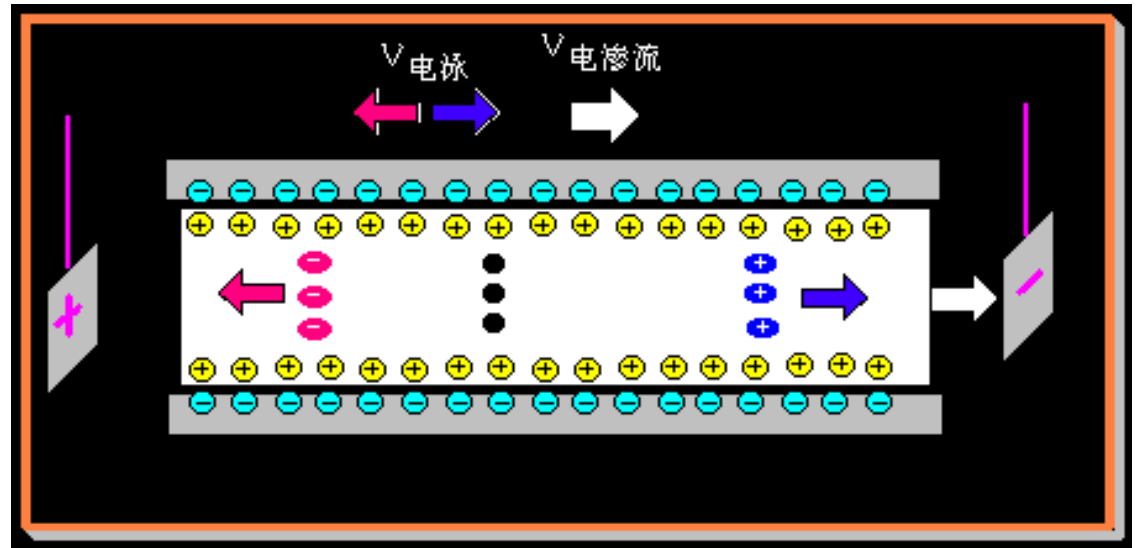
电泳现象： 带电离子在电场作用下的迁移，速度 $v_{\text{电泳}}$

电渗流现象： 玻璃表面存在硅羟基， $\text{pH}>3$ 时，形成双电层，在高电场的作用下引起柱中的溶液整体向负极移动，速度 $v_{\text{电渗流}}$ 。



4. 分离过程

♥ 电场作用下，柱中出现：电泳现象和电渗流现象。



- ♥ 带电粒子的迁移速度=电泳和电渗流两种速度的矢量和。
- ♥ 正离子：两种效应的运动方向一致，在负极最先流出；
- ♥ 中性粒子无电泳现象，受电渗流影响，在阳离子后流出；
- ♥ 阴离子：两种效应的运动方向相反， $V_{\text{电渗流}} > V_{\text{电泳}}$ 时,阴离子在负极最后流出,在这种情况下,不但可以按类分离,除中性粒子外,同种类离子由于受到的电场力大小不一样也同时被相互分离。

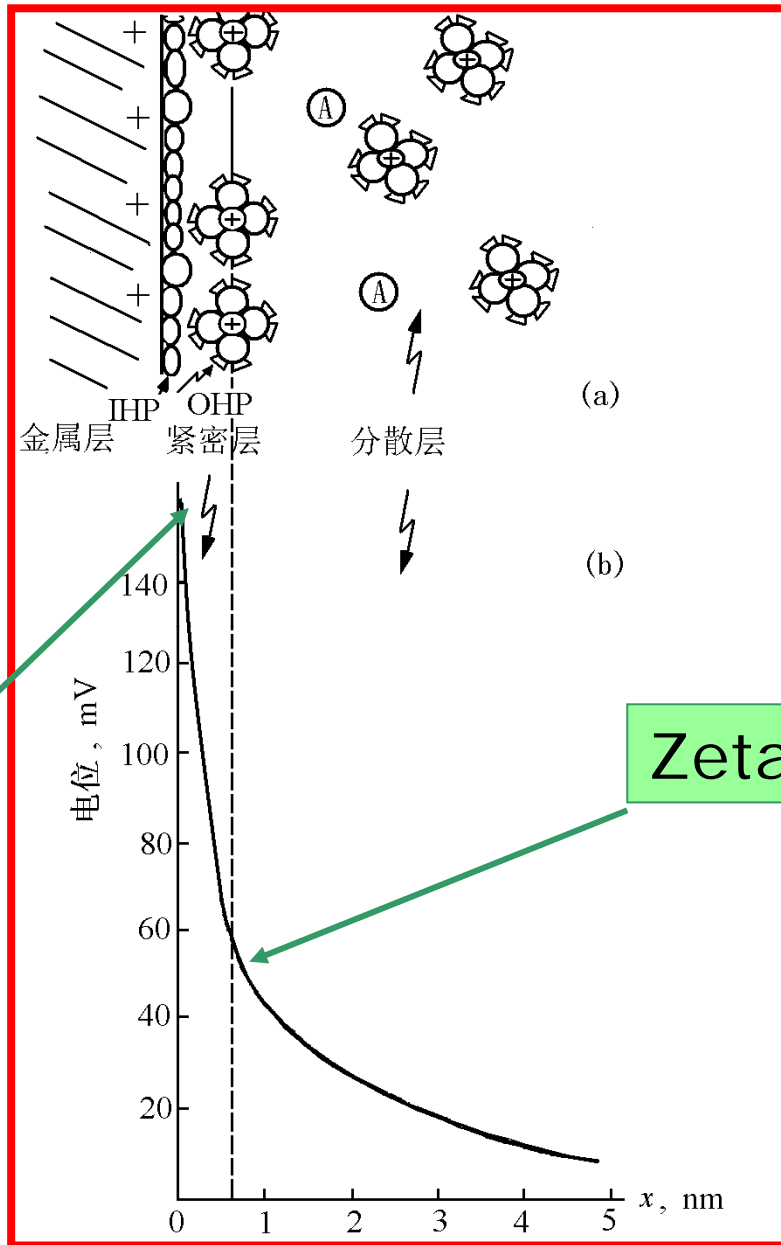
高效毛细管电泳的基本原理

1、双电层和Zeta电势

偶电层是浸没在液体中的所有表面都具备的一种特性，通常是指两相之间的分离表层由相对固定和游离的两部分组成的与表面电荷异号的离子层。在毛细管电泳中，不论是带电粒子的表面还是毛细管管壁的表面都有偶电层。

在电介质中的任何带电粒子都可被看成是一个偶电层系统的一部分，在这个系统中，粒子自身的电荷被异号的带电离子中和，这些异号离子中有一些被不可逆地吸附到粒子上，而另一些则游离在附近，并扩散到电介质中进行离子交换。“固定”离子有一个切平面，它和离得最近的游离离子之间的电势则被称之为粒子的Zeta电势。

固液两相间的
总电势-热力学
电势- ϕ_0



Zeta电势- ζ

2、恒场强下的迁移

电泳是在电场作用下带电粒子在缓冲溶液中的定向移动，这种移动的速度 u_{ep} 由下式决定：

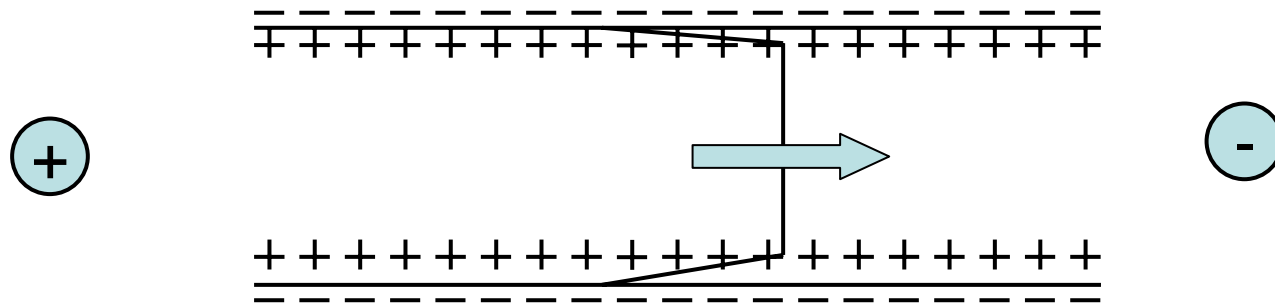
$$u_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad \mu_{ep} = \frac{\varepsilon \zeta_i}{4\pi\eta}$$

E 为电场强度， μ_{ep} 表示溶质的淌度，所谓的淌度即溶质在给定缓冲液中单位时间和单位电场强度下移动的距离。 ε 是流体的介电常数， η 是介质的粘度， ζ 是粒子的Zeta电势。

Zeta电势大小和粒子表面的电荷密度有关，即对给定质量的粒子，表面电荷越大，Zeta电势越大；反之电荷给定，则质量越大，Zeta电势越小。对于非胶体粒子，Zeta电势近似地正比于 $Z/M^{2/3}$ ，其中M是分子量，Z为净电荷，因此，不同离子即可能按照它们表面电荷密度的差别以不同的速率在电介质中移动，最终达到分离。

3、电渗

- 电渗是一种液体相对带电的管壁移动的现象。其产生和双电层有关，由于用作毛细管材料的熔融硅胶的等电点为1.5左右，因此在常用缓冲液pH下，管壁带负电，于是在贴近管壁的液体表面形成了一个和同表面电荷异号的双电层，在毛细管电泳里所指的电渗实际上是高电场下由双电层中水合阳离子或质子所引起的流体朝负极方向的运动。电渗是毛细管电泳中最重要和最有趣的性质之一。

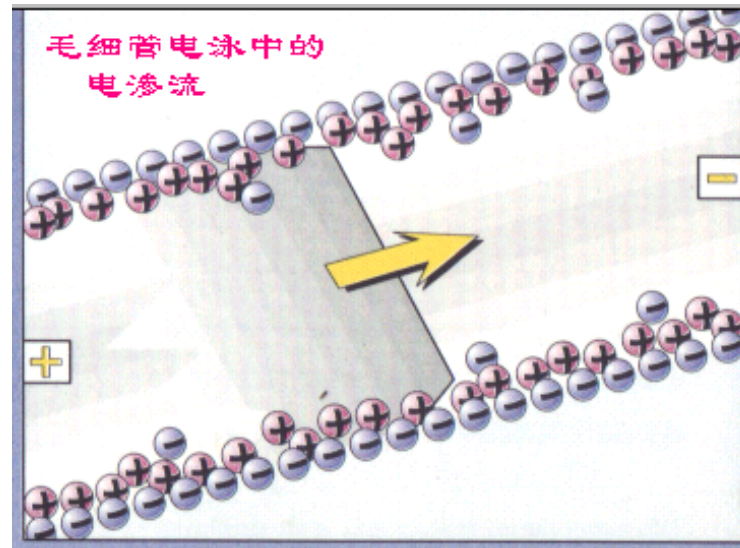


图、由毛细管壁引起的电渗

电渗与电渗流 (electroosmotic flow ,EOF)

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，这种液体相对于固体表面的移动的现象叫**电渗现象**。

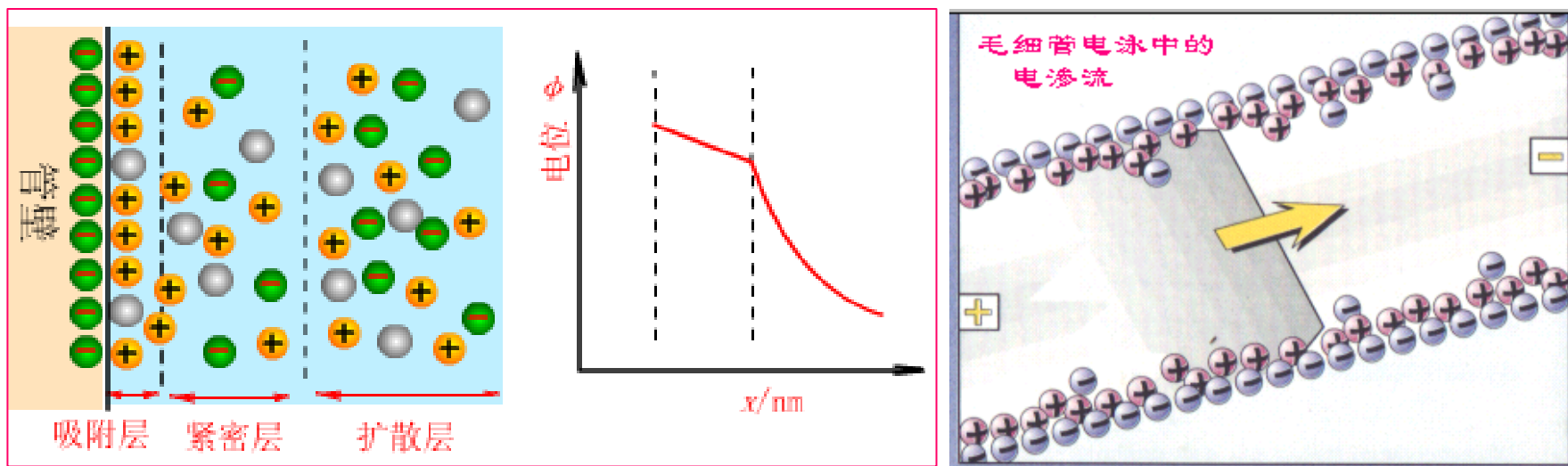
电渗现象中整体移动着的液体叫**电渗流** (electroosmotic flow，简称EOF)。



2. HPCE中的电渗现象与电渗流

石英毛细管柱，内充液pH>3时，表面电离成-SiO⁻，管内壁带负电荷，形成双电层。

在高电场的作用下，带正电荷的溶液表面及扩散层向阴极移动，由于这些阳离子实际上是溶剂化的，故将引起柱中的溶液整体向负极移动，速度 $v_{\text{电渗流}}$ 。



