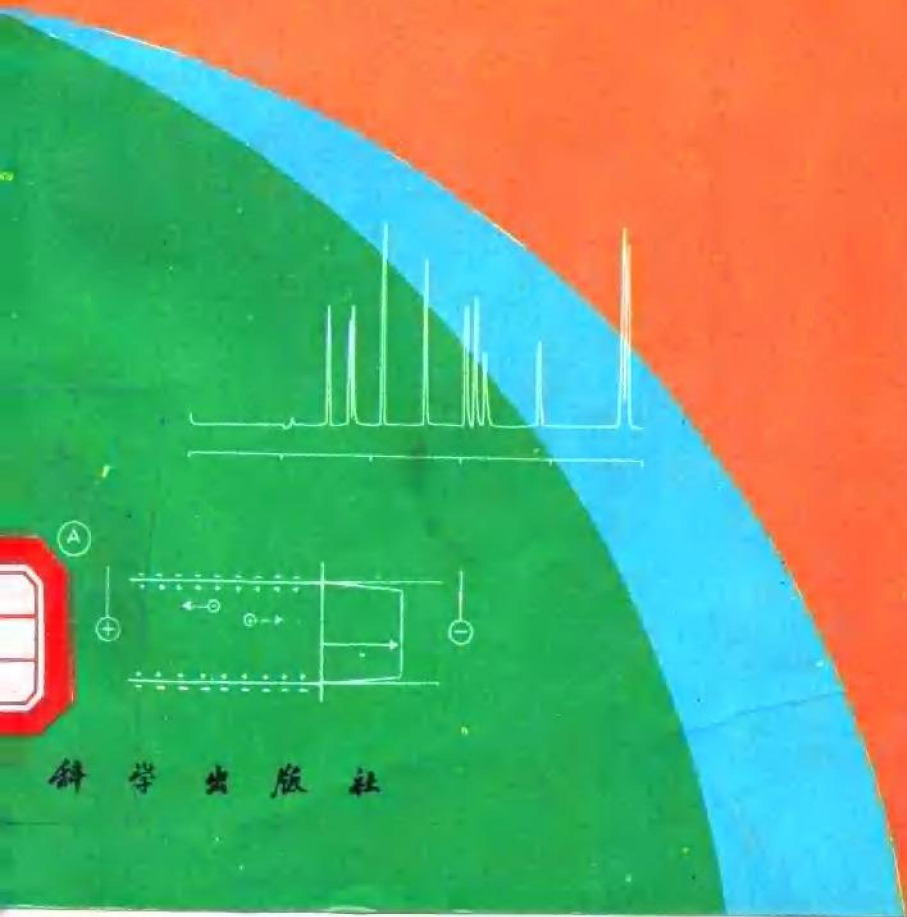


邓延俾 编著
何金兰

高效 毛细管电泳



科学出版社

高效毛细管电泳

邓廷倬 何金兰 编著

科学出版社

1996

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

高效毛细管电泳是分析化学、生物化学、药物化学、食品化学、环境化学及医学和法医学中一种十分重要的分离分析方法,具有广阔的发展前景。

本书共分八章,较全面、系统地介绍高效毛细管电泳的基本理论、方法和实际应用。第一章叙述高效毛细管电泳的发展历史与现状;第二章阐述基本原理;第三至七章介绍毛细管区带电泳,胶束电动毛细管色谱,毛细管凝胶电泳,毛细管内壁涂层与进样技术,毛细管电泳的检测方法和检测器;第八章评述毛细管电泳在各类分离分析中的应用。

本书内容丰富,材料新颖,可供高等学校、科研单位的分析化学、生物化学、分子生物学、药物化学、食品科学、环境科学、医学工作者和相关专业师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

高效毛细管电泳/邓延倬,何金兰编著. —北京:科学出版社,1996
ISBN 7-03-004793-1

I. 高… II. ①邓… ②何… III. 毛细管-电泳-分析(化学)
IV. ①0552.4②0646.1

中国版本图书馆CIP数据核字(95)第07681号

科 学 出 版 社 出 版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
新蕾印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1996年7月 第 一 版 开本:850×1168 1/32
1996年7月第一次印刷 印张:11 1/2
印数:1—1 450 字数:291 000

定价:25.00元

前 言

早在100年前,对荷电粒子在电场作用下的定向泳动现象,即电泳,就进行过研究.但是,电泳作为一种分离技术,直到本世纪30—40年代才得到较快发展,成为研究生物大分子的重要方法,对生物化学的发展起了重要的推动作用.

