

ОСНОВЫ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА. АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Я.С.Каменцев, Н.В.Комарова

Научно-производственная фирма аналитического приборостроения «Люмэкс»
198005, Санкт-Петербург, Московский пр., 19
knv@lumex.ru

Поступила в редакцию 5 декабря 2001 г.

Капиллярный электрофорез - относительно новый инструментальный метод анализа. Кратко изложены основные принципы, лежащие в основе электрофоретического разделения, представлено аппаратное оформление, а также показаны области использования метода.

PRINCIPLES OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS. EQUIPMENT AND APPLICATIONS

Ya.S.Kamentzev, N.V.Komarova

The separation in capillary electrophoresis (CE) is based on the mobility difference in the presence of electroosmotic flow. High efficiency, separation speed and low cost are the major advantages of this new technique. CE is successfully used for the separation of small ions, neutral molecules and large biomolecules.

Каменцев Ярослав Сергеевич - научный сотрудник НИИХимии СПбГУ.

Область научных интересов: аналитическая химия.

Автор 28 опубликованных работ.

Комарова Наталья Викторовна - инженер-химик НПФ АП "Люмэкс", аспирант химического факультета СПбГУ (специальность "Аналитическая химия").

Область научных интересов: методы разделения и концентрирования.

Автор 9 опубликованных работ.

ВВЕДЕНИЕ

Метод капиллярного электрофореза (КЭФ) основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора (около 2 нл) 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 при детектировании последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной (после построения градуировочной зависимости) - высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

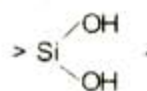
Основные закономерности электрофореза (как движения заряженных частиц в электрическом поле в среде электролита) были известны уже в конце XIX века. Но метод капиллярного электрофореза появился сравнительно недавно. Пер-

вые упоминания о нем относятся к середине семидесятых годов XX века. Затем в восьмидесятые годы были созданы и запущены в серийное производство первые приборы. В девяностые годы резко расширилось практическое использование этого метода в аналитических лабораториях мира [1,2]. Столь позднее появление метода КЭФ связано с тем, что лишь спустя столетие технологии позволили изготавливать кварцевые капилляры очень малых и, главное, равномерных внутренних диаметров (на уровне десятков микрон), прозрачных в ультрафиолетовой области. Кроме того, к этому моменту был накоплен также значительный опыт по возможностям детектирования аналитических сигналов в потоке.

Для того чтобы получить более подробное представление о методе, необходимо рассмотреть ряд процессов, происходящих в капилляре, заполненном электролитом и помещенном в продольное электрическое поле.

ОСОБЕННОСТИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА КАК АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА

Плавленый кварц несет на своей поверхности почти исключительно силосановые группы $>Si-O$. При контакте с водой силосановые группы подвергаются гидролизу и образуют силанольные группы



которые затем гидратируются. Скорость и степень гидролиза зависят от температуры и состава водного раствора, в частности от величины pH. Кислотные свойства поверхностных силанольных групп характеризуются константой диссоциации $K_a = 4 \cdot 10^{-11}$, поэтому при $pH > 2.5$ на поверхности находятся в большем или меньшем количестве диссоциированные силанольные группы, которые придают поверхности отрицательный заряд. При $pH < 2$ диссоциация силанольных групп практически полностью подавлена, и поверхность становится нейтральной.

На границе раздела *кварц - водный раствор электролита* возникает двойной электрический слой. Первую обкладку двойного слоя составляют отрицательно заряженные гидратированные силанольные группы. В приповерхностном слое электролита к отрицательно заряженной поверхности кварца примыкают гидратированные катионы, которые образуют вторую обкладку двойного слоя. Из-за мощного электростатического взаимодействия с поверхностью часть катионов, так же как и силанольные группы, частич-