4、电渗流的速度

$$u_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \zeta_w \cdot E$$

一般说来，Zeta电势越大，双电层越薄，粘度越小，电渗流值越大，在不少情况下，电渗流的速度是泳速的5-7倍。

3. HPCE中电渗流的大小与方向

电渗流的大小用电渗流速度 $v_{\text{电渗流}}$ 表示，取决于电渗淌度 μ 和电场强度 E 。即

$$v_{\text{电渗流}} = \mu E$$

电渗淌度取决于电泳介质及双电层的Zeta电势，即

$$\mu = \epsilon_0 \epsilon \xi$$

ϵ_0 —真空介电常数； ϵ —介电常数； ξ —毛细管壁的Zeta电势。

$$v_{\text{电渗流}} = \epsilon_0 \epsilon \xi E$$

实际电泳分析，可在实验测定相应参数后，按下式计算

$$v_{\text{电渗流}} = L_{\text{ef}}/t_{\text{eo}}$$

L_{ef} —毛细管有效长度； t_{eo} —电渗流标记物（中性物质）的迁移时间。

HPCE中电渗流的方向

电渗流的方向取决于毛细管内表面电荷的性质：

内表面带负电荷，溶液带正电荷，电渗流流向阴极；

内表面带正负电荷，溶液带负电荷，电渗流流向阳极；

石英毛细管；带负电荷，电渗流流向阴极；

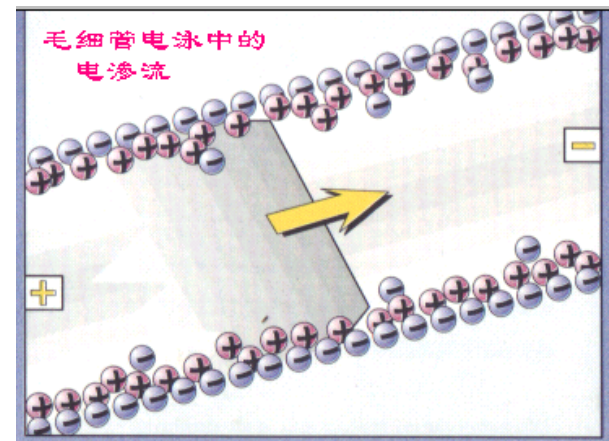
改变电渗流方向的方法：

(1) 毛细管改性

表面键合阳离子基团；

(2) 加电渗流反转剂

内充液中加入大量的阳离子表面活性剂，将使石英毛细管壁带正电荷，溶液表面带负电荷。电渗流流向阳极。



5、泳速

既然同时存在着泳流和渗流，那么，在不考虑相互作用的前提下，粒子在毛细管电泳内电介质中的运动速度应当是两种速度的矢量和。

$$u = u_{ep} + u_{eo} = (\mu_{ep} + \mu_{eo})E$$

正离子的运动方向和电渗一致，因此它应当最先流出，中性粒子的泳速为“零”，将随电渗而行，负离子因其运动方向和电渗相反，在电渗流速大于电泳速度时，它将在中性粒子之后流出，如果它的泳流速度大于电渗流速，则将无法流出，因此如果电渗流速的绝对值大于所有负离子泳流速度的绝对值，则此混合物中的所有组分将朝一个方向迁移。

5. HPCE中电渗流的作用

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。

6、电渗流的利弊

在区带电泳中，电渗流对负离子的分离可能有利，但对正离子分离可能无益。在电动力学色谱中，通常需要强大的流向阴极的电渗流作为组分和胶束向阴极运动的推动力，而在凝胶电泳和等电聚焦中，则必须尽可能地消除电渗流。但不管对于哪一种操作模式，电渗流都是极其重要的一种物理现象，有效地控制电渗流一直是许多学者研究的重点，这种情况也可被看作是毛细管电泳的一个重要特征。

三、HPCE中影响电渗流的因素

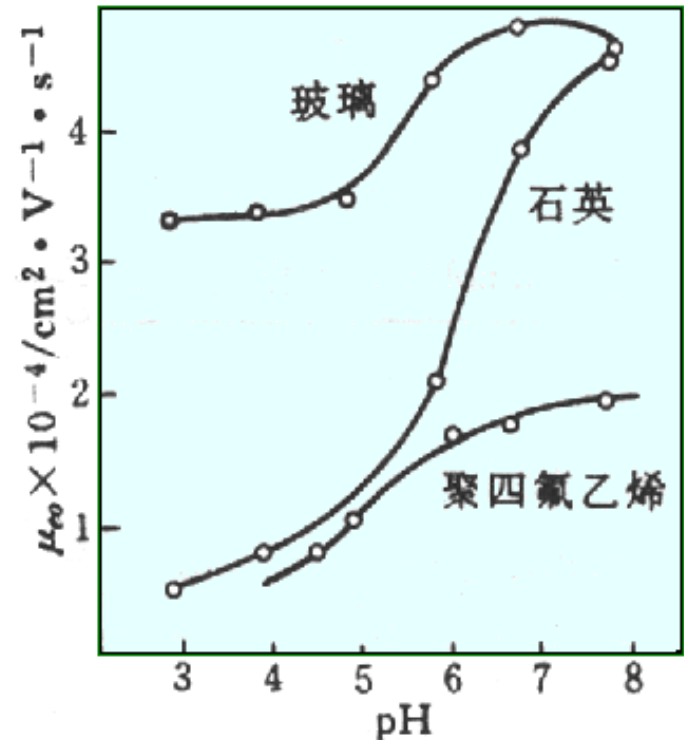
factors influenced electroosmosis

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。

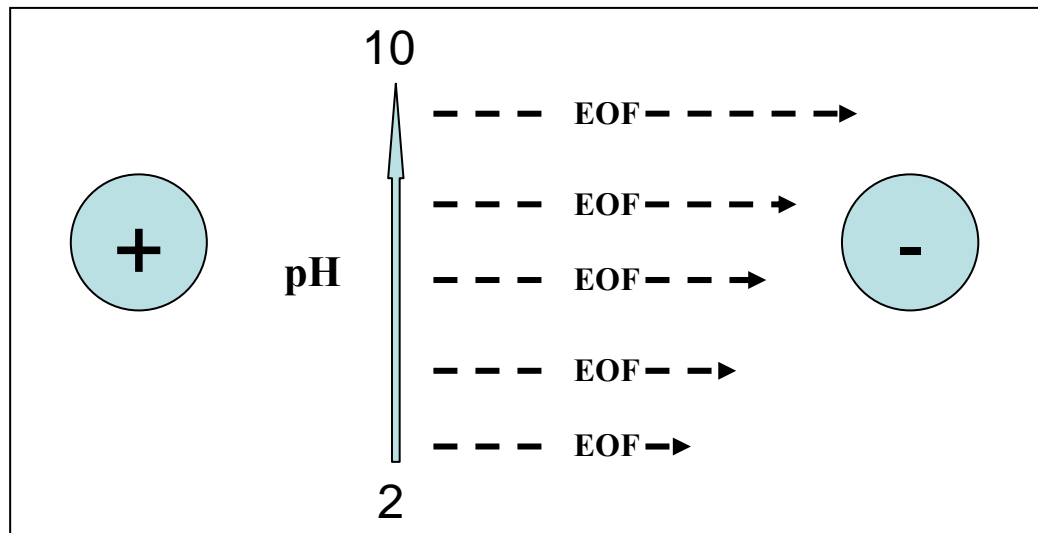
2. 毛细管材料的影响

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；



7、电渗流与pH的关系

- 电渗受Zeta电势的影响，Zeta电势由毛细管壁表面的电荷决定，而电荷又受到缓冲液pH值的影响，所以电渗流的值是缓冲液pH的函数，一般随pH的增加而增大，到中性或碱性时，其值变化更大。
- 示意图见图2.4



电渗随pH变化的示意说明

8、电渗流的控制

- 电渗流作为毛细管电泳中至关重要的物理量，当然必须予以控制。
- 原则上说控制电渗需要改变毛细管表面电荷或者缓冲液的黏度，值得注意的是影响壁表面电荷的条件通常，也影响溶质本身。
- 降低电场强度是最简单改变电渗的办法，但此法有很多缺点，诸如是分析时间延长，效率降低，分离度减小等。

- 从实际观点来看最理想的办法是改变缓冲液的pH，但是调节pH会影响溶质电荷和淌度，低pH的缓冲液易使管壁表面和溶质质子化，高pH则反之。调节缓冲液的浓度和离子强度也是控制电渗的一种方法。
- 一般来说随缓冲液浓度和电离强度的增加，电渗减小，缓冲液浓度较高时管壁有效电荷较少，有利于限制溶质和管壁库仑力的相互作用，但是浓度过高会使毛细管过热。

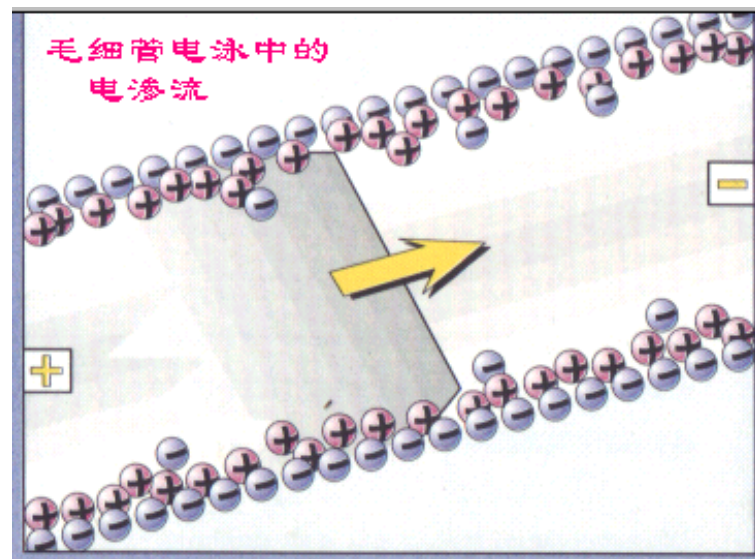
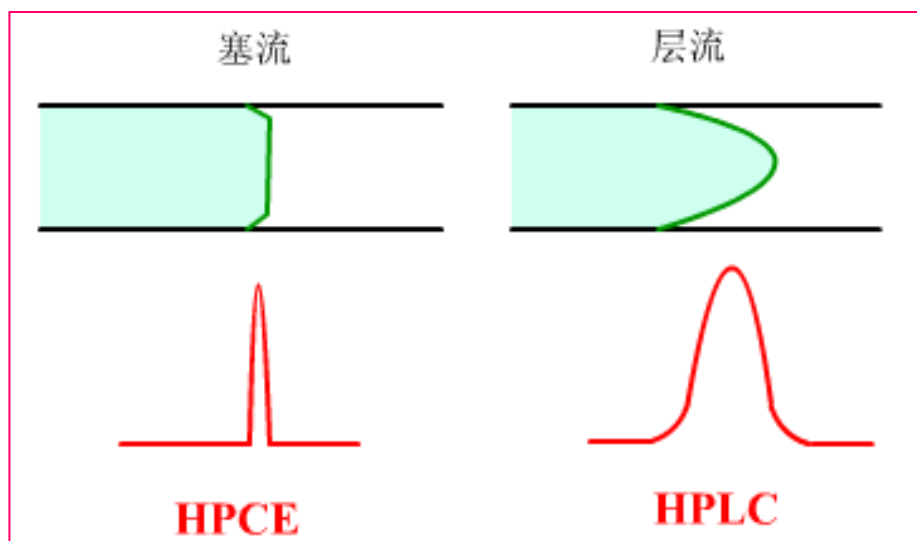
控制电渗流的方法

| 变量 | 直接结果 | 说明 |
|------------|------------------------------|---|
| 电场强度 | 电场强度增加，电渗流将成正比增加，反之亦然。 | 电场强度减小可能会降低效率和分离度，而电场强度的增加则会导致焦耳热的增加。 |
| 缓冲液pH | 在低pH下，电渗减少，高pH下，电渗增加。 | 这是改变电渗流最有效的方法，但可能改变溶质的荷电状况或构型。 |
| 离子强度或缓冲液浓度 | 它们的增加可能会较少Zeta电势和电渗流 | 高离子强度会产生高电流并引起高焦耳热，低离子强度会造成样品吸附，如果缓冲液电导和样品电导向差很多，可能会损坏峰形，如果减少离子强度或浓度可限制样品的堆积。 |
| 温度 | 每改变1°C，将改变黏度2-3%，因此影响电渗 | 由于温度受仪器控制，因此比较容易实现，也比较有效。 |
| 有机改性剂 | 改变Zeta电势和黏度(通常会减少电渗) | 造成的变化比较复杂，其影响最好由实验测定，此法也可能改变选择性。 |
| 表面活性剂 | 通过疏水和/或离子相互作用吸附到毛细管内壁，从而改变电渗 | 阴离子表面活性剂可能增加电渗，阳离子表面活性剂则会减少电渗或使之倒向，能显著地改变选择性 |
| 中性亲水聚合物 | 通过相互作用吸附到毛细管内壁上 | 通过屏蔽表面电荷，增加黏度来减少电渗 |
| 共价涂渍 | 在毛细管壁上作化学键合 | 有许多改性的途径，但通常有不稳定性问题存在 |

4. HPCE中电渗流的流形

电荷均匀分布，整体移动，电渗流的流动为平流，塞式流动（谱带展宽很小）；

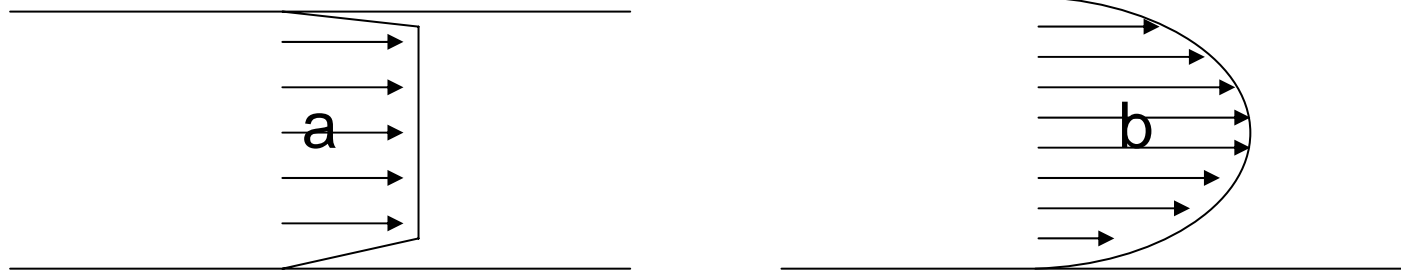
液相色谱中的溶液流动为层流，抛物线流型，管壁处流速为零，管中心处的速度为平均速度的2倍（引起谱带展宽较大）。



9、流型

- 毛细管电泳中的电渗是流体相对于带电管壁移动的一种现象，由离表面很近的一层过剩的正离子层引起，这正好象在毛细管内形成了一个带电的外壳，包围着流体内核，在管子两端加了电场后，带电的外壳就在通过靠近管壁那一层带电流体切面上的离子把电渗力传递进去，如果由重力等产生的流体静压差为零，那么这种电渗力可和由粘性产生的力平衡，这种粘性产生在壁到切面内表面的速度梯度区，在这一区域速度逐渐增加，而管子内的其余流体则以和这个内表面边界层一样的速度朝负极移动。由于切面的厚度极小，因此，即使在内径很小的毛细管子里，整个流体也会象一个塞子一样以均匀的速度向前运动，使整个流型呈扁平型。呈扁平型的塞子流是毛细管电泳的理想状态，也是导致毛细管电泳高效的重要原因。

