

## 附件 1: 0542 毛细管电泳法草案公示稿 (第二次)

## 0542 毛细管电泳法

毛细管电泳法是指以弹性石英毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力,根据供试品中各组成成分的淌度,即(单位电场强度下的迁移速度)和/(或)分配行为的差异而实现分离的一种物理分析方法。

## 一、原理

当熔融石英毛细管内充满操作缓冲液时,管内壁上硅羟基解离释放氢离子至溶液中使管壁带负电荷并与溶液形成双电层( $\zeta$  电位),即使在较低 pH 值缓冲液中情况也如此。当毛细管两端加上直流电压时将使带正电的溶液整体地移向阴极端。此种在电场作用下溶液的整体移动称为电渗流(EOF)。内壁硅羟基的解离度与操作缓冲液 pH 值和添加的改性剂有关。降低溶液 pH 值会降低解离度,减小电渗流;提高溶液 pH 值会提高解离度,增加电渗流。有机添加剂的加入有时会抑制内壁硅羟基的解离,减小电渗流。在操作缓冲液中带电粒子在电场作用下以不同速度向极性相反的方向移动,形成电泳,运动速度等于其电泳速度和电渗速度的矢量和。通常电渗速度大于电泳速度,因此电泳时各组分即使是阴离子也会从毛细管阳极端流向阴极端。为了减小或消除电渗流,除了降低操作缓冲液 pH 值或改变添加剂的种类之外,还可以采用内壁聚合物涂层的毛细管。这种涂层毛细管可减少大分子在管壁上的吸附。

供试品中各成分的迁移速度由在电场(E)作用下成分的电泳淌度和毛细管中缓冲溶液的电渗淌度的综合影响所决定。成分电泳淌度( $\mu_{ep}$ )取决于成分和缓冲液的性质,包括成分的电荷、分子大小和形状,缓冲液的类型、离子强度、pH 值、黏度和添加剂。假设成分为球形,可用下式表示电泳速度( $v_{ep}$ )。

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \left( \frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

式中, $q$  为成分的有效电荷; $\eta$  为电解质溶液的黏度; $r$  为成分的斯托克斯半径; $V$  为施加的电压; $L$  为毛细管的总长。

26 充满缓冲溶液的毛细管在外加电场的作用下，毛细管内会产生溶液流，称  
27 为电渗流。电渗流速度与电渗淌度 ( $\mu_{eo}$ ) 成正比关系，而电渗淌度取决于毛细  
28 管内壁电荷密度和缓冲液的性质。用下式计算电渗流的速度 ( $v_{eo}$ )。

$$29 \quad v_{eo} = \mu_{eo}E = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{\eta}\right)\left(\frac{V}{L}\right)$$

30 式中， $\varepsilon$  为缓冲液的介电常数； $\zeta$  为毛细管管壁的 zeta 电位；其他参数同前  
31 式定义。

32 可用下式表示成分的速度 ( $v$ )。

$$33 \quad v = v_{ep} + v_{eo}$$

34 成分的电泳迁移和电渗迁移可能是同一方向，也可能是相反的方向，这取  
35 决于成分所带电荷。在通常的毛细管电泳中，阴离子迁移的方向与电渗流的方  
36 向相反，其迁移速度小于电渗流速度。阳离子迁移的方向与电渗流的方向相  
37 同，其迁移速度大于电渗流速度。在电渗淌度大于成分电泳淌度的情况下，可  
38 在一次运行中同时分离阳离子和阴离子。用下式表示成分从进样点迁移到检  
39 测器，即毛细管有效长度 ( $l$ ) 所需的时间 ( $t$ )。

$$40 \quad t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

41 式中所有参数已在前面定义。

42 通常，在 pH3 以上时，未涂层的熔融石英毛细管内壁离子化硅羟基带负电  
43 荷，因此，所产生的电渗流从阳极流向阴极。为获得成分迁移速度较好的重现性，  
44 在每次运行时必须保持电渗流恒定成分。对于某些应用，有时候需要通过修饰毛  
45 细管内壁或者改变缓冲液的浓度、组成和/或 pH 值来减弱或者抑制电渗流。