но теряют гидратирующую воду, в результате чего первый слой катионов, непосредственно контактирующий с поверхностью, становится весьма малоподвижным. Остальная часть нейтрализующих отрицательный заряд катионов распространяется в толщу раствора, образуя так называемую диффузную часть второй обкладки двойного слоя. Распределение катионов между неподвижным и диффузным слоями, а следовательно, и толщина двойного слоя зависят в первую очередь от общей концентрации электролита в растворе. Чем она выше, тем большая часть положительного заряда диффузного слоя перемещается в неподвижный слой и тем меньше становится толщина диффузного слоя. При концентрации бинарного однозарядного электролита 10^{-3} – 10^{-4} М толщина двойного электрического слоя составляет в среднем 30–50 мкм. Таким образом, при диаметре внутреннего канала кварцевого капилляра 50–100 мкм практически вся жидкость, заполняющая капилляр, представляет собой диффузную часть двойного электрического слоя. При наложении продольного электрического поля в капилляре возникает движение носителей электрических зарядов (в том числе ионов) во взаимно противоположных направлениях. Поскольку в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация катионов, их движение увлекает за собой вследствие молекулярного сцепления и трения всю массу жидкости в капилляре. Возникает так называемый электроосмотический поток (ЭОП), направленный к катоду, который осуществляет пассивный перенос раствора внутри капилляра. Наряду с этим под действием электрического поля в капилляре имеет место и так называемая электрическая подвижность ионов, а также электрофоретическая подвижность других заряженных частиц. Эта сложная комбинация различных по природе и свойствам процессов, происходящих в капилляре при наложении электрического поля, используемая для аналитических целей, получила название **метода капиллярного электрофореза**.

Традиционно КЭФ сравнивают с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), поскольку в обоих методах разделение происходит в ограниченном пространстве (колонке или капилляре) с участием движущейся жидкой фазы и для детектирования используются аналогичные принципы [3]. Преимуществами КЭФ над ВЭЖХ являются:

- высокая эффективность разделения, недоступная ВЭЖХ и связанная с плоским профилем

электроосмотического потока:

- малый расход реактивов и практическое отсутствие потребности в применении дорогостоящих высокочистых растворителей: ацетонитрила, метанола, гексана;
- отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок и, следовательно, проблем со «старением» сорбента и заменой колонок при выработке ресурса;
- отсутствие прецизионных дорогостоящих насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- простота аппаратного оформления;
- экспрессность анализа.

Из недостатков КЭФ нужно отметить ограниченное применение метода для образцов, плохо растворяющихся в водных или разбавленных водно-спиртовых растворах, и невысокую чувствительность при регистрации сигнала в капилляре из-за малой длины оптического пути.

АППАРАТУРА ДЛЯ ЭЛЕКТРОМИГРАЦИОННОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Минимальный состав системы, реализующей метод КЭФ, должен иметь следующие узлы: кварцевый капилляр, источник высокого напряжения, устройство ввода пробы, детектор и систему вывода информации (рис. 1):

- используют, как правило, кварцевые капилляры с внешним полиимидным защитным покрытием (внутренний диаметр 50-75 мкм, внешний 365 мкм, общая длина 30-100 см);
- для разделения используют положительные и отрицательные напряжения до 30 кВ;
- для ввода нанолитрового объема пробы применяют избыточное давление (гидродинамический способ) или высокое напряжение (электрокинетический);
- для регистрации электрофореграмм чаще всего используют УФ-детектирование непосредственно в капилляре, в прямом и косвенном вариантах.

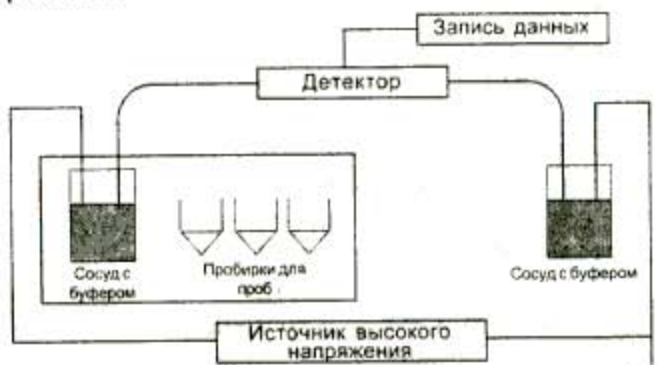


Рис.1. Устройство системы капиллярного электрофореза

Дополнительные устройства позволяют автоматизировать подачу образцов, осуществлять отвод тепла от капилляра (системы охлаждения капилляра) и управлять прибором, а также собирать и обрабатывать полученные данные (с помощью программных продуктов).

