

## 5. Капиллярный электрофорез

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества. На рис. 37 показана схема установки для капиллярного электрофореза.

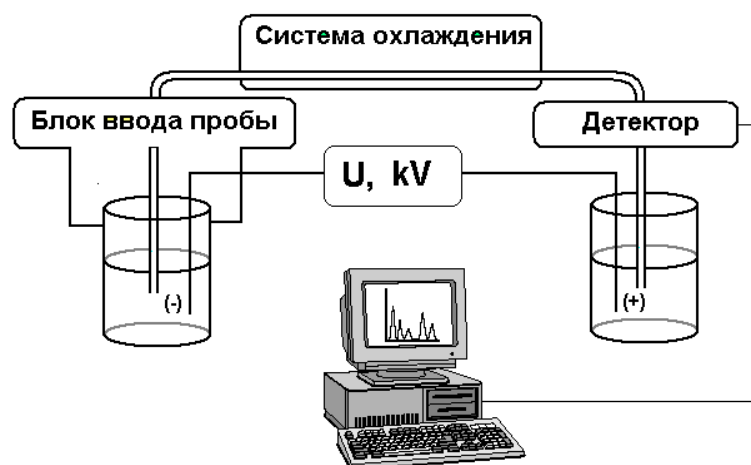


Рис. 37. Схема установки для капиллярного электрофореза

На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – электростатического притяжения и сопротивления движению частицы. В равновесных условиях действие этих сил уравнивает друг друга, и скорость миграции частицы определяется выражением:

$$\mu = q \cdot E / 6\pi\eta r \quad (16)$$

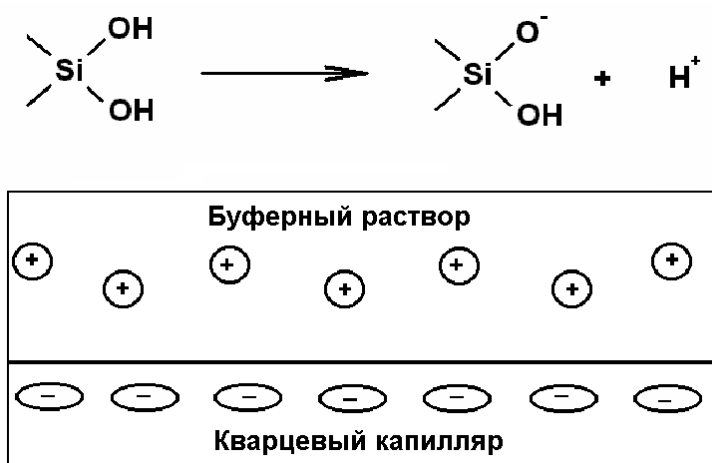
где  $q$  – заряд иона, а  $E$  – напряженность электрического поля.  $\eta$  – вязкость среды,  $r$  – радиус частицы

Электрофоретическая подвижность  $\mu_{эф}$  определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля:

$$\mu_{эф} = v_{эф} / E. \quad (17)$$

где,  $v_{эф}$  – скорость идеализированной сферической частицы. В

При проведении разделения в капиллярах особенно важное значение приобретает электроосмотический поток (ЭОП), связанный с движением диффузной части двойного слоя, образующегося относительно заряженной поверхности внутренней стенки капилляра (рис. 38).



**Рис. 38.** Схема возникновения электроосмотического потока

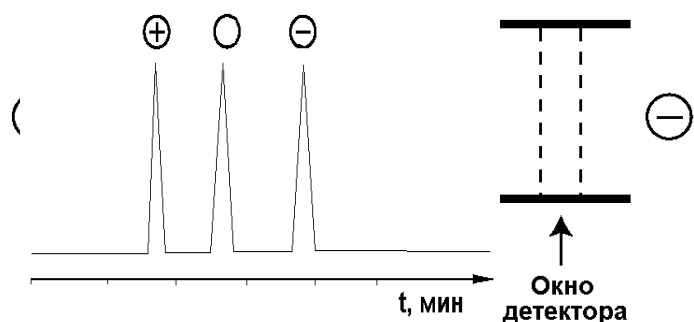
Как правило, заряд поверхности определяется наличием отрицательно заряженных силанольных групп на поверхности

немодифицированных кварцевых капилляров или создается за счет дополнительной модификации поверхности.