传统的电泳技术受焦耳热限制,只能在低电场强度下进行电泳操作,分离时间长、分离效率低、分离度受到严重制约.1967年, Hjerten 用内径3mm的石英管在高电场下进行电泳分离,试图克服焦耳热效应,可算是毛细管电泳的前身.1979年, Mikkers 和 Everaerts 用200 μ m PTFE 毛细管以区带电泳方式分离了16种有机酸,获得满意的柱效,可谓是毛细管电泳的开创性工作.1981年, Jorgenson 和 Lukacs 进一步使用内径75 μ m 毛细管进行区带电泳,分离丹酰化氨基酸,理论塔板数超过400 000/m,获得从未有过的极高的柱效和十分快速的分离,充分展现了窄孔径毛细管电泳的巨大分离潜力.此外,他们工作的更重要意义还在于用理论计算发现,柱效与电场强度成正比,与分子扩散系数成反比.这意味着外加高电压可以获得高柱效,而且对扩散系数小的分子,像蛋白质那样的生物大分子的分离更为有效.这一结果立即使人们意识到:毛细管电泳将会为生物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.从此,毛细管电泳的研究与应用迅速发展,各种分离模式相继建立,各种操作技术日臻完善,高性能商品仪器不断推向市场,应用研究迅速扩展到各个领域.十多年来,大量的研究与应用实践表明:毛细管电泳具有分离效率高(理论塔板数已达 10^6 — 10^7 /m)、快速(20—30min内完成一次电泳操作,如几分钟完成几十个阳离子或阴离子的分离)、样品用量少(仅需纳升级,甚至能对单个细胞胞液进行分离分析)的特

点，用激光诱导荧光检测达到了超高灵敏度分析，得到 10 ymol ($1 \text{ ymol} = 1 \times 10^{-24} \text{ mol}$) 或 6 个分子的超低质量检测限。应用范围包括无机离子、有机分子以及生物大分子和对映体等，在分析化学、生物化学、分子生物学、药物化学、食品化学、环境化学、医学和法医学等许多领域，有广阔的应用前景。尽管目前毛细管电泳技术还有不足之处，存在着一些亟待解决的问题，但它已受到世人瞩目！成为近年来发展最快的一种分离分析新技术。

我国是开展高效毛细管电泳研究较早的国家之一，尤其是近年来，在基础研究、仪器研制以及实际应用等方面都有长足进展，从事研究与应用的人员迅速增加。我们于 1989 年起开展高效毛细管电泳研究，在凝胶毛细管电泳，毛细管区带电泳和毛细管电泳检测方法等方面做了一些研究工作，为研究生开设了选修课程。在教学和科研实践中深深地感到，毛细管电泳技术的发展十分迅速，文献数量呈直线增长，迫切需要将浩瀚的文献资料系统化、条理化以供教学和科研及实际应用参考。近年来，国外已陆续出版教材和专著近 10 种。在我国，高效毛细管电泳正处在迅速发展时期，迫切需要一本较系统、较完整地论述毛细管电泳技术的书籍，基于这种设想，我们根据近年教学和科研工作中的体会及所掌握的资料编写成本书。

本书共分八章，以基本理论、方法、柱操作、检测和应用为主线安排内容。第一章介绍高效毛细管电泳发展历史与现状；第二章阐述高效毛细管电泳基本原理；第三至五章分别详细介绍高效毛细管电泳中三个基本的电泳模式，即高效毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱和毛细管凝胶电泳；第六章介绍毛细管内壁涂层技术和进样技术；第七章以较多篇幅较全面地评述了高效毛细管电泳的各种检测方法和检测器；第八章介绍高效毛细管电泳的各种应用。

