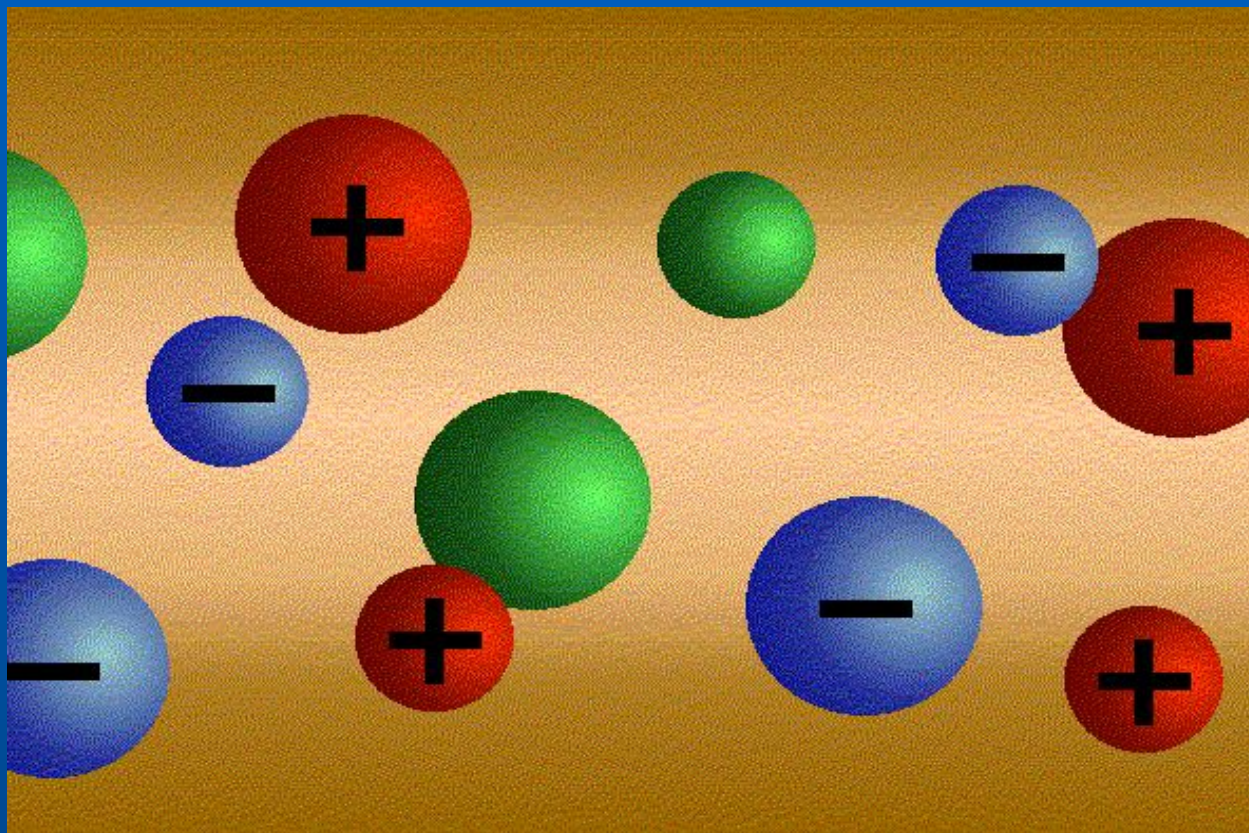


Капиллярный электрофорез и электрохроматография



Аналитический Центр химического факультета МГУ
Москва, Ленинские горы, ГСП-1.
939-35-14

История и этапы развития метода

Электрофорез – движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля

История:

- Начало 19-го века – открытие электрофореза
- 1937 – Нобелевская премия (Тизелиус)
- 1981-1983 – первые аналитические приборы капиллярного электрофореза (Джоргенсон, Лукас)
- 1990-2003 Расшифровка генома человека

Электрофоретическая подвижность

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

(см² В⁻¹ сек⁻¹)

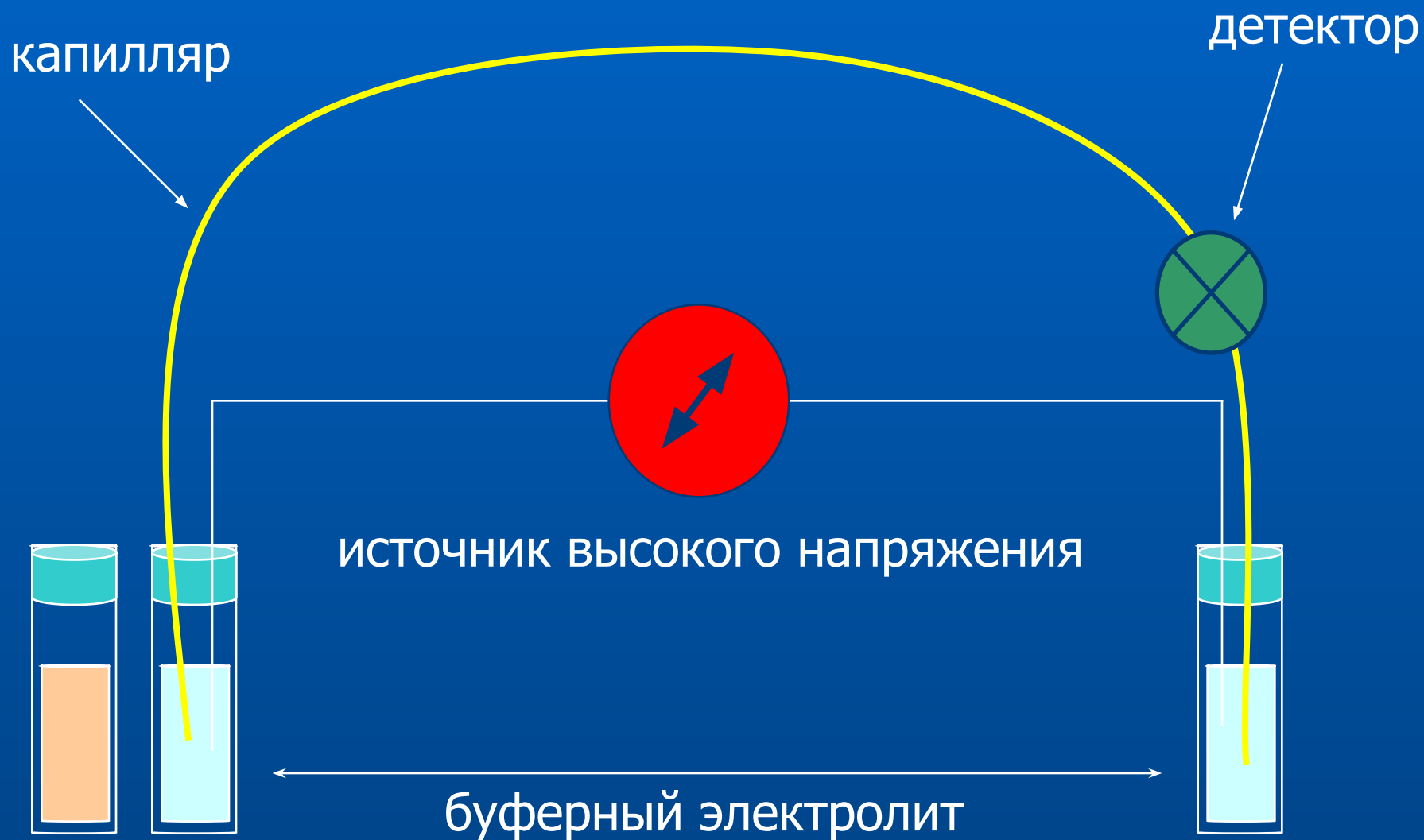
μ = электрофоретическая подвижность

q = заряд частицы

η = вязкость раствора

r = радиус частицы

Схема прибора для капиллярного электрофореза



Скорость миграции по капилляру

Скорость миграции:
$$v = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{V}{L}$$

Где:

v = скорость миграции иона в электрическом поле (см сек⁻¹)

μ_{ep} = электрофоретическая подвижность (см² В⁻¹ сек⁻¹)

E = напряженность поля (В см⁻¹)

V = приложенное напряжение (В)

L = длина капилляра (см)

Эффективность в электрофорезе не зависит от длины капилляра!

Уравнение Ван-Деемтера:

$$H = A + B/u + Cu$$

- $A = 0$ (капилляр узкий, нет турбулентности)
- $C = 0$ (нет неподвижной фазы)
- Остается только B

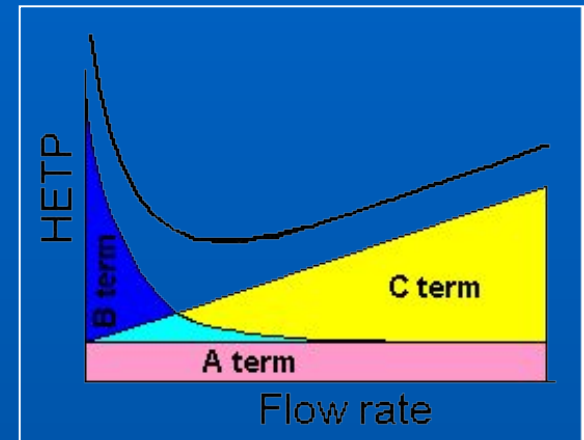
$$H = B/u$$

$$N = L/H$$

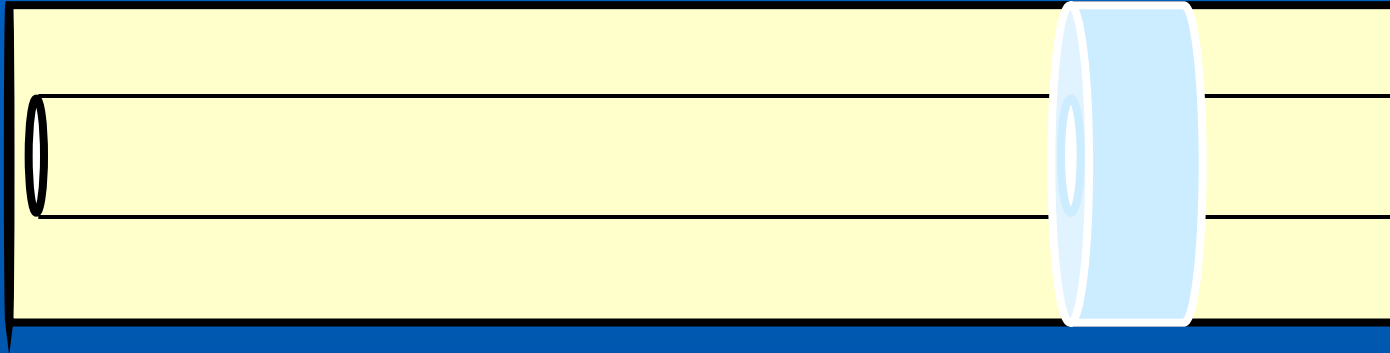
$$H = B/v = 2D/v$$

$$v = \mu E = \mu V/L$$

Следовательно, $N = L/[2D/(\mu V/L)] = \mu V/2D$

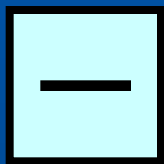
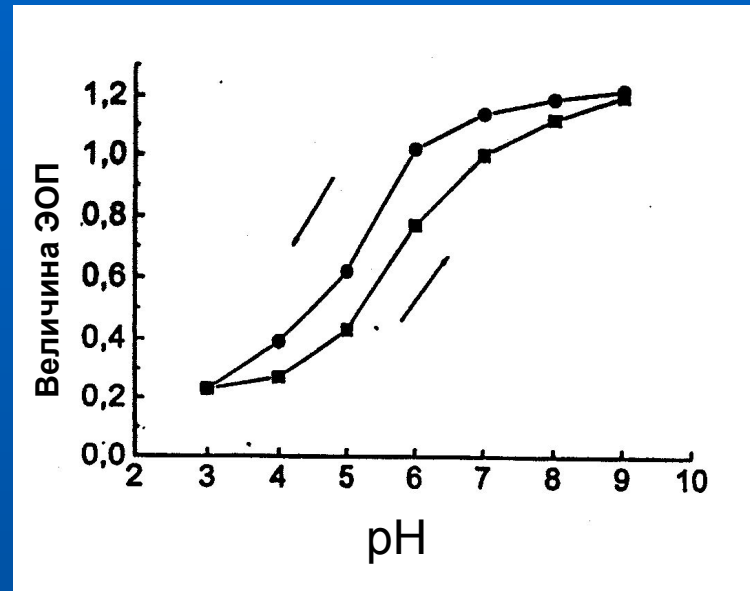
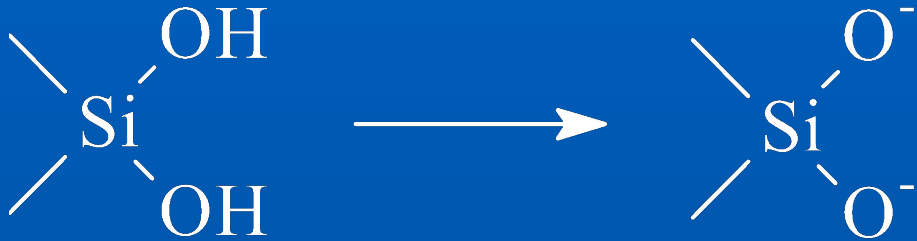


Строение капилляра

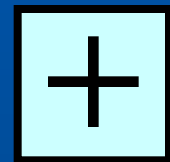


- Трубка из плавленого кварца со строго фиксированными диаметрами.
- Внешний диаметр 375 мкм, внутренний – от 20 до 100 мкм (50, 75 мкм)
- Длина 20 - 100 см
- Покрытие полиимидной пленкой
- В месте детектирования покрытие удалено (окно детектирования)

