

第四部分 毛细管电泳与超临界流体色谱

毛细管电泳与超临界流体色谱



第一章 毛细管电泳

第一节 概述



一、毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 又称高效毛细管电泳 (high performance capillary electrophoresis, HPCE)，是以高压电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据样品中各组分之间淌度和（或）分配系数的不同而进行分离的一类新型液相分离技术。



二、毛细管电泳的发展史及新动向

瑞典科学家Tiselius在1937年首先提出电泳，创造了Tiselius电泳仪，并建立了移动界面电泳方法。1948年他获得了诺贝尔化学奖。



1981年，Jorgenson创立了毛细管电泳技术。

1988年美国Bio-Rad公司研制出第一台毛细管电泳仪HPE-100型。

1989年在Boston召开首届HPCE专题会议。



三、电泳与色谱

1. 作用原理
2. 分离过程
3. 仪器构成
4. 分离通道的形状



四、毛细管电泳的特点

三高二少一广

1. 高灵敏度 紫外检测器的检测限可达 $10^{-13} \sim 10^{-15}$ mol，激光诱导检测器可达 $10^{-19} \sim 10^{-21}$ mol；



**2. 高分离效能 每米理论塔板
数可达几百万甚至几千万；**

**3. 高速度 通常的分析时间不
超过30 min。有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；**



**4. 样品用量少 只需纳升级的
进样量；**

**5. 分析成本低（消耗少） 只需
少量（几毫升）流动相，分析过程
是在价格低廉的毛细管柱中进行行；**



6. 应用范围广 可分离小分子（氨基酸、药物等）、离子（无机及有机离子）、生物大分子（蛋白质等）、甚至各种颗粒（如细胞、硅胶颗粒等），具有“万能”分析功能或潜力。



五、毛细管电泳的分类

1. 毛细管区带电泳 (CZE)

又称自由溶液毛细管电泳

2. 毛细管凝胶电泳 (CGE)

属非自由溶液电泳，含有“分子筛”效应。



3. 毛细管等速电泳 (CITP) 电泳型

4. 毛细管等电聚焦 (CIEF)

按等电点分离，属电泳型，要求完全抑制电渗流动。



5. 胶束电动毛细管色谱 (MECC)

又称电动色谱 (EKC)，是电泳技术和色谱技术巧妙结合的分离新技术，为CZE扩展的色谱型。

6. 毛细管电色谱 (CEC)

又称毛细管电动色谱，属非自由溶液色谱型。



7. 微乳液电动毛细管色谱 (MEEKC)

为CZE扩展的色谱型

8. 非水毛细管电泳 (NACE)