46 在供试品引入毛细管后，样品中的离子按照各自的淌度以独立区带的方式移  
47 动。多种情况可能引起区带展宽，即每一个供试品区带变宽。在理想条件下，导  
48 致供试品区带展宽的唯一因素是成分在轴向方向的扩散。在这个理想条件下，用  
49 下式计算理论板数。

$$50 \quad N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})(Vl)}{2DL}$$

51 式中， $D$  为成分在缓冲液中的分子扩散系数。

52 实际上，其他因素如散热、样品在毛细管内壁的吸附、样品和缓冲液电导率  
53 的不匹配、进样时毛细管插入的长度、检测池大小和储液池不在同一个水平，都  
54 会导致区带的显著展宽。用下式可计算两个区带之间的分离情况，以分离度 $R_S$ 表  
55 示。

$$R_S = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}$$

56

57 式中， $\mu_{epa}$ 和 $\mu_{epb}$ 为两个待测物的电泳淌度； $\bar{\mu}_{ep}$ 为两个待测物的平均电泳淌  
58 度：

$$\bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{epb} + \mu_{epa})$$

59

## 60 二、对仪器的一般要求

60

61 在品种正文项下一般需对毛细管、缓冲液、前处理方法、供试品溶液和迁移  
62 等条件作出具体规定。电解质溶液需要过滤以除去颗粒，还需要除气以避免气泡  
63 在毛细管中干扰检测或者在分别运行时阻断毛细管内的电流接触。为了达到好的  
64 重复性，对于每一个分析方法都应开发严格执行的冲洗程序。

65 毛细管电泳仪的主要部件及其性能要求如下。

66 1. 毛细管 用弹性石英毛细管，内径  $50\mu\text{m}$  和  $75\mu\text{m}$  两种使用较多（毛细管  
67 电色谱有时用内径更大些的毛细管）。细内径分离效果好，且焦耳热小，允许施  
68 加较高电压；但若采用柱上检测，则因光程较短，其检测限比较粗内径管要差。  
69 毛细管长度称为总长度，根据分离度的要求，可选用  $20\sim 100\text{cm}$  长度；进样端至  
70 检测器间的长度称为有效长度。毛细管通常盘放在管架上控制在一定温度下操作，  
71 以控制焦耳热，操作缓冲液的黏度和电导率，对测定的重复性很重要。推荐使用  
72 恒温系统来保持毛细管内的温度恒定，以得到好的分离重复性。若仪器不含恒温  
73 系统，则需充分验证系统的分离重复性。

74 2. 直流高压电源 采用  $0\sim 30\text{kV}$ （或相近）可调节直流电源，可供应约  $300\mu\text{A}$   
75 电流，具有稳压和稳流两种方式可供选择。

76 3. 电极和电极槽 两个电极槽里放入操作缓冲液，分别插入毛细管的进口端

77 与出口端以及铂电极；铂电极连接至直流高压电源，正负极可切换。多种型号的  
78 仪器将试样瓶同时用做电极槽。

79 4. 冲洗进样系统 每次进样之前毛细管要用不同溶液冲洗，选用自动冲洗  
80 进样仪器较为方便。进样方法有压力（加压）进样、负压（减压）进样、虹吸进  
81 样和电动（电迁移）进样等。~~进样时通过控制压力或电压及时间来控制进样量。~~  
82 采用电动进样时，样品中的每一组分的进样量和各自的淌度相关，可能造成进样  
83 差异。

84 5. 检测系统 紫外-可见分光检测器、激光诱导荧光检测器、电化学检测器、  
85 质谱检测器、核磁共振检测器、化学发光检测器、LED 检测器、共振瑞利散射光  
86 谱检测等。其中以紫外-可见分光光度检测器应用最广，包括单波长、程序波长和  
87 二极管阵列检测器。~~将毛细管接近出口端的外层聚合物剥去约 2mm 一段，使石~~  
88 ~~英管壁裸露，毛细管两侧各放置一个石英聚光球，使光源聚焦在毛细管上，透过~~  
89 ~~毛细管到达光电池。~~对无光吸收（或荧光）的~~成分溶质~~的检测，可选用适当的紫  
90 外或荧光衍生试剂与被检测样品进行柱前、柱上或柱后化学反应来实现~~成分溶质~~  
91 的分离与检测。还可采用间接测定法，即在操作缓冲液中加入对光有吸收（或荧  
92 光）的添加剂，在~~成分溶质~~到达检测窗口时出现反方向的峰。

93 6. 数据处理系统 与一般色谱数据处理系统基本相同。

### 94 三、分离模式

95 当以毛细管空管为分离载体时毛细管电泳有以下几种模式。

96 1. 毛细管区带电泳（CZE）~~将待分析溶液引入毛细管进样一端，施加直流电~~  
97 ~~压后，各组分按各自的电泳和电渗流的矢量和流向毛细管出口端，按阳离子、中~~  
98 ~~性粒子和阴离子及其电荷大小的顺序通过检测器。中性组分彼此不能分离。出峰~~  
99 ~~时间为迁移时间（ $t_m$ ），相当于高效液相色谱和气相色谱中的保留时间。~~

100 （1）原理 在毛细管区带电泳里，供试品中的组分分离是在只含缓冲液而  
101 没有其他抗对流介质的毛细管内进行。在这一技术里，供试品中的每一组分按照  
102 各自不同的速度，形成不连续的区带而得到分离。而每一区带的速度取决于成分  
103 的淌度和缓冲液的电渗流（见原理）。对于易吸附于熔融硅胶表面的物质可以使  
104 用涂层的毛细管以增加分离效率。