Результирующая подвижность частиц  $\mu$  определяется суммой электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{эо}}. \quad (18)$$

Это дает определенные преимущества при анализе смесей противоположно заряженных ионов, поскольку все определяемые компоненты будут двигаться в направлении детектора вследствие ЭОП. Однако скорость передвижения ионов с одинаковым направлением электрофоретической и электроосмотической подвижностей будет увеличиваться, а противоположенным – уменьшаться. Для немодифицированного кварцевого капилляра в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация



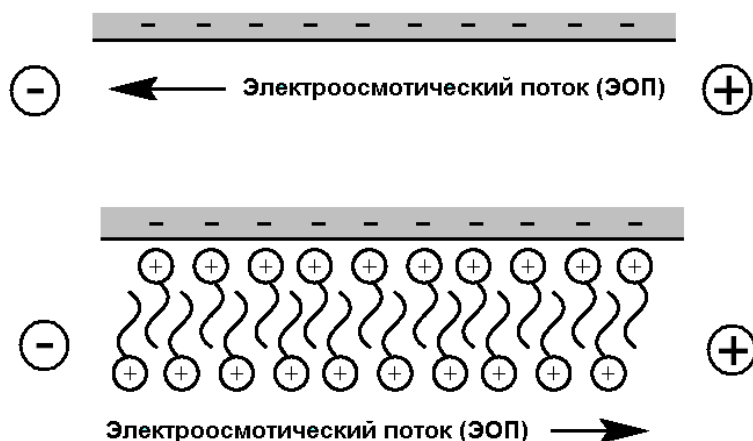
катионов, в результате движения которых возникает ЭОП, направленный к катоду. В результате катионы будут перемещаться быстрее и детектироваться до ЭОП, а анионы медленнее и детектироваться после ЭОП, нейтральные молекулы движутся с ЭОП, как это показано на рис. 39.

**а**

**б**

**Рис. 39.** Движение заряженных частиц в немодифицированном кварцевом капилляре (а) и общий вид электрофореграммы смеси частиц с различными зарядами (б)

Для повышения воспроизводимости КЭ в присутствии ЭОП, электроосмотический поток должен быть постоянным в течение всех проводимых определений, а сохранение постоянства ЭОП часто требует значительных усилий по подготовке до и после работы. В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением рН, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд (рис. 40), то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.



**Рис. 40.** Изменение направления электроосмотического потока при модификации кварцевого капилляра катионными поверхностно-активными веществами

Уникальной особенностью ЭОП является плоский профиль потока в капилляре. Такой профиль выгоден, поскольку уменьшается размывание зон разделяемых веществ. Следует отметить, что эффективность разделения в капиллярном электрофорезе прямо пропорциональна, а время

анализа – обратно пропорционально напряжению, приложенному к электродам.

Разделение в КЭ может быть выполнено как с положительной, так и отрицательной полярностью электродов. Зная значения  $pK_a$  для компонентов пробы, можно выбрать буфер с подходящим значением pH и полярность электродов, чтобы образец двигался в сторону детектора. Скорость миграции зависит от напряженности электрического поля, которая обычно составляет 200-400 В/см.

### **Варианты капиллярного электрофореза**

Существует ряд вариантов капиллярного электрофореза, отличающихся по принципам и механизму разделения.

*Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ)* является наиболее распространенным вариантом КЭ и предполагает использование одного буфера в качестве разделяющей среды. Разделение компонентов пробы основано на различиях в подвижности заряженных молекул или ионов. Метод находит широкое применение при определении пептидов, белков, аминокислот, лекарственных препаратов, неорганических ионов и многих других объектов.

*Капиллярный ионный анализ* – это разновидность КЗЭ в которой для определения неорганических ионов, не поглощающих свет в УФ-области спектра, используется косвенное фотометрическое детектирование, достигаемое за счет введения в буфер для электрофореза коионов, поглощающих свет в УФ-области спектра. Вытеснение коионов в зоне определяемого иона уменьшает фоновое поглощение буфера, что выражается в появлении отрицательного пика на электрофореграмме. Так, при разделении катионов используют различные органические основания, например, бензиламин. При определении неорганических анионов в буфер обычно добавляют катионное поверхностно-активное вещество, которое

модифицирует поверхность капилляра и изменяет направление ЭОП. Поскольку направление электрофоретического потока и эндоосмотического потока совпадают, то в этом случае возможны экспрессные и высокоэффективные разделения.