В приборе, реализующем метод капиллярного электрофореза, капилляр, заполненный раствором электролита, своими концами опущен в два содержащих тот же электролит сосуда, в которые введены электроды. Электролит обязательно должен обладать буферными свойствами, чтобы, с одной стороны, воспрепятствовать изменению состава раствора в приэлектродных пространствах, а с другой – стабилизировать состояние компонентов пробы в процессе анализа. При подаче на электроды высокого напряжения в капилляре быстро устанавливается стационарное состояние, при котором через капилляр протекает постоянный электроосмотический поток, на который накладывается взаимно противоположная по направлению электромиграция катионов и анионов. Если в капилляр со стороны анода (положительного электрода) ввести небольшой объем раствора пробы, то ЭОП будет переносить эту зону к катоду, и зона некоторое время будет находиться в капилляре под воздействием электрического поля высокого напряжения. В течение этого времени компоненты пробы, имеющие заряды и отличающиеся от компонентов ведущего электролита, будут перемещаться в соответствии с их электрическими подвижностями, специфичными для каждого компонента. Катионные компоненты пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять электроосмотический поток. Скорость их движения будет складываться из скорости ЭОП и скорости электромиграции, поэтому на выходе капилляра катионные компоненты будут появляться первыми и тем раньше, чем больше электрическая подвижность данного иона. Нейтральные компоненты пробы будут перемещаться только под действием ЭОП и появятся на выходе, когда его достигнет зона пробы. Анионные компоненты, перемещаясь к аноду, будут двигаться со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП. Некоторые из них, медленно мигрирующие, будут появляться на выходе после зоны ЭОП, а те, чья скорость электромиграции по абсолютной величине превышает скорость ЭОП, вообще будут выходить из капилляра в прианодное пространство. Если время нахождения пробы в капилляре (которое можно регулировать длиной капилляра, скоростью ЭОП или, в меньшей степени, напряжением) достаточно, то на выходе капилляра

вблизи катода можно наблюдать зоны раствора, в которых находятся индивидуальные компоненты пробы. Происходит, таким образом, разделение исходной смеси. Если тем или иным способом зарегистрировать изменение концентраций компонентов на выходе из капилляра, то полученная запись называется электрофореграммой и может служить основой для качественного и количественного анализа смеси.

ООО «Люмэкс» первым из отечественных при-

боростроительных предприятий освоил серийное производство систем капиллярного электрофореза, которые включены в Государственный реестр средств измерений РФ. Предлагаемые приборы представлены в нескольких модификациях (см. таблицу). Разнообразие технических решений, использованных при создании приборов системы «Капель», позволяет потребителю выбрать тот аппарат, который в наибольшей степени соответствует характеру решаемой задачи.

Сравнительные характеристики модификаций системы «КАПЕЛЬ»

Модификация	«Капель-103Р»	«Капель-104»	«Капель-105»
Детектор	Фотометрический, 254 нм	Фотометрический, 254 нм	Фотометрический, 190...380нм
Ввод пробы	Электрокинетический, пневматический		
Охлаждение капилляра	Воздушное, принудительное, без контроля температуры	Жидкостное, с контролем температуры	
Смена образцов	Ручная	Ручная или автоматическая	
Число пробирок на входе капилляра	4	10	
Число пробирок на выходе капилляра	2	10	
Управление	Функциональная клавиатура, интерфейс RS 232		
Индикация	ЖК-дисплей, 4 строки по 20 символов	ЖК-дисплей, 30 строк по 16 символов	
Обработка данных	ПО «МультиХром» для Windows-95/98/NT		
Источник питания	220 В ±15 %, 50/60 Гц		
Потребляемая мощность	60 ВА	80 ВА	150 ВА
Габариты	420x330x360 мм	420x360x440 мм	
Масса	16 кг	22 кг	24 кг

«Капель-103Р» является наиболее простым аппаратом с полностью ручным управлением и пошаговым методом работы. В прибор можно установить только одну пробирку с анализируемым раствором. Все операции по промывке капилляра, вводу пробы и анализу выполняются по командам оператора, причем в приборе предусмотрена диагностика и предупреждение неправильных действий оператора. Особенностью прибора «Капель-103Р» является то, что он идеально подходит для обучения методу капиллярного электрофореза в университетах, технических лицеях и лабораториях, благодаря наглядности всех процедур и простоты управления. Использование прибор «Капель-103Р» также предпочтительно при разработках новых методик.