105 毛细管区带电泳适合分析  $MW < 2000$  的小分子物质和  $2000 < MW < 100\ 000$  的

106 大分子物质。毛细管区带电泳可以达到较高的分离效率，故即使分子荷质比差别  
107 很小也可以进行分离。该分离模式也可在缓冲液中加入手性选择剂进行手性物质  
108 的分离。

109 **(2) 分离条件优化** 分离条件的优化是一个复杂的过程。多个分离参数都  
110 可以起到很关键的作用。但需要考虑的最主要参数是仪器和电解质溶液。

### 111 **(3) 仪器参数**

112 **电压** 焦耳热曲线可以用来优化分离电压和柱温。分离时间与施加的电压成  
113 正比。但随着电压的增加会产生过多的热量。这些热量会提高毛细管内缓冲液的  
114 温度和黏度，从而使区带展宽并降低分离度。

115 **极性** 一般阳极在入口，阴极在出口。电渗流流向阴极。如果电极的极性相  
116 反，电渗流方向会与出口方向相反，只有电泳淌度大于电渗流的成分才能从出口  
117 流出。

118 **温度** 温度主要对缓冲液的黏度和电导有影响，进而影响迁移速度。有些情  
119 况下，毛细管温度的增加可能导致蛋白质变性，进而改变它们的迁移时间并降低  
120 分离效率。

121 **毛细管** 毛细管的长度和内径可以影响分析时间、分离效率和进样量。在一  
122 定的电压下，增加毛细管总长或者有效长度都会降低电场，从而增加迁移时间。  
123 对于给定的缓冲液和电场，热量的散发（样品区带的增宽）主要和毛细管的内径  
124 有关。而内径又影响检出限。检测限还和进样量与检测系统有关。

125 样品在毛细管内壁的吸附会限制分离的效率，因此，开发分离方法时需要考虑  
126 采取措施以避免吸附作用。这对含蛋白的溶液特别重要。对于部分蛋白质，已  
127 有一些方法避免其在管壁的吸附。这些方法（使用极端的 pH 值和正电荷的添加  
128 剂）只需改变缓冲液来阻止蛋白质吸附。其他方法还包括用聚合物对毛细管内壁  
129 涂层，来阻止蛋白和管壁的接触。上述应用的毛细管，包括中性亲水、阳离子和  
130 阴离子聚合物涂层的毛细管，都已经商品化。

### 131 **(4) 电解质溶液参数**

132 **缓冲液的类型和浓度** 用于毛细管电泳的缓冲液应该具备一定的 pH 选择范  
133 围和低的迁移率，以抑制电流的产生。

134 为了减小区带变形，应使缓冲液和成分的迁移率匹配。样品溶剂的种类对样

135 品在柱内的聚集是很重要的，这可以提高分离效率和检出限。在给定 pH 值条件  
136 下，增加缓冲液浓度会降低电渗流和成分速度。

137 **缓冲液的 pH** 缓冲液的 pH 会影响分析物和添加剂表面的电荷，改变电渗  
138 流进而影响分离。对于蛋白质和多肽的分离，pH 从等电点之上变化为等电点之  
139 下时，会改变成分的净电荷，从负变正。缓冲液 pH 的增大往往增加电渗流。

140 **有机溶剂** 有机改性剂，如甲醇、乙腈以及其他试剂，添加到水性溶液里可  
141 增加成分的溶解性或可能会影响样品组分的离子化程度。这些有机溶剂的添加通  
142 常会降低电渗流。

143 **手性分离添加剂** 为了分离光学异构体，也可添加手性选择剂到分离缓冲液  
144 中。最常用手性选择剂有环糊精、冠醚、某些聚多糖以及一些蛋白质。手性的  
145 识别是由于手性选择剂和每个异构体作用力的不同而实现的，因此手性选择的分  
146 离度很大程度上依赖于所用的手性选择剂。尝试使用不同大小的环糊精 ( $\alpha$ -、 $\beta$ -、  
147 或者  $\gamma$ -环糊精)，修饰中性基团 (甲基、乙基和羟基) 的环糊精或离子化基团 (氨  
148 甲基、羧甲基和磺丁基醚) 的环糊精对分离是很有作用的。当使用修饰的环糊精  
149 时，必须考虑到批与批之间的差异，因为它会影响到选择性。手性分离的分离度  
150 也受手性选择剂的浓度、组成、缓冲液的 pH 值、分离温度等影响。有机添加剂，  
151 如甲醇和尿素，也会影响分离的分辨率。

