

苯甲醇、苯甲酸、水杨酸的毛细管电泳分离

一、实验目的

1. 进一步理解毛细管电泳的基本原理；
2. 熟悉毛细管电泳仪器的构成；
3. 了解影响毛细管电泳分离的主要操作参数。

二、实验原理

1. 电泳淌度

毛细管电泳 (CE) 是以电渗流 (EOF) 为驱动力, 以毛细管为分离通道, 依据样品中组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的一种液相微分离技术。离子在自由溶液中的迁移速率可以表示为:

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

式中 v 是离子迁移速率, μ 为电泳淌度, E 为电场强度。对于给定的荷电量为 q 的离子, 淌度是其特征常数, 它由离子所受到的电场力 (F_E) 和通过介质所受到的摩擦力 (F_F) 的平衡所决定。

$$F_E = qE \quad (2)$$

对于球形离子:

$$F_F = -6\pi\eta rv \quad (3)$$

式中 η 为介质粘度, r 为离子的流体动力学半径。在电泳过程达到平衡时, 上述两种力方向相反, 大小相等:

$$qE = -6\pi\eta rv \quad (4)$$

将式 (4) 代入式 (1), 得:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

因此, 离子的电泳淌度与其荷电量呈正比, 与其半径及介质粘度呈反比。带相反电荷的离子其电泳淌度的方向也相反。需要指出, 我们在物理化学手册中可以查到的离子淌度常数是绝对淌度, 即离子带最大电量时测定并外推至无限稀释条件下所得到的数值。在电泳实验中测定的值往往与此不同, 故我们将实验值称为有效淌度 (μ_e)。有些物质因为绝对淌度相同而难以分离, 但我们可以通过改变介质的 pH 值, 使离子的荷电量发生改变。这样就可以使不同离子具有不同有效淌度, 从而实现分离。下文中所提到

的电泳淌度除特别说明外，均指有效淌度。

2. 电渗流和电渗淌度

电渗流 (EOF) 是 CE 中最重要的概念，指毛细管内壁表面电荷所引起的管内液体的整体流动，来源于外加电场对管壁溶液双电层的作用。

在水溶液中多数固体表面根据材料性质的不同带有过剩的负电荷或正电荷。就石英毛细管而言，表面的硅羟基在 pH 大于 3 以后就发生明显的解离，使表面带有负电荷。为了达到电荷平衡，溶液中的正离子就会聚集在表面附近，从而形成所谓双电层，如图 1 所示。这样，双电层与管壁之间就会产生一个电位差，叫做 Zeta 电势。但毛细管两端施加一个电压时，组成扩散层的阳离子被吸引而向负极移动。由于这些离子是溶剂化的，故将拖动毛细管中的体相溶液一起向负极运动，这便形成了电渗流。需要指出，很多非离子型材料如聚四氟乙烯和聚丙烯等材料表面也可以产生电渗流，原因可能是其表面对阴离子的吸附。

电渗流的大小可用速率和淌度来表示：

$$v_{EOF} = (\varepsilon \xi / \eta) E \quad (6)$$

$$\text{或者 } \mu_{EOF} = \varepsilon \xi / \eta \quad (7)$$

式中 v_{EOF} 为电渗流速率， μ_{EOF} 为电渗淌度， ξ 为 Zeta 电势， ε 为介电常数。

Zeta 电势主要取决于毛细管表面电荷的多少。一般来说，pH 越高，表面硅羟基的解离程度越大，电荷密度越大，电渗流速率就越大。

除了受 pH 的影响外，电渗流还与表面性质（硅羟基的数量、是否有涂层等）、溶液离子强度有关，双电层理论认为，增加离子强度可以使双电层压缩，从而降低 Zeta 电势，减小电渗流。此外，温度升高可以降低介质粘度，增大电渗流。电场强度虽然不影响电渗淌度，但却可改变电渗流速率。显然，电场强度越大，电渗流速率越大。