属自由溶液电泳型。



第二节 毛细管电泳理论

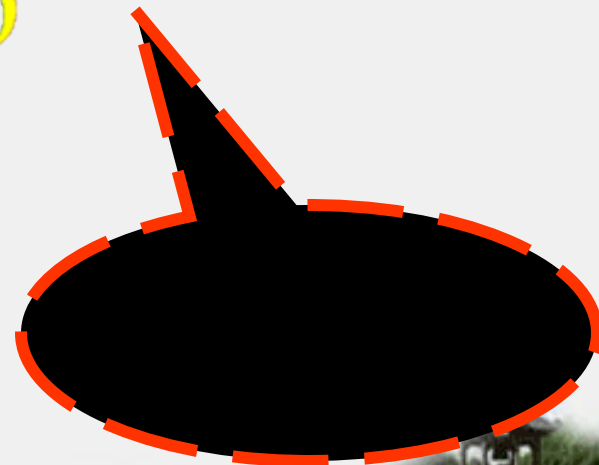
一、电泳和电泳淌度

电泳是带电粒子在直流电场作用下于一定介质（溶剂）中所发生的定向移动。



在电场作用下，带电粒子定向迁移的速度（电泳速度）可用下式表示：

$$u_{ep} = \mu_{ep} E$$



电场强度是指单位距离的电压降（ V/cm ）。

淌度（mobility）是指溶质在单位电场下的迁移速度，即单位电场下的电泳速度。



在无限稀释溶液中（稀溶液数据外推）测得的淌度称为绝对淌度（absolute mobility）。

绝对淌度是在无限稀释时单位电场强度下带电粒子的平均迁移速度，是该离子在一定溶液中的特征物理常数。



电场力：

$$F_E = qE$$

根据流体力学知道，（球型）

离子的流动阻力 F_f ：

$$F_f = 6\pi\eta ru = 6\pi\eta r\mu_{ep} E$$

一定时间后，两种力的作用达到平衡，即 $F_E = F_f$ ，此时离子作匀速运动，电泳进入稳态。

$$6\pi\eta r\mu_{ep}E = qE$$

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon\xi_i}{\eta}$$

毛细管电泳与超临界流体色谱

棒状粒子：

$$\mu_{ep} = \frac{\varepsilon \xi_i}{4\pi\eta}$$

显然，分子半径小，电荷大的离子具有较大的电泳淌度，而分子半径大，电荷小的离子具有较小的电泳淌度。



有效淌度 (effective mobility) 是实际测出的离子淌度，可表示为：

$$\mu_{ef} = \sum \alpha_i \gamma_i \mu_{ep}$$



它与带电粒子的电荷、形状、大小、离解度、溶剂化作用，溶剂的介电常数、粘度、pH值和温度有关。



电泳分离的基础是建立在各分离组分有效淌度的差异上。



二、电渗

电渗流 (electroosmotic flow, EOF)，简称电渗，是指管内溶液在外力电场作用下整体向一个方向运动的现象。



HPCE通常采用的是石英毛细管柱，一般情况下 ($\text{pH} > 3$)，硅醇基 (—SiOH) 电离为硅氧基负离子 (—SiO^-)，使管壁表面带负电，为了保持电荷平衡，溶液中水合离子（一般为阳离子）被吸附到表面附近，形成双电层。当在毛细管两端加高电压时，双电层中的阳离子向阴极移动，由于离子是溶剂化的，所以带动了毛细管中溶液整体向阴极移动，产生电渗流。



电渗流的大小可用电渗速度和电渗淌度 μ_{os} 表示。

$$u_{os} = \mu_{os} E = \frac{\varepsilon \xi_{os}}{\eta} E$$

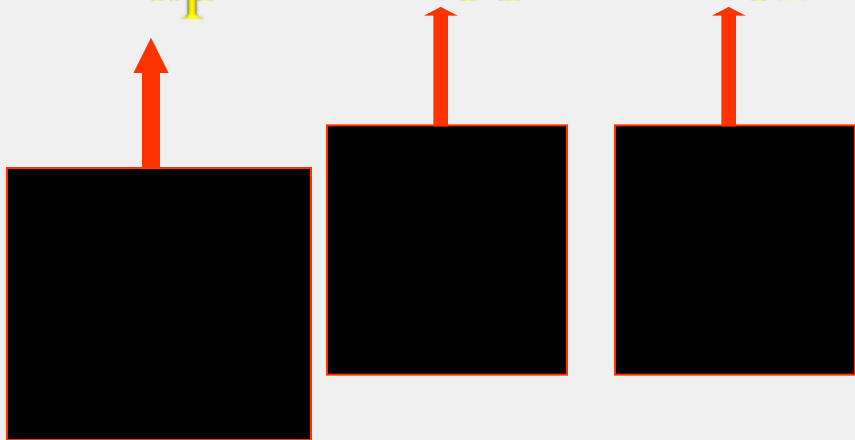
一般情况下，电渗流的速度是电泳速度的5~7倍。

三、表观淌度和权均淌度

在毛细管电泳中，同时存在电泳和电渗，若不考虑它们之间的相互作用，粒子在毛细管内的迁移速度应当是电泳速度和电渗速度的矢量和，即：



$$u_{ap} = u_{os} + u_{ef} = (\mu_{os} + \mu_{ef})E$$



$$\mu_{ap} = \mu_{os} + \mu_{ef}$$



组分	表观淌度	表观迁移速度
----	------	--------

正离子	$\mu_{os} + \mu_{ef}$	$u_{os} + u_{ef}$
中性分子	μ_{os}	u_{os}
负离子	$\mu_{os} - \mu_{ef}$	$u_{os} - u_{ef}$