152 **2. 毛细管凝胶电泳 (CGE)** ~~在毛细管中装入单体和引发剂引发聚合反应生~~  
153 ~~成凝胶，如聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶等，这些方法主要用于测定蛋白质、DNA~~  
154 ~~等生物大分子。另外还可以利用聚合物溶液，如葡聚糖等的筛分作用进行分析，~~  
155 ~~称为毛细管无胶筛分。有时将它们统称为毛细管筛分电泳，下分为凝胶电泳和无~~  
156 ~~胶筛分两类。~~在毛细管凝胶电泳中，分离是在填充了具有分子筛作用的凝胶的毛  
157 细管内进行。按照分子大小的不同将具有相似荷质比的分子分开。与大分子相比，  
158 小分子更加容易穿越凝胶网络，因此迁移速度更快。不同的生物大分子 (如蛋白  
159 质和 DNA 片段)，通常拥有相似的荷质比，因此可以通过毛细管凝胶电泳根据分  
160 子质量的不同将其分离。

161 **凝胶的特性** 毛细管电泳中常用的两种凝胶：永久凝胶涂层和动态凝胶涂层。  
162 永久凝胶涂层在毛细管中通过单体的聚合反应制备，例如交联的聚丙烯酰胺凝胶。  
163 这种凝胶通常键合在毛细管的内壁上，不破坏毛细管是不能去除凝胶的。在还原

164 条件下的蛋白分析，分离缓冲液里常常包含有十二烷基硫酸钠，样品放在十二烷  
165 基硫酸钠和巯基乙醇（或二巯苏糖醇）的混合液中加热变性。在非还原条件下（如  
166 一个完整抗体的分析），2-巯基乙醇和二巯苏糖醇是不能使用的。在使用交联凝  
167 胶进行分离时，一般通过改变缓冲液（见毛细管区带电泳）和控制凝胶的孔隙度  
168 来优化分离。对于交联的聚丙烯酰胺凝胶，通过改变丙烯酰胺的浓度或者交联剂  
169 的百分比来控制孔隙率。通常来说，孔隙率的降低会导致成分迁移率的降低。因  
170 为这种凝胶刚性大，所以只能使用电动方式进样。

171 动态凝胶涂层是亲水的聚合物（如线性聚丙烯酰胺凝胶、纤维素、葡聚糖等）。  
172 这些聚合物溶解于水性的分离缓冲液中就可以作为分子筛使用。它们要比交联的  
173 聚合物更容易制备。在容器中配制好，然后在压力的作用下进入涂层的没有电渗  
174 流的毛细管内。在每次进样前，替换新的凝胶可以提高重复性。使用高分子量的  
175 聚合物（聚合物浓度一定）或者使用低浓度的聚合物（分子量一定）可以提高动  
176 态涂层凝胶的孔隙率。孔隙率的降低会导致同一缓冲液中成分迁移率的降低。因  
177 为这些聚合物的溶解使缓冲液的黏度比较低，所以可以使用流体动力学进样或电  
178 动进样。

179 3. 毛细管等电聚焦电泳（CIEF）~~将毛细管内壁涂覆聚合物减小电渗流，再~~  
180 ~~将供试品和两性电解质混合进样，两个电极槽中分别加入酸液和碱液，施加电压~~  
181 ~~后毛细管中的操作电解质溶液逐渐形成 pH 梯度，各溶质在毛细管中迁移至各自~~  
182 ~~的等电点（pI）时变为中性形成聚焦的区带，而后用压力或改变检测器末端电极~~  
183 ~~槽储液的 pH 值的方法使溶质通过检测器，或者采用全柱成像方式进行检测。~~

184 **（1）原理** 在毛细管等电聚焦电泳中，分离缓冲液中添加了具有很宽等电  
185 点范围的两性电解质（如多氨基酸），这种缓冲液会产生一个 pH 梯度，分子只  
186 要带上电荷就会在电场作用下发生迁移。毛细管等电聚焦电泳有三个基本的操作  
187 步骤：进样、聚焦和移动。

188 **（2）进样** 毛细管等电聚焦电泳有两种进样方式。

189 **一步进样** 样品和两性电解质混合在一起，然后通过压力或者真空注入毛细  
190 管内。

191 **顺序进样** 按照以下顺序进样：先是前沿缓冲液，再是两性电解质，然后是  
192 样品和两性电解质的混合物，再是单独的两性电解质，最后是末端缓冲液。样品

193 的体积必须非常小，以免改变 pH 梯度。

194 **(3) 聚焦** 施加电压后，由于所带电荷的不同，两性电解质向正极或者负  
195 极移动，形成 pH 梯度。阳极 pH 值低，阴极 pH 值高。在这一步中，要分离的组  
196 分进行迁移，直到到达各自的等电点。在等电点，电流变得非常小。

