

# 毛细管电泳

傅小芸 吕建德 编著

浙江大学出版社

# 毛细管电泳

傅小芸 吕建德 编著



浙江大学出版社

## 内容提要

本书系统地阐述了毛细管电泳的理论,以及各种分离模式、仪器、技术和应用。全书共分十一章,包括绪论、基础理论、自由溶液毛细管电泳、毛细管离子分析、毛细管胶束电动色谱、毛细管凝胶电泳、毛细管等电聚焦、毛细管等速电泳、毛细管电泳检测方法、仪器和操作及毛细管电泳在蛋白质、肽、核(苷)酸、各种有机化合物、手性化合物、无机和有机小分子离子分离分析中的应用。

本书可供从事分析化学、生物化学以及其它使用毛细管电泳的科学工作者参考,也可作为有关专业的研究生和高年级本科生毛细管电泳的教材或参考书。

## 毛细管电泳

傅小芸 吕建德 编著

(杭州玉古路 20 号 邮政编码 310027)

浙江大学出版社电脑排版中心排版

德清第二印刷厂印刷

浙江省新华书店发行

\*

850×1168 32 开 9 印张 250 千字

1997 年 4 月第 1 版 1997 年 4 月第 1 次印刷

印数 0001—1000

ISBN 7-308-01886-5/O · 199 定价:9.50 元

## 序

毛细管电泳正以飞快的速度在发展。本书的问世,对于毛细管电泳工作者及广大的分析化学、生物化学和医药等领域的工作者都是一件值得庆幸的事。

自从 1981 年 J. W. Jorgenson 取得重大突破以后,毛细管电泳就走上了康庄大道。作者自 1986 年起即开始毛细管电泳的研究,特别是在毛细管胶束电动色谱方面卓有成就,在自由溶液毛细管电泳和等速电泳方面也有丰富的经验。这本书汇集了作者在浙江大学教授毛细管电泳的多年经验,也包含了作者长期的研究成果,有它自己的特色。相信这本书的出版,会给我国的毛细管电泳事业增添活力。

中国科学院化学研究所

竺安

1996 年 8 月

# 前 言

毛细管电泳是 80 年代初迅速发展起来的新型分离分析技术,它具有高效、快速、低消耗、应用广及易于自动化的特点,已在生物、化学、医药、临床、环保和食品等领域中显示了它独特的优点以及良好的应用前景。我国是开展毛细管电泳研究较早的国家之一,近年来已在毛细管电泳的基础理论、仪器技术和各领域的应用等方面开展了相当深度的研究工作,取得了可喜的成绩。自 1990 年起,我国引进了毛细管电泳仪,几年来,仪器数量迅速增加,应用范围日趋扩大。但是,目前国内尚无毛细管电泳的专著,为了促进毛细管电泳技术的发展和推广应用,我们撰写了“毛细管电泳”一书,供各相关领域的科技工作者和大学的师生参阅。

本书是作者近几年来,在浙江大学讲授毛细管电泳的教材基础上编写而成,并结合了作者自 1986 年至今在毛细管电泳的理论、技术和应用方面取得的科研成果和实践经验。全书较系统、全面地阐述了毛细管电泳的基础知识和仪器技术,着重讨论了毛细管电泳的关键问题,反映了毛细管电泳的发展概况,提供了研究工作必要的理论依据,并以较大的篇幅介绍毛细管电泳在各个领域的主要应用,各章均附有参考文献。

本书承中国科学院北京化学研究所研究员、浙江大学兼职教授竺安先生在百忙之中认真审阅全书,提出许多宝贵意见,并为本书撰写序言。在本书写作过程中,本单位有关领导及专家给予了热情鼓励 and 大力支持。谨在此一并深致谢意。

诚然,作者的愿望是把毛细管电泳的知识和经验奉献给读者,但限于水平,书中缺点和错误在所难免,恳请读者批评指正。

作者谨以本书向浙江大学校庆 100 周年献礼!

