

毛细管电泳法

姚彤炜 主讲

概述

- 毛细管电泳又叫**高效毛细管电泳** (High Performance Capillary Electrophoresis, **HPCE**), 是80年代初发展起来的一种新型分离分析技术, 它是**电泳**技术与**层析**技术相结合的产物
- 广泛用于生物大分子, 手性药物, 生物体内的药物及代谢物, 中西药物及其制剂等的分析, **在选择性上与高效液相法有很大的互补性**
- 被多国药典收载, 如2010年版中国药典对盐酸头孢吡肟中N-甲基吡咯烷的检查, USP对盐酸罗哌卡因的对映体纯度检查, 均采用毛细管电泳法测定

一、基本原理

- **高效**毛细管电泳以高压电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据各组分之间的迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术
- 在毛细管电泳中有两个重要的迁移：
 - 电泳迁移
 - 电渗流迁移

•电泳迁移

- 在电场作用下，带电组分作定向移动。其迁移速度（ v ）可用下式表示：

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

- μ_e 为电泳淌度
- E 为电场强度（ V/L ）——是外加电压和毛细管长度的函数

•电泳迁移原理

- 对于给定的离子和介质，淌度 μ_e 为离子的特征常数，其大小取决于分子所受的电场力 F_E 和其通过介质时的摩擦力 F_F 的平衡：

$$F_E = qE \quad (q \text{ 为离子电量})$$

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

(η 溶液粘度, r 离子半径, v 离子速度)

- 达到平衡时，两种力大小相等而方向相反，即

$$qE = 6\pi\eta r v \quad (2)$$

• 电泳迁移原理

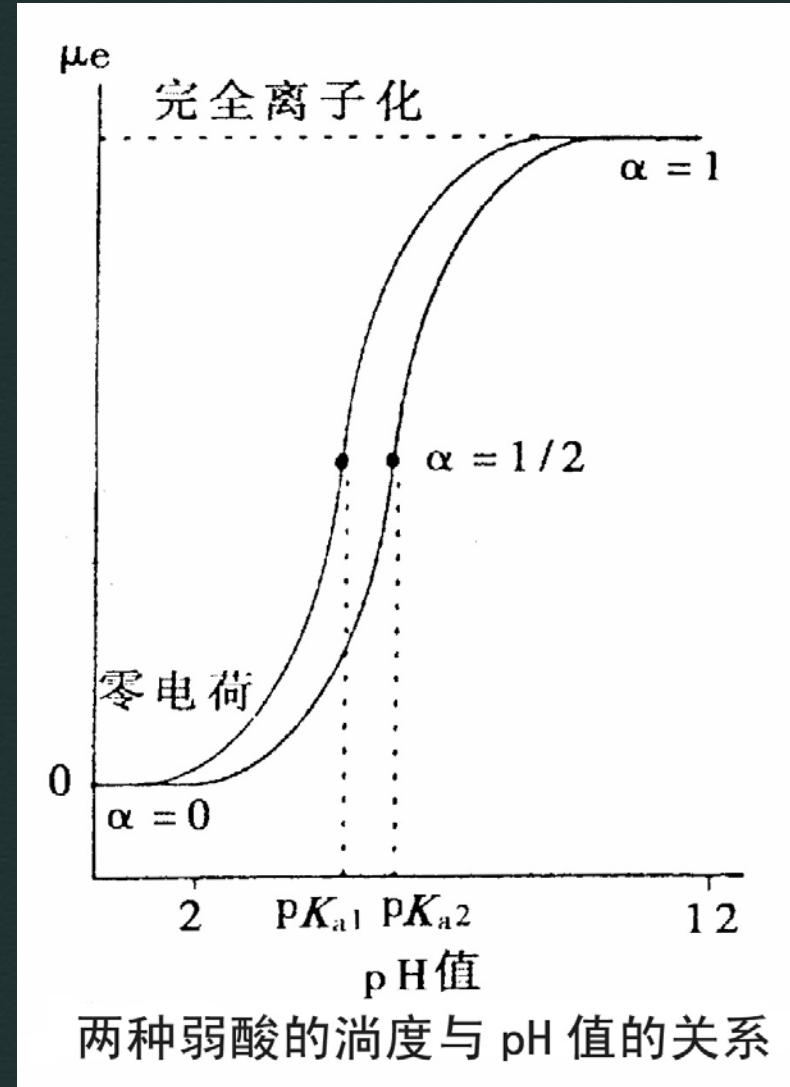
- 根据式 (1)，淌度 $\mu_e = v/E$
- 根据式 (2)， $v/E = q/(6 \pi \eta r)$
- 所以 $\mu_e = q/(6 \pi \eta r)$ (3)
- 式 (3) 表明，带电量大的物质，离子半径小的物质有较高的淌度