*Капиллярная электрокинетическая хроматография* основана на разделении нейтральных частиц при их распределении между движущимися в электрическом поле частицами и заполняющим капилляр электролитом. Такое распределение может быть обусловлено действием молекулярных сил, ион-парными взаимодействиями комплексообразованием (лигандный обмен), биоспецифическими взаимодействиями. Имеются следующие разновидности капиллярной электрокинетической хроматографии: мицеллярная, ионообменная, лигандообменная и др.

В мицеллярной капиллярной электрокинетической хроматографии (МКЭКХ) в буферный раствор вводят ПАВ, например, додецилсульфат натрия, что приводит к образованию мицелл, которые будут двигаться к аноду, ЭОП – по направлению к катоду. Разделение основано на различной степени связывания компонентов смеси с мицеллами. Этот метод широко используется для различных классов как нейтральных, так и заряженных соединений, например, фенолов, ароматических аминов и др.

### **Капилляры для разделения**

подавляющее большинство разделений в КЭ проводят с использованием кварцевых капилляров имеющих внешнее полимерное покрытие, обычно - полиимидное, улучшающее их механическую прочность, и значительно реже полимерные капилляры, например из тефлона. Внутренний диаметр капилляров колеблется в пределах от 25 до 200 микрон, а длина капилляра в зависимости от поставленной задачи - от нескольких сантиметров до 1 метра. Поскольку внешнее полиимидное

покрытие непрозрачно в УФ-области, то участок покрытия удаляют и создают окно для УФ-детектирования. Капилляр закрепляется в специальной пластиковой кассете. Надежное термостатирование капилляра является основным условием получения воспроизводимых времен миграции определяемого соединения и площади результирующего пика, что важно для количественного анализа.

Выбор оптимальных размеров капилляра представляет собой компромиссное решение между требуемой чувствительностью определения и разрешающей способностью. Используют капилляры с внутренним диаметром 25-50 мкм, что является компромиссным решением между достаточно высокой чувствительностью и эффективностью разделения.

*Модифицированные капилляры.* Первоначально большинство разделений в капиллярном электрофорезе проводили с использованием немодифицированных кварцевых капилляров. Однако, необратимость адсорбции белков, пептидов, фрагментов ДНК, а также электростатические взаимодействия разделяемых соединений с внутренней поверхностью капилляров приводят к значительному снижению эффективности и разрешающей способности, невоспроизводимости разделений. Это требует дополнительных усилий по регенерации капилляров или даже их замене.

Главная цель модифицирования внутренней поверхности кварцевого капилляра состоит в изменении величины и направления ЭОП для улучшения эффективности разделения, а также снижения адсорбции. При этом также достигается ускорение или замедление электросепарационных разделений в зависимости от напряженности и полярности электрического поля; разрешающей способности и чувствительности анализа; движение как анионов, так и катионов в одном направлении, что позволяет проводить их одновременное определение.

## **Введение проб**

Проба может быть введена в капилляр электрофоретическим, электрокинетическим или вытеснительным способом. Объем вводимой пробы не превышает 2 нл, относительное стандартное отклонение составляет 0,03-0,04.

При электрофоретическом вводе пробы, к концам капилляра прикладывается высокое напряжение на фиксированный промежуток времени, при этом входной конец капилляра погружают в раствор пробы. Ионы пробы перемещаются в капилляр пропорционально их электрофоретической подвижности. В случае электрокинетического ввода, компоненты пробы попадают в капилляр за счет комбинации электроэндоосмотического давления и электрофоретической подвижности. Вытеснительный ввод пробы достигается либо за счет создания избыточного внешнего давления инертного газа, приложенного к резервуару с образцом, либо за счет создания вакуума на выходе из капилляра или путем изменения уровня/высоты резервуара, содержащего образец, относительно резервуара с буферным раствором на выходе из капилляра (так называемое гравитационное введение пробы).

## **Детектирование**

Хотя применимость различных вариантов детектирования, включая флуоресцентное, электрохимическое и кондуктометрическое, была показана для КЭ (табл. 26), большинство промышленно выпускаемых приборов оснащено фотометрическими детекторами.

КЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с ВЭЖХ:

- высокая эффективность разделения, обусловленная плоским профилем электроосмотического потока;



**Таблица 26.** Способы детектирования в капиллярном электрофорезе

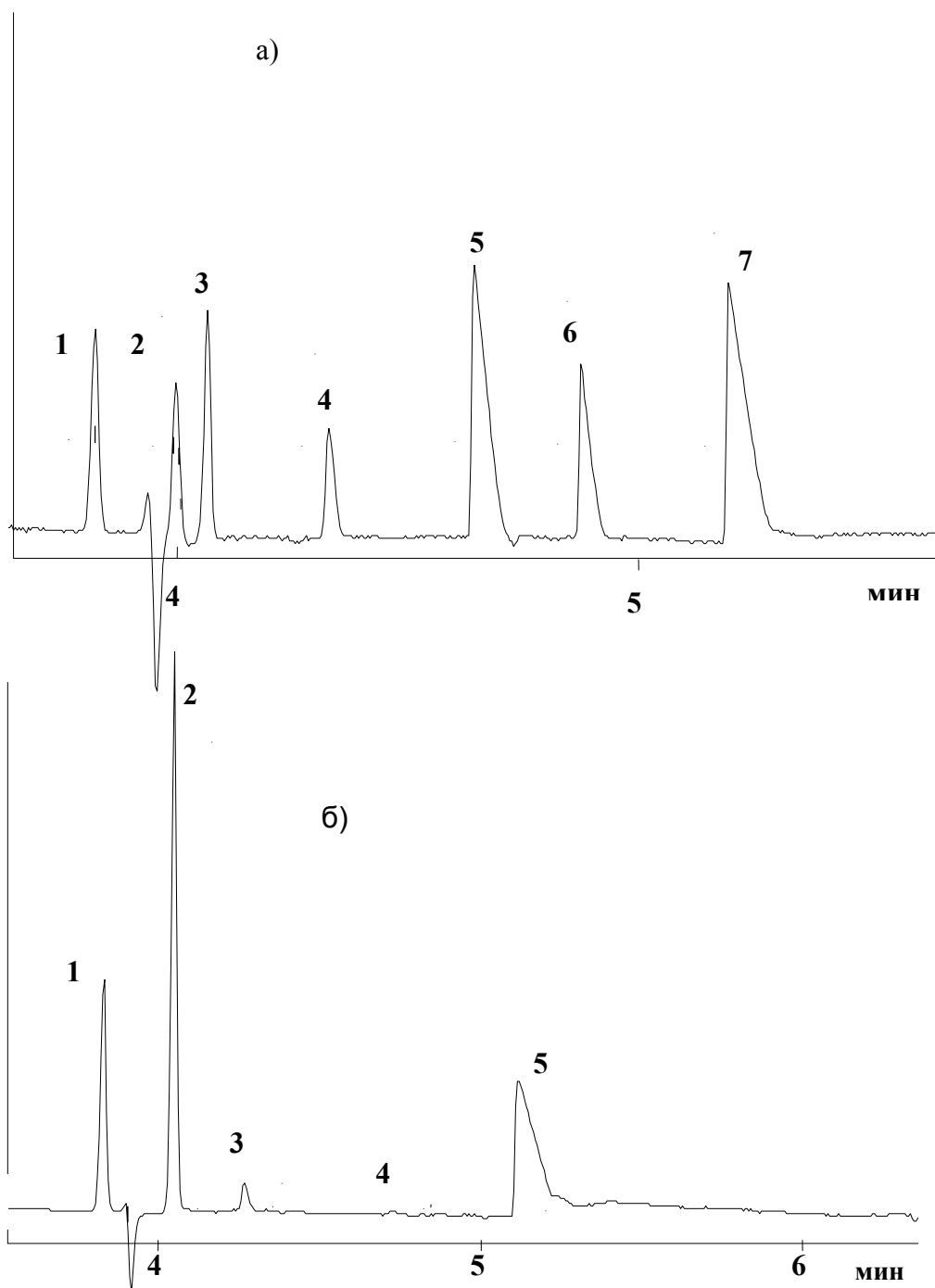
Детектор	Определяемые соединения	Предел обнаружения, М	Особенности
Фотометрический: прямое детектирование	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-4}$	Наиболее широко используется в УФ-области
косвенное детектирование	Ионы металлов, амины, органические и неорганические анионы, сахара	$10^{-8} - 10^{-4}$	Определяют вещества не поглощающие в УФ-области
Флуоресцентный: прямое детектирование	Производные аминокислот, пептиды, белки	$10^{-9} - 10^{-4}$	Необходимо получение производных
косвенное детектирование	Спирты, амины, сахара, неорганические анионы и катионы	$10^{-7} - 10^{-5}$	Применяется к ограниченному кругу объектов
Лазерный флуоресцентный	Производные аминокислот, фрагменты ДНК	$10^{-13} - 10^{-7}$	Используется редко, очень дорог
Амперометрический	Биогенные амины, фенольные соединения	$10^{-8} - 10^{-6}$	Пригоден для капилляров с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрический	Ионы металлов, амины, карбоновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-5}$	Трудно менять капилляр
Потенциометрический	Ионы щелочных и щелочноземельных металлов	$10^{-8}$	Трудность получения ионселективных микроэлектродов
Масс-спектрометрический	Белки, пептиды, мониторинг лекарств	$10^{-10} - 10^{-8}$	Широкие возможности, но высокая стоимость