197 **(4) 移动** 如果需要移动才能检测，则可使用下列三个可用的方法之一进  
198 行。

199 **方法 1** 如果电渗流足够小且不影响组分的聚焦，可以利用电渗流的作用在  
200 聚焦过程中完成移动。

201 **方法 2** 聚焦后使用正压来完成移动。

202 **方法 3** 聚焦后，根据想要移动的方向，在阴极或者阳极储液池中加些盐来  
203 改变毛细管中的 pH 值，从而完成移动。只要 pH 改变，蛋白质和两性电解质就  
204 会向着加了盐的储液池的方向移动，然后通过检测器。

205 能够达到的分离程度用  $\Delta pI$  表示，并且和 pH 梯度 ( $dpH/dx$ )、不同等电点  
206 的两性电解质的数量、分子扩散系数 ( $D$ )、电场强度 ( $E$ ) 和电泳淌度随 pH 值  
207 ( $-d\mu/dpH$ ) 的改变相关。并按下式计算分离程度。

$$\Delta pI = 3\sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

208

209 **(5) 优化** 在分离中需要考虑的几个主要参数如下。

210 **电压** 聚焦电压在 300~1000V/cm。

211 **毛细管** 根据移动的方法（见上）来选择，电渗流必须要减小或者抑制。涂  
212 层的毛细管可以减小电渗流。

213 **溶液** pH 值比大多数酸性两性电解质的等电点低的溶液放在阳极缓冲液贮  
214 存池内；pH 值比大多数碱性两性电解质的等电点高的溶液放在阴极缓冲液储液  
215 池中。经常把磷酸溶液放在阳极，氢氧化钠溶液在阴极。

216 把聚合物（如甲基纤维素）添加到两性电解质溶液中可以提高黏度从而抑制  
217 对流（若存在）和电渗流。商用的两性电解质包含很多种的 pH 范围。宽的 pH 范  
218 围用来测定等电点，而窄的 pH 范围用来提高精度。利用一系列标准的蛋白质标  
219 记的等电点来校正迁移时间。在聚焦过程中，蛋白质可能会在等电点处沉淀，如  
220 果必要，使用缓冲液添加剂，如甘油、表面活性剂、尿素或者两性缓冲液。不过，



221 根据使用的浓度不同，尿素可能使蛋白质变性。

222 4. 胶束电动毛细管色谱 (MEKC) ~~当操作缓冲液中加入大于其临界胶束浓~~  
223 ~~度的离子型表面活性剂时，表面活性剂就聚集形成胶束，其亲水端朝外、疏水非~~  
224 ~~极性核朝内，溶质则在水和胶束两相间分配，各溶质因分配系数存在差别而被分~~  
225 ~~离。对于常用的阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠，进样后极强亲水性组分不能~~  
226 ~~进入胶束，随操作缓冲液流过检测器(容量因子  $k'=0$ )；极强疏水性组分则进入胶~~  
227 ~~束的核中不再回到水相，最后到达检测器( $k'=\infty$ )。常用的其他胶束试剂还有阳离~~  
228 ~~子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵、胆酸等。两亲性质的聚合物，尤其是嵌段~~  
229 ~~聚合物也会在不同极性的溶剂中形成胶束结构，可以起到类似表面活性剂的作用。~~

230 (1) 原理 胶束电动色谱的电解质溶液中包含了超过临界胶束浓度 (cmc)  
231 的表面活性剂。成分分子按照分配系数在缓冲液和胶束所形成的伪固定相之间进  
232 行分配。这一技术可以认为是电泳和色谱的结合。可以用来分离中性和带电的成  
233 分，而保持毛细管电泳的效率、速度和仪器适用性。在 MEKC 中，最常用的表  
234 面活性剂是阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠。也会使用其他表面活性剂，例如  
235 阳离子表面活性剂十六烷基三甲基铵盐。

236 分离的机理如下：中性和碱性条件下的 pH 值会产生很强的电渗流，使液体  
237 移向阴极。如果使用十二烷基硫酸钠作为表面活性剂，阴离子胶束的电泳迁移朝  
238 向为相反的方向—阳极。因此，相对于电渗流的速度，胶束迁移总速度是减少了。  
239 对于中性的成分，因为它可以在胶束和水性溶液中分配而且不带电荷，所以分析  
240 物的迁移速度仅取决于它在胶束和水性溶液之间的分配系数。在电泳谱图里，不  
241 带电荷的成分的峰总是处于电渗流峰和胶束峰之间。电渗流峰和胶束峰之间的迁  
242 移时间称为分离窗口。对于带电成分，它的迁移速度既取决于它在胶束和水性溶  
243 液之间的分配系数也取决于在没有胶束时它的电泳淌度。