分离后出峰次序为：

正离子 > 中性分子 > 负离子



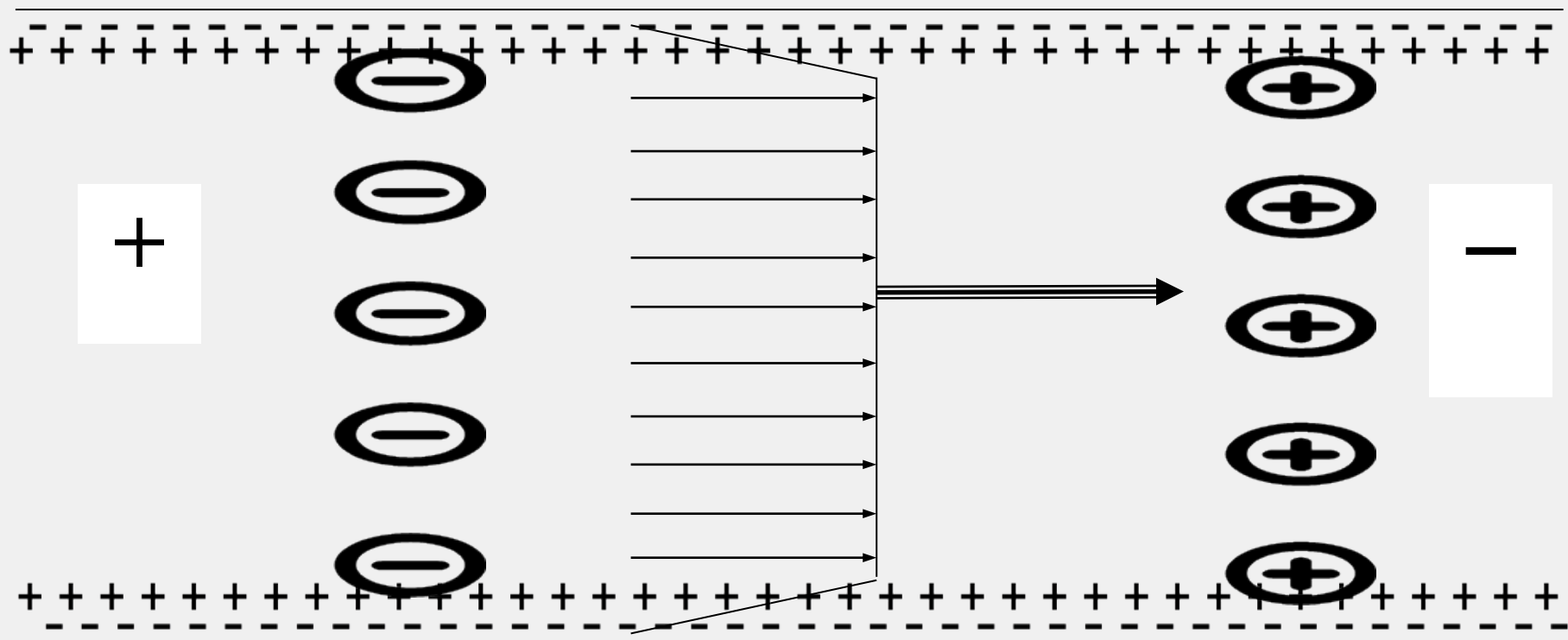


图 毛细管分离示意图



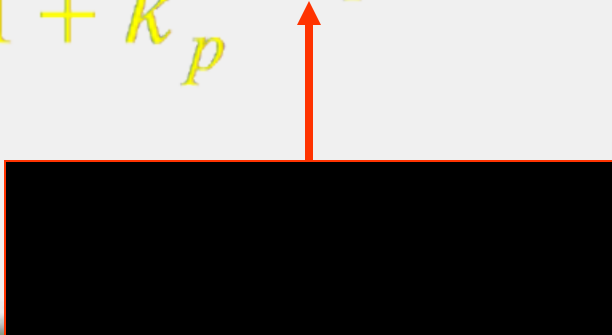
四、两相分配与权均淌度

如果特意在毛细管中引入另一相，称为 P 相，样品在电迁移过程中同时会发生相间分配，其迁移速度或淌度将发生变化，这样改变了的粒子迁移速度和淌度，称为加权平均速度和加权平均淌度，简称权均速度和权均淌度。