– экономичность, т.к. практически не требуется применение дорогостоящих высокочистых растворителей (ацетонитрил, метанол, гексан) и малый расход реактивов;

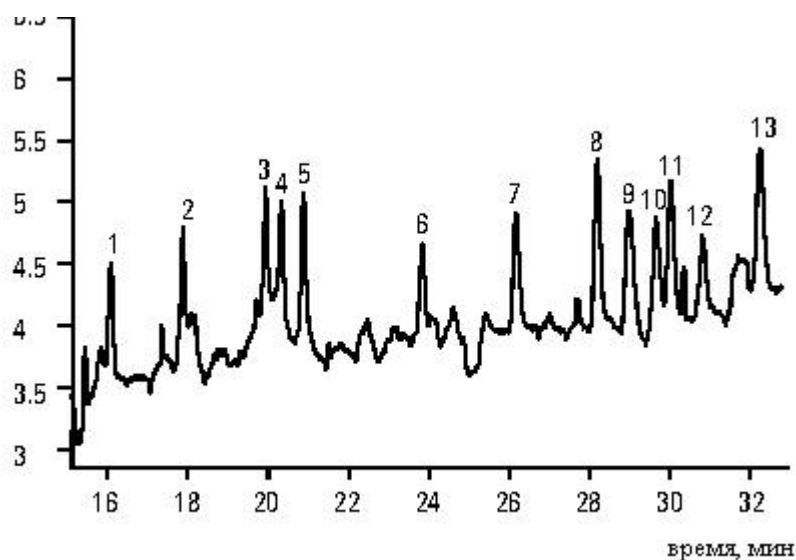
- отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок;
- отсутствие дорогостоящих прецизионных насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- простота аппаратного оформления;
- экспрессность анализа.

Эти преимущества обуславливают широкое использование КЭ для **анализа объектов окружающей среды**. Наиболее часто КЭ используют для определения катионов и анионов в водах. Следует отметить, что разделение одной и той же смеси анионов КЭ занимает существенно меньшее время, чем ВЭЖХ. Электрофореграммы смеси анионов и определения анионов в водопроводной воде показаны на рис. 41.