- 在压力驱动系统中，如HPLC，液体和固体表面接触处的摩擦力会导致压力降低，从而使流线呈抛物线型，或称层流。靠近管壁处，其速度趋近于零，而中心的速度则是平均速度的2倍。



电渗流流型 (a) 和压力驱动流型 (b)

在电驱动系统中，由于速度流型是扁平型的，又没有使不保留溶质弥散的倾向，其塔板数可表示为：

$$N = \mu_{app} E L_d / 2D$$

从理论上讲，对于理想的由电驱动的扁平流型系统，电场强度越大，柱效越高，这显然是因为溶质能以较快的速度通过柱子，而没有更多的时间扩散。另外从上式还可看出，如果溶质不保留，柱效与管子的直径无关，特别是扩散系数越小的分子，比如说生物大分子，其柱效越高。

10、自热

按理想的扁平流型导出的方程(上式)表明, 增加速度是减小谱带展宽, 提高效率的重要途径, 而在电泳条件下, 速度一般靠增加电场强度来实现, 但是充满在管子里的电介质在高电场下会产生自热, 在普通电泳中这种自热已成为实现快速、高效的重大障碍。

$$I = \pi r^2 \sigma_s E$$

$$I = \frac{Ar^2 \varepsilon EC_i \zeta_i}{4\eta}$$

$$w = I^2 R = IV$$

$$\Delta T = \frac{0.24w}{4K_1}$$

自热所引起的一个主要结果是在径向出现温度分布, 这种分布也是抛物线型的, 这种分布将影响到粘度。通常认为粘度随温度升高按指数下降, 因此使介质粘度在径向产生梯度, 从而影响淌度, 进而波及到速度。在径向扩散很慢的情况下, 靠近管轴中心的溶质分子将要比靠近管壁分子迁移得更快一些, 即所谓的径向速度梯度, 于是造成了谱带展宽, 柱效下降。

抑制焦耳热和温度梯度的方法

| 方法 | 效果 |
|---------------|--------------------------------|
| 降低电场强度 | 可相应地较少焦耳热，但同时将降低速度、柱效和分离多。 |
| 减小毛细管内径 | 显著减小电流，但将降低灵敏度并可能加剧样品的吸附 |
| 降低缓冲液的离子强度或浓度 | 相应地减少电流，但可能引起样品吸附的增加 |
| 用物理方法直接降温或恒温 | 除去毛细管内产生的热量，直接使系统恒温，但要增加仪器的成本。 |

11、扩散和吸附

- 扩散

毛细管中的吸附一般是指毛细管管壁对于被分离物质离子的作用。

- 吸附

在毛细管电泳中，造成管壁表面吸附的主要原因有两个：一是阳离子溶质和带负电的管壁的离子相互作用；二是疏水相互作用。在这个意义上，毛细管内表面积和体积之比($2/R$)越大，吸附的可能性也越大。因此细管径的毛细管不利于降低吸附。当然另一方面比值得增加有利于传热。吸附问题在蛋白质分子的分离中表现最为明显，因为它们有许多带电的粒子，管壁的硅羟基与其产生强烈的相互作用，从而对组分谱带的展宽以及而后的分离影响极大，必须尽可能地予以抑制。对管壁的种种修饰在很大程度上是基于抑制吸附的要求。

四、淌度 mobility

淌度：带电离子在单位电场下的迁移速度；
淌度不同是电泳分离的基础。

1. 绝对淌度 (absolute mobility) μ_{ab}

无限稀释溶液中带电离子在单位电场强度下的平均迁移速度，简称淌度。可在手册中查阅。

2. 有效淌度 (effective mobility) μ_{ef}

实际溶液中的淌度 (实验中测定的)。 $\mu_{ef} = \sum a_i \mu_i$

a_i — 溶质 i 的解离度； μ_i — 溶质 i 在解离状态下的绝对淌度

3. 表观淌度 μ_{ap}

离子在实际分离过程中的迁移速度 (表观迁移速度)：

$$V_{ap} = \mu_{ap} \cdot E$$

五、HPCE中的参数与关系式

parameters and relation in HPCE

1. 迁移时间（保留时间）

HPCE兼具有电化学的特性和色谱分析的特性。有关色谱理论也适用。

$$t = \frac{L_{ef}}{v_{ap}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{ap} \cdot E} = \frac{L_{ef} \cdot L}{\mu_{ap} \cdot V}$$

V —外加电压； L —毛细管总长度；

2. 分离效率（塔板数）

在HPCE中，仅存在纵向扩散， $\sigma^2 = 2Dt$

$$n = \frac{\mu_{ap} V L_{ef}}{2DL} = \frac{\mu_{ap} E L_{ef}}{2D}; \quad n = 5.54 \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2$$

扩散系数小的溶质比扩散系数大的分离效率高，分离生物大分子的依据。

3. 分离度

$$R = 0.177 \cdot \frac{\Delta\mu}{\mu_{\text{平均}}} \sqrt{\frac{\mu_{ap} V L_{ef}}{DL}}$$

$$\mu_{\text{平均}} = \frac{\mu_{ap1} + \mu_{ap2}}{2}$$

影响分离度的主要因素；工作电压V；毛细管有效长度与总长度比；有效淌度差。分离度可按谱图直接由下式计算：

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

六、影响分离效率的因素—区带展宽

factors influenced the efficiency—band broadening

1. 纵向扩散的影响

在HPCE中，纵向扩散引起的峰展宽： $\sigma^2=2Dt$

由扩散系数和迁移时间决定。大分子的扩散系数小，可获得更高的分离效率，大分子生物试样分离的依据。

2. 进样的影响

当进样塞长度太大时，引起的峰展宽大于纵向扩散。分离效率明显下降；理想情况下，进样塞长度：

$$W_{inj} = (24D t)^{1/2}$$

实际操作时进样塞长度小于或等于毛细管总长度的1%~2%。

3. 焦耳热与温度梯度的影响

电泳过程产生的焦耳热可由下式计算：

$$Q = \frac{V \cdot I}{\pi r^2 L} = \Lambda_m c_b E^2$$

Λ_m —电解质溶液的摩尔电导； I —工作电流； c_m —电解质浓度；

散热过程中，在毛细管内形成温度梯度（中心温度高），破坏了塞流，导致区带展宽。

改善方法：

- (1) 减小毛细管内径；
- (2) 控制散热；

4. 溶质与管壁间的相互作用

存在吸附与疏水作用，造成谱带展宽；

蛋白质、多肽带电荷数多，有较多的疏水基，吸附问题特别严重，是目前分离分析该类物质的一大**难题**。

细内径毛细管柱，一方面有利于散热，另一方面比表面积大，又增加了溶质吸附的机会。

减小吸附的方法和途径：加入两性离子代替强电解质，两性离子一端带正电，另一端带负电，带正电一端与管壁负电中心作用，浓度约为溶质的100-1000倍时，抑制对蛋白质吸附，又不增加溶液电导，对电渗流影响不大。

5. 其他影响因素

(1) 电分散作用对谱带展宽的影响

当溶质区带与缓冲溶液区带的电导不同时，也造成谱带展宽；尽量选择与试样淌度相匹配的背景电解质溶液。

(2) “层流”现象对谱带展宽的影响

一般情况下，HPCE中不存在层流，但当毛细管两端存在压力差时，出现抛物线形的层流；

产生的原因：毛细管两端液面高度不同。

实际操作时，保持毛细管两端缓冲溶液平面高度相同。

二、毛细管柱

一、柱管的几何尺寸、形状和材料

1、内径：25-75 μm

- 减少电流，因此减少自热。
- 增大散热面积（侧面积与截面积之比），因此能加快散热，其结果可以大大降低管中心和管壁之间的温差，从而减少粘度和速度在径向上的差异，保持电渗流流型的扁平性，最终保持分离的高效。
- 但是直径的减小也会增加管子的侧面积与体积之比，不利于对吸附的抑制，同时，又会造成进样、检测和清洗等技术上的困难，比如说检测，会使光程缩短，因此实际上柱内径的降低有个限度，这也是当前商品柱大体采用25-75 μm 内径料管的原因。

2、长度

在理想的条件下，如果电场强度保持恒定，则理论塔板数随着柱长的增加而增加，但为了保持电场强度的恒定，在增加柱长的同时还必须相应地增加操作电压。由于实际上电压的取值有一个极限，不能无限制增大，因此，柱长也不能无限增加。一般来说，在同样条件下，对同样电压下同样的柱子，长度增加，电流减小，因此有利于减少自热，淡化自由落体所造成的影响，但同时又要以降低电场强度、增加分析时间作为代价，反之，短柱则容易造成过热，虽然它能使分析时间明显缩短。总之，柱子长短需根据实际情况加以权衡。有人认为，管长70cm是一个阈值，在此长度范围内，分离度和效率大体随柱长的增加而增加，超过此长度则保持恒定不再增大，再增加柱长只会使电压增高，绝缘困难。实际上，区带电泳的常用长度在30cm左右，也有更短的，凝胶柱则要短得多。

3、管壁厚度

- 厚壁：375 μm
- 薄壁：150 μm

理想的毛细管柱应是化学和电惰性的，紫外光和可见光可以透过，有一定的柔性，易于弯曲，耐用而且便宜。毛细管柱的材料可以是聚四氟乙烯、玻璃和弹性石英等。

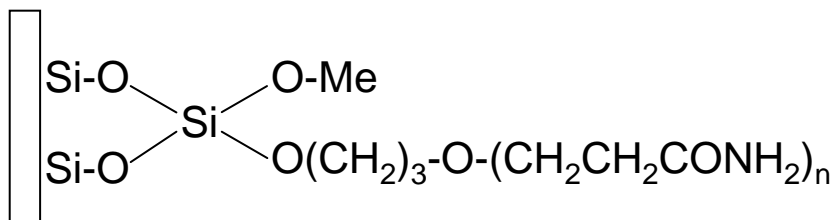
4、管壁的改性

用石英毛细管做电泳分离时，会产生吸附。吸附是由管壁和被分离物质离子相互作用及疏水相互作用所引起，在分离大分子蛋白时尤为严重，且通常都是不可逆的，因此造成一系列危害。

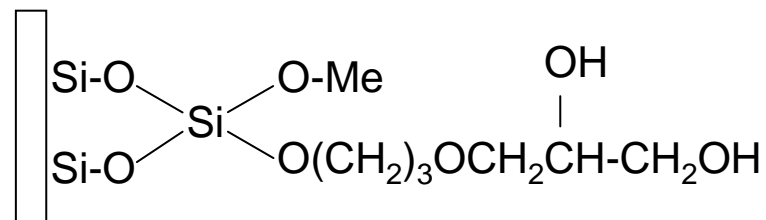
静态改性：管壁涂渍亲水聚合物可以在减少电渗的同时减少吸附。理想的新涂渍柱子时不会和溶质发生作用的，不管溶质是酸性、碱性、分子量高低，其原因如下：

1. 涂料是非离子型的亲水化合物，因此它能减少静电和疏水作用。
2. 两种不同的聚合物，通过形成两种液相或者沉淀，有相互排斥的倾向，因此像蛋白质和核酸这样的大分子，有尽量避免和聚合物接触的倾向。
3. 所涂渍聚合物密度很大，由于排阻效应，大分子物质不能进入。
4. 作电泳迁移的物质倾向于向迁移的干扰小的地方运动。

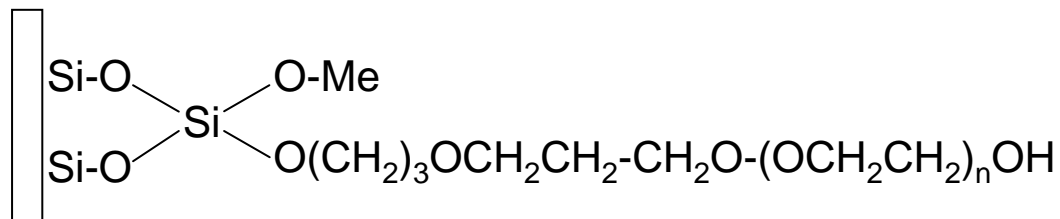
聚丙烯酰胺



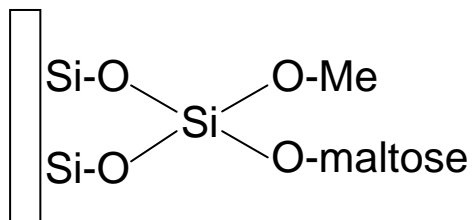
环氧二醇



聚乙二醇



聚糖



不同试剂处理后的毛细管表面

常用的偶联剂

- 有机硅烷，磷酸酯，钛酸酯，铬络合物，有机胺，有机酸

以上分析表明，未改性柱的毛细管壁在对大分子的电泳分离过程中，存在着较为严重的吸附现象，改性后的毛细管柱能有效地消除管壁对溶质的吸附，实现各种多肽和蛋白质的理想分离。

这里要指出的是，吸附并不是造成电泳峰变形的唯一原因，至少还应当提及的是电弥散。电弥散是毛细管电泳中的特有现象，它在很大程度上又样品区带和缓冲液区带之间电导率的差别引起，这种差别可能造成三种影响，其中之一是使峰变形。

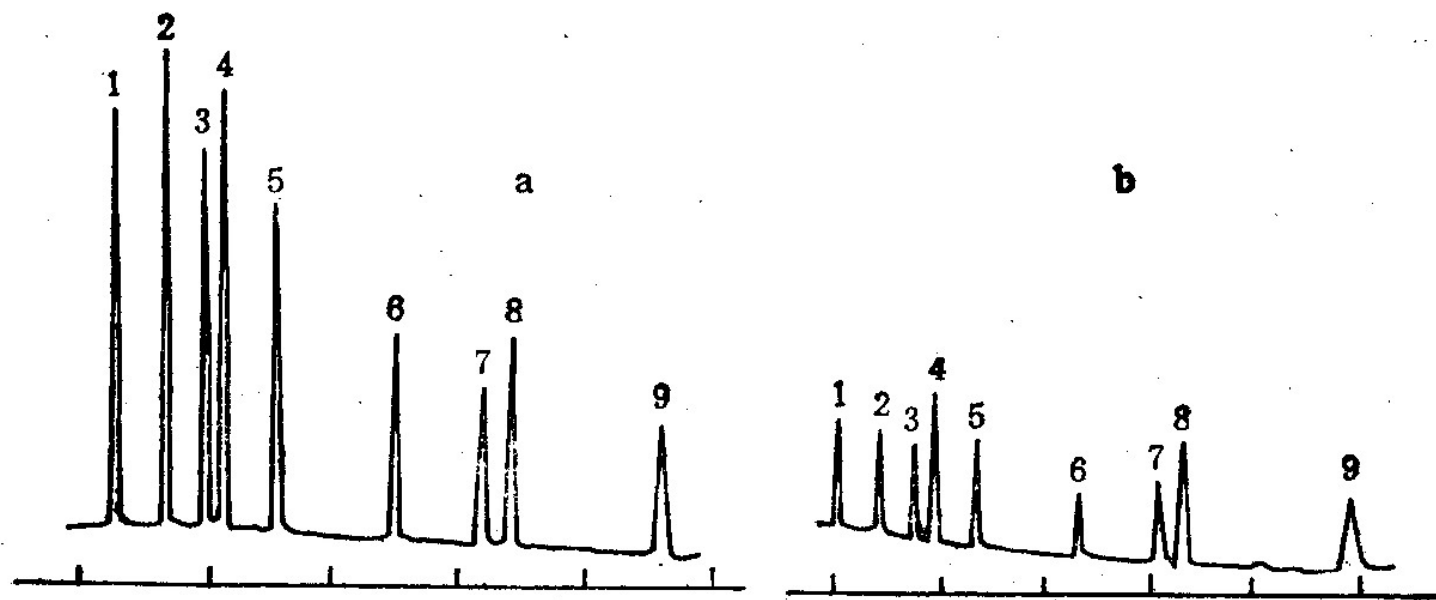


图 3.3 pH 2.5 时多肽混合物的毛细管区带电泳分离谱图

条件: 柱: a. PEG-400 交联, b. 未改性, 均为 $50\mu\text{m} \times 30\text{cm}$;
 进样: $8.0\text{kV}, 8\text{s}$; 电压: $8.0\text{kV}, (+) \rightarrow (-)$; 缓冲液: 0.1mol/L
 磷酸盐; 检测: UV, $200\text{nm}, 0.01\text{AUFS}$.