在编写过程中，我们力求做到内容新颖、理论联系实际，并尽可能给出有关文献，以供读者进一步查阅参考。但鉴于高效毛细管电泳技术的发展日新月异，新技术、新方法不断涌现，为使

本书尽快与读者见面，在不失系统性的前提下，对一些内容作了精简。由于作者水平有限，书中错误与不妥之处，祈望广大读者予以指正。

本书编写过程中，得到惠普（Hewlett Packard）公司和贝克曼（Beckman）公司提供的资料，得到武汉大学化学系李银玉副教授的大力支持与帮助。初稿承蒙程介克教授认真审阅，提出许多宝贵修改意见。本书的出版得到国家自然科学基金的资助。对此，谨致以最衷心的感谢。

作者

1995年4月

符 号 表

(一) 英文符号

A	峰面积
a	毛细管内半径
a_0	熔硅毛细管 (不含聚酰亚胺层) 外半径
a_p	熔硅毛细管 (含聚酰亚胺层) 外半径
B	常数
C	溶液浓度, 高聚物网络浓度
C_0P	注入样品浓度
C_b	背景电解质 (缓冲溶液) 浓度
C_i	样品中组分 i 浓度
C_{is}	样品组分 i 在样品塞中的浓度
C_{ib}	样品组分 i 在毛细管 (样品塞以外) 中的浓度
C_L	前导缓冲溶液浓度
C_s	样品塞中缓冲溶液浓度
$\%C$	凝胶交联剂浓度
D	扩散系数
d	胶束间的 $\frac{1}{2}$ 距离
d_0	双电层紧密层厚度
D_{en}	层流增大的扩散系数
D_{aq}	溶质在水相中的扩散系数
D_i	除进样和检测外, 其它因素 i 引起的区带分散系数
D_j	由焦耳热引起的分散系数
D_{mc}	溶质在胶束相中的表观扩散系数
DR	动态储备
E	电场强度
e	溶液中每单位面积的过剩电荷
E_s	粘度流的活化能
E_b	毛细管中背景电解质 (样品塞以外) 场强

E_{in}	电迁移进样电场强度
E_s	样品塞内场强
F	电场作用力
F'	粘滞阻力
f	平动摩擦系数, 溶质以离子形式存在的摩尔分数, 函数算符
G	焦耳热量
g	重力常数
H	理论塔板高
h	峰高, 热传输系数
ΔH	相对于体系最小理论塔板高所增加的百分数
Δh	毛细管两端液面高度差
I	毛细管电泳电流, 光束强度
K_a	酸的离解常数
K_b	碱平衡常数
K_b^{\ominus}	碱常数
K_d	一级离解常数, 解吸速率常数, 溶质在胶束和水相中的分配系数
K^{mc}	溶质对胶束的结合常数
k	热导率
k'	容量因子
k_b	背景电解质热导率
k_p	聚酰亚胺热导率
k_s	熔硅的热导率
L	毛细管总长
L'	置换电解质进入毛细管中的长度
l	毛细管有效长度
M	常数
m	常数
N	理论塔板数
$N. A.$	物镜的数值孔径
N_d	检测器噪声
N_{req}	要求达到两组分完全分离 ($R_s=1$) 时的理论塔板数
n	常数, 胶束聚集数, 峰容量, 高聚物的重复单元数, 折射指数
n_{aq}	在水中的样品量
n_{mc}	进入胶束中的样品量
P	功率, 极限分配系数