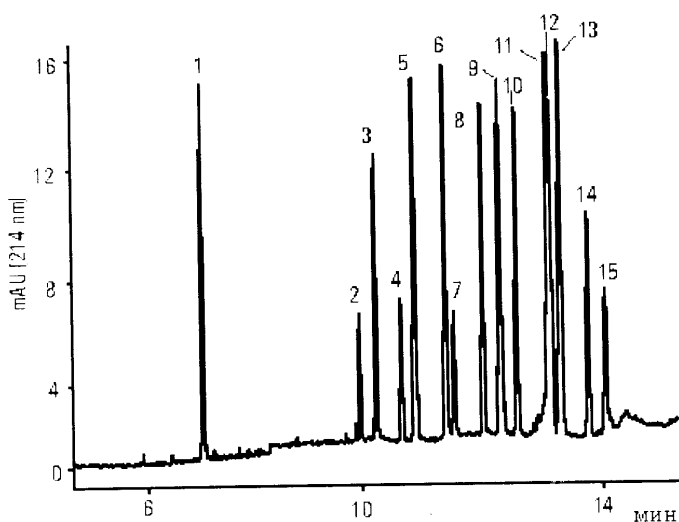
Эффективно применение этого метода и для определения пестицидов и гербицидов в воде и почве. Примеры разделения приведены на рис. 42 и 43. Метод применим для определения таких опасных экотоксикантов, как фенолы. Электрофоретическое определение фенолов (хлор-, нитро-, метилфенолов) обычно производят методами МКЭКХ или КЗЭ с обращенным электроосмотическим потоком. Селективность разделения повышают, изменяя рН буфера (область изменения рН 7-10), вводя добавки нейтральных и анионных ПАВ, а также катионных ПАВ совместно с органическими растворителями. В качестве анионной добавки чаще всего используют додецилсульфат натрия, катионной – бромид цетилтриметиламмония, полиэтиленимин, 3,6-ионен. Детектирование фенолов обычно проводят фотометрически на длине волны 190,214 и 280 нм. Предел детектирования с предварительным сорбционным концентрированием составляет 0,3-1 мкг/л. По сравнению с ВЭЖХ повышается эффективность разделения фенолов. Кроме того, гуминовые и фульвокислоты, всегда присутствующие в природных водах, не мешают определению, они отделяются от фенолов с высоким разрешением вследствие различного миграционного поведения.



**Рис. 41.** Определение анионов в воде капиллярным электрофорезом. а) Электрофореграмма градуировочного раствора. Концентрация каждого аниона (кроме гидрокарбоната) – 2 мг/дм<sup>3</sup>: 1 – хлорид; 2 – нитрит; 3 – сульфат; 4 – нитрат; 5 – фторид; 6 – гидрофосфат; 7 – гидрокарбонат; б) Электрофореграмма водопроводной воды: 1 – хлорид (4,9 мг/дм<sup>3</sup>); 2 – сульфат (18,1 мг/дм<sup>3</sup>); 3 – нитрат (1,4 мг/дм<sup>3</sup>); 4 – фторид (<0,25 мг/дм<sup>3</sup>); 5 – гидрокарбонат. Рабочее напряжение U= - 17 кВ



**Рис. 42.** Электрофореграмма разделения гербицидов: 1- лондакс, 2- квист, 3- эмбер, 4 – флуметсулам, 5 – апбеат, 6 – эцент, 7 – хармони, 9 – просульфурон, 10 –примсульфурон, 11 – элли, 12 – галосульфурон метил, 13 – глеан. Условия проведения анализа: капилляр длиной 102 см и внутренним диаметром 750 мкм; буферный электролит (50 мМ ацетатный буферный раствор, pH 4,75); напряжение 30 кВ; детектор УФ, 240/30 нм



**Рис. 43.** Электрофореграмма смеси пестицидов: 1– десэтилатразин; 2 – гексазинон; 3 – метоксурон; 4 – монолинурон; 5 – симазин; 6 – цианазин; 7 – метабромурон; 8 – хлортолурун; 9 – изопротурон и атразин; 10 – диурон; 11 – линурон; 12 – метабензтиазурон; 13 – себутилазин; 14 – тетбутилазин; 15 – металахлор. Условия проведения анализа: капилляр длиной 64,5 см и внутренним диаметром 50 мкм; буферный электролит (12 мМ фосфата, 8 мМ бората, pH 8,9, 100 мМ додецилсульфата натрия); напряженность поля 440 В/см; детектор УФ, 214 нм

Помимо экологического контроля капиллярный электрофорез также используется:

- **в пищевой промышленности:** для определения катионов, анионов в минеральной воде и водке; консервантов, катионов, анионов, витаминов, антиоксидантов, красителей в напитках и соках; витаминов, аминокислот, микотоксинов в различных продуктах; **в фармакологии:** для анализа лекарственных препаратов, для технологического контроля; разделения энантиомеров; **в биохимия и медицине:** для определения белков и аминокислот в биожидкостях гликозилированного гемоглобина и исследования фармакокинетики; **в криминалистике:** для выявления следов взрывчатых веществ и наркотических