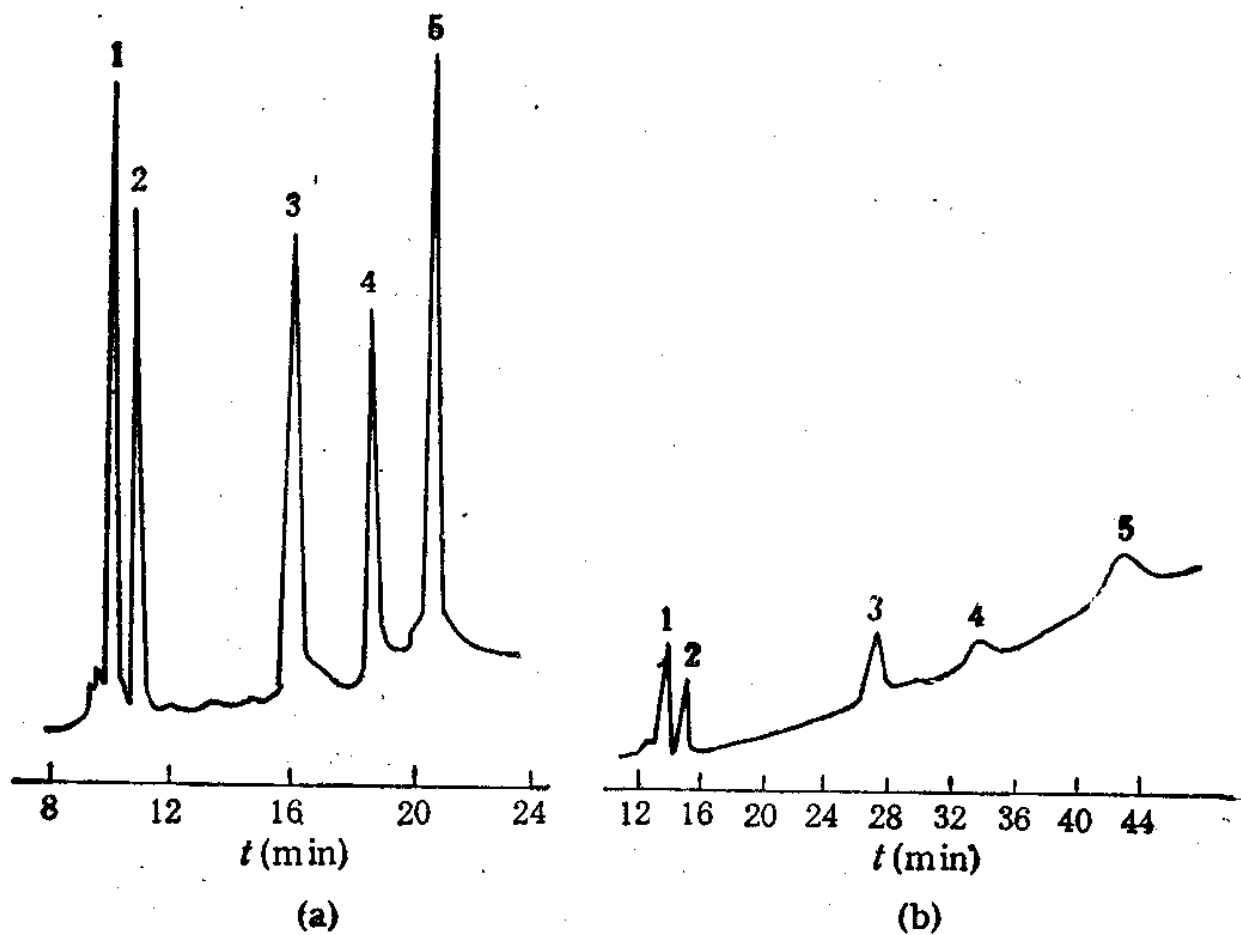


图 3.4 pH8.5 时, 5 种蛋白质的毛细管区带电泳分离图

条件: 柱: a. PEG—400 交联, b. 未改性, 均为 $50\mu\text{m} \times 30\text{cm}$;

进样: 8.0kV , 8s ; 电压: $8.0\text{kV}(-) \rightarrow (+)$; 缓冲液: 0.3mol/L

硼酸盐; 检测: UV, 200nm , 0.01AUFS .

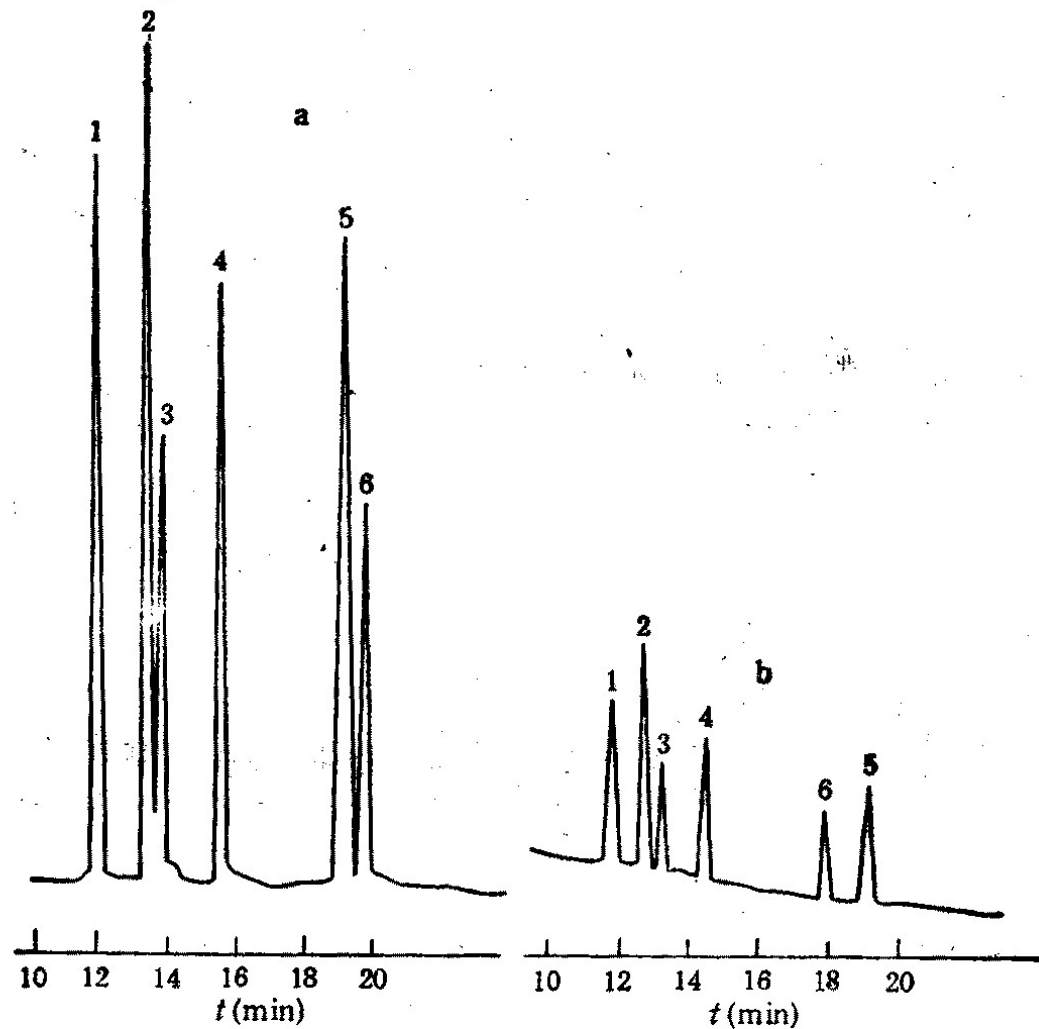


图 3.9 多肽混合物在两种毛细管柱中的区带电泳分离图

条件: 柱: a. PEG-400 柱, b. 未改性柱均为 $50\ \mu\text{m} \times 30\ \text{cm}$;
 进样: $8.0\ \text{kV}, 8\ \text{s}$; 电压: $8.0\ \text{kV}, (+) \rightarrow (-)$; 缓冲液: $\text{pH}=3.5$,
 $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸盐; 检测: UV, $200\ \text{nm}$, $0.01\ \text{AUFS}$.

动态改性

- 改变缓冲液pH值，采用极高或极低pH的缓冲液，通过消除壁和溶质的电荷差来减少库仑相互作用。通常采用的pH从2-12，电渗流在低pH时接近完全消除，在高pH时则非常快。
- 采用高缓冲液离子强度或浓度以减少库仑相互作用，这种方法通常会减少电渗流，但要受到焦耳热的限制。
- 将适当的添加剂加到运行的缓冲液中，优点是稳定，改性剂在缓冲液中，脱活过程连续产生。添加剂如各种不同的亲水性聚合物，表面活性剂等。
- **缺点：**溶质与毛细管壁表面会因此受到影响，使用表面活性剂就如同使用极端pH一样，以丧失“生理条件”作为代价；这种方法通常需要较长的平衡时间以得到一个可重复的表面和恒定的电渗流；倘若在电泳之后还有其他分析，如质谱，因这些方法对添加剂比较敏感，有可能对结果造成影响。

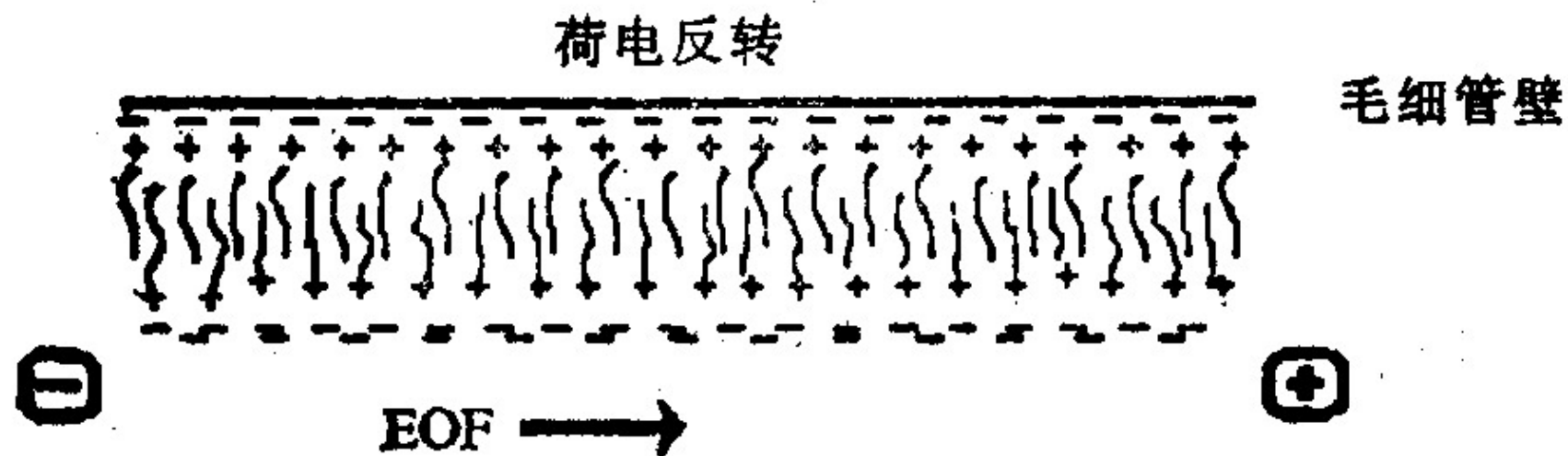


图 3.11 电渗流改向原理图

三、检测

毛细管电泳管的直径极小，产生的溶质谱带体积也极小，因此在检测器的研制中，首先面临的问题是如何解决既对溶质作灵敏的检测，又不使其微小的谱带展宽。通常采用解决办法是电泳的柱上检测，这是减小区带展宽的有效途径。采用紫外和荧光、电化学检测器，它们对被测物质的响应有特征，而对缓冲液系统无响应，因此灵敏度较高。

影响因素：内径小，光路短，光通量极微，管子的曲面使只有一部分光通过中心。

1、紫外检测器（二极管阵列）

2、荧光检测器灵敏，检测下线可达 10^{-15} mol级；激光诱导荧光检测器的灵敏度更高，但对大多数样品来说，需要衍生。

3、电化学检测器

4、质谱检测器（电喷雾质谱）

5、拉曼光谱检测器

四、进样

为了达到高效和快速的特点，毛细管电泳对进样的要求比较严格。在进样时，应当满足两方面的要求：一是进样时不能引入显著的区带扩张，二是样品量必须小于100nL，否则会造成过载。

电迁移进样：也叫电动力学进样。在这种进样方式下，毛细管的阳极端（假设电渗流朝接地端移动），先不和缓冲液接触，而直接置于样品液中，然后在很短时间内施加进样电压，使样品通过电迁移进入毛细管，在这种情况下，电迁移是溶质的电泳迁移和毛细管中电渗流带动的综合结果。