Электроосмотический поток и причины его возникновения

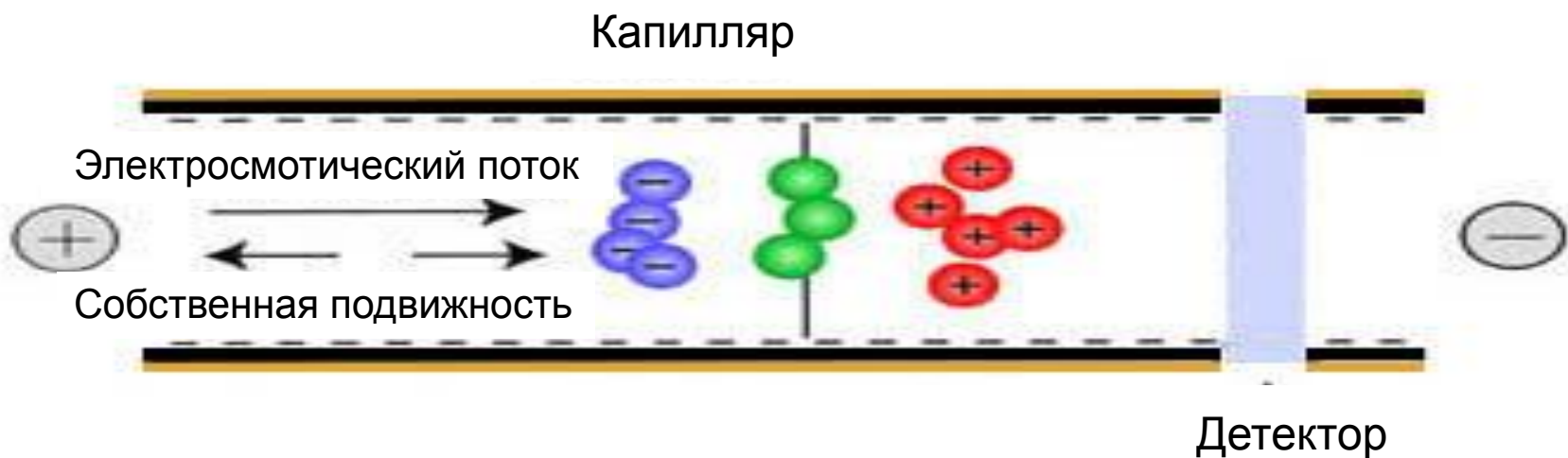


ЭОП (EOF)



pH > 3-4

Скорость и направление движения ионов по капилляру



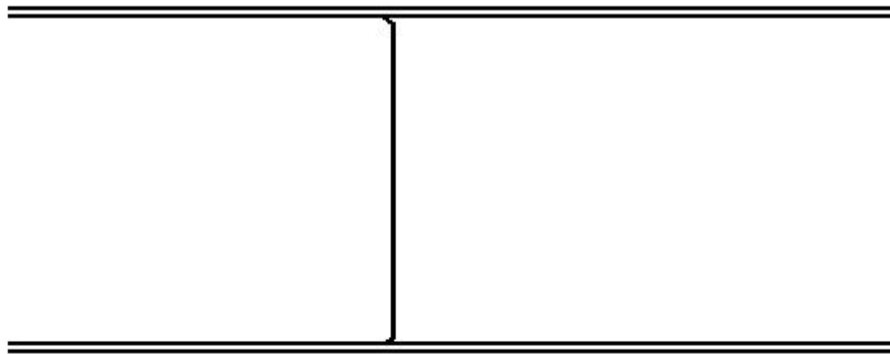
Катионы: $\rightarrow + \rightarrow = \rightarrow$

Анионы: $\rightarrow + \leftarrow = \rightarrow$

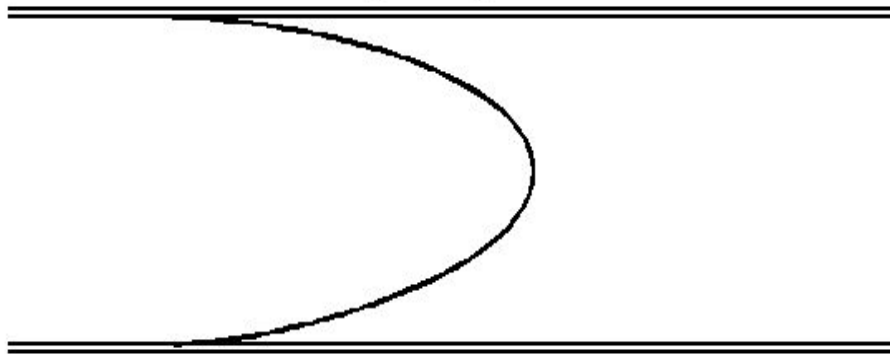
Нейтральные в-ва: $\rightarrow = \rightarrow$

Профиль гидродинамического и электроосмотического потоков

Cross-Sectional Flow Profile
Due to Electroosmotic Flow



Cross-Sectional Flow Profile
Due to Hydrodynamic Flow



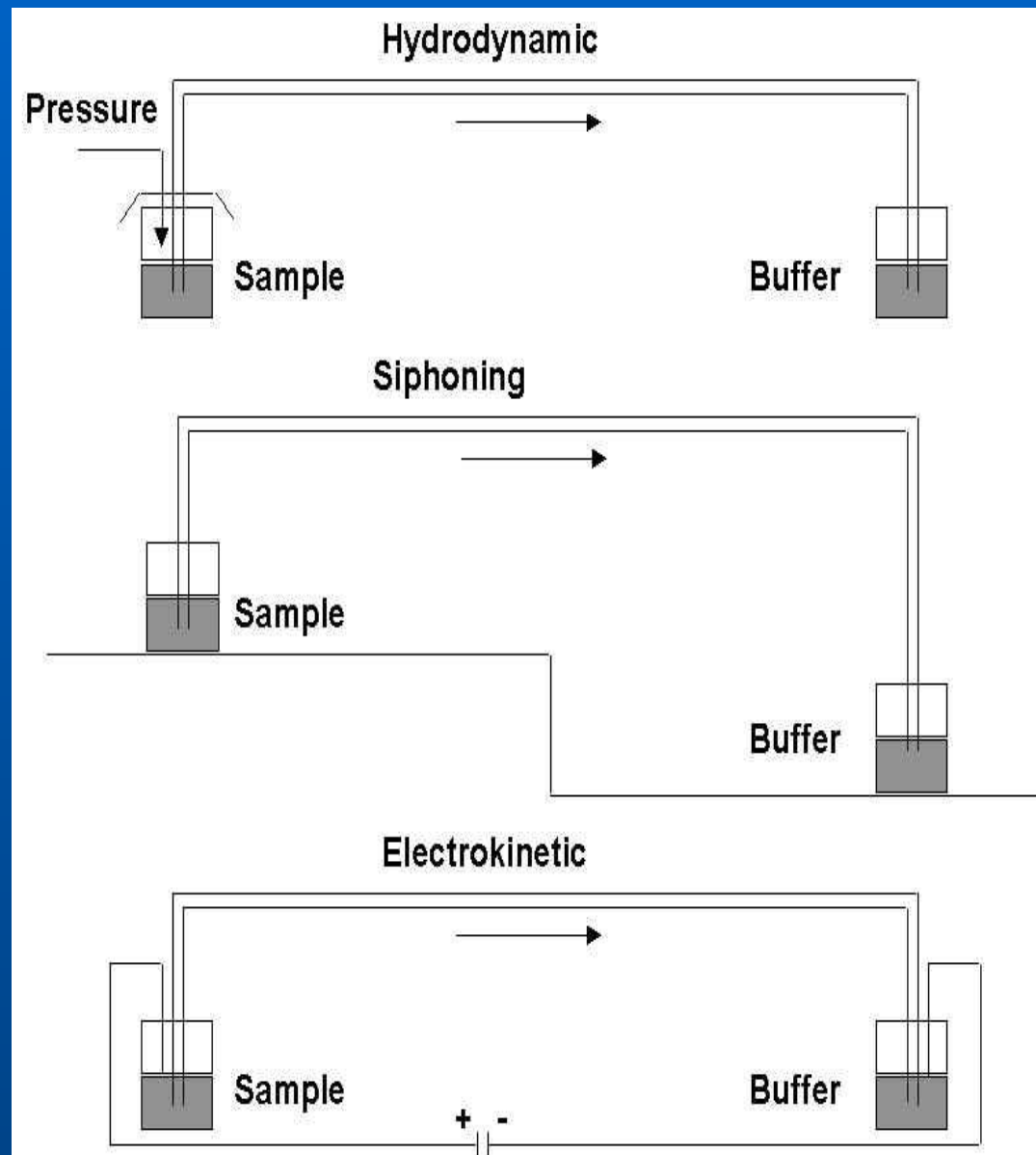
- **Электроосмотический**
 - Плоский профиль
 - Минимизируется размывание зон
 - Зависит от свойств поверхности капилляра
- **Гидродинамический**
 - Параболический профиль
 - Больше размывание зоны
 - Не зависит от свойств поверхности

Выделение тепла капилляром

- Капилляр работает как сопротивление
- Чем больше ток, тем больше выделение тепла
- Зависимость силы тока от напряжения нелинейна
- Чем меньше диаметр капилляра, тем меньше ток
- Чем концентрация буферного электролита, тем меньше ток
- Желателен ток до $< 60 \text{ мА}$ ($< 1 \text{ W}$)

Ввод пробы в капилляр

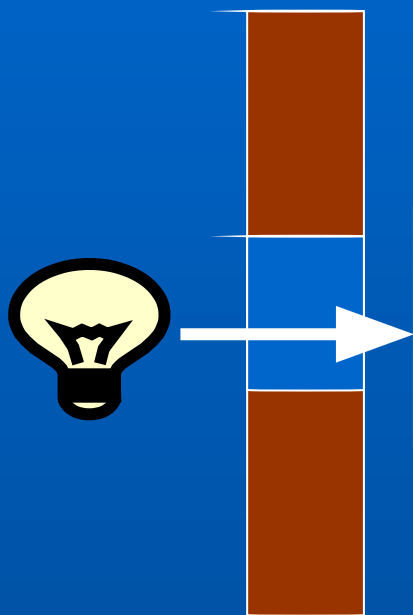
- Гидродинамический
 - Давление
 - Вакуум
- Гидростатический
- Электрокинетический



Детектирование в капиллярном электрофорезе

- Капилляр имеет малый объем, следовательно объем вводимой пробы очень мал (нанолитры)
- Специальные приемы по минимизации мертвого объема
- Должна быть решена проблема высокого напряжения при анализе
- Обычно используемые детекторы
 - UV/Vis – наиболее распространен
 - LIF (laser-induced fluorescence) - наиболее чувствителен
 - Mass spectrometry – наиболее перспективен
 - Бесконтактная кондуктометрия

Пределы обнаружения



- Объем пробы ~ 1нл
- Длина оптического пути ~ 50 мкм
- Вещество с Mw = 100

Детектор	Абсолютные ПО, моль	Концентрационные ПО, М/л - (мкг/мл)
UV/Vis	10^{-16} - 10^{-13}	10^{-5} - (1)
LIF	10^{-18} - 10^{-15}	10^{-8} - (0.001)
MS	10^{-17} - 10^{-8}	10^{-6} - (0.1)

Оптимизация в капиллярном электрофорезе

- рН
 - Первое, что надо варьировать
 - Влияет на ЭОП и подвижность (заряд)
- Органический растворитель
 - Сольватация веществ
- Концентрация и природа добавок
 - образование мицелл, ионных пар и т.п.
- Неводный электрофорез
 - Сольватация, заряд (но проблемы с током !)
- Температура, напряжение
 - Сольватация, хим. равновесие, подвижность

Достоинства капиллярного электрофореза

- Очень высокая эффективность (до 6 млн. тт)
- Требуемый объем пробы (1-10 мкл)
- Быстрое разделение (1 - 30 мин)
- Предсказуемая селективность
- Автоматизация
- «Ненужные» компоненты матрицы пробы можно легко удалить из капилляра промывкой
- Капилляр легко заменить
- Совместимость с масс-селективным детектором

Недостатки капиллярного электрофореза

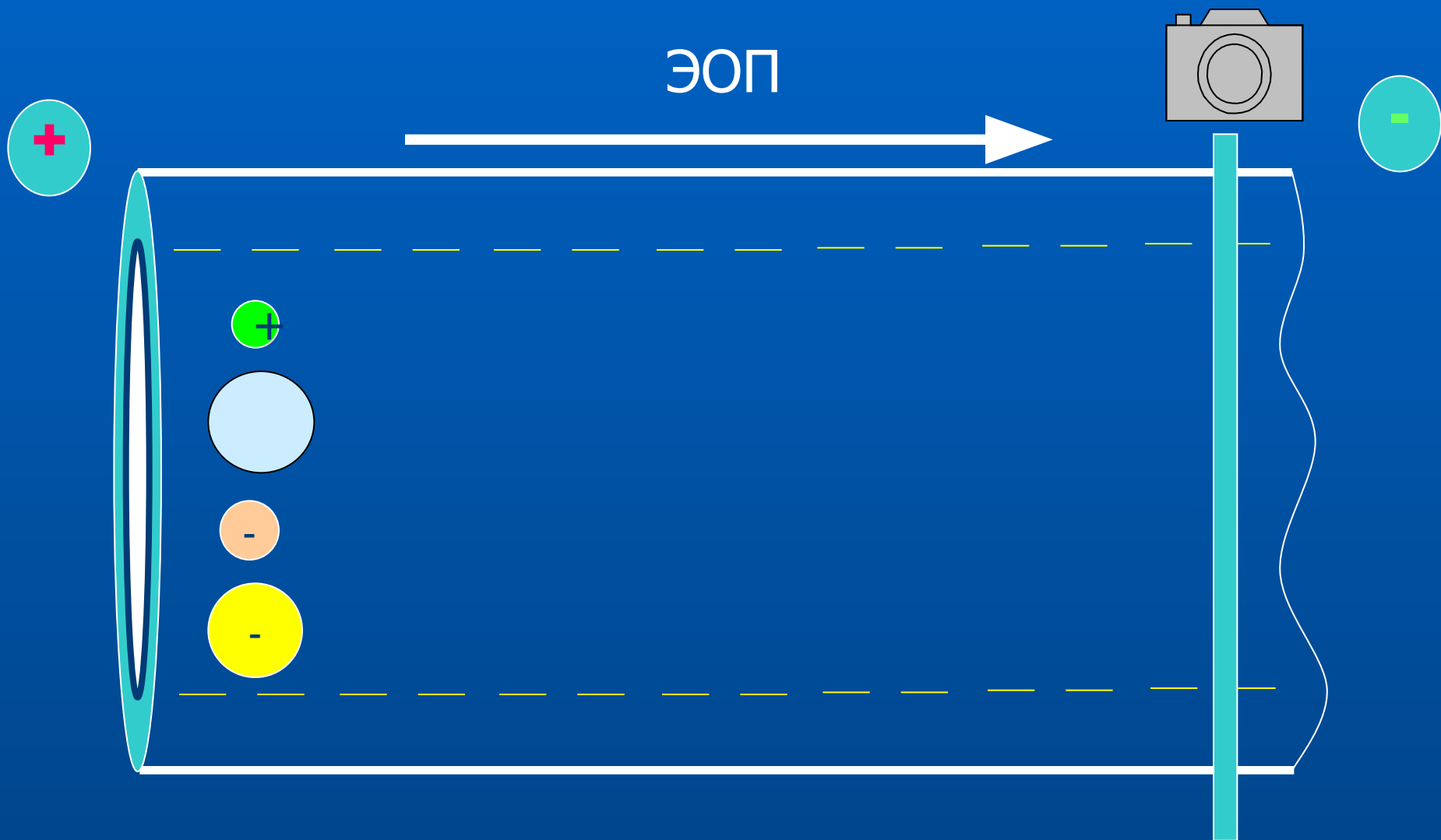
- Часто недостаточная чувствительность
- Хуже воспроизводимость по сравнению с хроматографией
- Сложно контролировать величину ЭОП
- Свойства капилляров могут меняться от партии к партии
- Узкий динамический диапазон (1 порядок концентраций)
- Образование пузырьков газа в капилляре
- Форма пиков часто несимметрична