ΔP	毛细管两端压力差
Q	功率密度, 溶质电荷, 电动进样量
Q_0	毛细管表面电离的硅羟基总数
q	有效电荷
R	毛细管电阻, 气体常数
R_g	迁移溶质的半径 (假设为不变形粒子)
R_s	分离度
r	表观流体动力学半径, 毛细管内径向位置, 凝胶的股绳厚度
S	表面活性剂
T	温度
T_1	毛细管壁温度
T_0	溶液温度
T_k	Krafft 温度
TR	转换比
$\%T$	凝胶单体浓度
ΔT	熔硅毛细管与周围环境的温差
t	时间
t_A	分析时间
t_{eo}	电渗流标记物从进样端迁移至检测窗口的时间
t_{inj}	进样时间
t_m	迁移时间
t_{mc}	胶束迁移时间
t_0	中性标记物流出时间
t_0/t_{mc}	迁移时间比 (保留时间比), 迁移时间窗口
t_r	保留时间
V	毛细管两端外加电压
V_{inj}	进样体积
V_{mol}	胶束相的摩尔体积
V_{mc}/V_{aq}	相比 (胶束相体积/水相体积)
v	荷电离子电泳速度
v_{ap}	表观迁移速度
v_{av}	层流平均速度
v_{ef}	有效迁移速度
v_{eo}	电渗流速度
$v_{ep,ib}$	样品离子在毛细管 (样品塞以外) 中的电泳速度

v_{p1s}	样品离子在样品塞中电泳速度
\bar{v}	平均迁移速度
v'	粒子稳态速度
Δv	两组分迁移速度差, 溶质在管壁和中心的迁移速度差
$\Delta v/\bar{v}$	两相邻组分的相对速度差
v_1	在管壁上电泳速度
W	峰宽
W_d	检测器空间宽度
W_{eff}	堆积后的有效样品塞长度
$W_{1/2}$	半高峰宽 (s)
W_{inj}	样品塞长度
W_s	样品区带的空间宽度
W_z	区带的空间宽度
z	价电子数

(二) 希腊符号

α	分离因子 (选择因子)
α_i	离解度
β	溶质在水相中的分数
γ	场放大增强因子, 操作缓冲溶液与样品塞中缓冲溶液的浓度比
δ	扩散层厚度
δ_0	两回射光束的初相位
$\Delta\delta$	两回射光束的相位差
ϵ	介电常数
ϵ_b	背景吸收试剂的摩尔吸收系数
ϵ_0	真空介电常数
ζ	zeta 电位
η	介质粘度, 显微物镜收集效率
θ	光束偏转角
κ	电导率
Λ	当量电导
λ	波长
μ	淌度, 溶质在凝胶中的电泳淌度
μ_{A^-}	酸的阴离子淌度
μ_{ab}	绝对淌度

μ_{ap}	表观淌度
μ_{ep}	电泳淌度
$\mu_{\text{ep(mo)}}$	胶束电泳淌度
μ_{eo}	电渗流淌度
μ_{ef}	有效淌度
$\mu_{\text{ef}(c)}$	溶质完全电离的淌度
μ_i	离子淌度
μ_0	溶质在自由溶液中的淌度
μ_{R}	对离子淌度
$\Delta\mu/\mu$	两相邻组分的相对淌度差
$d\mu/dT$	溶质淌度的温度系数
ξ	高聚物网络孔隙平均孔径
ρ	电阻率, 溶液密度
ρ_{b}	毛细管内背景电解质(除样品塞外)的电阻率
ρ_{s}	样品塞电阻率
σ^2	区带浓度分布方差
σ_{T}^2	系统总方差
σ_{L}^2	层流增宽的方差
σ_{x}	区带中样品浓度分布的标准偏差
λ_{d}	初始注入的样品塞长度与毛细管总长之比
ψ_{c}	stern 面电势
ψ_{o}	表面电势

(三) 缩写符号

Acr	丙烯酰胺
AG	琼脂糖
APF	五氟代芳基
APS	过硫酸铵
BGE	背景电解质
BiA	甲撑双丙烯酰胺
CBQCA	3-(4-羧基甲酰基)-2-奎宁羧酸
CCD	电荷耦合器件
CD	环糊精
CDEKC	环糊精电动色谱
CE	毛细管电泳