流体动力学进样：1、在进样端加压；2、在出口断减压；3、调节进样槽和出口槽之间的相对高度使之产生虹吸作用，将样品引入。

三、毛细管电泳的进样方式

injection method of HPCE

进样量：毛细管长度的1%-2%；纳升级、非常小；

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

$$\text{进样体积} = \frac{\Delta P d^4 \pi}{128 \eta L} t$$

2. 电动进样方式

毛细管一端插入样品瓶，加电压；

$$\text{进样量} = \frac{(\mu_{eo} \pm \mu_{ef})V\pi r^2 ct}{L} t$$

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。

进样注意事项

- 毛细管一经插入样品溶液，就应立即开始进样操作，并在操作完成后将其从样品槽移至运行缓冲液中，随即开始运行，否则将会产生毛细作用及虹吸现象，引起误差并使谱带展宽。
- 如果电极和毛细管接触，毛细作用可能使某些样品流进间隔，使定量精度降低，区带展宽，甚至使峰分裂。另外，样品贮器和缓冲液贮器液面的高度不平衡所产生的虹吸现象会造成进样精度的下降。
- 只要检测器能提供足够的信号，进样区带宜越小越好，加大进样区带会使柱效和分离度降低。从这个意义上讲，进样时间以短为宜，但是，时间太短常会使精度变差，特别是柱子较短或较粗，样品浓度较高时，更是如此。
- 温度也是使进样体积保持恒定的重要条件，因为温度直接影响粘度。当然，这种影响不及对迁移时间影响严重，因为样品区带只占整个体积非常小的一部分。

- 样品溶液和运行缓冲液不尽相同，样品溶液中的溶剂必须与运行缓冲液互溶，且不会引起后者沉淀。另外，前者的离子强度低于后者的离子强度。
- 关于样品溶液和缓冲液的蒸发和损耗样品溶液和缓冲液都有一个蒸发问题。

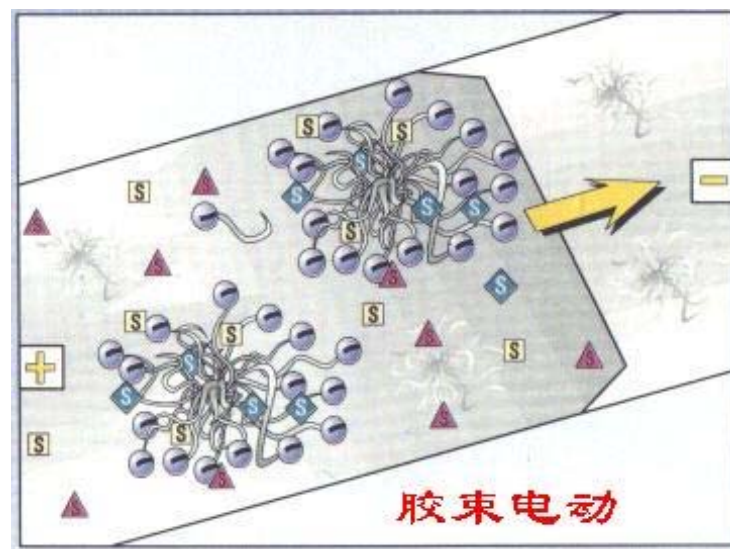
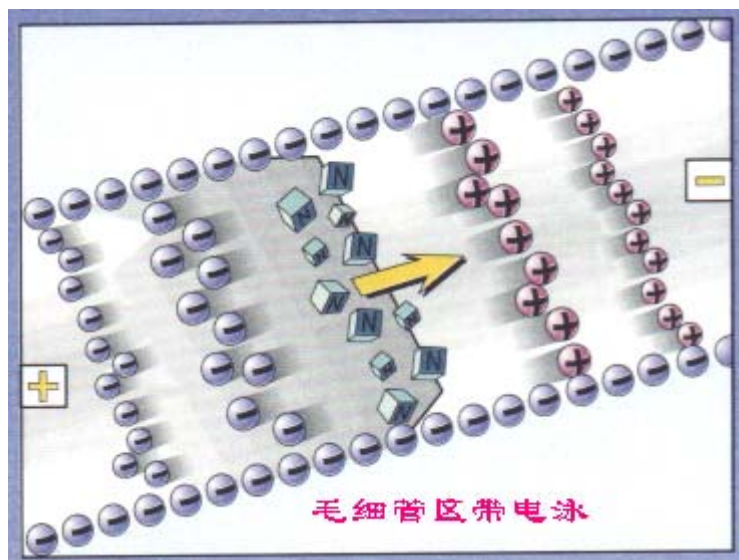
毛细管和电极的直径都比较小，需要用合适的封闭装置，以防止蒸发。通常宜测定蒸发的程度并根据运行时间的长短加以校正。除蒸发外，离子的电泳也会使缓冲液从一个槽流到另一个槽而造成损失，在这个过程中，由于水不断地电离，使电中性得以保持，但最终又会造成从一个槽到另一个槽时离子无法平衡，并使贮器中的缓冲液的pH改变，采用较大体积的缓冲液贮器或频繁地更换缓冲液有利于解决这一问题。

分离类型

八种分离类型，介绍常用的几种；

根据试样性质不同，采用不同的分离类型；

每种机理的选择性不同；



区带毛细管电泳(CZE)

- 电压：柱长确定时，随着操作电压的增大，电渗流和电泳流速度的绝对值都增大。在选择操作电压时，不进样品只改变电压，根据电流的变化，作电压-电流曲线，选择线性部分。

缓冲液种类

要求：

1. 所选择的pH范围内有很好的缓冲容量
2. 在检测波长的吸收低
3. 自身的淌度低，即分子大而荷电小，以减少电流的产生
4. 为了达到有效的进样和合适的电泳淌度，缓冲液的pH至少必须比分析物质的等电点高或低一个pH单位。
5. 只要条件允许就尽可能采用酸性缓冲液
6. 如果蛋白质的等电点低于缓冲液的pH，则极性的放置应从负-正。反之，应从正-负。

一、毛细管区带电泳

capillary zone electrophoresis, CZE

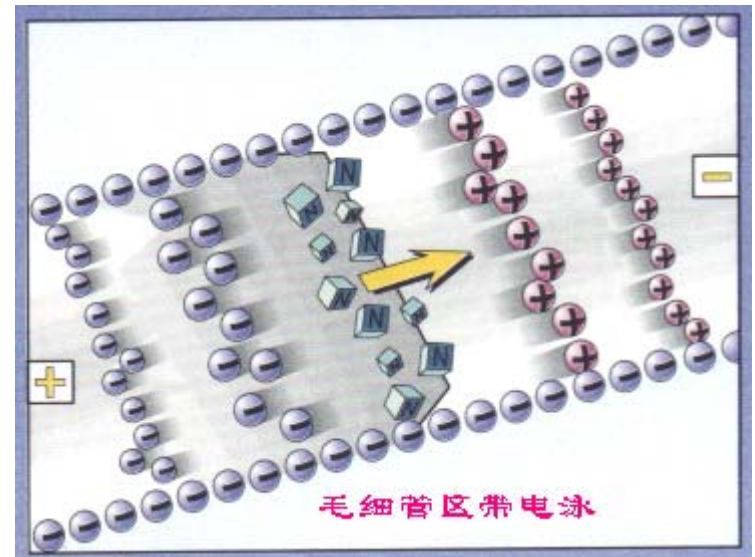
带电粒子的迁移速度=电泳和电渗流速度的矢量和。

正离子：两种效应的运动方向一致，在负极最先流出；

中性粒子：无电泳现象，受电渗流影响，在阳离子后流出；

阴离子：两种效应的运动方向相反； $v_{\text{电渗流}} > v_{\text{电泳}}$ 时，阴离子在负极最后流出，在这种情况下，不但可以按类分离，同种类离子由于差速迁移被相互分离。

最基本、应用广的分离模式；



缓冲液的pH

- 对于两性电介质，它的表观电荷数受到缓冲液pH的影响，不同pH对应不同的电荷，因此有不同的质荷比。质荷比的变化涉及到电荷密度的变化，它将对迁移带来很大的影响。在缓冲液的pH低于溶液的pI时，溶质带正电，朝阴极迁移，和电渗同向，因此粒子迁移的总速度较电渗还快。反之，则情况相反。
- 除影响溶质本身外，pH的改变还会引起电渗的相应变化。因此要对分离条件进行优化。在高pH下，电渗很大，流出次序为阳离子、中性分子和阴离子。

缓冲液的浓度

缓冲液浓度是一个很重要的指标，它的作用比较复杂，有利有弊。增加浓度，使离子强度增加，因此明显改变缓冲液的容量，减少溶质和管壁之间、被分离的粒子和粒子之间的相互作用，从而改善分离。

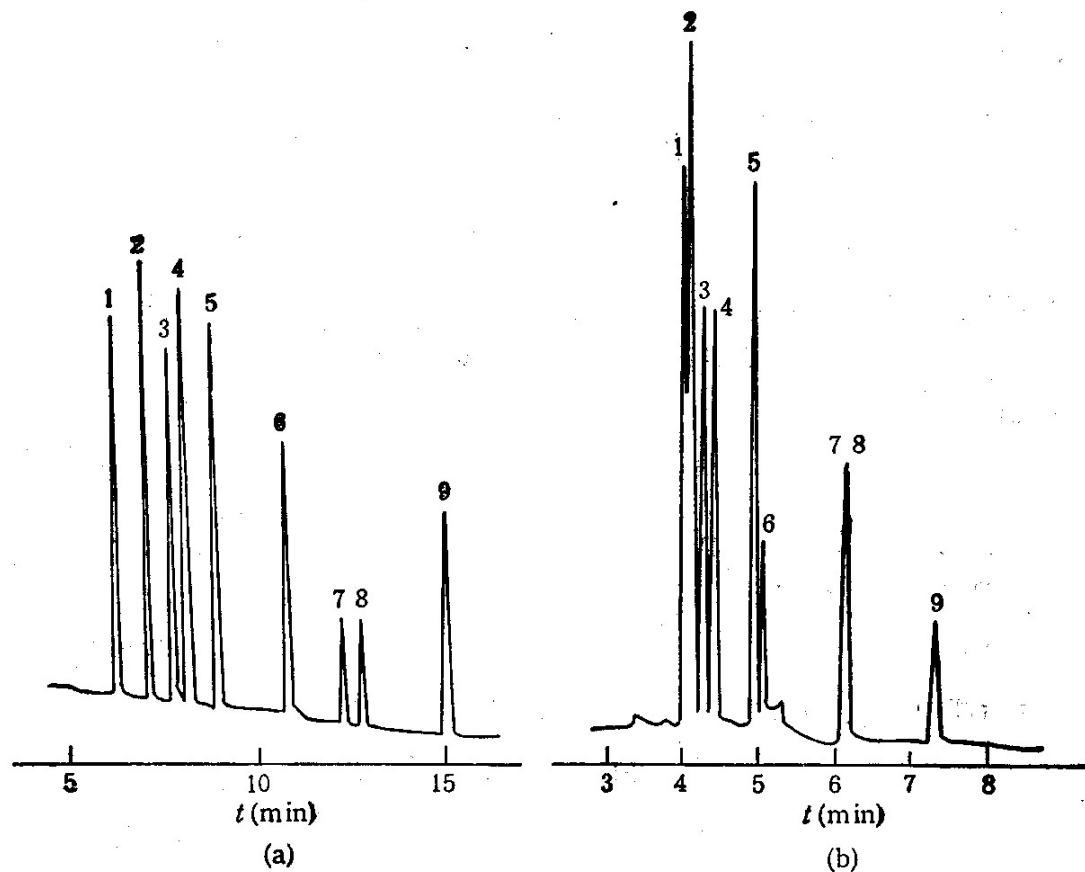


图 6.2 9 个肽混合样在 pH2.5(a) 和 pH6.9(b) 时的图谱

条件

样品: 肽;

毛细管: H5-1, 自制涂渍 28cm × 50 μ m;

电压: 11kV;

缓冲液: 0.1mol/L 磷酸盐 pH2.5;

检测: UV, 200nm, 0.02AUFS.

条件

样品: 肽;

毛细管: H5-1, 自制涂渍 28cm × 50 μ m;

电压: 11.0kV;

缓冲液: 磷酸盐混合物, pH6.9;

检测: UV, 200nm, 0.02AUFS.

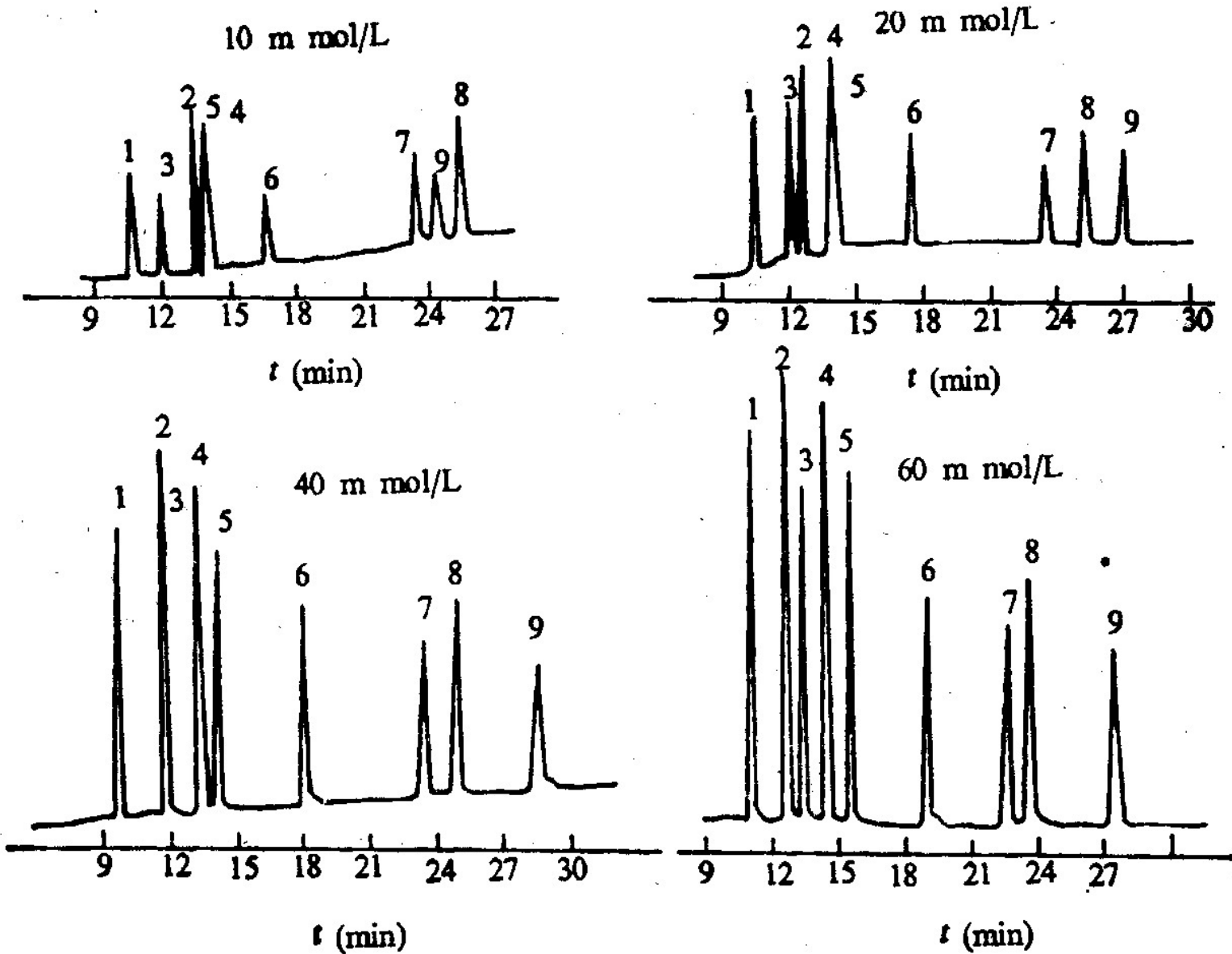


图 6.5 磷酸盐浓度对肽类样品分离的影响(条件同图 6.4)