• 淌度

- **淌度**——物理常数，是在溶质带最大电量时测定并外推至**无限稀释条件下的数值**，即**绝对淌度**
- **有效淌度**——实验条件下测得的数值，其取决于操作缓冲液的pH值和组成

• 溶液pH值对淌度的影响

- 若两种溶质在完全离子化状态下，具有相同的电泳淌度，则因没有差速迁移而不能分离
- 但若它们具有不同的pKa值，则可调节溶液pH值，使它们具有不同的有效淌度，而达到分离的目的



•电渗流 (Electroosmosis flow, EOF)

- 毛细管电泳中的一个重要现象，它是毛细管内壁表面电荷所引起的管内液体整体流动的现象，是推动流体前进的驱动力
- 当固体与液体接触时，固-液两相界面上会带有相反符号的电荷，形成双电层。对于石英毛细管柱，当溶液pH值达4以上时，其内壁带负电荷，管中液体将感应一层正电荷，形成双电层，在高电压作用下缓冲液整体向负极移动，此即电渗流 (μ_{eof})

•电渗流作用示意图

Electro-osmotic flow.

电渗流

Negatively charged capillary wall

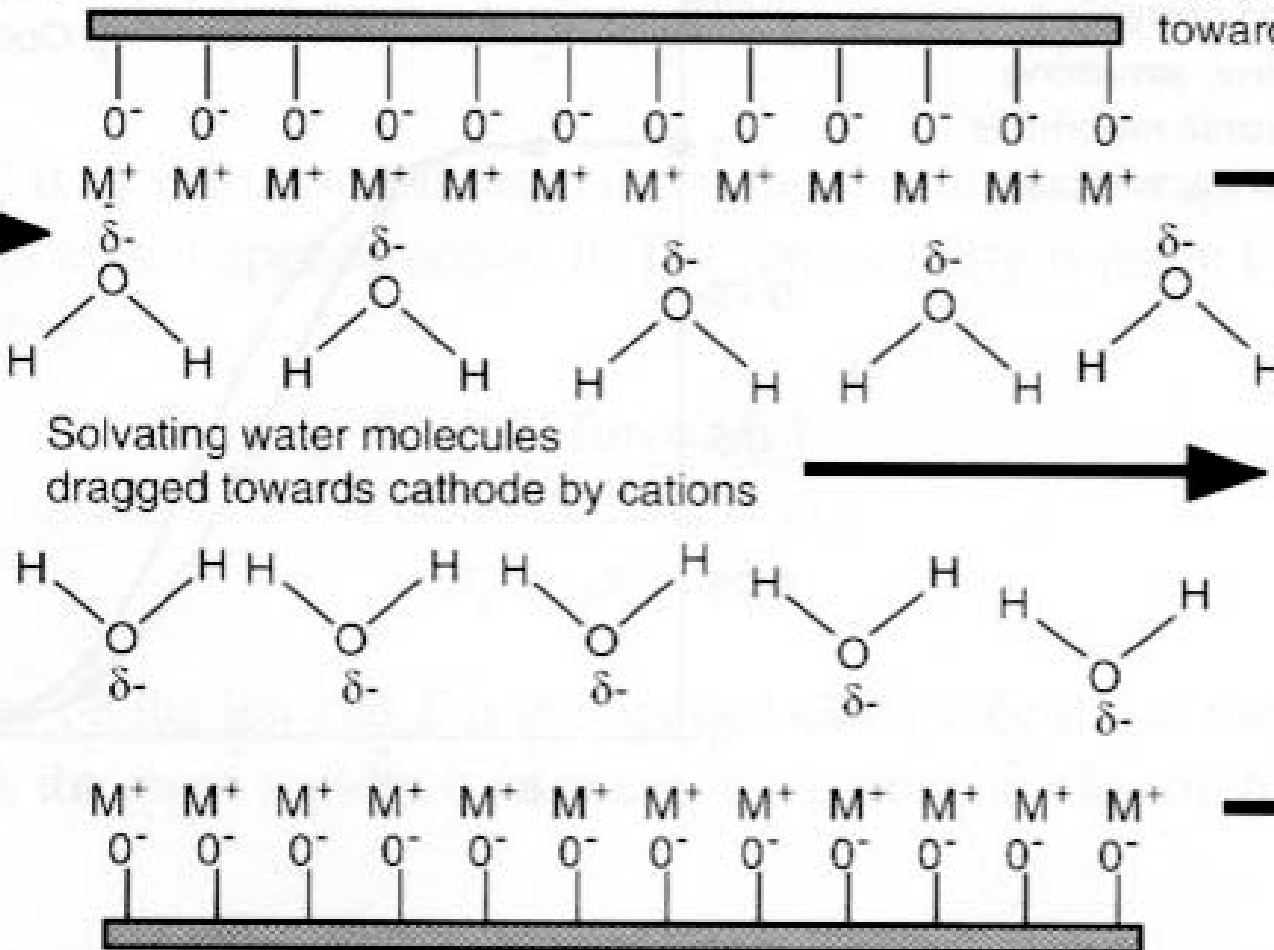
Cations move towards cathode

Cations attracted to wall

在电场作用下

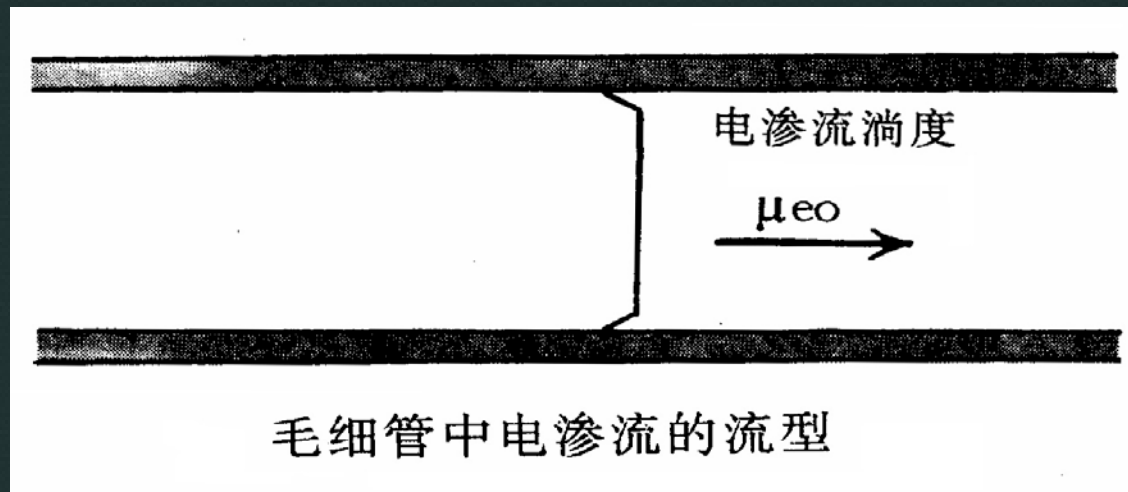
+

-



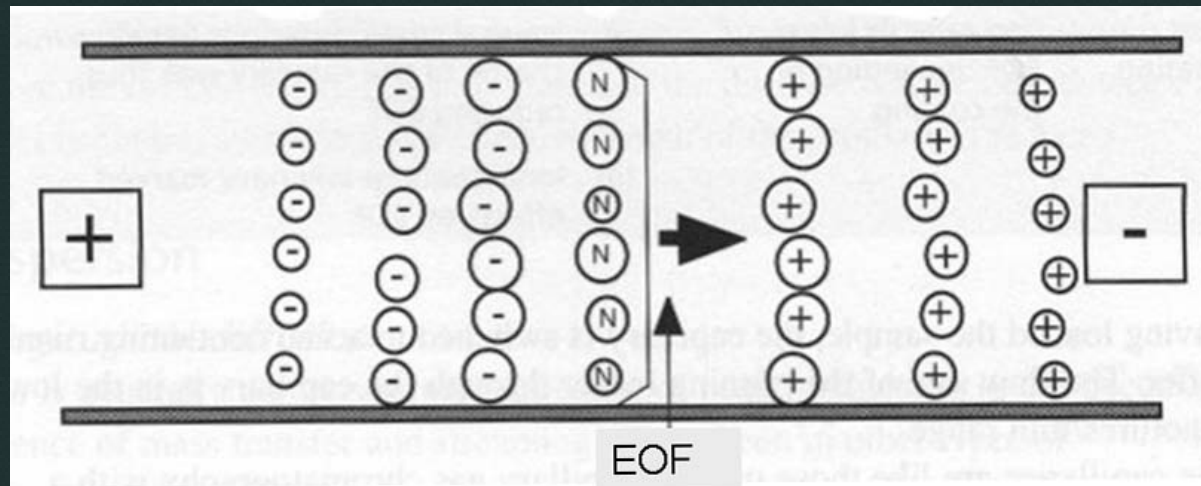
•电渗流性质

- 电渗流的一个**独特性质**是其具有平面流型，推动液体流动的力在毛细管内均匀分布，平面流型的优点是对谱带的扩散没有直接作用



•带电微粒在毛细管内的移动速度

- 带电微粒在毛细管内的移动速度为电泳流和电渗流的矢量和。 $v = (\mu_e + \mu_{eof}) V/L$
- 一般情况下，电渗流的方向是由正极向负极移动，而电渗流的速度又远大于电泳流