Основные виды электрофореза

- Капиллярный зонный электрофорез (CZE)
- Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЕКС)
- Микроэмульсионная электрокинетическая хроматография (МЕЕКС)
- Капиллярная электрохроматография с заполненными капиллярами (СЕС)
- Капиллярный гель-электрофорез (CGE)
- *Изотахорез (ИТР)*
- *Капиллярная изоэлектрическая фокусировка (CIEF)*

Капиллярный зонный электрофорез

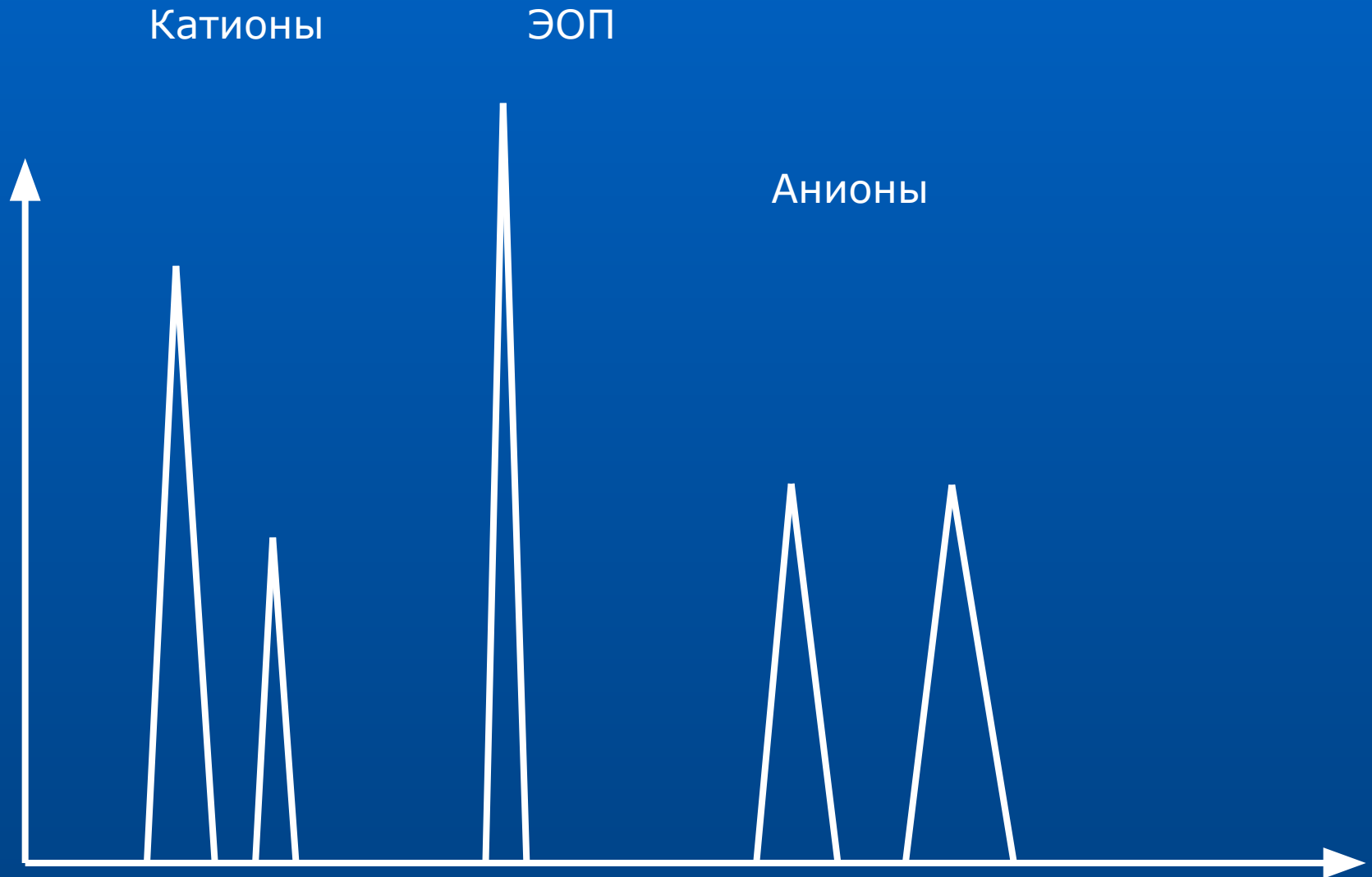
Схема удерживания ионов в капиллярах



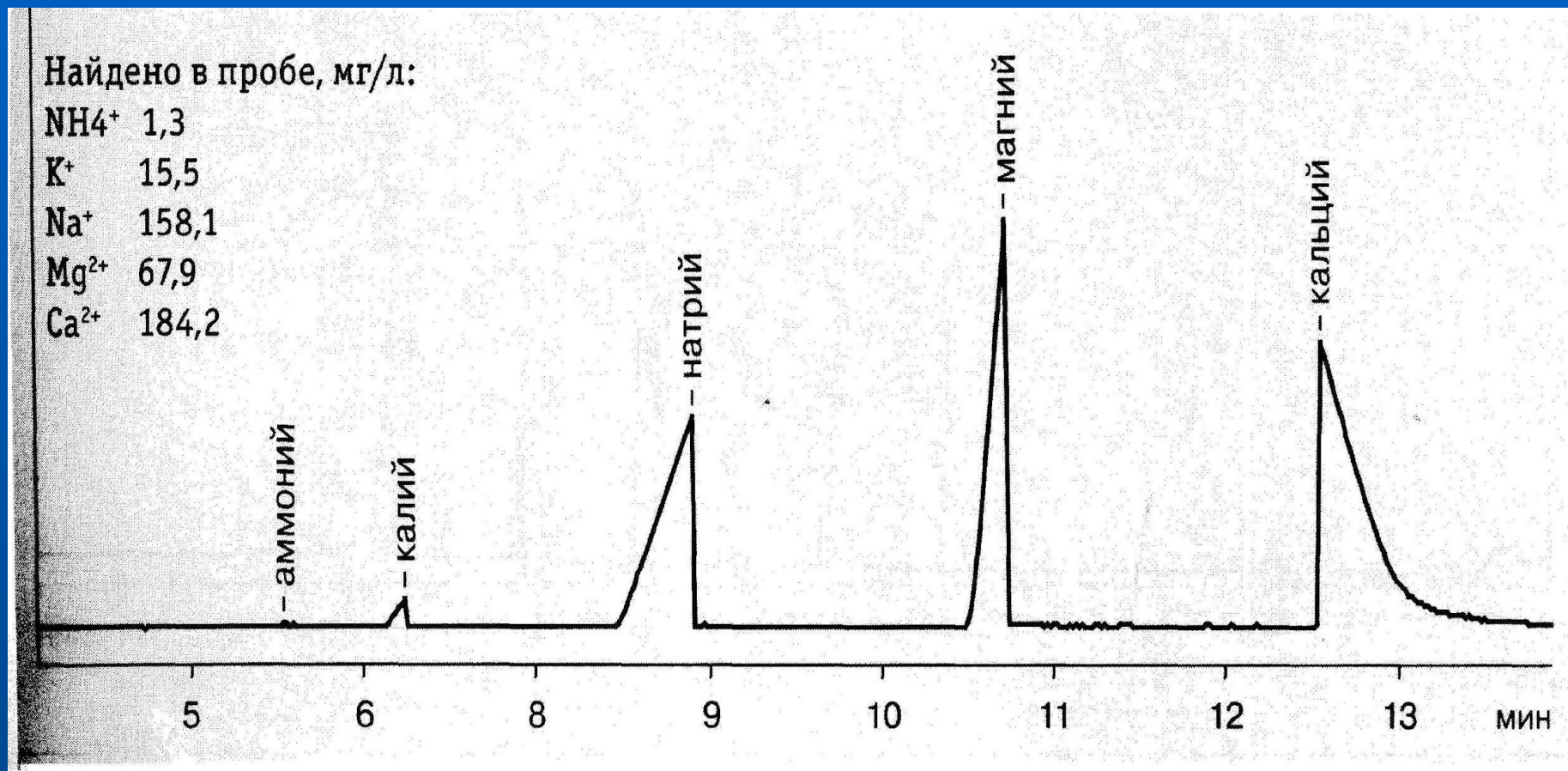
Механизм разделения в капиллярном зонном электрофорезе

- Разделяются ТОЛЬКО заряженные соединения. Направления движения катионов и анионов различны.
- Подвижности ионов отличаются в зависимости от отношения их заряда к размеру, что обуславливает разделение.
- Общая подвижность зависит от направления и величины ЭОП

Порядок миграции ионов в кварцевых капиллярах



Определение катионов в сточных водах методом капиллярного зонного электрофореза



Буферный электролит: 10 мМ бензимидазол, винная кислота, 18-краун-6
Напряжение: 13 кВ
Детектирование: Косвенное, 254 нм

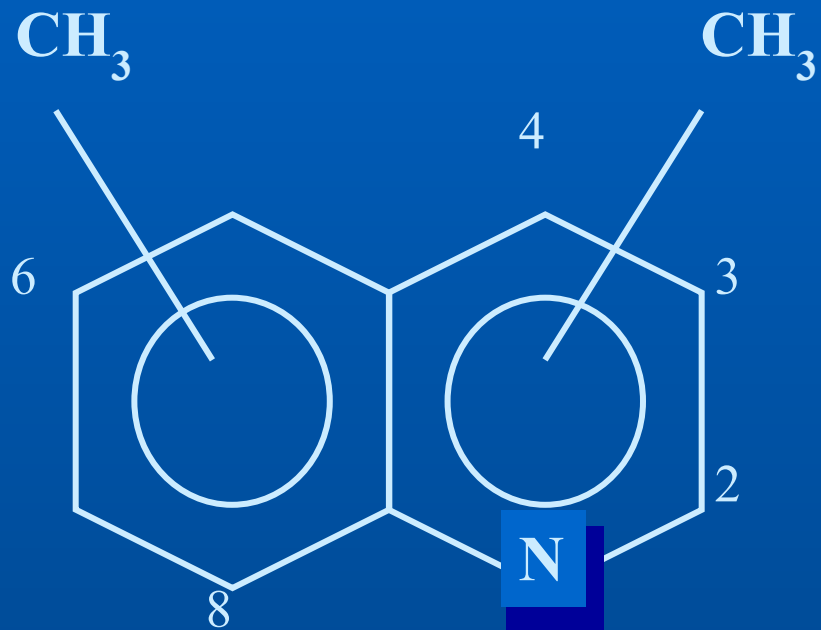
Хорошие начальные условия для КЗЭ:

Капилляр: 75 мкм внутренний диаметр, 60 см длина

Электролит: Фосфатный или боратный буферный раствор
с концентрацией около 50 мМ

Напряжение: +/- 20 kV (так, чтобы ток не более 100 μ A)