设相分配过程远快于电泳过程，则有：


$$k_p = \frac{n_p}{n_s}$$


$$\mu = \frac{u}{E} = \frac{1}{1 + k_p} \mu_{ap} + \frac{k_p}{1 + k_p} \mu_p$$


P相在电场中可静止，也可迁移，运动方向可正、可负。利用引入P相，可使中性组分产生不同的权均淌度，因而解决了中性组分在毛细管电泳中的分离问题。



五、分离效率与谱带展宽

(一) 迁移时间 t_R

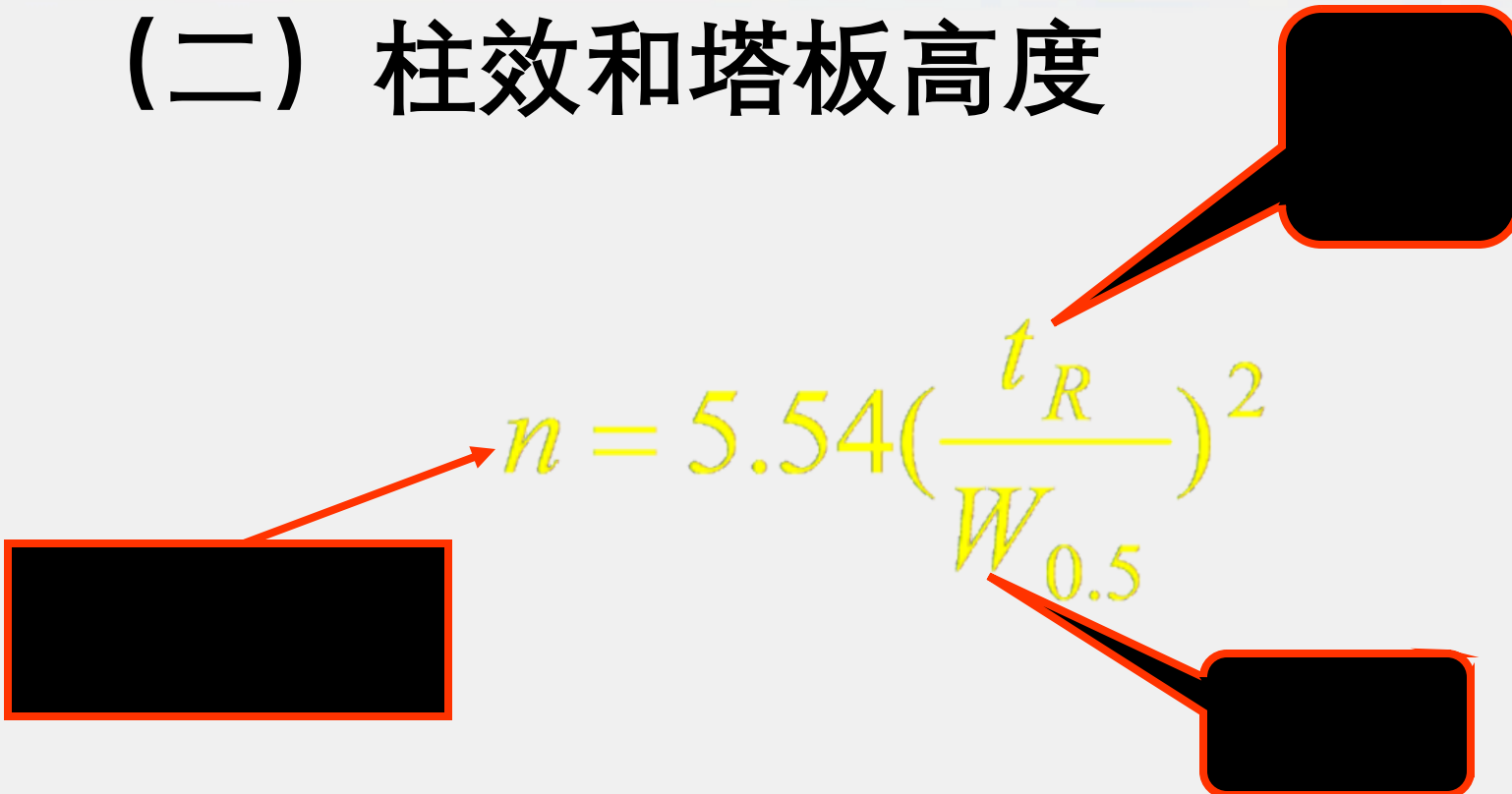
带电粒子从进样口迁移至检测窗所用的时间，称为迁移时间。

$$t_R = \frac{L_d}{u} = \frac{L_d}{\mu_{ap}} \cdot \frac{L}{V}$$

毛细管电泳与超临界流体色

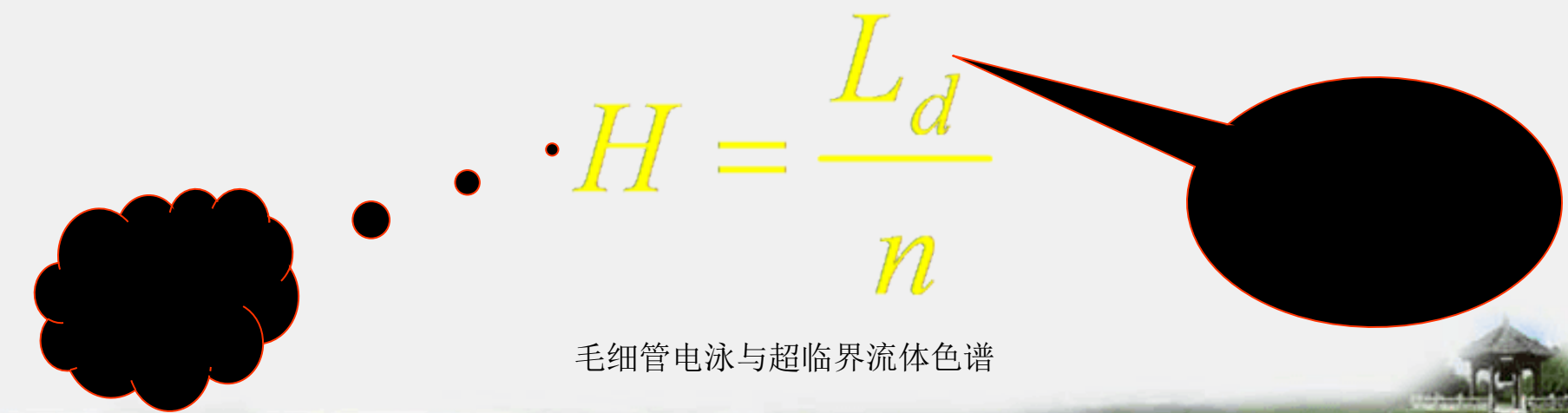


(二) 柱效和塔板高度



A diagram illustrating the relationship between plate number (n) and peak width ($W_{0.5}$). The equation $n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2$ is shown in yellow. A red arrow points from a black rectangular callout box on the left to the variable n . Another red arrow points from a black rectangular callout box on the right to the variable $W_{0.5}$. A third black rectangular callout box is located at the top right, with a red arrow pointing towards the equation.