244 因为在 MEKC 中，中性和弱离子成分分离的机理本质上是色谱分离，成分  
245 的迁移和分离度可以用成分的容量因子 ( $k'$ ) 来表示，也称为质量分配系数 ( $D_m$ )，  
246 系指胶束中的成分分子数与流动相中的成分分子数之比。对于中性化合物， $k'$  由  
247 下式计算。

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_{mc})} = K \left( \frac{V_S}{V_M} \right)$$

248

249 式中,  $t_r$  为成分的迁移时间;  $t_0$  为不保留成分的迁移时间, 可以通过一个不  
250 进入胶束的电渗流标记物 (如甲醇) 来测定;  $t_{mc}$  是胶束的迁移时间, 可以通过一  
251 个能够始终跟随胶束迁移的胶束标记物 (如苏丹红 III) 来测定;  $K$  是成分的分配  
252 系数;  $V_S$  是胶束相的体积;  $V_M$  是流动相的体积。

253 两个相邻成分的分离度 ( $R_S$ ) 由下式表示:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_b}{k'_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + k'_a \times \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}$$

254

255 式中,  $N$  是任意一种成分的理论板数;  $\alpha$  是选择性因子;  $k'_a$  和  $k'_b$  分别是两  
256 个成分保留因子 ( $k'_b > k'_a$ )。

257 带电成分的  $k'$  和  $R_S$  公式可以通过类似的方法推导, 但是不完全相同。

258 (2) 优化 使用 MEKC 方法来提高分离最主要考虑的参数是仪器参数和  
259 电解质溶液的参数。

### 260 (3) 仪器参数

261 电压 分离时间和电压成反比。但是, 电流的增加会产生过多的热量, 从而  
262 在毛细管的横截面造成温度和黏度的梯度。在高电导率的缓冲液 (如含有胶束)  
263 中, 这一效应特别明显。散热差会导致区带的变宽并降低分离度。

264 温度 毛细管内温度的变化可以影响成分在胶束和缓冲液中的分配系数、临  
265 界胶束浓度和缓冲液的黏度。这些因素都会导致成分迁移时间的变化。使用好的  
266 冷却系统可以使成分迁移时间的重复性更好。

267 毛细管 与毛细管区带电泳相同, 毛细管的长度和内径都会对分离时间和分  
268 离效率产生影响。增加毛细管的总长和有效长度都会降低电场 (电压不变), 延  
269 长迁移时间和提高分离效率。在固定的电场和缓冲液中, 内径控制着散热。散热  
270 不好会导致样品区带的变宽。

### 271 (4) 电解质溶液的参数

272 表面活性剂类型和浓度 作为色谱中的固定相, 表面活性剂的类型会改变分  
273 离选择性从而影响分离度。一个中性化合物的  $\log K'$  随着表面活性剂浓度增高而  
274 线性增高。当  $K'$  达到下式数值时:

$$\sqrt{t_{mc}/t_0}$$

275

276 MEKC 的分离度最大。改变流动相中表面活性剂的浓度会影响分离度。

277 **缓冲液 pH 值** pH 值并不会影响非离子化成分的分配系数，但是它可以改  
278 变未涂层毛细管中的电渗流。缓冲液 pH 的降低会降低电渗流，来提高中性成分  
279 的分离度，但是会导致分析时间的延长。

280 **有机溶剂** 为了提高疏水性物质的 MEKC 分离，可以将有机改性剂（甲醇、  
281 丙醇和乙腈等）添加到电解质溶液中，这些改性剂通常会减小迁移的时间和降低  
282 分离的选择性。有机改性剂的添加会影响临界胶束浓度，因此在胶束化过程受到  
283 抑制之前一定浓度的表面活性剂只能使用一定百分比的有机改性剂，否则会导致  
284 胶束消失，从而使 MEKC 的分配机制失效。不过高浓度有机溶剂导致胶束解离  
285 并不意味着一定不能进行分离。因为在有些情况下，离子表面活性剂单体和中性  
286 成分之间的疏水作用可以生成疏溶剂复合物，这些复合物可以通过电泳分离。

287 **手性分离的添加剂** 对于使用 MEKC 来分离对映体，胶束体系中需要包含  
288 手性的选择剂，要么和表面活性剂共价键合，要么加到电解质溶液中。带有手性  
289 识别基团的胶束，这些基团包括盐类、N-十二酰基-L-氨基酸、胆汁盐等。也可以  
290 使用手性识别剂，例如把环糊精加入到含非手性胶束的电解质溶液中。

291 **其他添加剂** 可以把化学试剂加入到缓冲液中来改变选择性。添加多种类型  
292 的环糊精到缓冲液中可以降低疏水成分与胶束之间的作用，增加这种成分的选择  
293 性。添加剂还可以吸附在胶束上，来改变成分-胶束之间的作用，从而提高在  
294 MEKC 中的分离选择性。这些添加剂可能包括其他一些表面活性剂（离子和非离  
295 子型），这会提高胶束的混合，或使金属阳离子溶解于胶束中以及与成分形成复  
296 合体。