Задача. Разделить смесь хинолинов

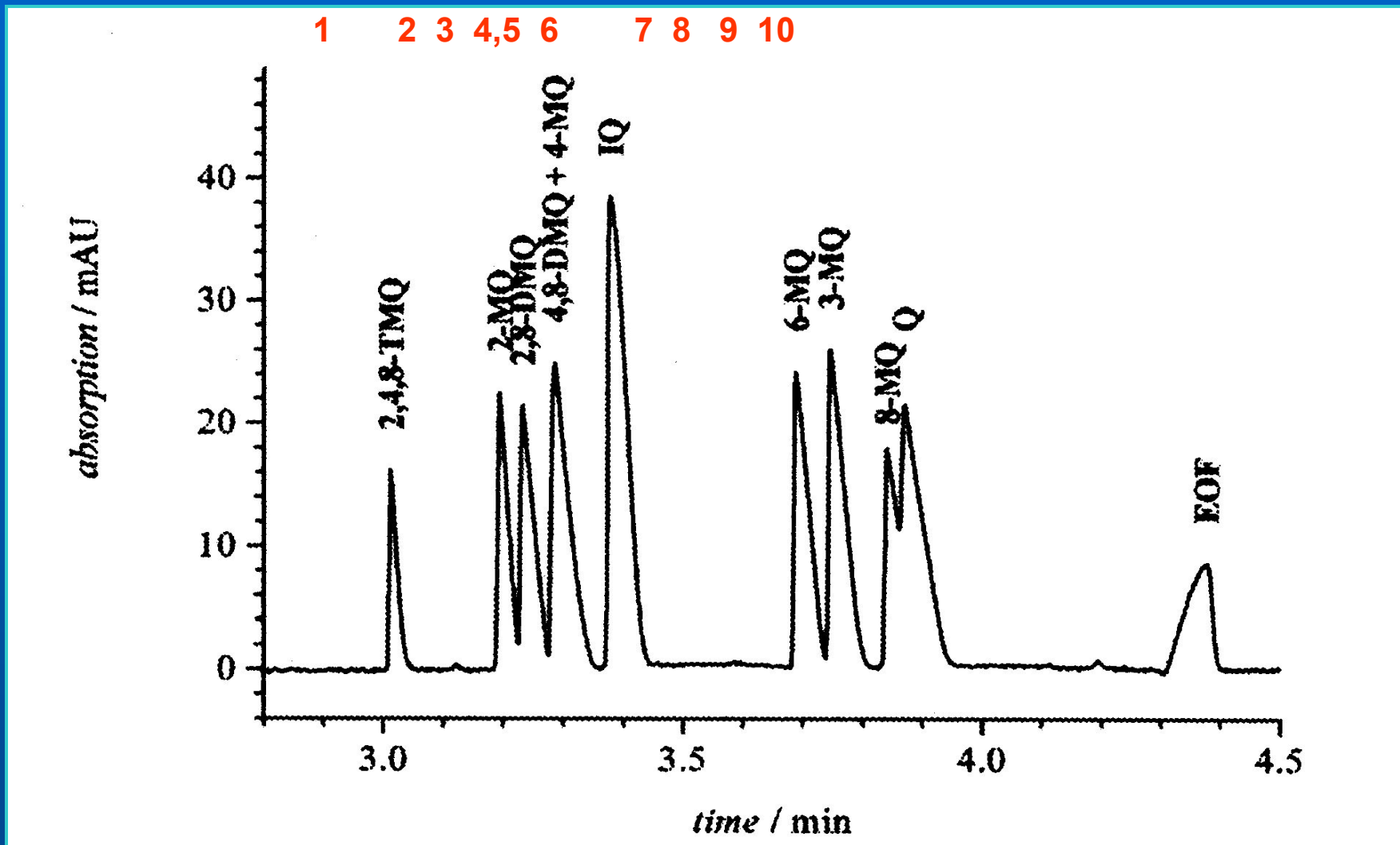


Исходные материалы при
производстве
пиридинкарбоновых кислот
и их производных

Активные ингредиенты в
фармацевтике

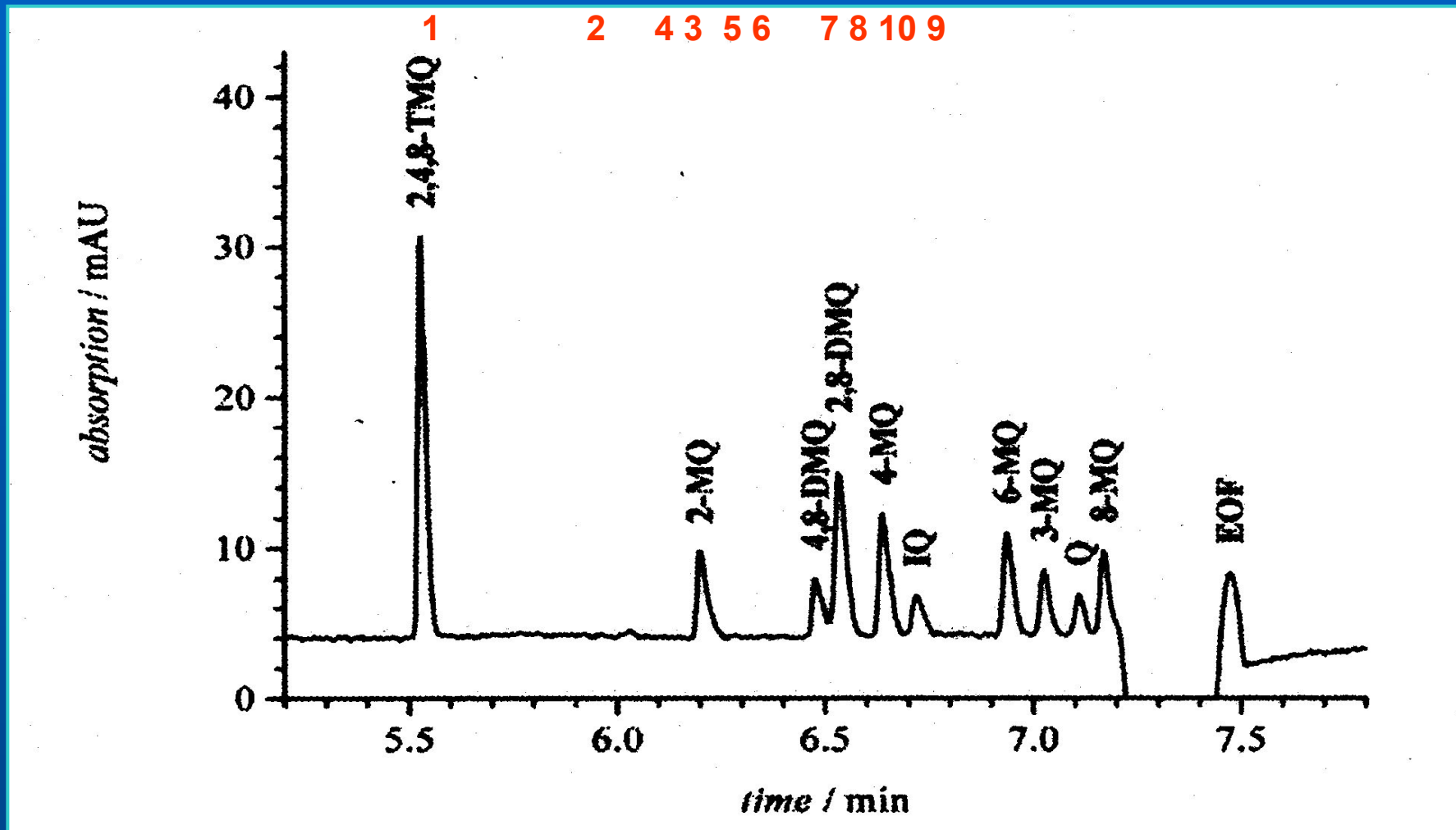
Некоторые метилхинолины
присутствуют в
биологических объектах
(выделения скунса)

Разделение смеси хинолинов методом КЗЭ



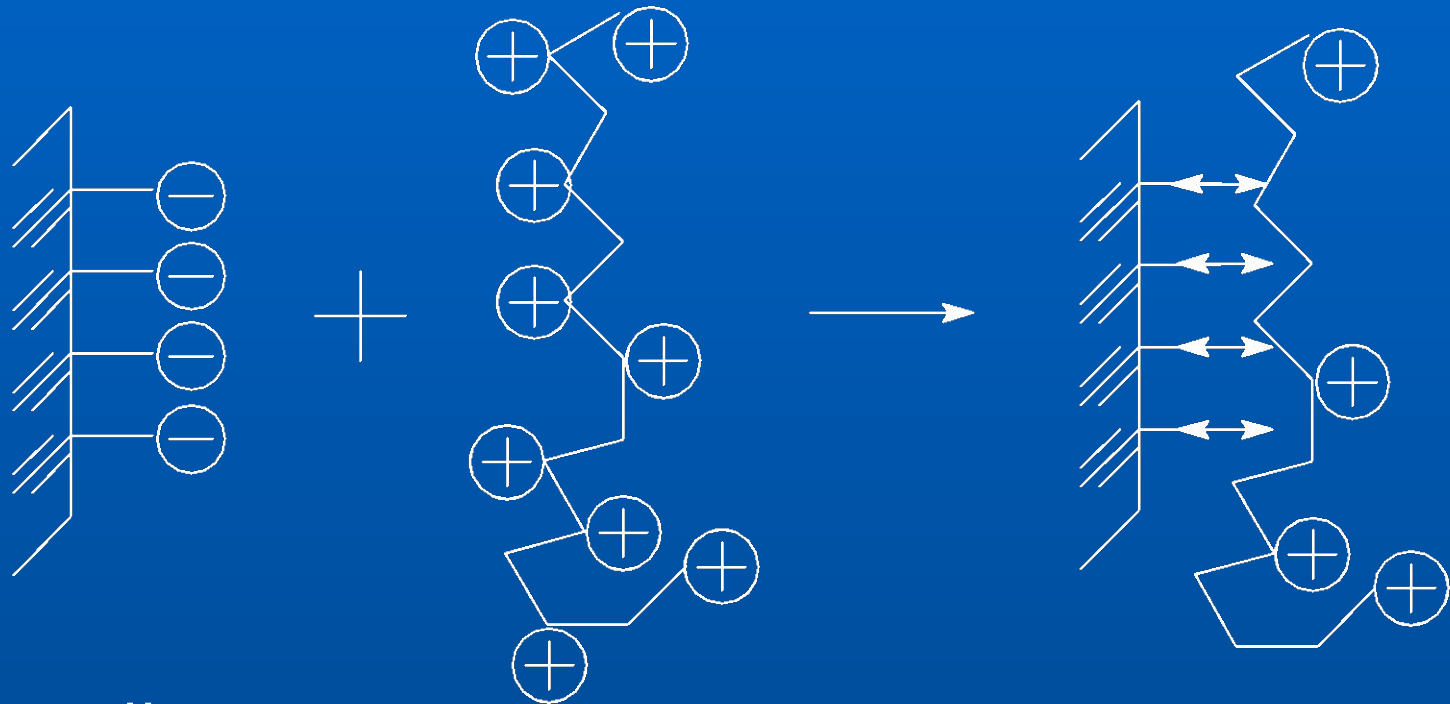
Электролит: Ацетат натрия/уксусная кислота, pH 5.5

Разделение смеси хинолинов методом КЗЭ в неводной среде



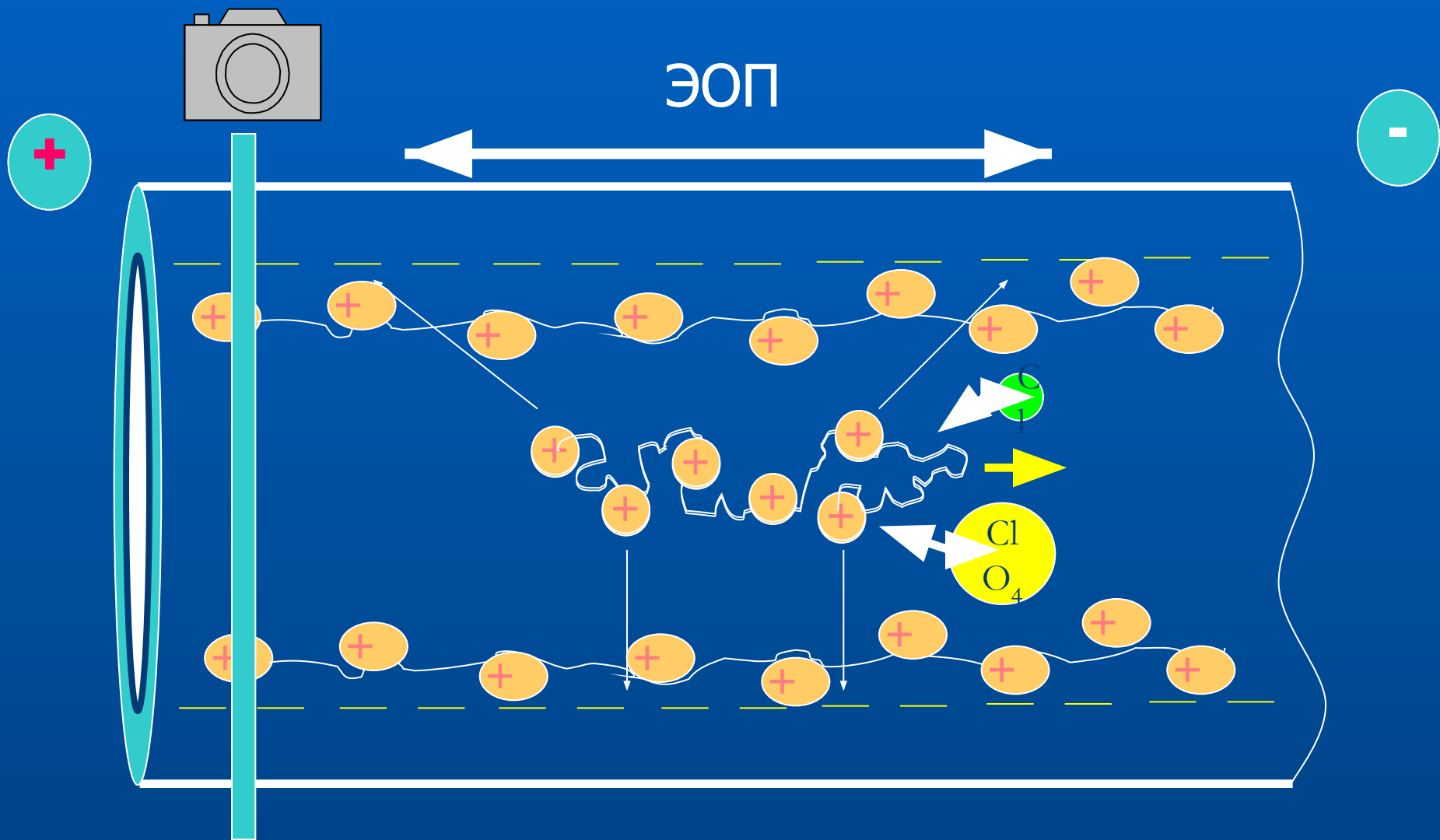
Электролит: 80 мМ уксусной кислоты в формамиде