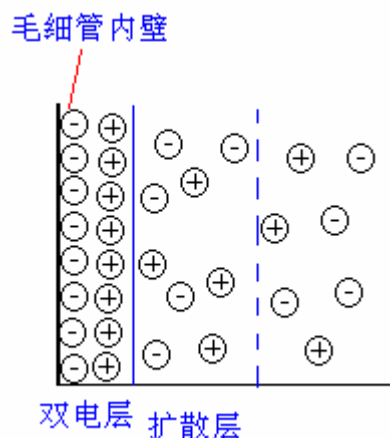


图 1 毛细管壁双电层结构示意图

由上可知，电渗流的方向一般是从正极到负极，然而，在溶液中加入阳离子表面活性剂后，由于毛细管表面强力吸附阳离子表面活性剂的亲水端，而阳离子表面活性剂的疏水端又会紧密结合一层表面活性剂分子，结果就形成了带负电的表面，双电层 Zeta 电势的极性发生了反转，最后使电渗流的方向发生了变化。在分析小分子有机酸时，这是常用的电渗流控制技术。

电渗流的一个重要特性是具有平面流型。由于引起流动的推动力在毛细管的径向上均匀分布，所以管内各处流速接近相等。其优点是径向扩散对谱带扩展的影响非常小，如图 2 所示。与此形成鲜明对照的是高压泵驱动的抛物线流型（如在 HPLC 中），由于管内径向上各处的流速不同，使得谱带峰形变宽。这也是与 HPLC 相比，CE 具有更高分离效率的一个重要原因。

电渗流的另一个重要优点是可以使几乎所有被分析物向同一方向运动，而不管其电荷性质如何。这是因为电渗淌度一般比离子的电泳淌度大一个数量级，故当离子的电泳淌度方向与电渗流方向相反时，仍然可以使其沿电渗流方向迁移。这样，就可在一次进样分析中，同时分离阳离子和阴离子。中性分子由于不带电荷，故随电渗流一起运动。如果对毛细管内壁进行修饰可以降低电渗流，而被分析物的淌度则不受影响。在此情况下，阴阳离子有可能向不同的方向迁移。

3. 毛细管电泳的仪器及操作

图 3 所示为 CE 仪器示意图。其组成部分主要是高压电源、缓冲液瓶（包括样品瓶）、毛细管和检测器。下面分别简要讨论之。

高压电源是为分离提供动力的，商品化仪器的输出直流电压一般为

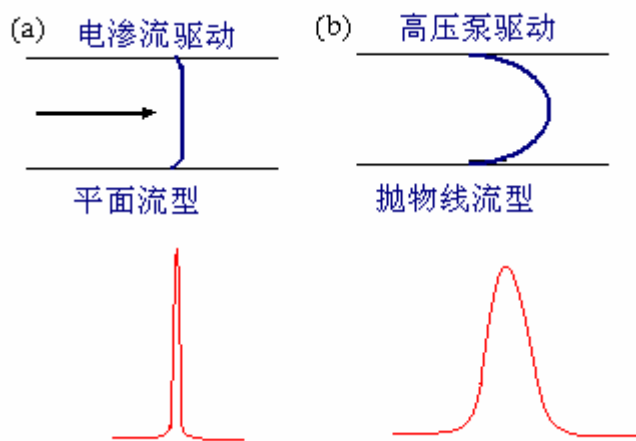


图 2 不同驱动力的流型和相应的谱带峰形

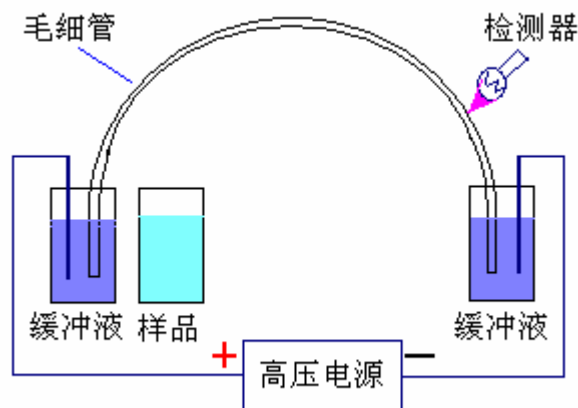


图 3 CE 仪器组成示意图

0~30kV，也有文献报道采用 60kV 以至 90kV 电压的。大部分直流电源都配有输出极性转换装置，可以根据分离需要选择正电压或负电压。

缓冲液瓶多采用塑料（如聚丙烯）或玻璃等绝缘材料研制成，容积为 1~3mL。考虑到分析过程中正负电极上发生的电解反应，体积大一些的缓冲液瓶有利于 pH 的稳定。进样时毛细管的一端伸入样品瓶，采用压力或电动方式将样品加载到毛细管入口，然后将样品瓶换为缓冲液瓶，接通高压电源开始分析。