故所有组分均向同一方向——阴极移动，但速度各不相同

• 淌度与迁移时间

$$T_m = \frac{L \times l}{\mu_e \times V}$$

- 式中 L 为毛细管总长度， l 为毛细管有效长度（进样点到检测器距离）， V 为电压
- 当 L ， l ， V 一定时， T_m 与 μ_e 成反比

•电渗流后的迁移时间

- $T_m = L \cdot I / (\mu_e + \mu_{eof}) \cdot V$
- $(\mu_e + \mu_{eof})$ 称为**表观淌度** μ_a (即在电渗流存在下测得的淌度)
- 溶质从进样点迁移至检测点所用的时间称为“**迁移时间**(t)”，根据上式可计算溶质的表观淌度：
- $\mu_a = \mu_e + \mu_{eof} = L \cdot I / t \cdot V$
- 当L、I、V一定时， μ_a 与t成反比
- 如用一种中性标记物（二甲亚砷等）单独测定EOF，则可自表观淌度中扣除电渗淌度而求得溶质的有效淌度

二、毛细管电泳分离模式

- 毛细管电泳的操作方式有多种，分离机制各不相同，常用的分离模式有：

方 式	分离依据
毛细管区带电泳 (CZE)	自由溶液的淌度
胶束电动色谱 (MECC)	疏水性/离子性相互作用
毛细管凝胶色谱 (CGE)	分子大小/ 电荷
毛细管等电聚焦 (CIEF)	等电点
毛细管等速电泳 (CITP)	移动界面
毛细管电色谱 (CEC)	样品与固定相间相互作用

毛细管区带电泳

(capillary zone electrophoresis, CZE)

- CZE是应用最广泛的一种技术，在毛细管内充满缓冲液，不同质荷比大小的组分在电场的作用下，根据迁移速度不同而达到分离
- 缓冲液选择
 - 因电渗流（EOF）对pH值很敏感，故要求采用缓冲液来维持恒定的pH值

•对缓冲液的要求

- 强缓冲能力，低的紫外吸收，小的淌度
- 常用的缓冲液有Tris（三羟甲基氨基丙烷），硼酸盐，磷酸盐等

• 缓冲液的pH值

- 当测定多肽、蛋白质等时，由于溶质的pI值相接近，此时调节缓冲液的pH值对分离特别有用。在高于或低于溶质的pI值情况下操作，可使溶质所带电荷改变，从而在EOF前或后流出

• 表面活性剂

- 在毛细管电泳中常添加表面活性剂，作为疏水性溶质的增溶剂、与溶质形成离子对，或作为毛细管内壁的改性剂等，以改善分离效率。
- 常用表面活性剂有：

- 阴离子—十二烷基硫酸钠（SDS）
- 阳离子—十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）
- 两性离子—*N,N'*二甲基胺-3-丙烷-1-磺酸