297 **5. 毛细管等速电泳（CITP）** 采用前导电解质和尾随电解质，在毛细管中  
298 充入前导电解质后，进样，电极槽中换用尾随电解质进行电泳分析，带不同电荷  
299 的组分迁移至各个狭窄的区带，然后依次通过检测器。

300 **6. 亲和毛细管电泳（ACE）** 在缓冲液或管内加入亲和作用试剂，实现物质  
301 的分离。如将蛋白质（抗原或抗体）预先固定在毛细管柱内，利用抗原-抗体的特  
302 异性识别反应，毛细管电泳的高效快速分离能力、激光诱导荧光检测器的高灵敏

303 度，来分离检测样品混合物中能与固定化蛋白质特异结合的组分。

304 当以毛细管填充管为分离载体时毛细管电泳有以下几种模式。

305 7. 毛细管电色谱 (CEC) 将细粒径固定相填充到毛细管中或在毛细管内壁  
306 涂覆固定相，或以聚合物原位交联聚合的形式在毛细管内制备聚合物整体柱，以  
307 电渗流驱动操作缓冲液(有时再加辅助压力)进行分离。分析方式根据填料不同，  
308 可分为正相、反相及离子交换等模式。

309 除以上常用的单根毛细管电泳外，还有利用一根以上的毛细管进行分离的毛  
310 细管阵列电泳以及芯片毛细管电泳。

311 8. 毛细管阵列电泳 (CAE) 通常毛细管电泳一次分析只能分析一个样品，  
312 要高通量地分析样品就需要多根毛细管阵列，这就是毛细管阵列电泳。毛细管阵  
313 列电泳仪主要采用激光诱导荧光检测，分为扫描式检测和成像式检测两种方式，  
314 主要应用于 DNA 的序列分析。

315 9. 芯片式毛细管电泳 (Chip CE) 芯片毛细管电泳技术是将常规的毛细管  
316 电泳操作转移到芯片上进行，利用玻璃、石英或各种聚合物材料加工出微米级通  
317 道，通常以高压直流电场为驱动力，对样品进行进样、分离及检测。芯片式毛细  
318 管电泳与常规毛细管电泳的分离原理相同，还具备分离时间短、分离效率高、系  
319 统体积小且易实现不同操作单元的集成等优势，在分离生物大分子样品方面具有  
320 一定的优势。

321 以上分离模式中，1 和 4 使用较多。~~6~~和 7 分离机理以色谱为主，但对荷电  
322 成分则兼有电泳作用。

323 操作缓冲液中加入各种添加剂可获得多种分离效果。如加入环糊精、衍生化  
324 环糊精、冠醚、血清蛋白、多糖、胆酸盐、离子液体或某些抗生素等，可拆分手  
325 性化合物；加入有机溶剂可改善某些组分的分离效果，~~以至且~~可在非水溶液中进行  
326 分析。

#### 327 四、定量

328 为弥补每次运行时迁移时间的漂移引起的信号响应偏差，峰面积必须除以相  
329 应的迁移时间得到校正的面积以减小误差。校正面积也会弥补样品中不同迁移时  
330 间的成分在信号响应上的差异。当使用内标时，要使待测组分峰不与内标峰重叠。  
331 定量测定以采用内标法为宜。用加压或减压法进样时，供试品溶液黏度会影响进  
332 样体积，应注意保持试样溶液和对照溶液黏度一致；用电动法进样时，被测组分

333 因电歧视现象和溶液离子强度会影响待测组分的迁移量，也要注意其影响。

334 **计算** 根据测定数据计算供试品中一种或多种组分的含量。如供试品中一种  
335 或多种成分的百分含量是由各自的校正峰面积占所有峰的总校正峰面积的百分  
336 比计算，如归一化法，溶剂和辅料峰应除外。建议使用自动积分系统，如积分仪  
337 或数据采集和处理系统。

## 338 五、系统适用性试验

339 ~~为考察所配置的毛细管分析系统和设定的参数是否适用，系统适用性的测试~~  
340 ~~项目和方法与高效液相色谱法或气相色谱法相同，相关的计算式和要求也相同，~~  
341 ~~如重复性(相对标准偏差, RSD)、容量因子( $k'$ )、毛细管理论板数( $n$ )、分离度( $R$ )、~~  
342 ~~拖尾因子( $T$ )、线性范围、检测限(LOD)和定量限(LOQ)等，可参照测定。具~~  
343 ~~体指标应符合各品种项下的规定，特别是进样精度和不同荷电溶质迁移速度的差~~  
344 ~~异对分析精密度的影响。~~