4. 毛细管电泳的分离模式

CE 有 6 种常用的分离模式，其分离依据及应用范围如表 1 所示。其中毛细管区带电泳（CZE）、胶束电动毛细管色谱（MEKC）和毛细管电色谱（CEC）最为常用。本实验的内容为 CZE。

表 1 6 种 CE 分离模式的分离依据及应用范围

分离模式	分离依据	应用范围
毛细管区带电泳（CZE）	溶质在自由溶液中的淌度差异	可解离的或离子化合物、手性化合物及蛋白质、多肽等
毛细管胶束电动色谱（MECC）	溶质在胶束与水相间分配系数的差异	中性或强疏水性化合物、核酸、多环芳烃、结构相似的肽段
毛细管凝胶电泳（CGE）	溶质分子大小与电荷/质量比差异	蛋白质和核酸等生物大分子
毛细管等电聚焦（CIEF）	等电点差异	蛋白质、多肽
毛细管等速电泳（CITP）	溶质在电场梯度下的分布差异（移动界面）	同 CZE，电泳分离的预浓缩
毛细管电色谱（CEC）	电渗流驱动的色谱分离机制	同 HPLC

毛细管区带电泳（CZE）是最简单的 CE 模式，因为毛细管中的分离介质只是缓冲液。在电场的作用下，样品组分以不同的速率在分立的区带内进行迁移而被分离。由于电渗流的作用，正负离子均可以实现分离。在正极进样的情况下，正离子首先流出毛细管，负离子最后流出。中性物质在电场中不迁移，只是随电渗流一起流出毛细管，故得不到分离。

在 CZE 中，影响分离的因素主要有缓冲液的种类、浓度和 pH 值、添加剂、分析电压、温度、毛细管的尺寸和内壁改性等。缓冲液种类的选择主要考虑其 pKa 值要与分析所用 pH 匹配，另外，有的缓冲液与样品组分之间有特殊的相互作用，可提高分析选择性。比如，分析多羟基化合物时，多用硼酸缓冲液，因为硼酸根可与羟基形成络合物，

有利于提高分离效率。增大缓冲液的浓度一般可以改善分离，但电渗流会降低，因而延长了分析时间，过高的盐浓度还会增加焦耳热。缓冲液的 pH 主要影响电渗流的大小和被分析物的解离情况，进而影响被分析物的淌度，是 CZE 分析中最重要的操作参数之一。缓冲液添加剂多为有机试剂，如甲醇、乙腈、尿素、三乙胺等，其作用主要是增加样品在缓冲液中的溶解度，抑制样品组分在毛细管壁的吸附，改善峰形。提高分析电压有利于提高分离效率和缩短分析时间，但可能造成过大的焦耳热。温度的变化可以改变缓冲液的粘度，从而影响电渗流。毛细管内径越小，分离效率越高，但样品容量越低；增加毛细管长度可提高分离效率，但延长了分析时间。有时为了改善分离，要对毛细管内壁进行改性，比如采用涂层技术。

5. 毛细管电泳的基本参数

CE 中的分析参数可以用色谱中类似的参数来描述，比如与色谱保留时间相对应的有迁移时间，定义为一种物质从进样口迁移到检测点所用的时间，迁移速率 (v) 则是迁移距离 (l , 即被分析物质从进样口迁移到检测点所经过的距离, 又称毛细管的有效长度) 与迁移时间 (t) 之比:

$$v = \frac{l}{t} \quad (8)$$

因为电场强度等于施加电压(V)与毛细管长度(L)之比:

$$E = \frac{V}{L} \quad (9)$$

就 CE 的最简单的模式—毛细管区带电泳 (CZE) 而言, 结合式 (1), 可得:

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \quad (10)$$

在毛细管区带电泳(CZE) 条件下测得的淌度是电泳淌度与电渗流淌度的矢量和, 我们称之为表观淌度 μ_a , 即:

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (11)$$

实验中可以采用一种中性化合物, 如二甲亚砜或丙酮等, 来单独测定电渗流淌度, 然后求得被分析物的有效淌度。例如, 图 4 是一个混合物的分离结果, 其中三个峰分别为阳离子 ($t = 39.5s$)、中性化合物 ($t = 66.4s$) 和阴离子 ($t = 132.3s$)。实验用毛细管总长度为 48.5cm, 有效长度 (从进样口到检测点的距离) 为 40cm, 施加电压为 20kV。根据上述公式, 我们便可以计算出电渗淌度以及不同离子的表观淌度和有效淌度。

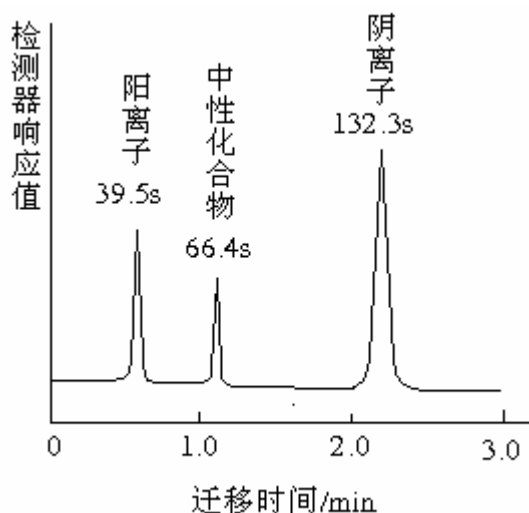


图 4 阳离子、中性化合物和阴离子的 CE 分离图

电渗淌度:

$$\mu_{EOF} = \frac{40 \times 48.5}{20000 \times 66.4} = 1.46 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

阳离子:

$$\mu_a = \frac{40 \times 48.5}{20000 \times 39.5} = 2.46 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} = 1 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

阴离子:

$$\mu_a = \frac{40 \times 48.5}{20000 \times 132.3} = 7.33 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} = -5.87 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

注意, 阴离子的有效淌度为负值, 因为其电泳淌度与电渗淌度的方向相反。

三、实验设备

每四人一组共用一台 Capel-103RT 电泳仪。

四、实验仪器及试剂

5 mL 移液管 2 只, 1mL 移液管共 2 支, 分别标上四种标样的标签, 两组公用。每组 10 mL 容量瓶 2 个, 滴管 2 支, 分别标上标准、未知的标签。塑料样品管共 16 个, 每组 8 个, 分别用于标准样品、未知样品、三种缓冲溶液、NaOH、水和废液, 做好标号。滴瓶一共 5 个, 分别装三种缓冲液(buffer)、1mol/L 的 NaOH 和乙醇。镊子、洗瓶、吸耳球、试管架、塑料样品管架、废液烧杯每组一个。剪刀一把, 记号笔一支, 滤纸。

标样: 苯甲醇、苯甲酸、水杨酸、对氨基水杨酸, 均溶于二次水中, 浓度 1.00 mg/mL, 作为标准品, 混合稀释作为标样。另有一个预先配制的未知浓度混合样品。

缓冲溶液(buffer): 10 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 1:1 缓冲溶液(NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 各 5mMol/L), 20 mmol/L HAc-NaAc pH 为 6 (HAc:NaAc 大约 1:15)缓冲溶液, 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液。

1mol/L NaOH 溶液, 二次去离子水。

五、实验步骤

1. 仪器的预热和毛细管的冲洗: 在实验教师的指导下, 打开仪器和配套的工作站。

工作温度设置为 30℃，不加电压，冲洗毛细管，顺序依次是：1 mol/L NaOH 溶液 5 min，二次水 5 min，10 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 1:1 缓冲溶液 5 min，冲洗过程中出口(outlet)对准废液的位置，并不要升高托架。