Принцип образования полиэлектролитных комплексов

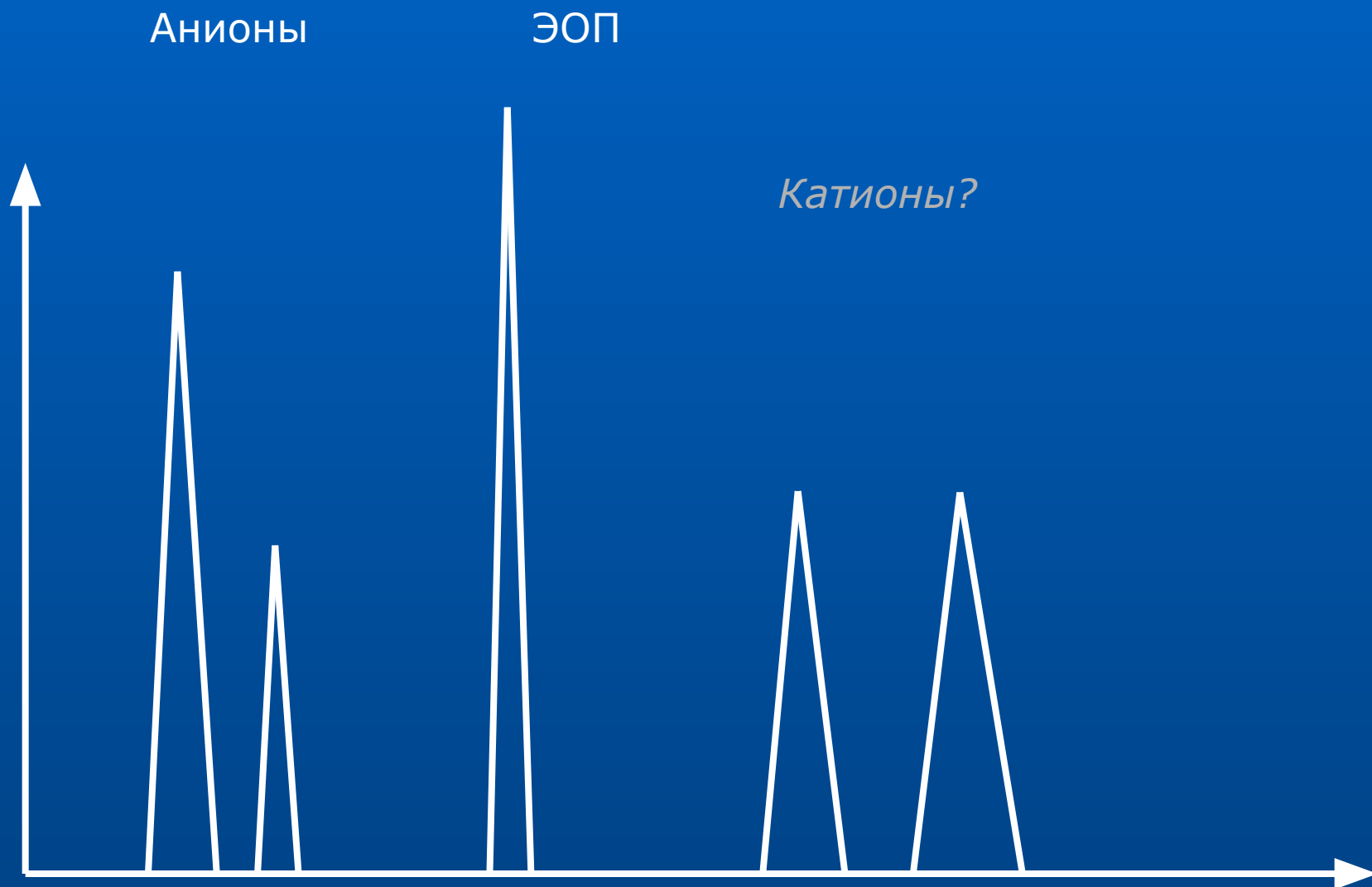


- Простой синтез
- Высокая стабильность покрытия ($K = 10^{100-200}$)
- Различные структуры полимеров-модификаторов
- Конформационные эффекты
- Варьирование молекулярной массы полимеров

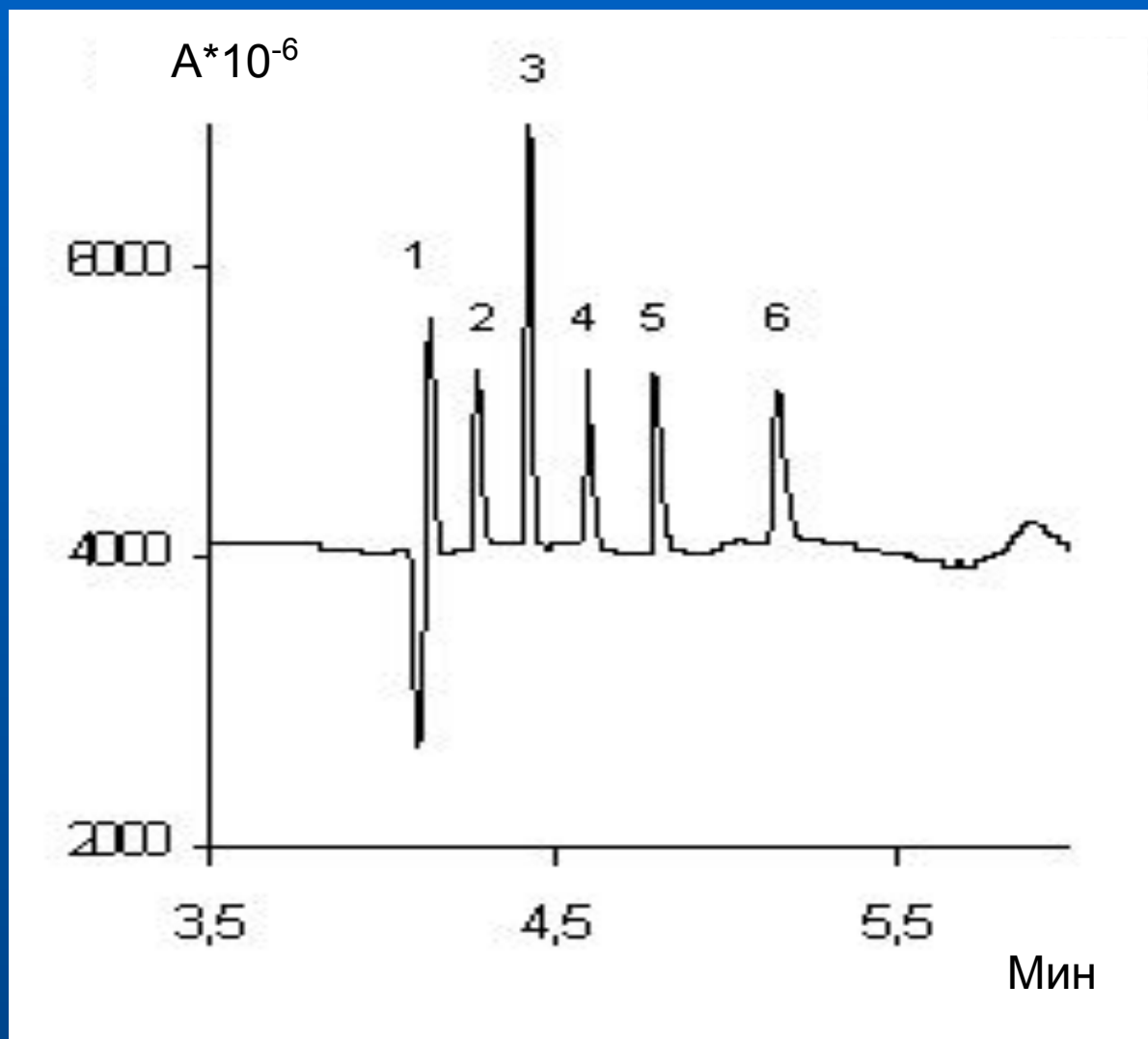
Схема удерживания анионов в модифицированных капиллярах



Порядок миграции ионов в модифицированных кварцевых капиллярах



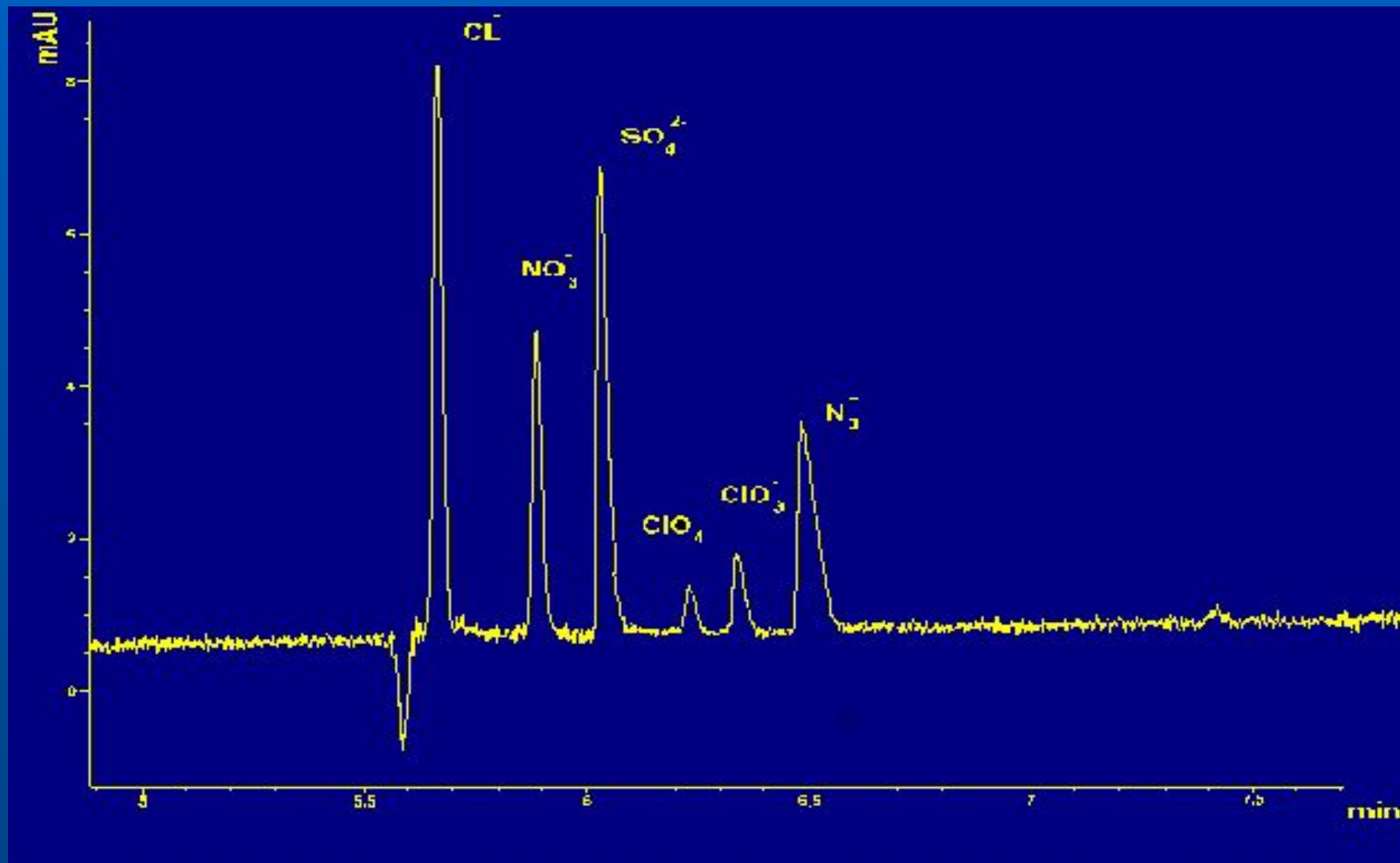
Определение анионов в варианте КЗЭ с обращенным электроосмотическим потоком



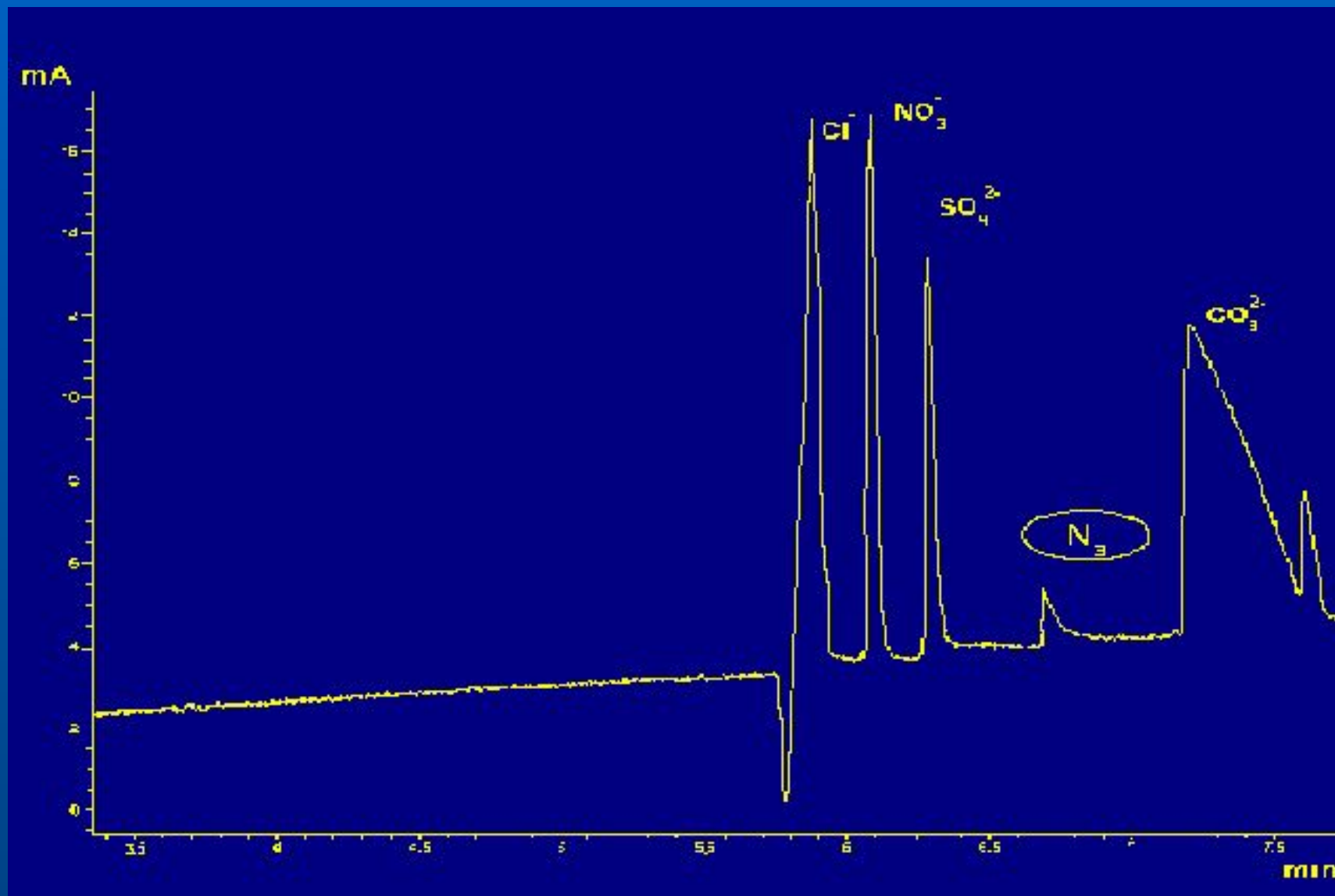
1-хлорид, 2-нитрит, 3-сульфат, 4-перхлорат, 5-молибдат, 6-формиат