345 为保证在方法转移、方法确认和日常检验中使用的分析方法始终具有良好性  
346 能，品种项下的毛细管电泳分析方法应设置系统适用性试验。可选择设置的系统  
347 适用性试验参数如重复性、毛细管理论板数( $n$ )、分离度( $R_s$ )、拖尾因子( $T$ )  
348 和灵敏度等，及其可接受标准，如适合可参照高效液相色谱法(通则 0512)。由  
349 于毛细管电泳方法的耐用性受更多分析条件(参数)变量的影响，通常还需增设  
350 其它系统适用性试验，如保留因子( $k'$ ) (仅适用于胶束电动色谱法)等。尤其  
351 要特别关注进样精密度和不同荷电成分迁移速度的差异对分析精密度的影响，必  
352 要时，增设相应的系统适用性试验及其可接受标准。

## 353 六、基本操作

354 (1) 按照仪器操作手册开机，预热、输入各项参数，如毛细管温度、操作  
355 电压、检测波长和冲洗程序等。操作缓冲液需过滤和脱气。冲洗液、缓冲液等放  
356 置于样品进样小瓶中，依次放入进样器。

357 (2) ~~毛细管处理的好坏，对测定结果影响很大。~~毛细管的处理对测定结果  
358 有较大影响。未涂层新毛细管要用较浓碱液在较高温度(例如用 1mol/L 氢氧化  
359 钠溶液在 60℃)冲洗，使毛细管内壁生成硅羟基，再依次用 0.1mol/L 氢氧化钠  
360 溶液、水和操作缓冲液各冲洗数分钟。两次进样中间可仅用缓冲液冲洗，但若发  
361 现分离性能改变，则开始须用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液冲洗，甚至要用浓氢氧化

362 钠溶液升温冲洗。凝胶毛细管、涂层毛细管、填充毛细管的冲洗则应按照所附说  
363 明书操作。冲洗时将盛溶液的试样冲洗液的进样小瓶依次置于进样器，设定顺序  
364 序列和时间进行。

365 (3) 操作缓冲液的种类、pH 值和浓度，以及添加剂[用以增加溶质成分的  
366 溶解度和(或)控制溶质成分的解离度，手性拆分等]的选定对测定结果的影响也  
367 很大，应照各品种项下的规定配制，根据初试的结果调整、优化。

368 (4) 将待测装有供试品溶液的进样小瓶置于进样器中，设定操作参数，如  
369 进样压力(电动进样电压)、进样时间、正极端或负极端进样、操作电压或电流、  
370 检测器参数等，开始测试进样。根据初试的电泳谱图调整仪器参数和操作缓冲液，  
371 以获得优化结果。而后用优化条件正式测试。

372 (5) 序列测试完毕后用水冲洗毛细管，注意将毛细管两端浸入水中保存，  
373 如果长久不用应将毛细管用氮吹干，最后关机，或根据毛细管供应商的要求进行  
374 日常维护保养。

375 ~~(6) 定量测定以采用内标法为宜。用加压或减压法进样时，供试品溶液黏~~  
376 ~~度会影响进样体积，应注意保持试样溶液和对照溶液黏度一致；用电动法进样时，~~  
377 ~~被测组分因电歧视现象和溶液离子强度会影响待测组分的迁移量，也要注意其影~~  
378 ~~响。~~

---

起草单位：中国食品药品检定研究院

主要起草人及联系方式：魏宁漪，010-53851604；周颖 010-53851459；陈华 010-53851622  
北京市大兴区华佗路 31 号中国食品药品检定研究院

## 0542 毛细管电泳法第二次公示稿修改说明

根据 2023 年 9 月 0542 毛细管电泳法第一次公示稿的反馈意见和建议，国家药典委员会相关专业委员会进行了研讨，在第一次公示稿的基础上修订了部分内容，主要为：

1. 对仪器的一般要求项下，考虑到毛细管电泳仪可能存在没有毛细管恒温系统的情况，增加描述“若仪器不含恒温系统，则需充分验证系统的分离重复性”。

2. 对仪器的一般要求项下，并非所有检测系统中都在“毛细管两侧各放置一个石英聚光球，使光源聚焦在毛细管上，透过毛细管到达光电池”，因此删去此句描述。

3. 系统适用性试验项下，HPLC 方法推荐的数值限度接受标准，可能并不适用于电泳方法（尤其是高糖基化或复杂生物分子），因此调整相关要求为可选择的系统适用性试验参数“如适合可参照高效液相色谱法（通则 0512）”。考虑到毛细管电泳法中线性不适合用作系统适用性试验，删去“线性范围”要求，增设“保留因子（ $k'$ ）（仅适用于胶束电动色谱法）”。

4. 基本操作项下，考虑到并非所有毛细管都用两端浸水保存，因此增加“或根据毛细管供应商的要求进行日常维护保养”。