CGE	毛细管凝胶电泳
CIEF	毛细管等电聚焦
CITP	毛细管等速电泳
CLOD	浓度检测限
CMC	临界胶束浓度
CPAGE	毛细管聚丙烯酰胺凝胶电泳
CTAB	十六烷基三甲基溴化铵
CTAC	十六烷基三甲基氯化铵
CVL	激光诱导毛细管振动
CZE	毛细管区带电泳
Da	道尔顿 (质量单位)
DABSYL	4-(二甲氨基)偶氮苯-4'-磺酰氯
DNB	3,5-二硝基苯甲酸
DNP	二甲基氨基偶氮苯异硫氰酸盐
DNS	丹酰氯; 3,5-二硝基水杨酸
DTAB	十二烷基三甲基溴化铵
DTAC	十二烷基三甲基氯化铵
EKC	电动色谱
EOF	电渗流
ESI	电喷射电离
FAB	快速原子轰击
FITC	荧光素异硫氰酸盐
FMOC	9-芴基甲基氯甲酸酯
FTC	荧光素硫代氨基甲酸酐
FTICR	傅立叶变换离子回旋共振
HETP	理论塔板高
HF	流体静力流
HPCE	高效毛细管电泳
HPLC	高效液相色谱
HQS ⁻	8-羟基奎宁磺酸根
IEF	等电聚焦
IS	离子喷射
ITP	等速电泳
IXEKC	离子交换电动色谱
LIF	激光诱导荧光
LMT	<i>N</i> -十二酰- <i>N</i> -甲基牛磺酸钠

LOD	检测限
MALDI	基体辅助激光解吸电离
MECC	胶束电动毛细管色谱
MEEKC	微乳胶电动色谱
MEKC	胶束电动色谱
MLOD	质量检测限
MS	质谱
MW	分子量
NaCh	胆酸钠
NDA	萘二醛
ODA	二异辛基磷酸, 邻苯二醛
PAG	聚丙烯酰胺凝胶
PAH	多环芳香碳氢化合物
PCR	聚合酶链反应
PD	光二极管
PEG	聚乙二醇
PEI	聚乙烯亚胺
PEO	聚环氧乙烷
PIC	苦味酸
PITC	异硫氰酸苯酯
PMS	聚甲基硅氧烷
PMT	光电倍增管
PTFE	聚四氟乙烯
PTH	乙内酰苯硫脲
PVA	聚乙烯醇
RI	折射指数
RIM	折射指数匹配液
RSD	相对标准偏差
SDC	脱氧胆酸钠
SDS	十二烷基硫酸钠
SDVal	<i>N</i> -十二酰-L-缬氨酸钠
SOR	山梨酸
STC	牛磺胆酸钠
STDC	牛磺脱氧胆酸钠
STS	十四烷基硫酸钠
TAA	四烷基铵

TEMED 四甲基乙二胺
TIM 瞬时离子基体
TNS 甲基氨基萘磺酸盐
TRITC 四甲基罗丹明异硫氰酸盐
TRITC 四甲基罗丹明硫代氨基甲酸酯
TTAB 十四烷基三甲基溴化铵

目 录

第一章 绪论	1
§ 1.1 高效毛细管电泳及其特点	1
§ 1.2 历史的简单回顾	2
§ 1.3 毛细管电泳技术的飞速发展	4
§ 1.3.1 CE 实验技术上的进展	5
§ 1.3.2 CE 向多种分离模式发展	6
§ 1.3.3 CE 仪器的逐步完善与商品仪器的竞相推出	8
§ 1.3.4 基础理论研究不断深入	9
§ 1.3.5 CE 应用领域的迅速扩展	12
§ 1.3.6 CE 文献量按指数函数增长, 学术交流活动频繁活跃	12
§ 1.3.7 CE 技术在中国	14
参考文献	16
第二章 毛细管电泳基本原理	21
§ 2.1 毛细管电泳预备知识	21
§ 2.1.1 双电层和 zeta 电势	21
§ 2.1.2 电泳	23
§ 2.1.3 电渗流	24
§ 2.1.4 淌度	30
§ 2.2 分离效率与分离度	33
§ 2.2.1 分离效率	33
§ 2.2.2 分离度	33
§ 2.3 区带宽度与区带增宽	35
§ 2.3.1 区带的时间宽度与空间宽度	35
§ 2.3.2 区带增宽	37
参考文献	50