«Капель-104» предназначена для выполнения серийных анализов. Она имеет на входе и выхо-

де капилляра два автомата подачи пробы карусельного типа для размещения в каждом до 10 пробирок (6–7 рабочих пробирок, остальные вспомогательные), удобный интерфейс, позволяющий создавать программы работы прибора в автоматическом режиме.

«Капель 103-PT» и «Капель 104-T» отличаются от основных моделей наличием жидкостной системы охлаждения капилляра, которая позволяет поддерживать температуру теплоносителя на заданном уровне, независимо от температуры лабораторного помещения, благодаря чему улучшается стабильность градуировочных характеристик приборов.

«Капель-105» – прибор с наиболее широкими возможностями. В нем сохранены лучшие качества предыдущих моделей: жидкостная система охлаждения капилляра, автоматы подачи пробы.

возможность работы в программируемом автоматическом режиме. В дополнение к этому в приборе установлена в качестве источника света дейтериевая лампа и монохроматор с дифракционной решеткой, благодаря чему прибор может работать в широком диапазоне длин волн от 190 до 380 нм. Всё это делает «Капель-105» незаменимым аппаратом для исследовательской работы как в области разработки новых методик, так и в аналитической практике.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА

К основным областям применения метода КЭФ относятся:

- экологический и технологический контроль водных объектов (катионный и анионный состав, пестициды и другие экотоксиканты);
- пищевая промышленность (определение консервантов и подсластителей, пищевых красителей и витаминов в напитках и соках; контроль качества бутилированных вод и напитков, оценка подлинности вин и виноматериалов; контроль за содержанием биогенных аминов (аминокислот, гистамина и др.));
- фармацевтика, биохимия и клиническая медицина (анализ лекарственных препаратов и биологических жидкостей);
- производственный контроль (анализ следовых количеств основного (сопутствующего) компонента на фоне матрицы);
- судебная экспертиза и криминалистика (анализ наркотических средств, следов взрывчатых веществ и т.д.);
- научные исследования.

Метод начинает проникать сегодня даже в те области, о которых еще вчера говорили, что они лежат вне зоны возможностей КЭФ. Так, например, принципы неводного КЭФ позволили снять ограничения по физико-химическим свойствам анализируемых веществ (должны быть растворимы в воде или водно-органических смесях), а новые аппаратные возможности привели к повышению чувствительности определения.

Высокая разделяющая способность КЭФ позволяет максимально упростить пробоподготовку. В подавляющем большинстве случаев подготовка пробы к анализу заключается в фильтровании образца через мембранный фильтр и дегазации пробы. По данным ГУП ЦИКВ (г. Санкт-Петербург), уже несколько лет работающего на приборе «Капель», при определении анионов в сточных водах и серийном выполнении анализов трудозатраты составляют не более 20 минут на пробу, включая все стадии, кроме пробоотбо-

ра. Это позволяет за один рабочий день выполнять до 20 анализов по одной методике. В случае определения в течение одного дня и катионов и анионов необходимо менять кассеты с капилляром (для экономии времени подготовки поверхности капилляра к разделению).

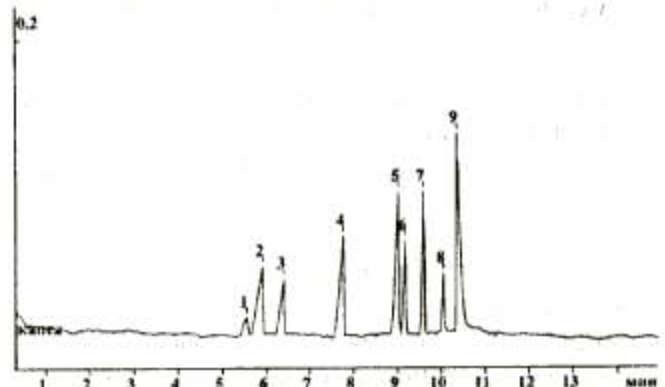


Рис.2. Электрофореграмма градуировочной смеси катионов. Аппаратура: «Капель-103» (НПФ АП «Люмэкс», г.Санкт-Петербург); состав буфера: 6 мМ бензимидазола, 2,5 мМ винной кислоты, 2,0 мМ 18-краун-6; капилляр: 50/60 см, 75 мкм; ввод пробы: 150 мбар·с; рабочее напряжение: +10 кВ; детектирование: косвенное, 254 нм. Концентрация компонентов: цезий – 20, барий – 5, литий – 1, остальные катионы – по 10 мг/дм³