• 手性选择剂

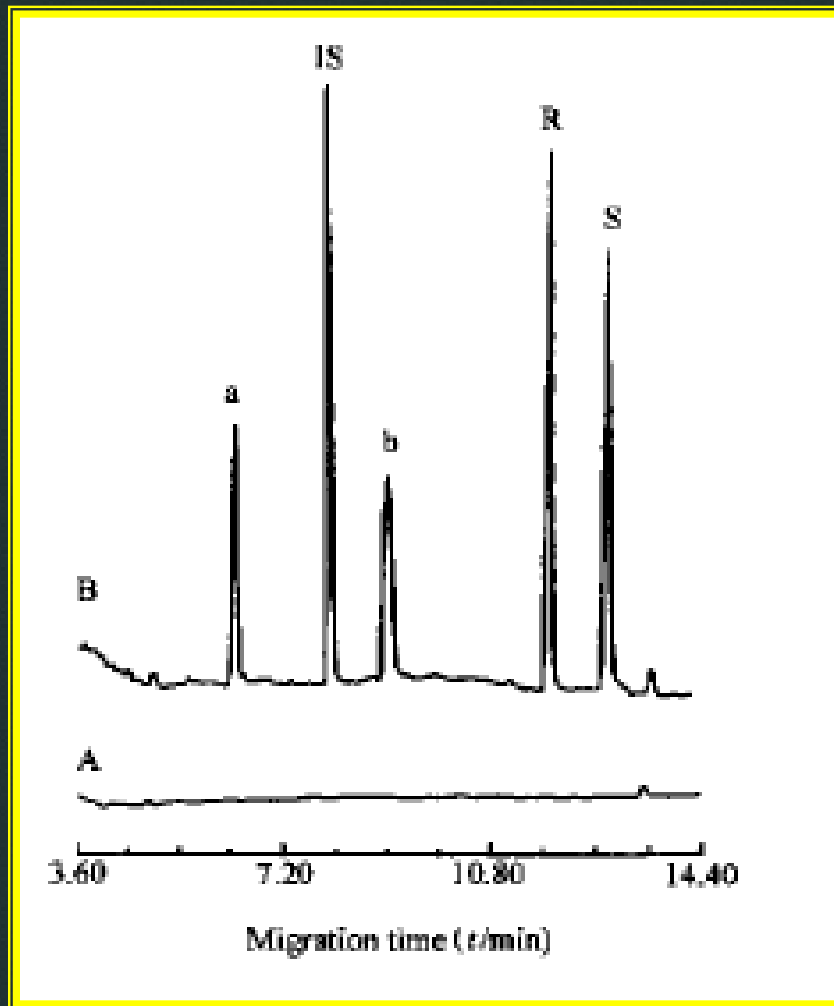
- 在操作缓冲液中加入少量手性试剂可以实现手性分离。常用的手性试剂有：
 - 环糊精及其衍生物、冠醚、胆汁盐等
 - 选择手性试剂的种类、浓度或添加醇类、表面活性剂、金属离子等可提高选择性

• 温度与毛细管内壁改性

- **温度**——恒温是消除焦耳热的主要目的，但温度也可作为一个优化分离的参数。通过调节温度来改变溶液黏度、EOF和分析时间，以达到分离目的
- **毛细管内壁改性**——在分离生物大分子物质如蛋白质时，由于它们与可被毛细管内壁强烈吸附，使分离效率大大降低。需对毛细管内壁改性：
 - 永久性改性——硅烷化
 - 动力学去活——操作缓冲液中加改性剂

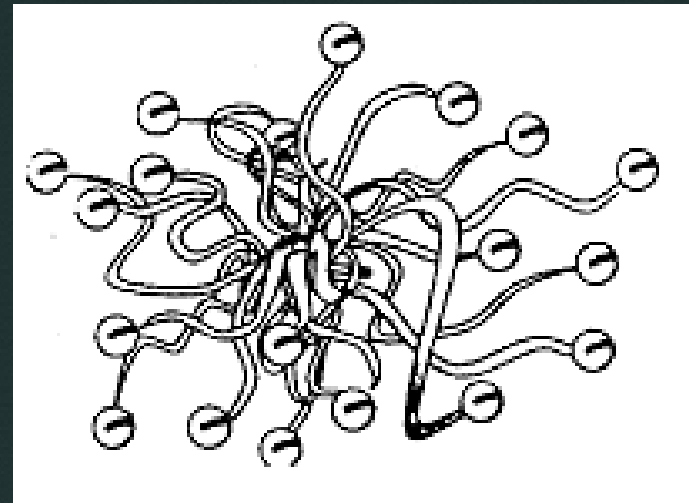
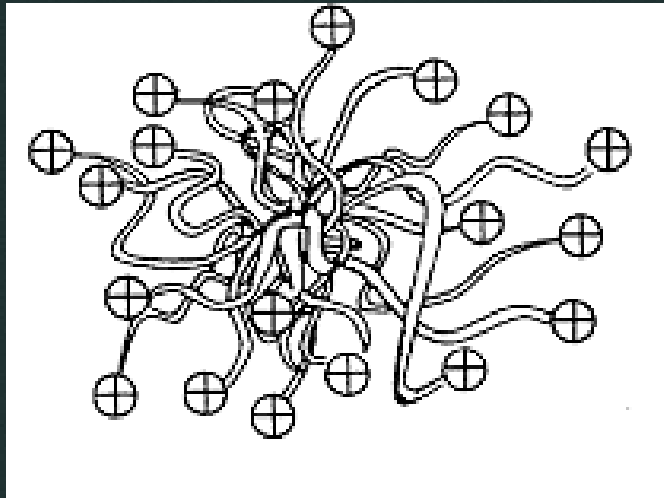
例 氯苄律定对映体在家兔体内药代动力学研究