作 者  
1996 年 9 月于杭州

# 目 录

## 第一章 绪 论

§ 1.1 电泳发展简史 .....	1
§ 1.2 电泳分类 .....	3
§ 1.3 毛细管电泳特点 .....	5
1.3.1 毛细管电泳与常规电泳比较 .....	5
1.3.2 毛细管电泳与高效液相色谱比较 .....	6
1.3.3 毛细管电泳特点 .....	7
参考文献 .....	8

## 第二章 基础理论

§ 2.1 电泳 .....	9
§ 2.2 电渗及电渗控制 .....	11
2.2.1 电渗 .....	11
2.2.2 电渗的控制 .....	14
§ 2.3 毛细管电泳原理 .....	17
2.3.1 分离原理 .....	17
2.3.2 迁移时间和迁移率 .....	18
§ 2.4 柱效和分辨率 .....	19
2.4.1 扩散与理论板数 .....	19
2.4.2 分辨率 .....	21
§ 2.5 焦耳热和电场强度优化 .....	22
2.5.1 焦耳热和温度梯度 .....	22
2.5.2 温度梯度曲线引起的方差 .....	25
2.5.3 焦耳热和温度梯度的控制 .....	26
2.5.4 电场强度优化 .....	27
§ 2.6 影响柱效的其它因素 .....	28
2.6.1 影响柱效的因素 .....	28

2.6.2	进样区带宽度·····	29
2.6.3	溶质—毛细管壁相互作用·····	30
2.6.4	电扩散作用·····	32
	<b>参考文献</b> ·····	34
<b>第三章 自由溶液毛细管电泳(FSCE)</b>		
§ 3.1	电泳迁移率·····	35
3.1.1	迁移率与分子体积的关系·····	35
3.1.2	缓冲溶液离子对溶质有效电荷和迁移率的影响·····	36
3.1.3	迁移率的测定·····	38
§ 3.2	影响分离的主要因素·····	40
3.2.1	溶质的体积和电荷·····	40
3.2.2	缓冲溶液·····	43
3.2.3	其它操作条件对分离的影响·····	47
§ 3.3	缓冲溶液添加剂·····	49
3.3.1	添加剂的类型·····	49
3.3.2	表面活性剂·····	50
3.3.3	络合剂·····	50
3.3.4	环糊精·····	51
§ 3.4	毛细管壁修饰·····	54
3.4.1	键合相和涂覆相·····	55
3.4.2	动态修饰·····	58
§ 3.5	应用·····	60
	<b>参考文献</b> ·····	63
<b>第四章 毛细管离子分析(CIA)</b>		
§ 4.1	阴离子分析·····	65
4.1.1	原理·····	65
4.1.2	电渗流改性剂·····	68
4.1.3	背景电解质·····	71

4.1.4	影响分离选择性的因素	75
§ 4.2	阳离子分析	75
4.2.1	原理	75
4.2.2	络合剂对分离的影响	76
4.2.3	背景电解质	77
§ 4.3	应用	79
	<b>参考文献</b>	80
<b>第五章 毛细管胶束电动色谱(MECC)</b>		
§ 5.1	胶束及其增溶过程	81
5.1.1	胶束	81
5.1.2	胶束增溶过程	83
§ 5.2	原理	85
5.2.1	基本原理	85
5.2.2	溶质的迁移速度表达式	85
§ 5.3	基本参数	87
5.3.1	容量因子	87
5.3.2	容量因子与分配系数 K	88
5.3.3	分辨率	88
5.3.4	柱效	89
§ 5.4	影响分离的因素	93
5.4.1	表面活性剂种类	93
5.4.2	表面活性剂浓度	94
5.4.3	缓冲溶液	95
5.4.4	有机溶剂及其它添加剂	95
5.4.5	其他操作条件	96
§ 5.5	其它电动色谱方法	98
5.5.1	带电 $\beta$ -环糊精衍生物	98
5.5.2	微乳液	98
§ 5.6	应用	99



参考文献.....	100
<b>第六章 毛细管凝胶电泳 (CGE)</b>	
§ 6.1 原理 .....	102
6.1.1 原理和迁移率表达式 .....	102
6.1.2 聚合物的种类 .....	104
§ 6.2 交联聚丙烯酰胺凝胶柱的制备 .....	104
6.2.1 结构和孔径 .....	104
6.2.2 凝胶柱的制备 .....	106
§ 6.3 线性聚合物溶液(无胶筛分) .....	107
6.3.1 基本原理 .....	107
6.3.2 重叠阈值 .....	108
6.3.3 网络大小 .....	109
§ 6.4 影响分离的因素 .....	110
6.4.1 毛细管尺寸 .....	110
6.4.2 凝胶浓度 .....	111
6.4.3 电场强度 .....	111
6.4.4 进样 .....	111
6.4.5 重现性 .....	111
6.4.6 柱寿命 .....	113
§ 6.5 应用 .....	115
6.5.1 肽和蛋白分子量测定 .....	115
6.5.2 低聚核苷酸及 DNA 分析 .....	117
6.5.3 其它 .....	117
参考文献.....	118
<b>第七章 毛细管等电聚焦 (CIEF)</b>	
§ 7.1 原理 .....	119
7.1.1. 基本原理 .....	119
7.1.2 分辨率 .....	120
7.1.3 与区带电泳比较 .....	121