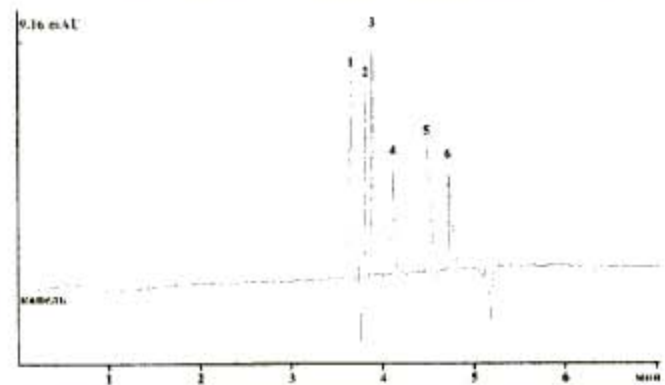


Рис.3. Электрофореграмма градуировочной смеси анионов. Аппаратура: «Капель-103» (НПФ АП «Люмэкс», г.Санкт-Петербург); состав буфера: 5 мМ хромат-иона, 20 мМ диэтанолamina, 1,65 мМ ЦТАБ; капилляр: 50/60 см, 75 мкм; ввод пробы: 300 мбар·с; рабочее напряжение: -17 кВ; детектирование: косвенное, 254 нм. Концентрация компонентов: фторид 2,5, остальные анионы – по 5 мг/дм³

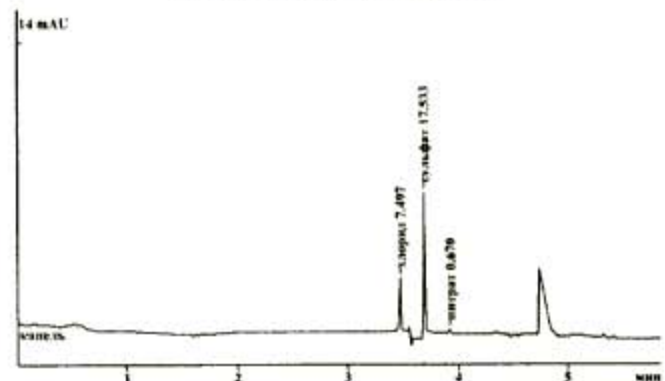


Рис.4. Определение анионов в питьевой воде. Условия такие же, как на рис.3. Рядом с пиком указана концентрация определяемого компонента в мг/дм³ в реальном образце

В качестве примеров электрофоретических разделений можно привести определение катионного и анионного составов водных объектов (рис. 2 - 4) по методикам, изложенным в нормативных документах [4, 5]. Максимальная характеристика погрешности для концентраций на уровне десятых долей миллиграмма на кубичес-

кий дециметр не превышает 25 %.

Таким образом, представленный метод капиллярного электрофореза является экспрессным высокоточным инструментальным методом и находит широкое применение в аналитической практике для целей разделения и количественного определения компонентов сложных смесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Landers J.P. Handbook of Capillary Electroforesis. Boca Raton, CRC Press. 1994. 486 p.
2. Engelhardt H., Beck W., Schmitt T. Capillarelektroforese, Methoden und Möglichkeiten. Wiesbaden: Vieweg Verlag, 1994. 218 p.
3. Penmetsa K.V., Leidy R.B., Shea D. // J. Chromatogr. 1996. V. 745. P.201.
4. ПНД Ф 14.1:2:4.157-99. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фос-

фат-ионов в пробах природной, питьевой и сточной вод с применением системы капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: Люмэкс, 1999.

5. ПНД Ф 16.1:2:4.167-2000. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации катионов цезия, аммония, калия, натрия, лития, магния, кальция, стронция, бария в пробах питьевых, природных и сточных вод с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: Люмэкс, 2000.

* * * * *