添加剂

- 添加剂是毛细管电泳中一个十分重要的控制因素，表面活性剂和有机溶剂是最常用的添加剂。

温度

在毛细管电泳中，温度对迁移的影响主要通过粘度体现。温度控制的主要目的是保持柱温恒定，在某种意义上是焦耳热的恒定，温度增加，粘度减小，淌度增大。

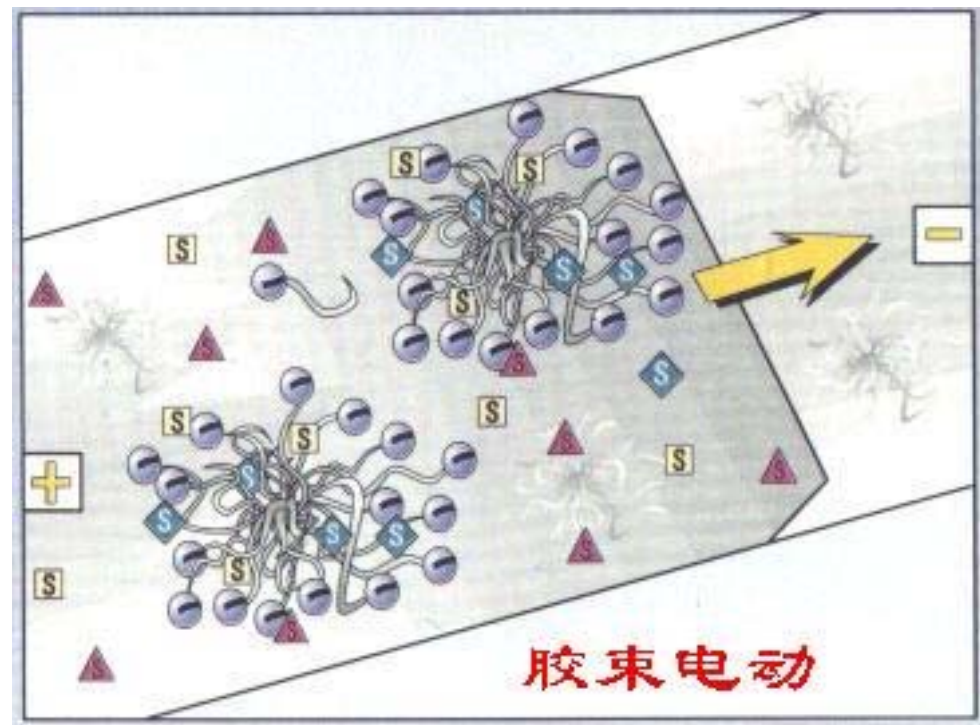
胶束电动毛细管电泳(MECC或MEKC)

- 1984年由Terabe提出。
- 在MECC中，通常是将离子型表面活性剂加入到缓冲液中，如果浓度足够的大，则表面活性剂的单体就结合在一起，形成一个球体，称之为胶束。这种“足够大浓度”即胶束的临界浓度。在MECC中，实际上存在着类似色谱的两相，一是流动的水相，另一是起固定相作用的胶束相，溶质在两相之间分配，由其在胶束中不同的保留能力而产生不同的保留。
- 与毛细管区带电泳一样，由于缓冲液在靠近管壁处形成的正电，使其显示出强烈的电渗流向阴极移动。对于SDS胶束，由于其外壳带很大的负电荷，本应以较大的淌度朝阳极移动，但在一般情况下，电渗流的速度大于胶束的迁移速度，这就迫使胶束最终以较低的速度向阴极移动。
- 由此可见，胶束电动力学色谱有别于普通色谱的一个重要特性为它的“固定相”是移动的，这种移动的“固定相”又被称之为“准固定相”。

三、 胶束电动毛细管色谱 (MECC, MEKC) micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC

1. 缓冲溶液中加入离子型表面活性剂，其浓度达到临界浓度，形成一疏水内核、外部带负电的胶束。

在电场力的作用下，胶束在柱中移动。

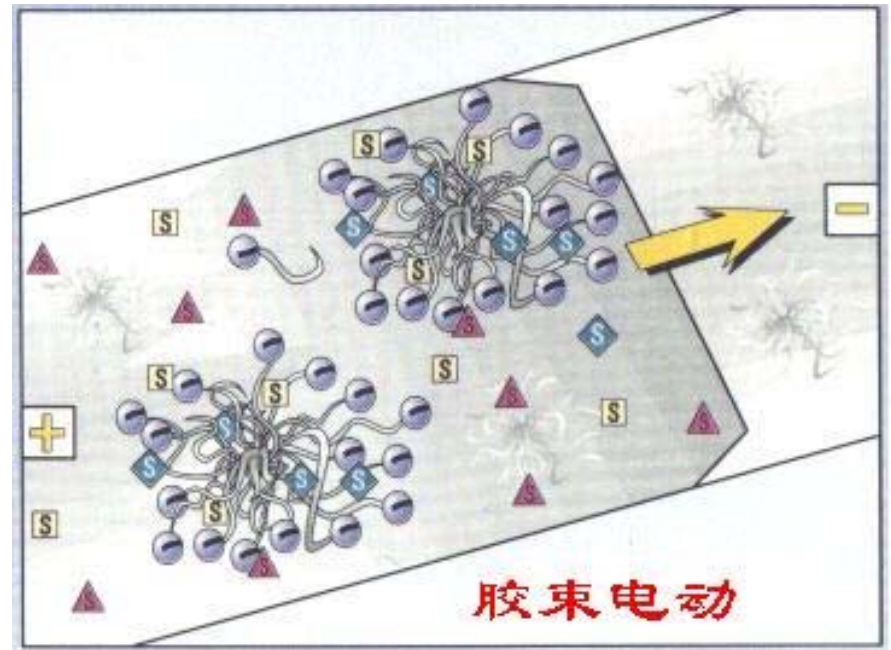


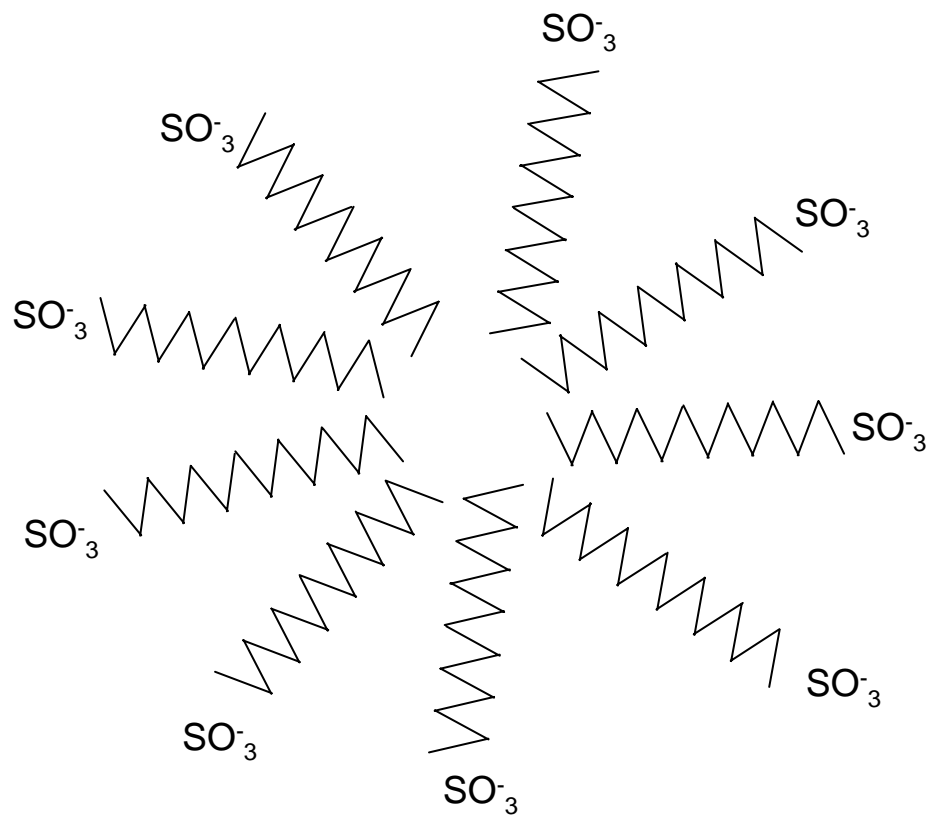
2. 电泳流和电渗流的方向相反，且 $v_{\text{电渗流}} > v_{\text{电泳}}$ ，
负电胶束以较慢的速度向负极移动；

3. 中性分子在胶束相和溶液（水相）间分配，疏水性强的组分与胶束结合的较牢，流出时间长；

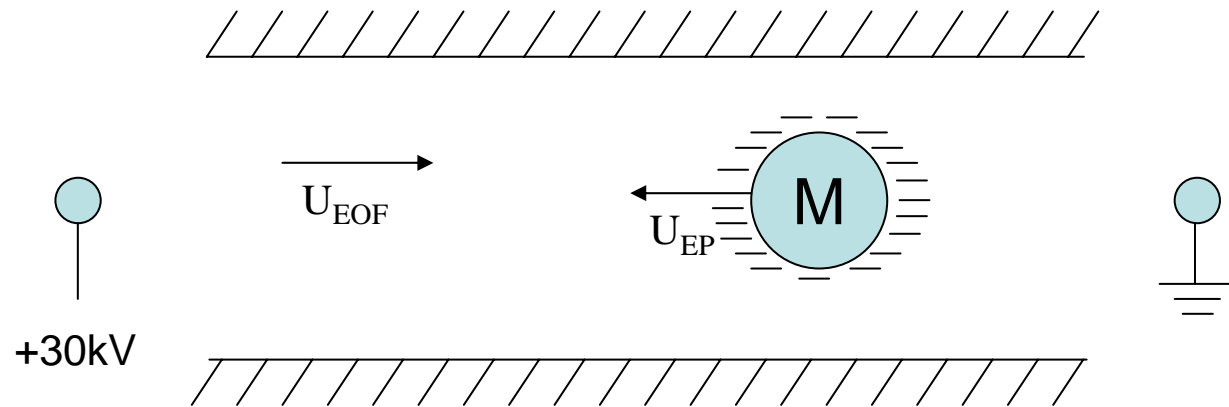
4. 可用来分离中性物质，扩展了高效毛细管电泳的应用范围；

5. 色谱与电泳分离模式的结合。





SDS胶束的结构



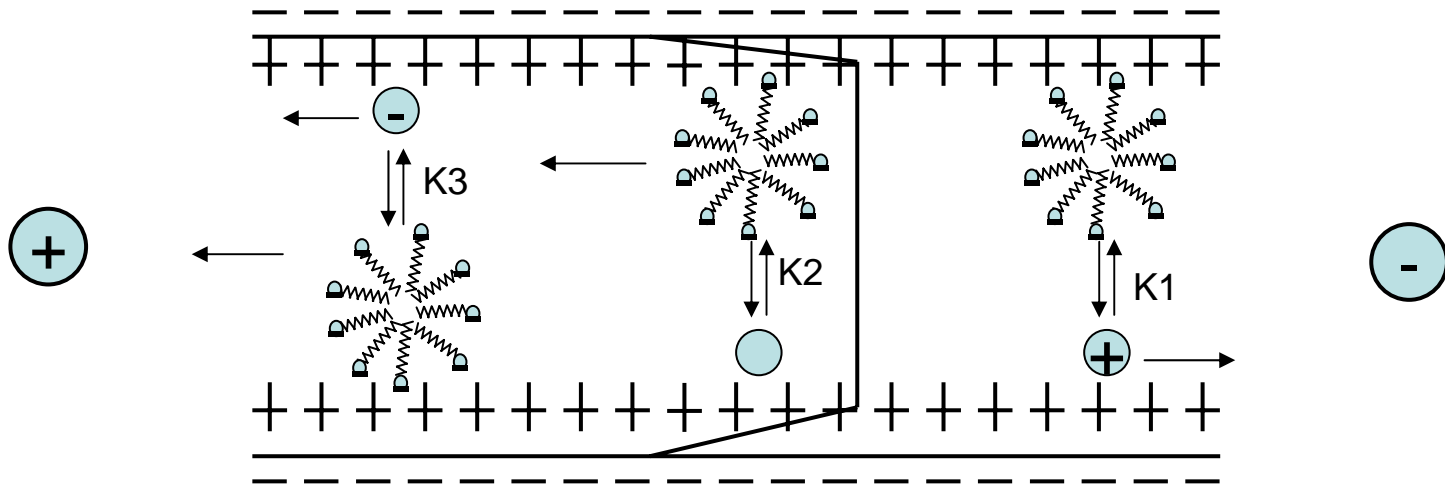
电动力学色谱中胶束的移动

在胶束电动力学色谱中，中性粒子根据本身疏水性的不同而达到分离。具有不同疏水性的粒子与胶束的相互作用不同，疏水性强的作用力就大，其留在胶束中的时间就长，因胶束相的绝对速度很小，故组分的保留时间就长，反之组分较多地停留在缓冲液中按电渗的速度移动，因此，保留时间较短。以上所述为使用阴离子表面活性剂的情况，如果使用阳离子表面活性剂则情况相反。