Определение инициаторов взрывчатых веществ

Модификатор: 2,4-ионен



Определение азида в пробе с места взрыва



Анализ лекарственных композиций

Церебролизин ® Высокое качество

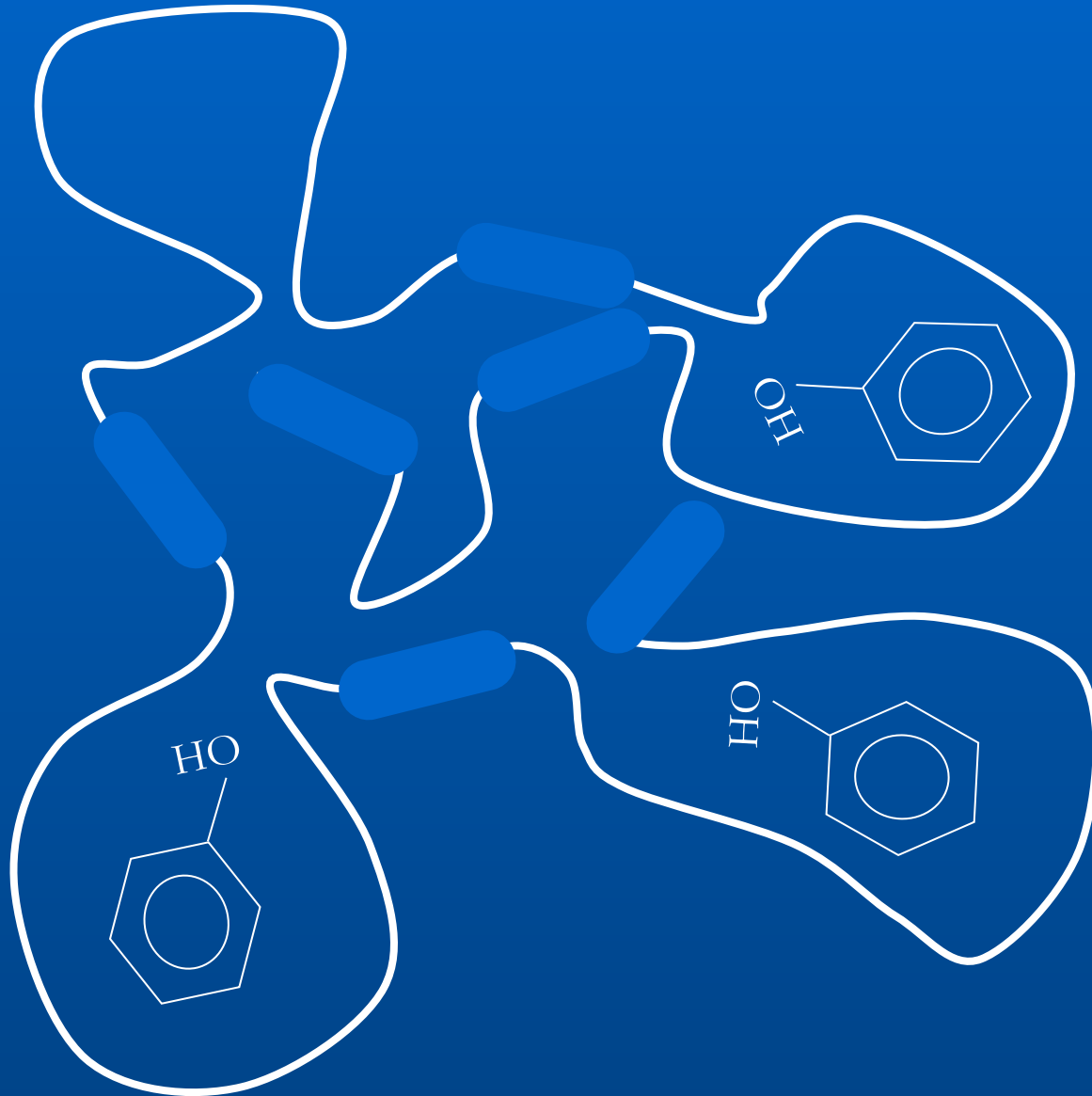
Аминокислоты
Витамины
Ароматические консерванты
ПАВ
Гетероциклы
Гормоны
другие вещества

Церебролизат ® ? качество

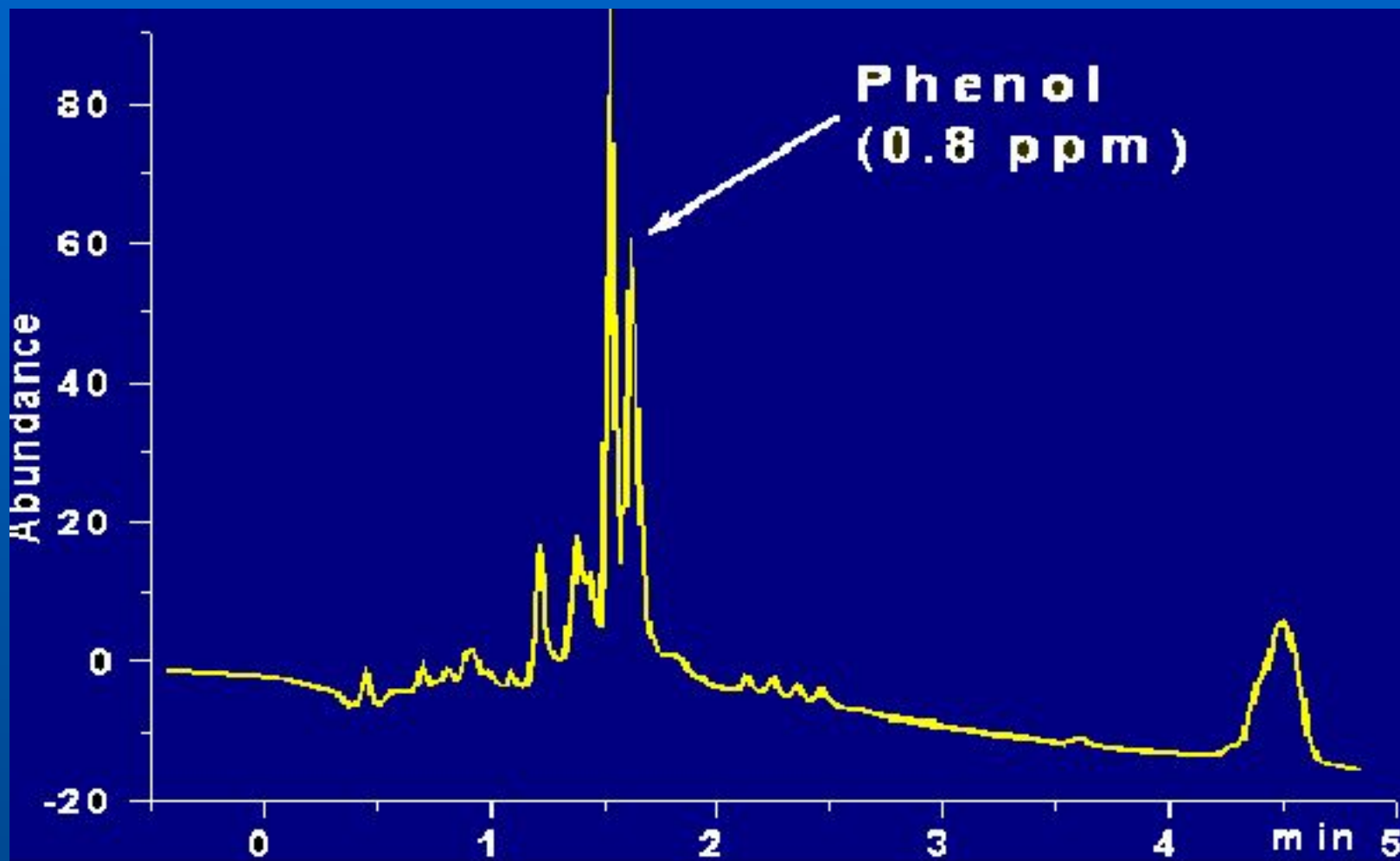


Фенол ?

Структура 2,10-ионена



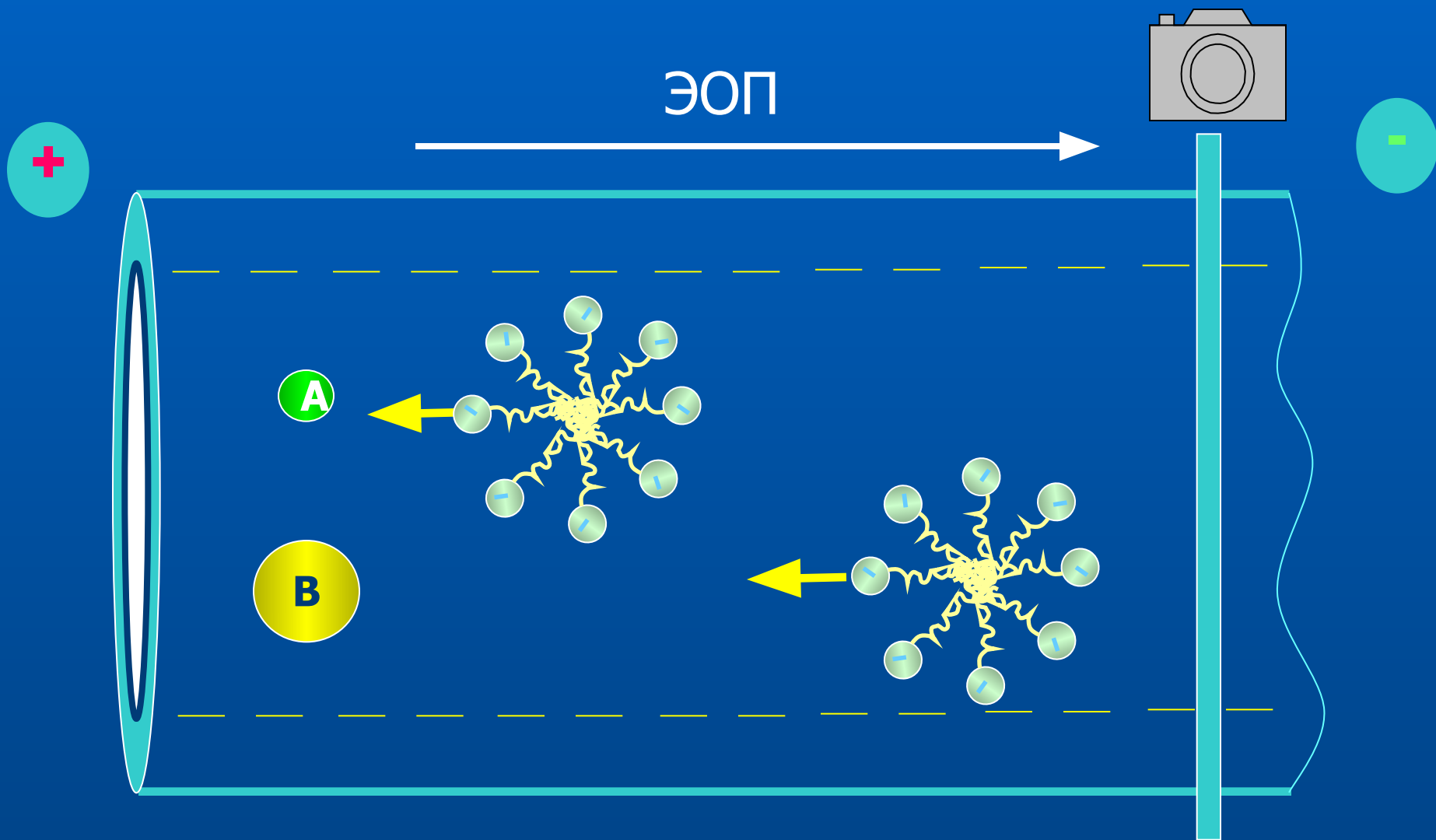
Запрещенная добавка в лекарство



Buffer: 10 mM NaH₂PO₄ + 0.05% 2,10-ionene, pH 9.9
Capillary: 35.5 cm(eff) * 50 μm I.D. Voltage -20 kV.
Detection: 214 nm