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2$$



A diagram illustrating the relationship between plate height (H) and column length (L_d). The equation $H = \frac{L_d}{n}$ is shown in yellow. A red arrow points from a large black oval callout box on the right to the variable L_d . A black cloud-like callout box is on the bottom left, and a small black circle is between it and the equation. A black rectangular callout box is at the top right, with a red arrow pointing towards the equation.

$$H = \frac{L_d}{n}$$

(三) 谱带展宽

1. 流型

以电场力驱动产生的EOF，与HPLC中靠外部泵压产生的液流不同。EOF的流型属扁平流型或称“塞流”。扁平型的塞子流不会引起样品区带的增宽，是毛细管电泳高效的重要原因。



HPLC的流型则是抛物线状的层流，它在壁上的速度为零，中心速度为平均速度的2倍。



Van Deemter方程:

$$H = A + B/u + Cu$$


空心毛细管柱，则用Golay方程式表

示:

$$H = B/u + Cu$$

毛细管电泳与超临界流体色谱



由于在毛细管电泳中，无固定相和流动相两相，因此不存在传质项，而且速度流型又是扁平的，于是只有纵向扩散项：


$$H = B/u = 2D/u$$

$$n = L_d u / 2D = \mu_{ap} E L_d / 2D$$



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/316103124113010050>