机 理

在MECC中存在有两相，一相是以胶束形式存在的准固定相，另一相是作为载体的液体，又称流动相，试样中的组分在MECC中的分离，从本质上来说，是由它们的分子和胶束相及流动相分子之间的相互作用的差异造成的，而这种差异是通过分配系数的差异来反映的。

具体地讲，溶质在毛细管柱内受到两种力，一是胶束对它的作用力，二是流动相的溶解力，即溶质处于两个作用力场的平衡之中，作用力强，溶解力差时，溶质有较大的保留，反之，则较早流出毛细管柱。



电动力学色谱原理示意图

毛细管筛分电泳

- 以凝胶等具有筛分功能的物质为介质，流经凝胶的物质原则上是按照分子大小进行分离的，即服从筛分机理的毛细管电泳，称之为毛细管筛分电泳。
- 用于DNA测序

二、毛细管凝胶电泳

capillary gel electrophoresis , CGE

将聚丙烯酰胺等在毛细管柱内交联生成凝胶。

其具有多孔性，类似分子筛的作用，试样分子按大小分离。能够有效减小组分扩散，所得峰型尖锐，分离效率高。

蛋白质、DNA等的电荷/质量比与分子大小无关，CZE模式很难分离，采用CGE能获得良好分离，DNA排序的重要手段。

特点：抗对流性好，散热性好，分离度极高。

无胶筛分技术：采用低粘度的线性聚合物溶液代替高粘度交联聚丙烯酰胺。柱便宜、易制备。

毛细管等电聚焦

- 当缓冲液的pH等于蛋白质的pI时，蛋白质分子的表现电荷数为零，不同蛋白质的等电点不同。如果蛋白质处在pH和等电点一致的介质中而介质不受电渗的推动，则迁移就停止。如果介质内的pH是位置的函数，或者说有一个pH的位置梯度，那么有可能使有不同等电点的分子分别聚集在不同的位置上，不作迁移而彼此分离，这就是等电聚焦过程，毛细管等电聚焦过程是在毛细管内实现的。

四、毛细管等电聚焦

capillary isoelectric focusing, CIEF

1. 根据等电点差别分离生物大分子的高分辨率电泳技术；
2. 毛细管内充有两性电解质（合成的具有不同等电点范围的脂肪族多胺基多羧酸混合物），当施加直流电压（6~8V）时，管内将建立一个由阳极到阴极逐步升高的pH梯度；
3. 氨基酸、蛋白质、多肽等的所带电荷与溶液pH有关，在酸性溶液中带正电荷，反之带负电荷。在其等电点时，呈电中性，淌度为零；

4. 聚焦：具有不同等电点的生物试样在电场力的作用下迁移，分别到达满足其等电点pH的位置时，呈电中性，停止移动，形成窄溶质带而相互分离；

5. 阳极端装稀磷酸溶液，阴极端装稀NaOH溶液；

6. 加压将毛细管内分离后的溶液推出经过检测器检测；

7. 电渗流在CIEF中不利，应消除或减小。

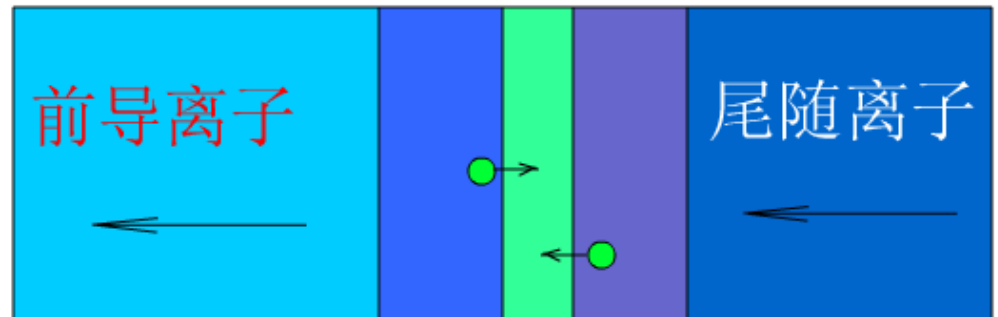
毛细管等速电泳

- 毛细管等速电泳是一种“移动边界”电泳技术，它采用两种不同的缓冲液系统，一种是前导电介质，充满整个毛细管柱，另一种称尾随电介质，置于一端的电泳槽中，前者的淌度高于任何样品组分，后者则低于任何样品组分，被分离的组分按其不同的淌度夹在中间，以同一个速度移动，实现分离。

五、毛细管等速电泳

capillary isotachopheresis , CITP

1. 将两种淌度差别很大的缓冲液分别作为前导离子(充满毛细管)和尾随离子, 试样离子的淌度全部位于两者之间, 并以同一速度移动。
2. 负离子分析时, 前导电解质的淌度大于试样中所有负离子的。所有试样都按前导离子的速度等速向阳极前进, 逐渐形成各自独立的区带而分离。阴极进样, 阳极检测。

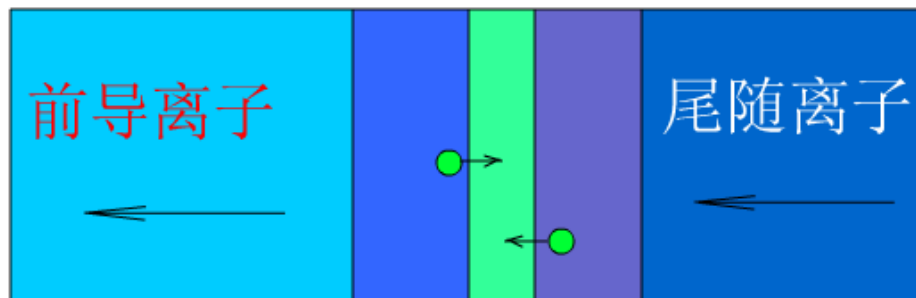


capillary isotachopheresis , CITP

3. 不同离子的淌度不同，所形成区带的电场强度不同 ($v = \mu E$)，淌度大的离子区带电场强度小；

沿出口到进口，将不同区带依次排序1、2、3、4...
· 电场强度依次增大。假设“2”号中离子扩散到“3”号，该区电场强度大，离子被加速，返回到“2”区；当“2”号中离子跑到“1”号区，离子被减速使之归队；

4. 特点：界面明显，富集、浓缩作用；



六、毛细管电渗色谱

capillary electroosmotic chromatography , CEC

在毛细管壁上键合或涂渍高效液相色谱的固定液，以电渗流为流动相，试样组分在两相间的分配为分离机理的电动色谱过程；

一、离子分析

analysis of ion

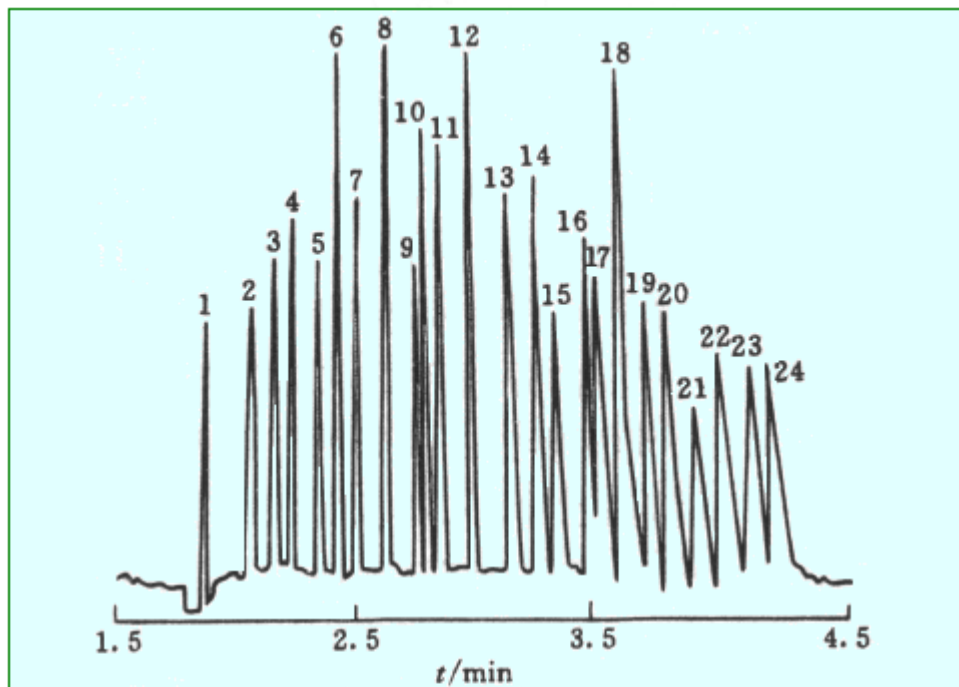
阳离子分析

迁移方向和电渗流方向一致；

4.5min内分离了24种金属离子；

阳极进样，阴极检测；

具有很高的灵敏度；



HPCE 分离多种金属离子

分离条件：36.5cm×75μm i. d.，35kV；

缓冲溶液：1mmol·L⁻¹ 4-甲基苄胺+15mmol·L⁻¹ 乳酸 (pH4.8)；

检测：阴极端，UV214nm 间接检测。

出峰顺序：1—K⁺；2—Ba²⁺；3—Sr²⁺；4—Ca²⁺；5—Mg²⁺；6—Mn²⁺；
7—Cd²⁺；8—Co²⁺；9—Pb²⁺；10—Ni²⁺；11—Zn²⁺；
12—La³⁺；13—Ce³⁺；14—Pr³⁺；15—Nd³⁺；16—Sm³⁺；
17—Gd³⁺；18—Cu²⁺；19—Dy³⁺；20—Ho³⁺；21—Er³⁺；
22—Tm³⁺；23—Yb³⁺；24—Lu³⁺。

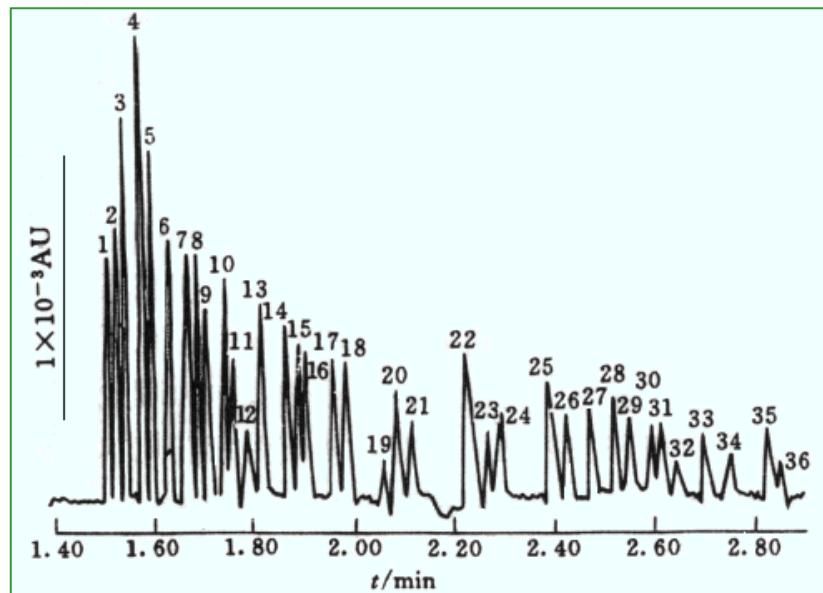
阴离子分析

阴离子电泳方向和电渗流方向相反、速度接近，分析时间长、效率低；

质量小、电荷密度大的离子如： SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 F^- 等，电泳速率大于电渗流，阳极端流出，在阴极端无法检测；

加入电渗流改性剂，十六烷基三甲基溴化胺等，使电泳方向和电渗流方向一致，可在3.1min内分离36种阴离子；阴极进样，阳极检测；

离子价态及存在形态分析；



CZE 分离 36 种阴离子

毛细管柱：60cm×50 μm i. d. 工作电压：-30kV

缓冲溶液：5mmol·L⁻¹铬酸盐+0FM-BT (pH8.0)

检测：阳极端，UV254nm 间接检测

- 1— $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ； 1— Br^- ； 3— Cl^- ； 4— SO_4^{2-} ； 5— NO_2^- ； 6— NO_3^- ；
7—钼酸根； 8—叠氮化物； 9— WO_4^{2-} ； 10—氟磷酸根；
11— ClO_3^- ； 12—柠檬酸根； 13— F^- ； 14—甲酸根； 15—磷酸根；
16—亚磷酸根； 17—次氯酸根； 18—戊二酸根； 19—邻苯二甲酸根；
20—半乳糖二酸根； 21—碳酸根； 22—乙酸根； 23—氯乙酸根；
24—乙基磺酸根； 25—丙酸根； 26—丙基磺酸根； 27—天冬酸根；
28—巴豆酸根； 29—丁酸根； 30—丁基磺酸根； 31—戊酸根；
32—苯甲酸根； 33—L-谷氨酸根； 34—戊基磺酸根；
35—d-葡萄糖酸根； 36—d-半乳糖醛酸根。