Мицеллярная
электрокинетическая
хроматография

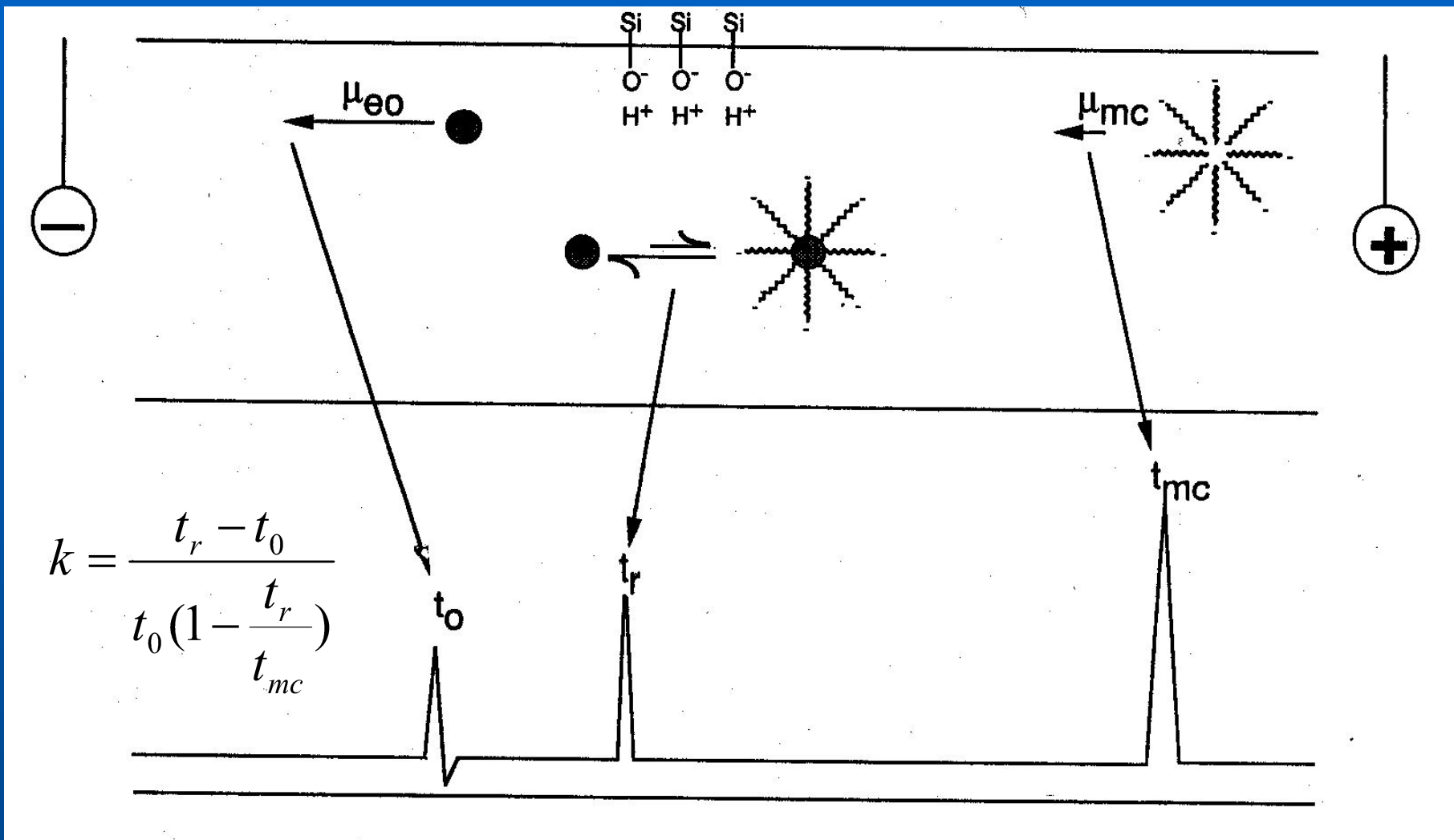
Мицеллярная электрокинетическая хроматография



Механизм разделения в мицеллярной электрокинетической хроматографии

- Два механизма разделения
 - Электрофоретическая подвижность в свободном растворе электролита
 - Распределение между анализом и мицеллами
- Мицеллы
 - Образуются в растворах при концентрации ПАВ выше ККМ
 - Имеют заряженную поверхность и гидрофобное ядро
 - Додецилсульфат натрия (SDS) наиболее распространен (ККМ \sim 15 мМ).

Порядок миграции веществ в МЕКС



Окно миграции

Факторы, влияющие на селективность в МЕКС

■ Природа ПАВ

- Длина гидрофобного «хвоста» и природа гидрофильных ионогенных групп
- Различное агрегатное число ($SDS = 16$)
- Желчные кислоты
- Катионные ПАВ обращают направление ЭОП
- pK ионогенных групп

■ Буферный электролит

- Добавки органических растворителей имеют большее влияние, чем в КЗЭ.
- Большое кол-во орг. растворителей разрушает мицеллы
- pH и pK аналитов

■ Температура

- Сильное влияние на устойчивость и поведение мицелл
- Необходимо тщательное термостатирование ($\pm 2^\circ C$ критично)

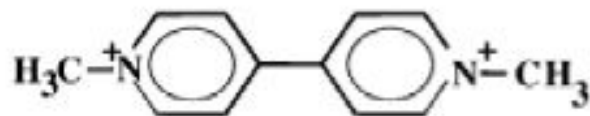
Хорошие начальные условия для МЭКС:

Капилляр: 50 мкм внутренний диаметр, 60 см длина

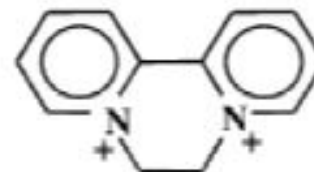
Электролит: 20 мМ боратный буферный раствор с рН 9,
содержащий 50...100 мМ
додецилсульфата натрия (SDS)

Напряжение: + 20 kV

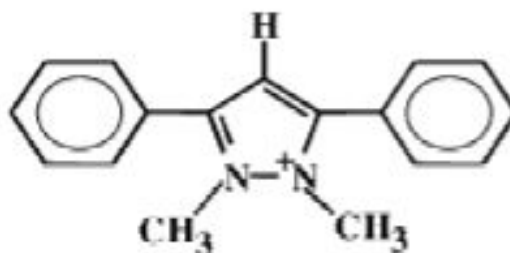
Структурные формулы ариламмониевых гербицидов



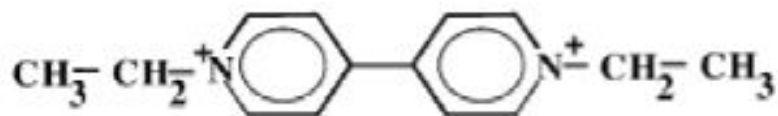
Paraquat



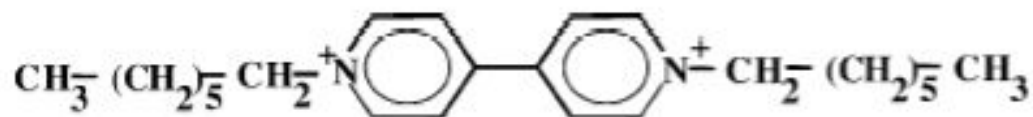
Diquat



Difenzoquat



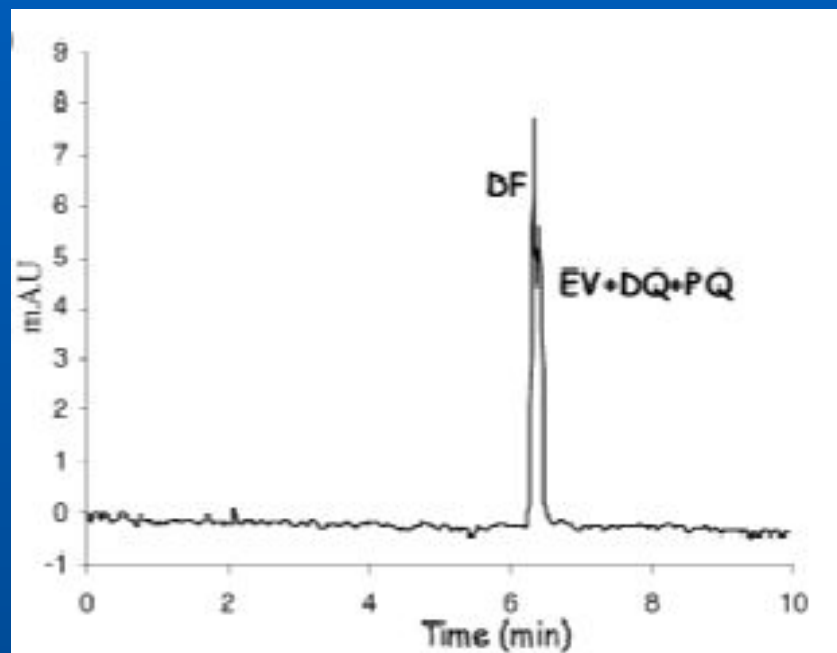
Ethylviologen



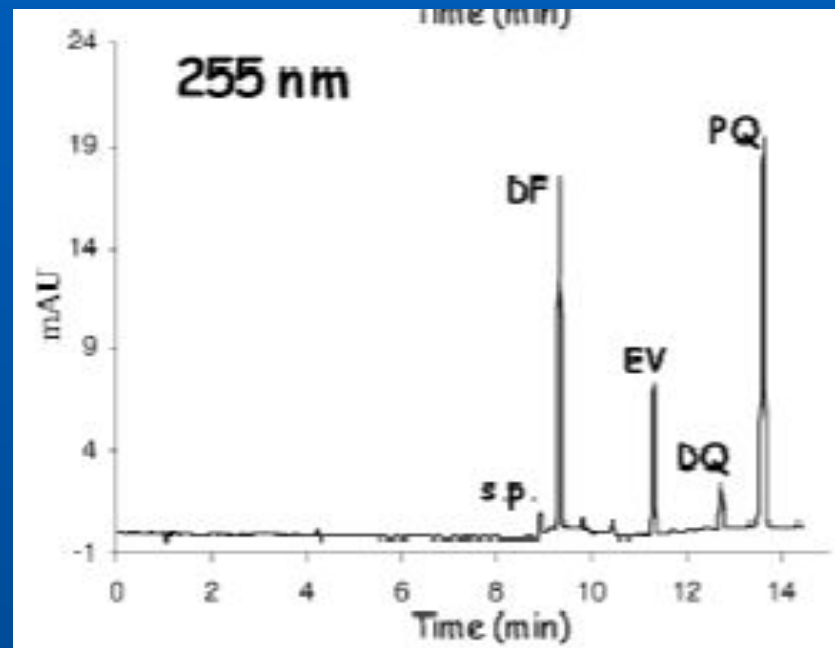
Heptylviologen

Разделение гербицидов в варианте:

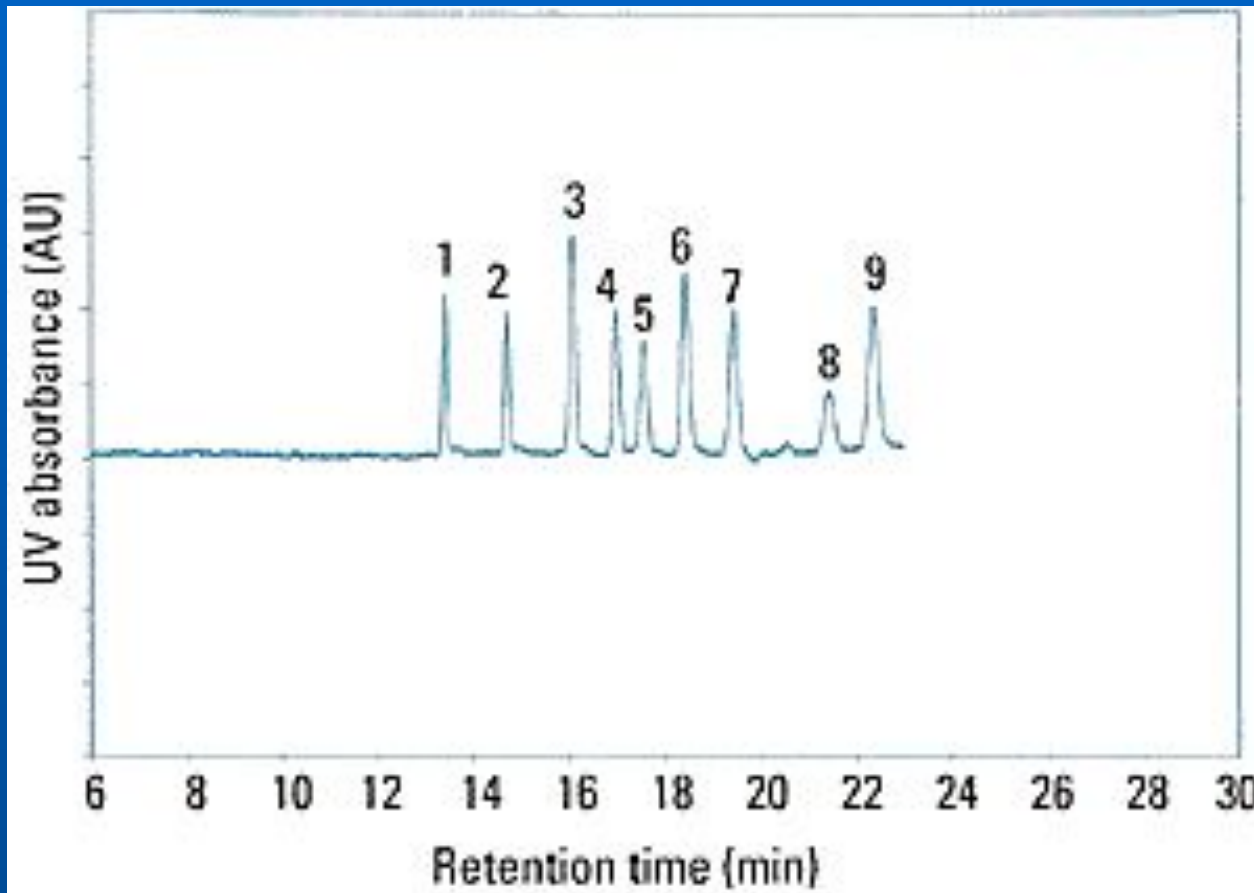
КЗЭ



МЭКХ



Разделение ПАУ в варианте МЕКС



Separation of nine PAHs in methanol:water (75:25 v/v).

Electrolyte is 10 mM H₃PO₄ with 70 mM sodium *n*-tetradecyl sulfate.

1, benzo[a]perylene; 2, perylene; 3, benzo[a]anthracene; 4, pyrene;
5, 9-methylanthracene; 6, anthracene; 7, fluorene; 8, naphthalene; 9, benzophenone.