- 电泳条件：
 - ① 羧甲基环糊精衍生物 (CM- β -CD) 为手性拆分剂, 最佳浓度 5mmol/L
 - ② 毛细管柱 48cm \times 58 μ m
 - ③ 75mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH2.3)
 - ④ UV检测波长 200nm
 - ⑤ 电迁移进样 (20kV \times 16s)
 - ⑥ 电压 20kV, 柱温 20 $^{\circ}$ C



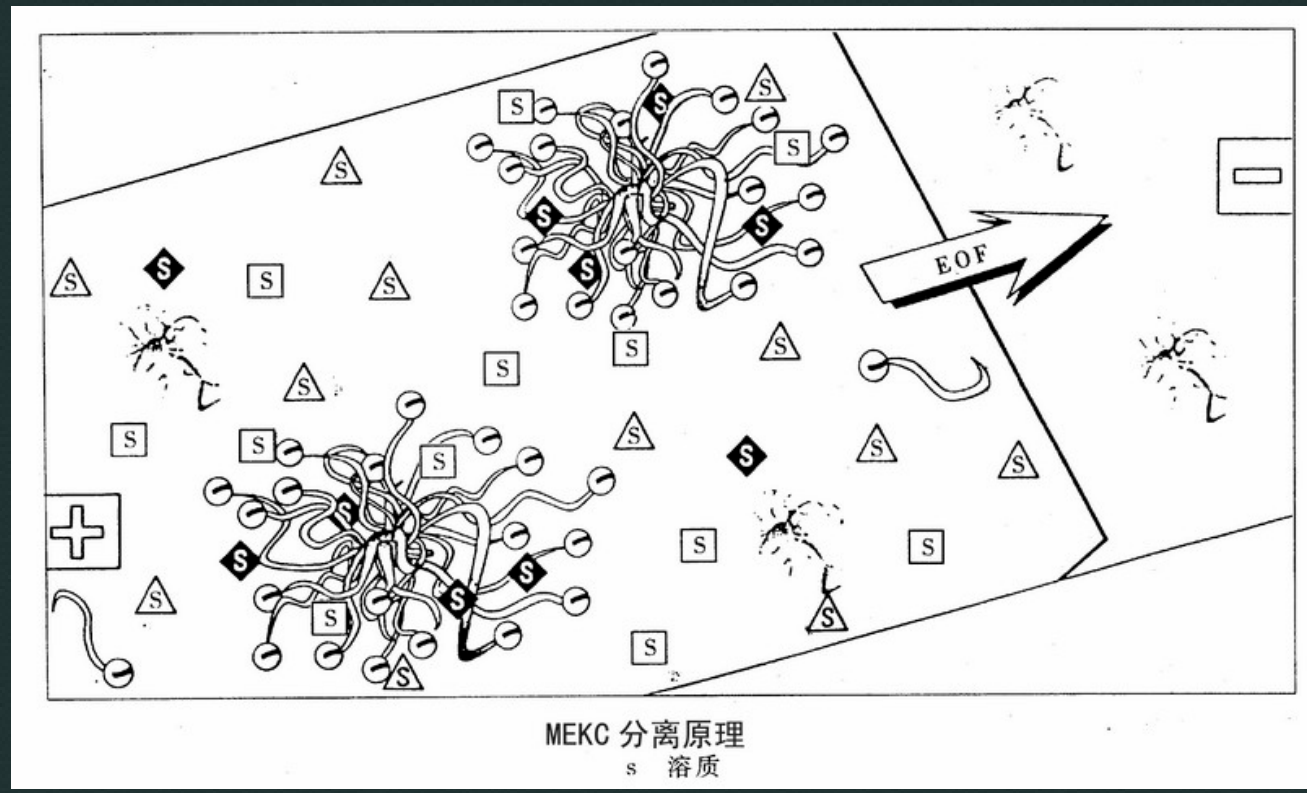
胶束电动毛细管色谱 (MECC或MEKC)

- **MECC**是电泳技术与色谱技术的交叉，也是唯一既能分离中性物质又能分离带电组分的电泳技术。把表面活性剂加到缓冲液中，在表面活性剂的**临界浓度**以上，单个表面活性剂之间聚集形成胶束。疏水性一端聚在一起朝向里，带电荷的一端则朝向缓冲液