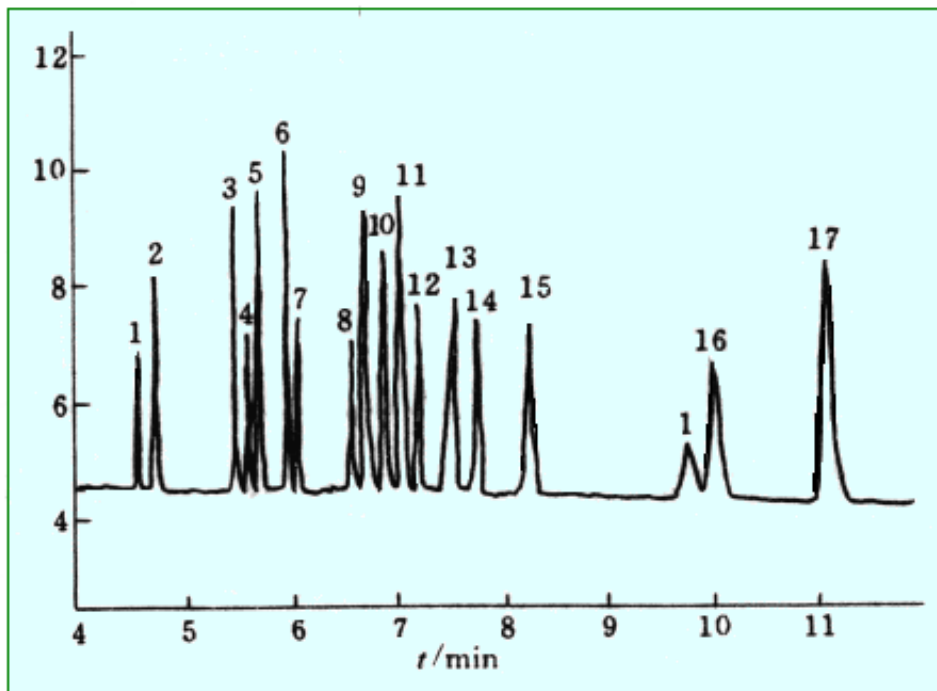
二、药物分析

analysis of pharmaceuticals

检测体液或细胞中某些代谢产物的分析；

尿液中的氨基酸含量作为临床诊断糖尿病的辅助手段；

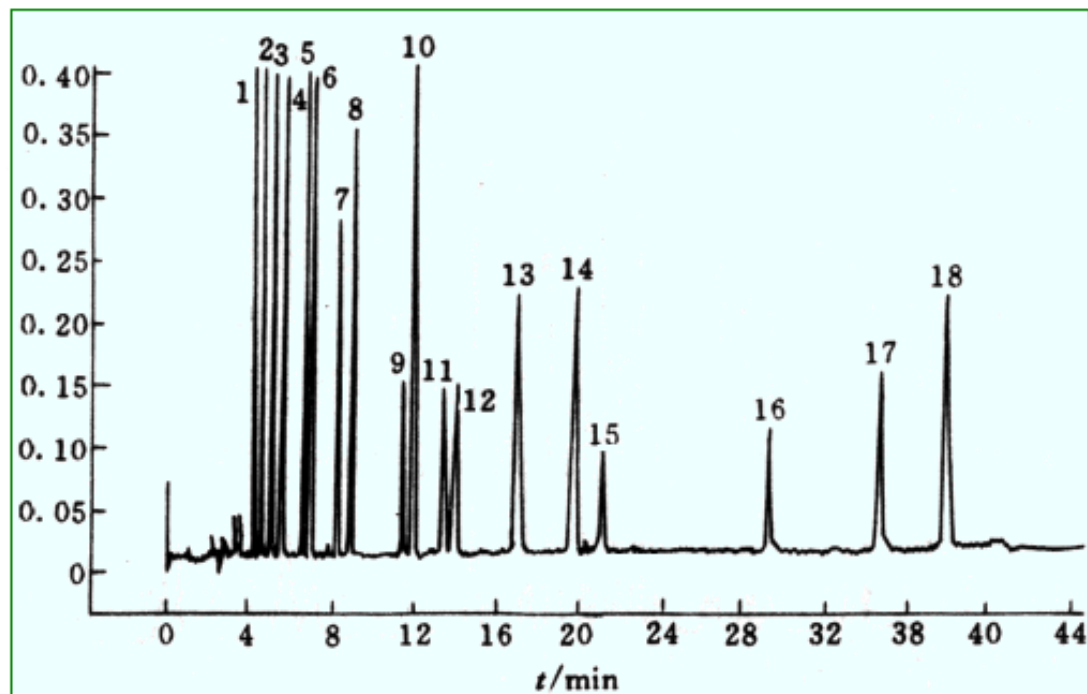
采用毛细管区带电泳方式，在11min内分离17种药物；



毛细管电泳分离 17 种药物混合物

出峰顺序：1—噻吩甲吡胺；2—溴苯吡胺；3—苯丙胺；
4—去甲麻黄碱；5—普鲁卡因；6—四氢萘唑啉；7—苯甲马琳；
8—对胺苯酸二丁胺丙酯；9—去氧安定；10—利多卡因；
11—可待因；12—乙酸丙嗪；13—氯苯甲嗪；14—安定；
15—吗乙苯吡酮；16—苯佐卡因；17—安眠酮。

采用MEKC模式，
鉴定违禁药物；
效果优于HPLG法



MEKC 用于法庭鉴定违禁药物

毛细管柱：27cm×50 μ m i. d. 有效长度 25cm；

背景电解质溶液：8.5mmol/L 磷酸盐+8.5mmol/L 硼砂
+85mmol/L SDS+15%乙腈，pH8.5；

工作电压：20kV； 检测：210nm；

1—西洛西宾；2—吗啡；3—苯巴比妥；4—二甲-4-羟色胺；
5—可待因；6—安眠酮；7—麦角酰二乙胺；8—海洛因；
9—苯丙胺；10—利眠宁；11—可卡因；12—去氧麻黄碱；
13—氯羟去甲安定；14—安定；15—芬太尼；16—五氯酚；
17—大麻二酚；18—四氢大麻酚。

三、手性化合物分析

analysis of chiral compounds

合成获得单一手性化合物相当困难；528种手性合成药物，61中以单一对映体形式销售，其他为外消旋体；检测分析也相当困难；研究热点；

R-反应停是安眠药，S-式致胎儿畸形；

HPCE分离分析手性化合物的方法：加入手性选择剂；
形成配合物的稳定常数有差异，结合HPCE的高效率；

常用手性选择剂：环糊精及其衍生物；手性冠醚；手性表面活性剂（氨基酸衍生物、胆酸钠、牛磺脱氧胆酸及其钠盐、低聚糖等天然手性表面活性剂）

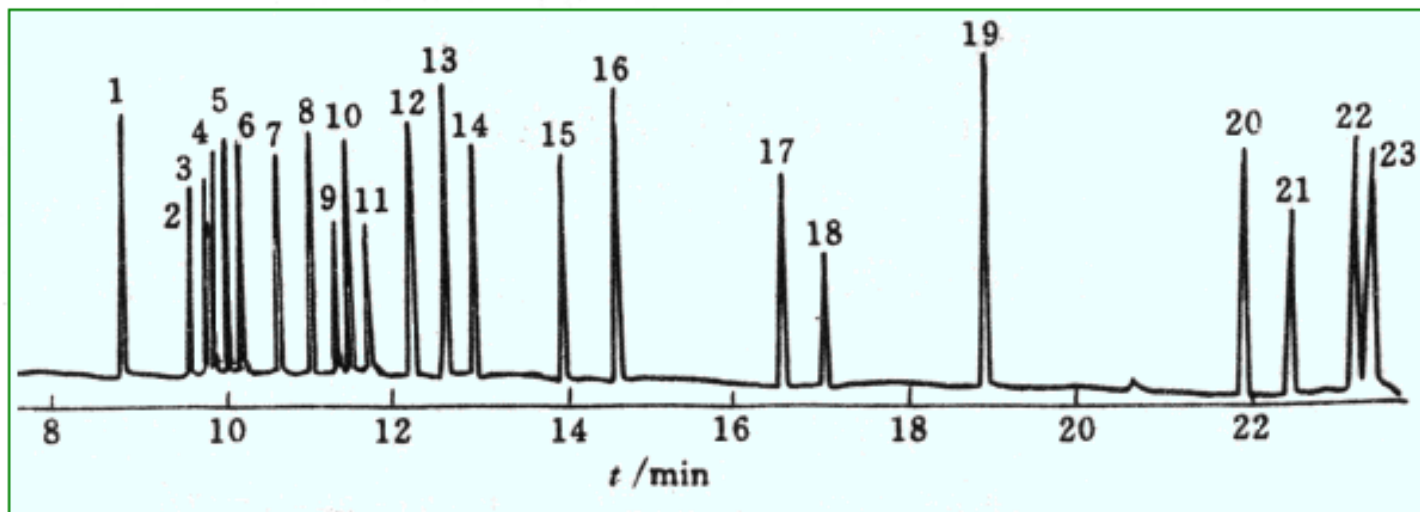
四、氨基酸与蛋白质分析

analysis of amino acids

采用MEKC模式，在25分钟内分离了23种丹酰化氨基酸；

HPCE可取代传统的氨基酸分析仪；

问题：吸附和检测；

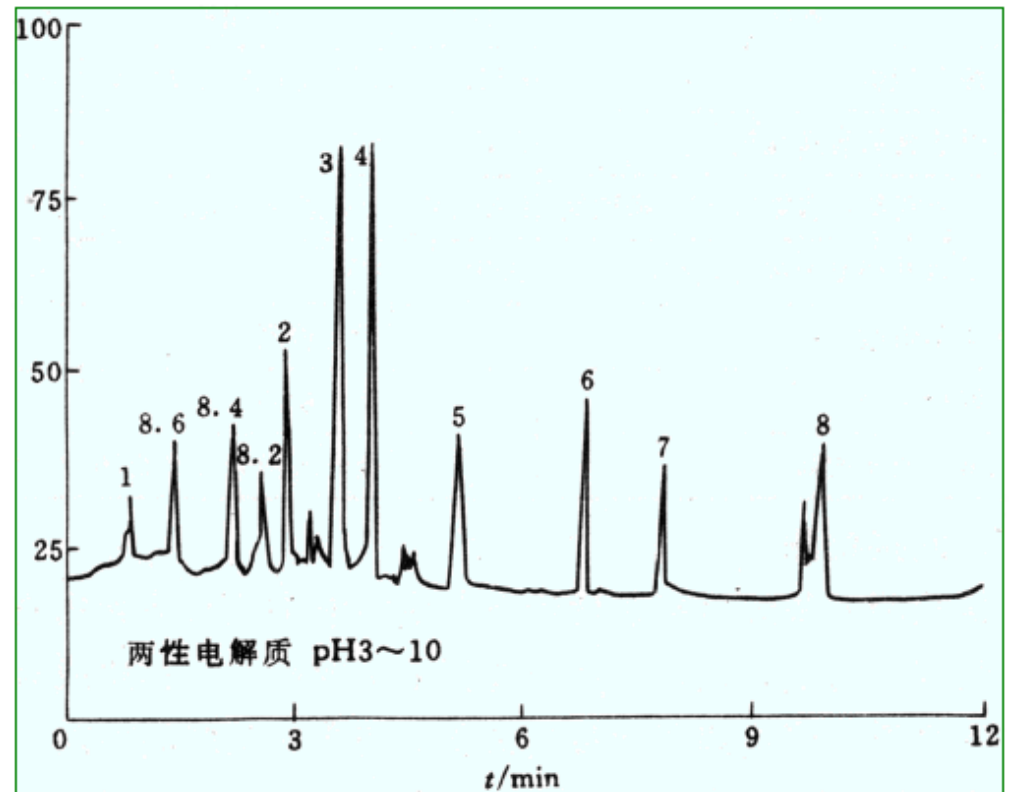


MEKC 高效分离 23 种丹酰化氨基酸的图谱

背景电解质溶液：20mmol/L 硼砂加 100mmol/L SDS；

检测波长：214nm；电泳中控制温度在 10℃。

蛋白质分析



毛细管等电聚焦分离蛋白质混合物的图谱

毛细管柱：14cm×0.1mm i. d. 的聚丙烯酰胺涂层毛细管；

等电聚焦介质：2%Bio-LYTE5/7，PI3~10；

聚焦电压：4kV/cm；检测波长：280nm；

峰序：8.6、8.4、8.2—分别代表流出的两性电解质；1—外源凝集素

2—人血红蛋白 A (7.5)；3—人血红蛋白 A (7.1)；4—马肌

红蛋白 (7.0)；5—马肌红蛋白 (6.8)；6—人碳酐酶 (6.5)；

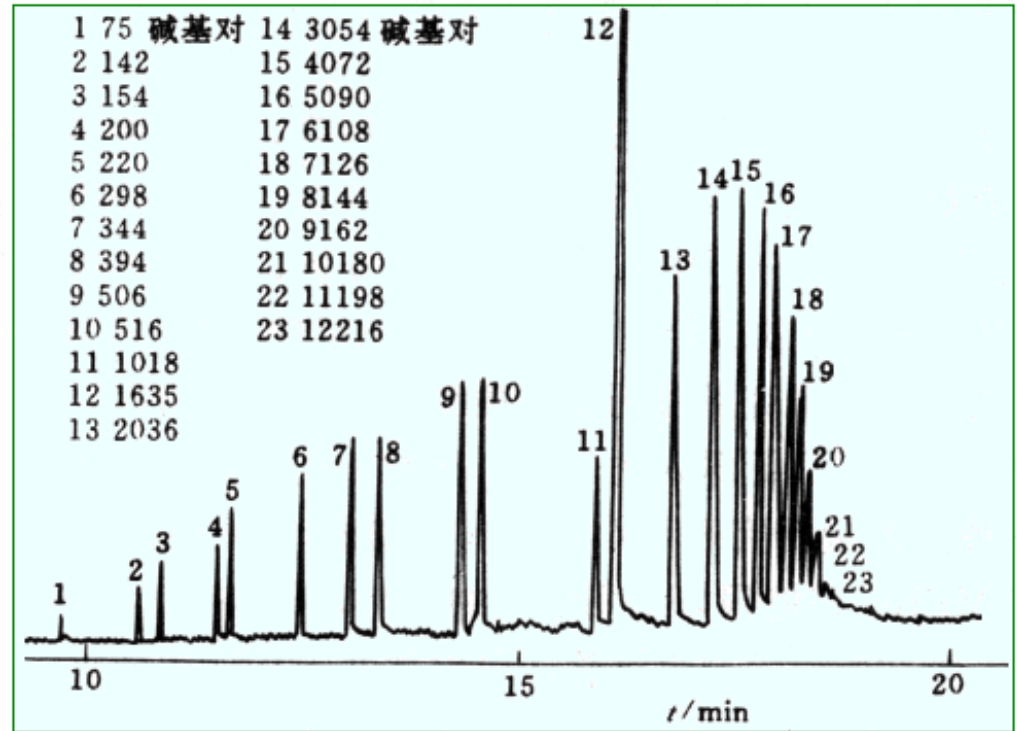
7—牛碳酐酶 (6.0)；8— β -乳球蛋白 B (5.1)。

五、核酸分析及DNA排序

analysis of nucleic acids and sequence of DNA

重要分析手段；

图，酶解的双螺旋DNA限制性片段的分离；



CGE 模式分离碱基对相差 1000 倍的 DNA 的图谱

毛细管：聚丙烯酰胺涂层毛细管 40cm×75μm i. d.，有效长度 30cm；

凝胶是二度交联的聚丙烯酰胺（3%T，0.5%C）；

流动相：100mmol/L Tris-硼砂缓冲溶液，pH8.3；

电场强度：250V/cm；电流 12.5μA；检测波长：260nm。

六、新进展

advances and special topics

1. 微型化

整体化学分析系统（TAS）及TAS微型化

在硅片上光刻出矩形槽作为毛细管，理论塔板数 $10^5/m$ ；

2. 联用仪器

CE-MS；

3. 阵列毛细管凝胶电泳

应用于人类基因DNA测序；

5~10万个基因，30亿个碱基对，目前最有效的DNA序列分析仪，10小时/次；可同时电泳24个样品；速度1200碱基对/小时，提高速度！

100支毛细管阵列电泳；速度280碱基对/小时/支