第三章 毛细管区带电泳	52
§ 3.1 毛细管区带电泳的外加电压	52
§ 3.1.1 外加电压对毛细管电泳分离的影响	52
§ 3.1.2 外加电压的实验选择	55
§ 3.1.3 电源操作模式及其选择	55
§ 3.2 毛细管电泳柱	58
§ 3.2.1 柱的尺寸、形状和材料	58
§ 3.2.2 柱内壁对 CE 行为的影响	59
§ 3.2.3 改性柱 CZE 分离效果	60
§ 3.3 CZE 中的缓冲溶液	60
§ 3.3.1 操作缓冲溶液组分	61
§ 3.3.2 缓冲溶液浓度	65
§ 3.3.3 缓冲溶液 pH 的影响	67
§ 3.4 缓冲溶液添加剂	72
§ 3.4.1 添加剂种类及其作用	72
§ 3.4.2 表面活性剂	73
§ 3.4.3 中性盐和两性离子添加剂	74
§ 3.4.4 有机溶剂	75
§ 3.4.5 手性选择试剂	75
§ 3.5 CZE 中的温度效应	77
§ 3.5.1 毛细管柱温对 CZE 参数和测量精度的影响	78
§ 3.5.2 柱温对溶质的影响	80
§ 3.5.3 毛细管电泳的柱温控制	84
§ 3.6 CZE 动态分离	88
§ 3.6.1 非均匀电场下的 CZE 分离	88
§ 3.6.2 CZE 的 pH 梯度动态分离	91
§ 3.6.3 瞬时离子基体效应及其用于 CZE 动态分离	93
参考文献	97
第四章 胶束电动毛细管色谱	100
§ 4.1 概述	100
§ 4.2 MECC 基本原理	101
§ 4.2.1 迁移时间窗口及其扩展	102

§ 4.2.2	容量因子和分离因子	105
§ 4.2.3	有效淌度和迁移时间	107
§ 4.2.4	分离效率和分离度	109
§ 4.3	MECC 中的胶束假相	111
§ 4.3.1	表面活性剂	111
§ 4.3.2	胶束假相的形成与特性	115
§ 4.3.3	胶束假相的选择与改良	118
§ 4.4	离子和可电离化合物的 MECC 分离	123
§ 4.4.1	MECC 中离子和可电离化合物的迁移行为	124
§ 4.4.2	流动相 pH 和表面活性剂浓度效应	128
§ 4.5	流动相的改良	131
§ 4.5.1	环糊精改良的 MECC	131
§ 4.5.2	有机溶剂添加剂	135
§ 4.5.3	尿素及其它添加剂	140
	参考文献	142
第五章 毛细管凝胶电泳		143
§ 5.1	概述	143
§ 5.2	聚丙烯酰胺凝胶毛细管的制备	146
§ 5.2.1	毛细管内表面的预处理	146
§ 5.2.2	丙烯酰胺聚合溶液的配制	147
§ 5.2.3	聚合溶液导入毛细管	147
§ 5.2.4	丙烯酰胺在毛细管中聚合	148
§ 5.2.5	气泡的产生及消除	149
§ 5.3	凝胶毛细管的电泳性能	150
§ 5.3.1	凝胶的物化性能	150
§ 5.3.2	柱效	150
§ 5.3.3	分离度	150
§ 5.3.4	迁移时间和重现性	152
§ 5.3.5	稳定性和使用寿命	152
§ 5.4	柱的性能及操作参数对 CPAGE 分离的影响	154
§ 5.4.1	管壁预处理对 CPAGE 分离的影响	154
§ 5.4.2	凝胶浓度对 CPAGE 分离的影响	155