•MECC的作用原理

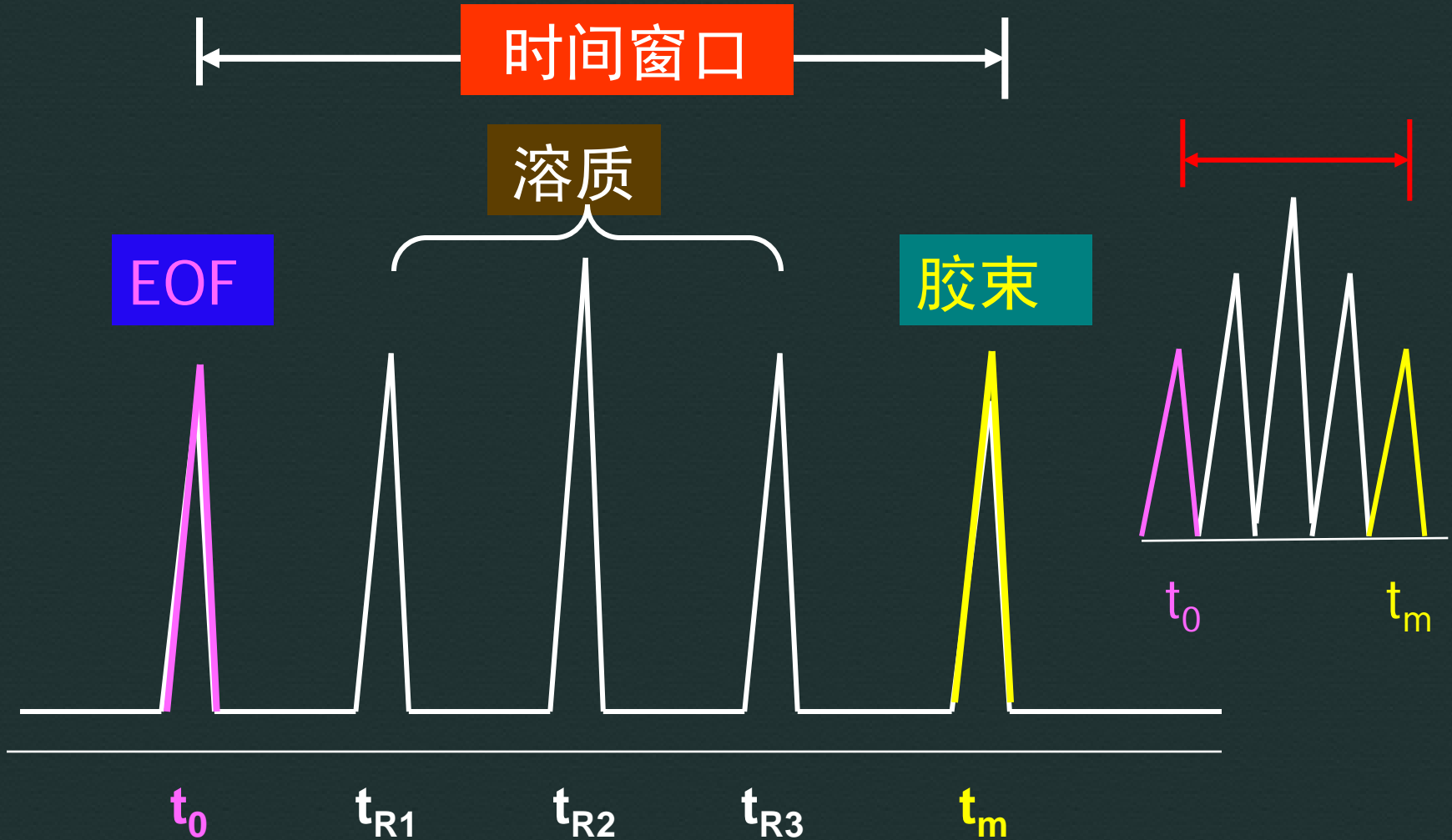
- 表面活性剂分子和胶束通常是带电的，以与EOF相同或相反的方向移动，但EOF的移动速度一般较胶束快



• 选择性与分离度

- 通过选择不同的表面活性剂，改变缓冲液浓度、pH值和操作温度，使用添加剂（尿素、金属离子、手性试剂），加入有机修饰剂（甲醇、乙腈、异丙醇）等来控制溶质与胶束之间的相互作用，以提高色谱的选择性
- 在分离中性物质时，所有溶质都在 t_0 与 t_m 之间流出。亲水性溶质随EOF流出，被胶束完全保留的溶质随胶束流出。控制条件，采用中等程度的EOF和高迁移率的胶束，以扩大时间窗口，提高分离度