2. 混合标样的配制：毛细管冲洗的同时，配制混合标样。分别用 5ml 的移液管移取 3ml 苯甲醇、3ml 苯甲酸，用 1ml 的移液管移取 1ml 水杨酸、0.5ml 对氨基水杨酸于 10ml 的容量瓶中，定容，得到苯甲醇、苯甲酸、水杨酸、对氨基水杨酸浓度分别为 300 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液作为混合标样。（试思考为什么不采用浓度一样的混合溶液作为混合标样？）

3. 混合标样的测定：待毛细管冲洗完毕，取 1 ml 混合标样，置于塑料样品管，放在电泳仪进口(Inlet)托架上 sample 的位置，然后调整出口(outlet)对准缓冲溶液(buffer)，升高托架并固定，然后开始进样。进样压力 30 mbar，进样时间 5 s。进样后将进口(Inlet)托架的位置换回缓冲溶液(buffer)，**切记换回 buffer 的位置！**选择方法 2004CE.mtw，修改合适的文件说明，然后开始分析，电压 25 kV，时间约 10 min。

4. 未知浓度混合样品的测定：方法与条件同上，测试未知浓度混合样品，分析时间约 10 min。

5. 不同缓冲溶液下迁移时间的变化：未知浓度混合样品的测定完毕后，冲洗毛细管，顺序依次是：1 mol/L NaOH 溶液 5 min，二次水 5 min，然后更换进出口两端的缓冲溶液为 20 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，冲洗 5 min；并在此条件下测试未知浓度混合样品，电压 25 kV，时间约 10 min。按照前面的顺序再次冲洗毛细管，再次更换进出口两端的缓冲溶液为 10 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ pH 为 6，冲洗 5 min；并在此条件下测试未知浓度混合样品，电压 25 kV，时间约 15 min。

6. 完成实验以后，用水冲洗毛细管 10 min，一天中的第二组(4:00-7:00)的同学用水冲洗以后再用空气吹干 10 min。

7. 打印报告，清理实验台。

六、实验数据处理

1. 根据电泳的原理，判断两组混合标样中 4 个峰各自的归属(需要查找被分析物的 pKa 值)，找到在未知浓度混合样品中与之迁移时间一致的峰。

2. 按照已知浓度峰的积分面积之比折算未知浓度混合样品中各个组分的浓度（外标定量法）。

3. 计算各个组分的表观淌度和有效淌度，并说明哪个组分可以作为电渗流标记物。

本次 CE 实验使用的毛细管总长度 $L=50\text{cm}$ ，有效长度 $l=40.5\text{cm}$ 。

4. 根据电泳的原理，判断在另外两种缓冲溶液下，各个峰的归属，并对各个组分迁移时间的变化做出合理分析和讨论。

七、实验注意事项

1. 冲洗毛细管时禁止在毛细管上加电压；不允许更改讲义上给定的工作电压，也不建议改变进样时间。

2. 样品和缓冲溶液之间的切换是手动的，在实验过程中要随时注意是不是放在正确位置；如果在分析时将样品或者洗涤液当作缓冲溶液，请停止分析并重新用对应缓冲溶液冲洗管路 10 min。因为电泳是需要在同一下午和其他实验交换的四学时实验，这样有可能会耽误时间，希望引起注意。此错误一经证实，每一次扣掉 10% 实验成绩。

3. 冲洗毛细管对于实验结果的可靠性和重现性至关重要，务必认真完成每一次冲洗，不允许缩短冲洗时间或者不冲洗。

4. 做完实验以后一定要用水冲洗毛细管，一天做完以后要用空气吹干，否则可能会导致毛细管堵塞，严重影响后面组的同学实验，希望引起足够的重视。

5. 塑料样品管的里面容易产生气泡，轻敲管壁排出气泡以后方可放入托管架。

6. 合理分配实验时间，注意一组四个同学之间的分工合作，每个同学均要实际操作冲洗、进样、分析全过程一次。