§ 7.2 两性电解质及 pH 梯度形成 .....	121
7.2.1 两性电解质 .....	121
7.2.2 pH 梯度形成 .....	122
§ 7.3 实验中应注意的几个问题 .....	123
7.3.1 电渗流和吸附的消除 .....	123
7.3.2 阴极和阳极漂移 .....	123
7.3.3 聚焦区带的移动 .....	124
7.3.4 蛋白沉淀的抑制 .....	125
§ 7.4 实验方法和应用 .....	125
7.4.1 实验方法 .....	125
7.4.2 应用 .....	126
<b>参考文献</b> .....	127

## **第八章 毛细管等速电泳(CITP)**

§ 8.1 分离原理 .....	128
§ 8.2 区带特征及定性定量方法 .....	130
8.2.1 区带特征 .....	130
8.2.2 定性定量方法 .....	132
§ 8.3 方法比较和应用 .....	132
8.3.1 CITP 与 FSCE 比较 .....	132
8.3.2 应用 .....	134
<b>参考文献</b> .....	135

## **第九章 毛细管电泳检测方法**

§ 9.1 检测器 .....	136
9.1.1 噪声和漂移 .....	136
9.1.2 灵敏度 .....	137
9.1.3 检测限 .....	138
9.1.4 线性范围 .....	139
9.1.5 选择性 .....	139
9.1.6 时间常数 .....	140

§ 9.2 紫外吸收检测 .....	140
9.2.1 原理 .....	140
9.2.2 检测器结构 .....	140
9.2.3 间接检测 .....	142
§ 9.3 荧光检测 .....	142
9.3.1 原理 .....	143
9.3.2 检测器结构 .....	143
9.3.3 荧光衍生检测 .....	144
9.3.4 间接检测 .....	145
§ 9.4 质谱检测 .....	145
9.4.1 CE-MS 联用流程 .....	145
9.4.2 接口和离子化方法 .....	146
§ 9.5 安培检测 .....	147
9.5.1 原理 .....	148
9.5.2 检测器结构 .....	148
9.5.3 检测模式 .....	149
9.5.4 间接检测 .....	150
§ 9.6 其他类型检测 .....	150
9.6.1 电导检测 .....	150
9.6.2 激光光热检测 .....	150
9.6.3 激光喇曼检测 .....	151
9.6.4 化学发光检测 .....	151
9.6.5 放射性同位素检测 .....	151
9.6.6 折射指数检测 .....	152
<b>参考文献</b> .....	152

## 第十章 仪器和操作

§ 10.1 概述 .....	154
§ 10.2 进样 .....	155
10.2.1 静压力进样 .....	156

10.2.2	电迁移进样	156
10.2.3	在柱样品浓缩	157
§ 10.3	分离	159
10.3.1	毛细管	159
10.3.2	温度控制	161
10.3.3	高压源	161
§ 10.4	检测	161
§ 10.5	数据记录和处理	161
§ 10.6	定性定量分析	162
10.6.1	迁移时间和迁移率的重现性	162
10.6.2	定量分析	164
§ 10.7	CE 操作常见故障分析	166
	<b>参考文献</b>	169

## 第十一章 毛细管电泳应用

§ 11.1	氨基酸	170
§ 11.2	肽	176
§ 11.3	蛋白质	186
§ 11.4	核苷酸	196
§ 11.5	无机离子	203
§ 11.6	有机酸	209
§ 11.7	有机化合物	219
§ 11.8	药物	235
§ 11.9	手性化合物	242
§ 11.10	碳水化合物	259

<b>附录 1</b>	<b>缩写说明</b>	264
<b>附录 2</b>	<b>符号说明</b>	266

# 第一章 绪 论

毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, 简称 CE)是 80 年代初迅速发展起来的一种新型的电泳与色谱相结合的分​​离分析技术,具有分离效率高、分析速度快、样品用量少、应用范围广等特点,已成为 90 年代重要的分离分析手段,在生物、化学、医药、环保、食品等领域具有很好的应用前景。

毛细管电泳的特点是以电泳或电渗作为分离的主要动力,以类似于色谱柱的毛细管作为分离管,同时具有电泳的高分离效率和现代色谱的快速、在线检测、自动操作等特点,因此,毛细管电泳技术和理论是以现代电泳和色谱的技术与理论为基础,通过十几年的毛细管电泳研究而发展起来的,相信随着毛细管电泳研究的广泛开展,将使毛细管电泳的技术和理论不断完善,成为一种标准的仪器分离分析技术。