•中性溶质的流出时间窗口示意图



例 高效毛细管电泳法测定注射用水溶性维生素的含量

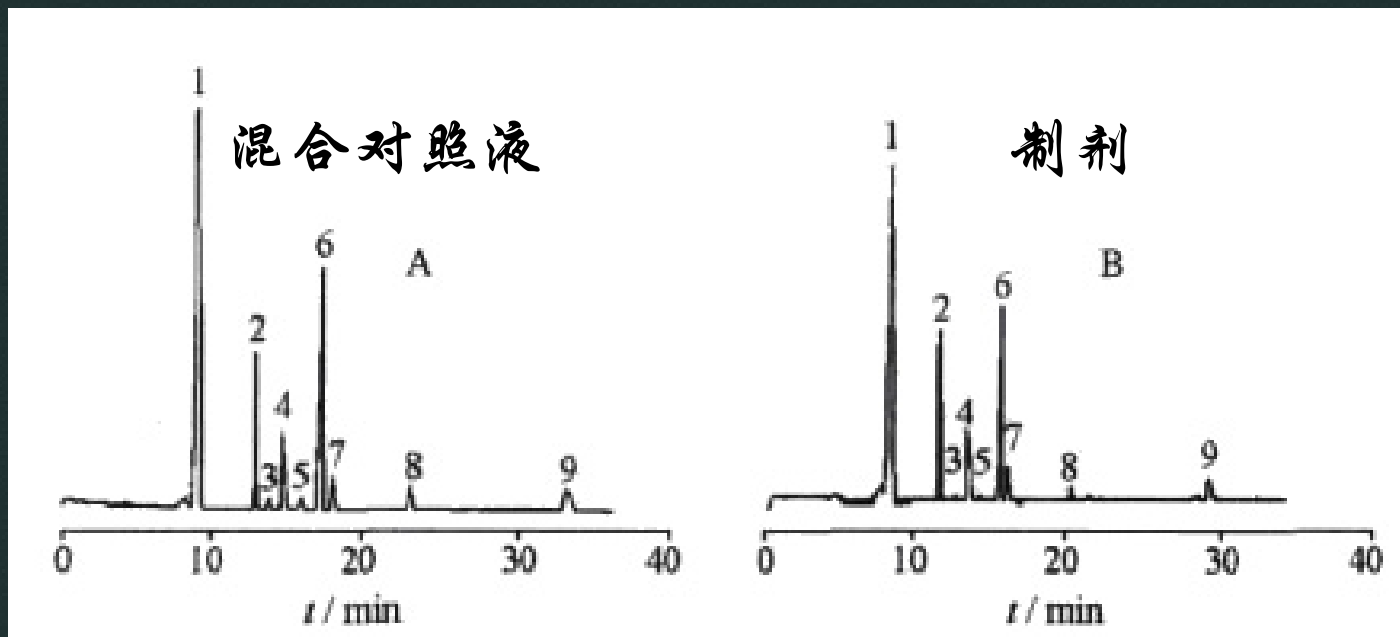
- 采用胶束电动毛细管色谱法，分离分析注射用水溶性维生素制剂中VB1、VB12、VB6、VC、烟酰胺、叶酸、D-生物素、核黄素磷酸钠、泛酸钠9种成分
- 电泳条件：
- 未涂层熔融石英毛细管(67cm×50 μm，有效长度55cm)
- 运行缓冲液为50 mmol/L SDS-50 mmol/L的硼酸钠 (pH 8.33)
- 检测波长214 nm
- 压力进样 (6.89KPa×10 s)
- 运行电压15.0 kV；毛细管柱温25℃

•测定方法

- 取约1.5g的内容物，精密称定，置于10ml量瓶中，用水冲洗瓶内壁，洗液与样品合并，加水溶解并稀释至刻度，混匀。用0.22 μ m微孔滤膜过滤后，在上述电泳条件下进样，记录维生素B12和D-生物素的峰面积。另精密量取上述样品溶液1.0ml，置于100 ml量瓶中，加水稀释至刻度、摇匀，同法测定，记录VB1, VB6, VC、烟酰胺、叶酸、核黄素磷酸钠、泛酸钠的峰面积，按外标法计算样品含量

•测定结果

- 测得各种成分按标示量计算的百分含量 (%) 在 97.5 ± 0.9 到 103.8 ± 0.7 之间 ($n=3$)
- 制剂中9种成分的毛细管电泳图如下:



1-烟酰胺； 2-VB6； 3-D-生物素； 4-核黄素磷酸钠；
5-VB12； 6-VC； 7-泛酸钠； 8-叶酸； 9-VB1