## § 1.1 电泳发展简史<sup>[1]</sup>

所谓电泳就是带电粒子或离子在电场的作用下作定向移动。

1809 年,俄国物理学家 Peñce 首次发现电泳现象。但是,电泳作为分离技术是瑞典科学家 Tiselius 在 1937 年首先提出的,他创造了 Tiselius 电泳仪,并建立了移动界面电泳方法。当时他将蛋白质混合物置于装有缓冲溶液的管子中,然后在管子两端加电场,发现样品组分根据其电荷和体积以一定的方向和速度移动,并第一次成功地从人血清中分离出白蛋白以及  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ - 球蛋白五种蛋白,由于他对电泳技术的发展和​​应用所做的杰出贡献,于 1948 年获得诺贝尔化学奖。

由于 Tiselius 移界电泳分辨率有限,而且电泳过程产生的焦耳热使自由溶液受热后发生密度变化产生对流,导致区带扰乱,因此在 50 年代以后,出现了各种抗对流支持介质,如滤纸、醋酸纤维、琼脂凝胶和淀粉凝胶的区带电泳。1959 年, Raymond 和 Weintraub 利用人工合成的凝胶作为支持介质,创造了聚丙烯酰胺凝胶电泳,极大地提高了区带电泳的分辨率。此后凝胶电泳在理论和实验上有了很大的发展,被广泛地应用于生物大分子的分离。

60 年代初, Svensson 提出了自然 pH 梯度的理论,即利用电场使两性电解质产生一个稳定的“自然”pH 梯度, Vesterberg 合成了具有 Svensson 预言性质的脂肪族多氨基多羧酸,这种两性电解质的合成,使等电聚焦(IEF) 技术有了很大的发展,并已成为一种广泛采用的分析和制备技术。

60 年代后期, Martin 和 Everaerts, Konst-antifóv, Oshurkova 和 Ornstein 分别独立地解决了不连续介质电泳的理论及装置等问题,使等速电泳取得了突破性进展,70 年代后期,商品仪器的问世,使等速电泳研究及应用得以广泛展开<sup>[2]</sup>。

开管毛细管电泳是 Hjerten 在 1967 年首先报导的<sup>[3]</sup>。对于毫米级内径的毛细管, Hjerten 采用沿轴向旋转的方法以使对流影响降低到最小。后来 Virtanen<sup>[4]</sup>以及 Mikkers<sup>[5]</sup>先后分别在约 200 $\mu\text{m}$  内径的玻璃或 Teflon 毛细管中进行电泳。

1981 年, Jorgenson 和 Lukacs<sup>[6]</sup>使用 75 $\mu\text{m}$  内径 100cm 的玻璃毛细管在 30kV 的高电压下进行电泳,获得了数十万理论板数的高分离效率,并阐明了其理论,描述了操作条件与分离效率的关系,证明了毛细管电泳作为分析技术的潜力,使该技术有了突破性进展。

1984 年, Terabe 等<sup>[7]</sup>将离子型表面活性剂胶束引入毛细管电泳中,以胶束作为分配相,使电中性物质可以通过在胶束相和水相的分配不同达到分离,从而发展了毛细管电泳的新分支——毛细管胶束电动色谱(MECC),提高了分离选择性,扩大了毛细管电泳的应用范围。

1987年, Hjerten 等<sup>[8]</sup>把传统的等电聚焦过程移到毛细管内进行, 提出了毛细管等电聚焦(CIEF)。同年 Cohen 和 Karger<sup>[9]</sup>发表了毛细管凝胶电泳(CGIE)的研究工作。

1990年, Jones 和 Jandik 等<sup>[10]</sup>首次报道了无机离子和小分子离子的毛细管电泳分析, 提出了毛细管离子分析法(CIA)。

1989年以后, 毛细管电泳商品仪器的问世及高灵敏度在柱检测器的发展, 使毛细管电泳研究在世界范围内蓬勃开展, 促进了毛细管电泳技术和理论的迅猛发展。迄今已有大量有关毛细管电泳各方面的研究论文、综述及专著发表<sup>[11~13]</sup>。毛细管电泳的最大优点是应用范围广。最初认为它主要用于生物大分子的分析, 现已经证明它能用于氨基酸、手性药物、维生素、农药、无机离子、有机酸、染料、表面活性剂、肽和蛋白质、碳水化合物、低聚核苷和 DNA 片段, 甚至整个细胞和病毒粒子的分离。

近几年来, 毛细管电泳研究有了很大的进展, 主要包括新的分离方法和理论研究, 高灵敏度检测器和检测方法研究, 电渗流的控制和毛细管柱技术的研究, 迁移时间和峰面积的重现性以及定量分析方法的改进, 在柱样品浓缩方法等诸方面的研究。毫无疑问, 随着毛细管电泳应用的发展, 它将成为一种标准的仪器分离分析技术。

## § 1.2 电泳分类<sup>[14]</sup>

与色谱法类似, 按分离原理不同电泳可分为四种类型, 见表 1-1。各种电泳的分离原理示意图见图 1-1。

表 1-1 电泳的分类及与色谱的对应关系

电 泳 (Electrophoresis)	色 谱 (Chromatography)
区带电泳 (Zone)	洗脱或区带 (Elution or Zone)
移动界面电泳 (Moving Boundary)	前沿 (Frontal)
等速电泳 (ITP, Isotachopheresis)	置换 (Displacement)
等电聚焦 (IEF, Isoelectric Focusing)	色谱聚焦 (Chromatofocusing)

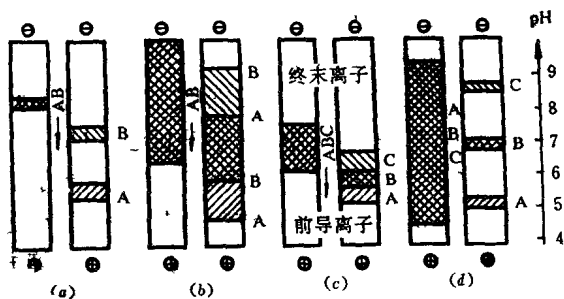


图 1-1 各种电泳分离原理示意图

(a)区带电泳；(b)移动界面电泳；(c)等速电泳；(d)等电聚焦。

1. 区带电泳 (Zone Electrophoresis)：不同的溶质在均一的缓冲溶液(或称载体电解质)系统中分离成独立的区带,如果用光密度计扫描可得出一个个互相分离的峰,与洗脱色谱的图形相似。电泳的区带随时间延长和距离加大扩散严重,影响分辨率。当以凝胶作为载体电解质时,它抑制了组分的扩散,又兼具分子筛的作用,其分辨率大大提高,是传统电泳中应用最广泛的电泳技术。

2. 移界电泳：它只能起到部分分离的作用,如将浓度对距离作图,则得出一个个台阶状的图形,与色谱法前沿分析的图形相似。最前面的成份有部分纯的,其他则互相重叠,各界面可用光学方法显示,这是 Tiselius 最早建立的电泳方法。

3. 等速电泳：样品离子置于前导和终末电解质之间,在电泳达到平衡后,各迁移率不同的离子前后相随,以等速移动。按浓度对距离作图也是台阶状,但不同于上述移界电泳,它的区带没有重叠,而是依次排列。

4. 等电聚焦：被分离的离子和两性电解质溶液混合装入毛细管,在电场的作用下,不同等电点的两性载体电解质自动形成 pH 梯度,被分离离子各自移至其等电点,形成很窄的区带,分辨率很高。

毛细管电泳是指所有在极细毛细管内进行的电泳,根据分离原



理的不同,毛细管电泳可分为五种不同的分离模式,即自由溶液毛细管电泳(Free Solution Capillary Electrophoresis, FSCE),毛细管胶束电动色谱(Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography 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),各分离模式所要求的载体电解质和分类见表 1-2。

表 1-2 毛细管电泳分离模式

模 式	载体电解质	类 型
自由溶液毛细管电泳(FSCE)	缓冲溶液	区带电泳
毛细管胶束电动色谱(MECC)	胶束—缓冲溶液	区带电泳
毛细管凝胶电泳(CGE)	凝胶—缓冲溶液	区带电泳
毛细管等电聚焦(CIEF)	不同等电点的两性电解质	等电聚焦
毛细管等速电泳(CTIP)	前导电解质, 终末电解质	等速电泳

## § 1.3 毛细管电泳特点

### 1.3.1 毛细管电泳与常规电泳比较

电泳分离是基于溶质组分在电场下的迁移率不同而进行的。在 Tiselius 自由溶液电泳中,分离效率受热扩散和对流的影响,因此传统上电泳在抗对流介质如聚丙烯酰胺或琼脂凝胶中进行。平板和管状凝胶主要用于生物分子如核酸、蛋白质等不同体积的分子的分离。虽然平板凝胶电泳是最常用的分离技术,但一般说来存在分析时间长、分离效率低、检测灵敏度低、分析结果难以保存、自动化程度低等不足。

如用小内径管子或毛细管代替平板进行电泳分离,由于小内径