Разделение смеси хинолинов методом МЭКС с Brij-35 в качестве мицеллообразователя

6 2 5 1 3 4 10 7 8

9

Brij35-МЕКС
pH 4.5

Электролит: 10 мМ Brij-35, ацетат натрия, уксусная кислота, pH 4.5

Разделение смеси хинолинов методом МЭКС с SDS в качестве мицеллообразователя

10 6 2 58 97 3 4 1

SDS-МЭКС
pH 9.0

Электролит: 50 мМ SDS, 25 мМ NaOH, борная кислота, pH 9.0

Строение водорастворимого полиэлектролитного комплекса

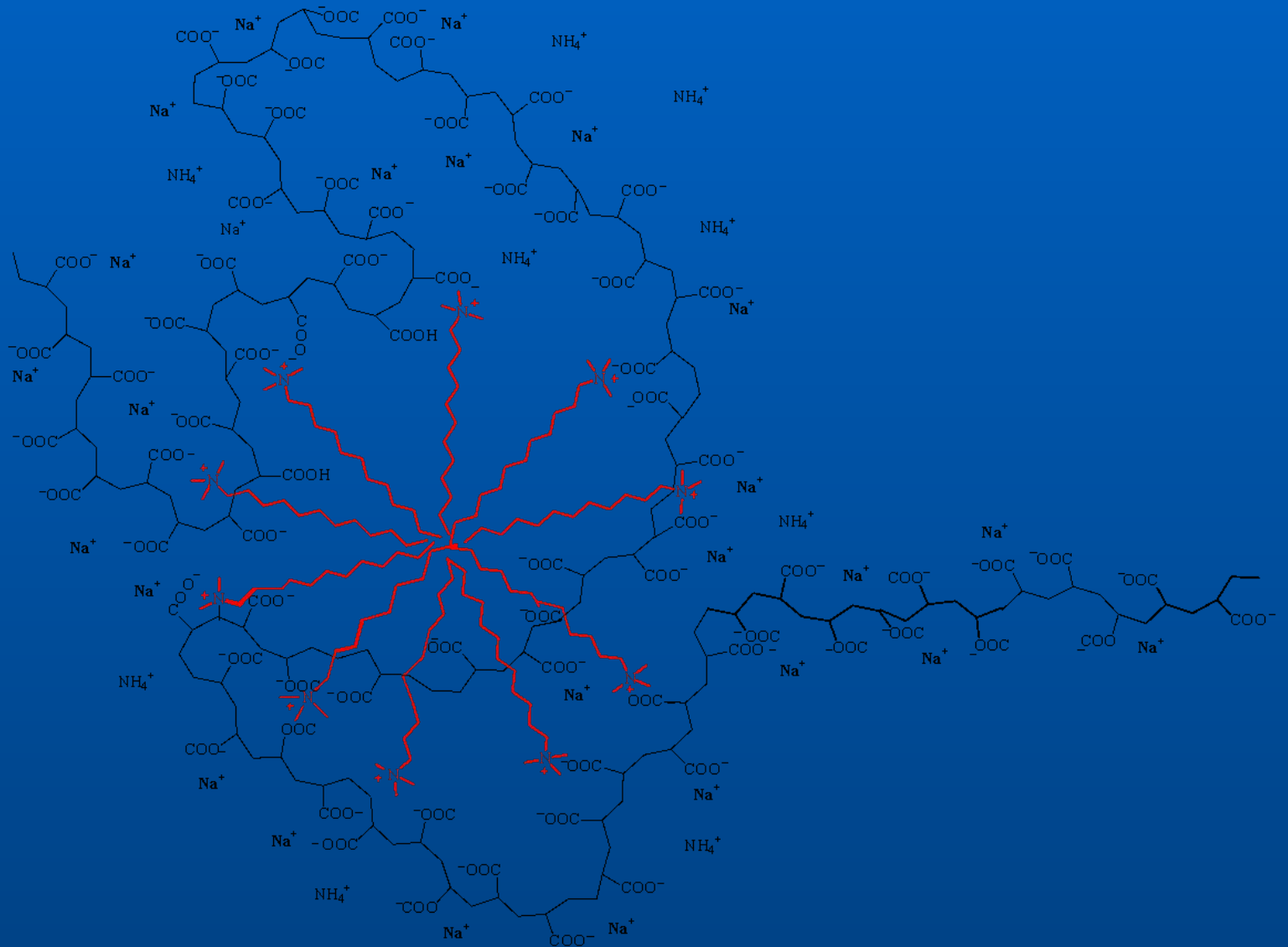
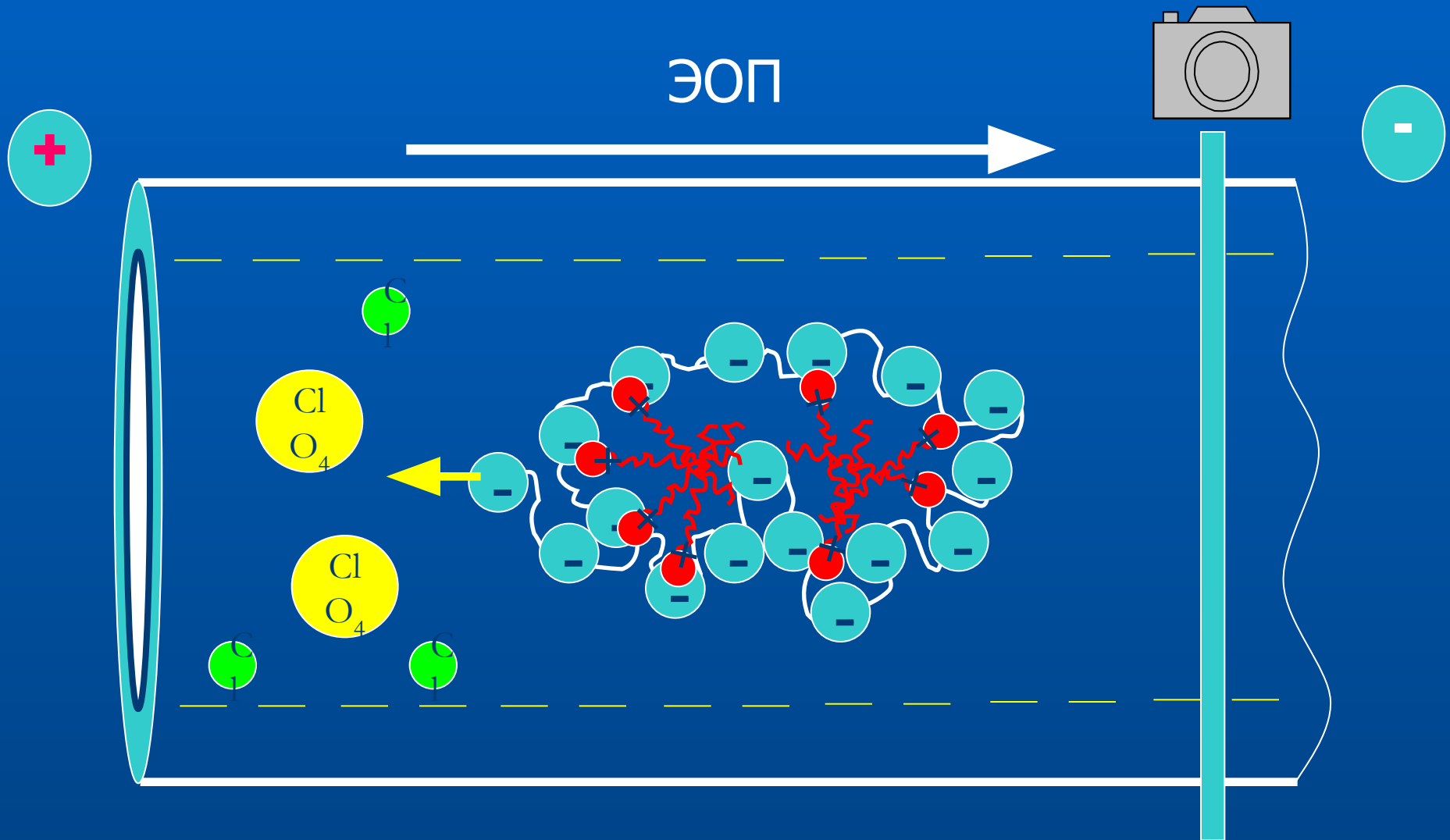
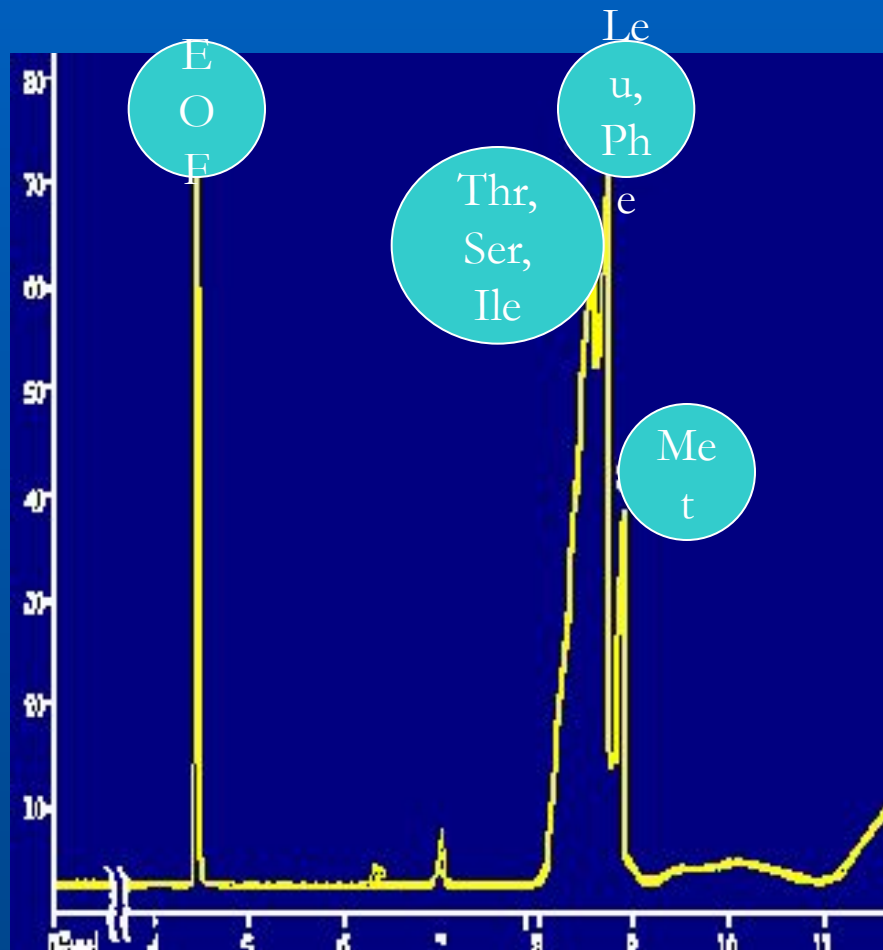


Схема удерживания анионов в МЭКС

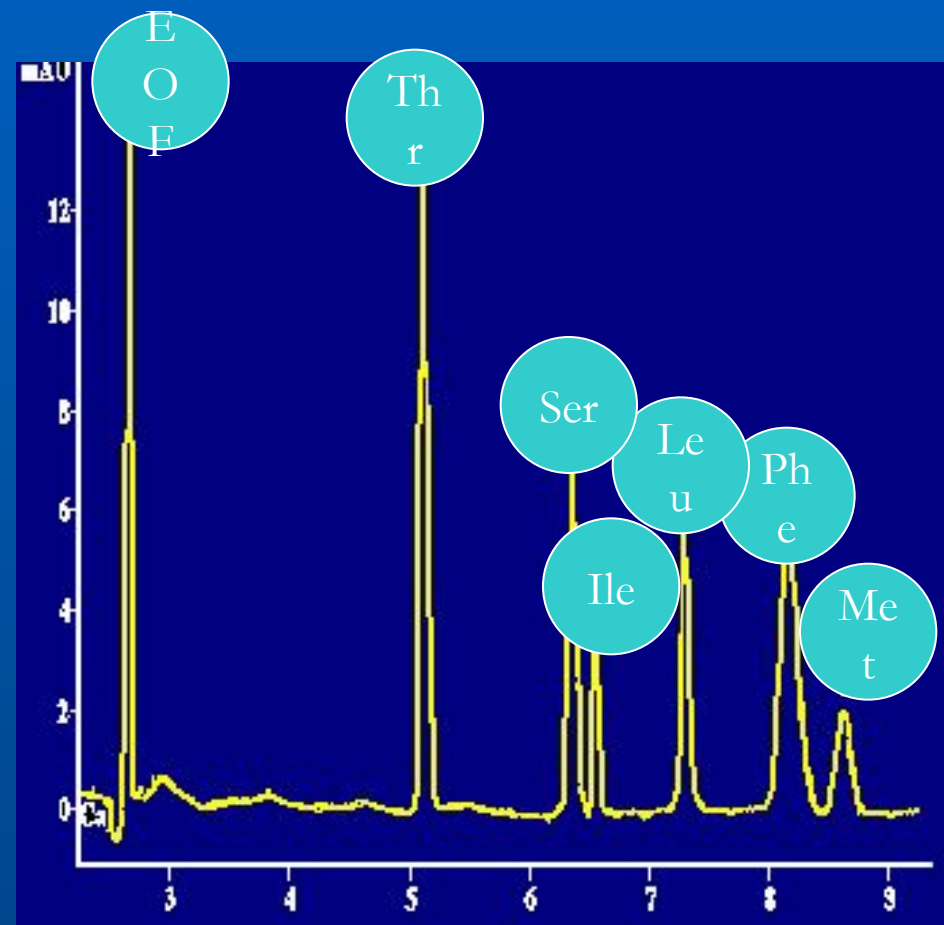


Определение DNS-производных аминокислот

60 mM of PAA



60 mM of PAA / C₁₂ ($\phi=0.3$)



Buffer: 10 mM NaH₂PO₄, pH 5.8.

Capillary: 50 cm (43 cm) * 100 μ m I.D. Voltage 15 kV. Detection: 214 nm.

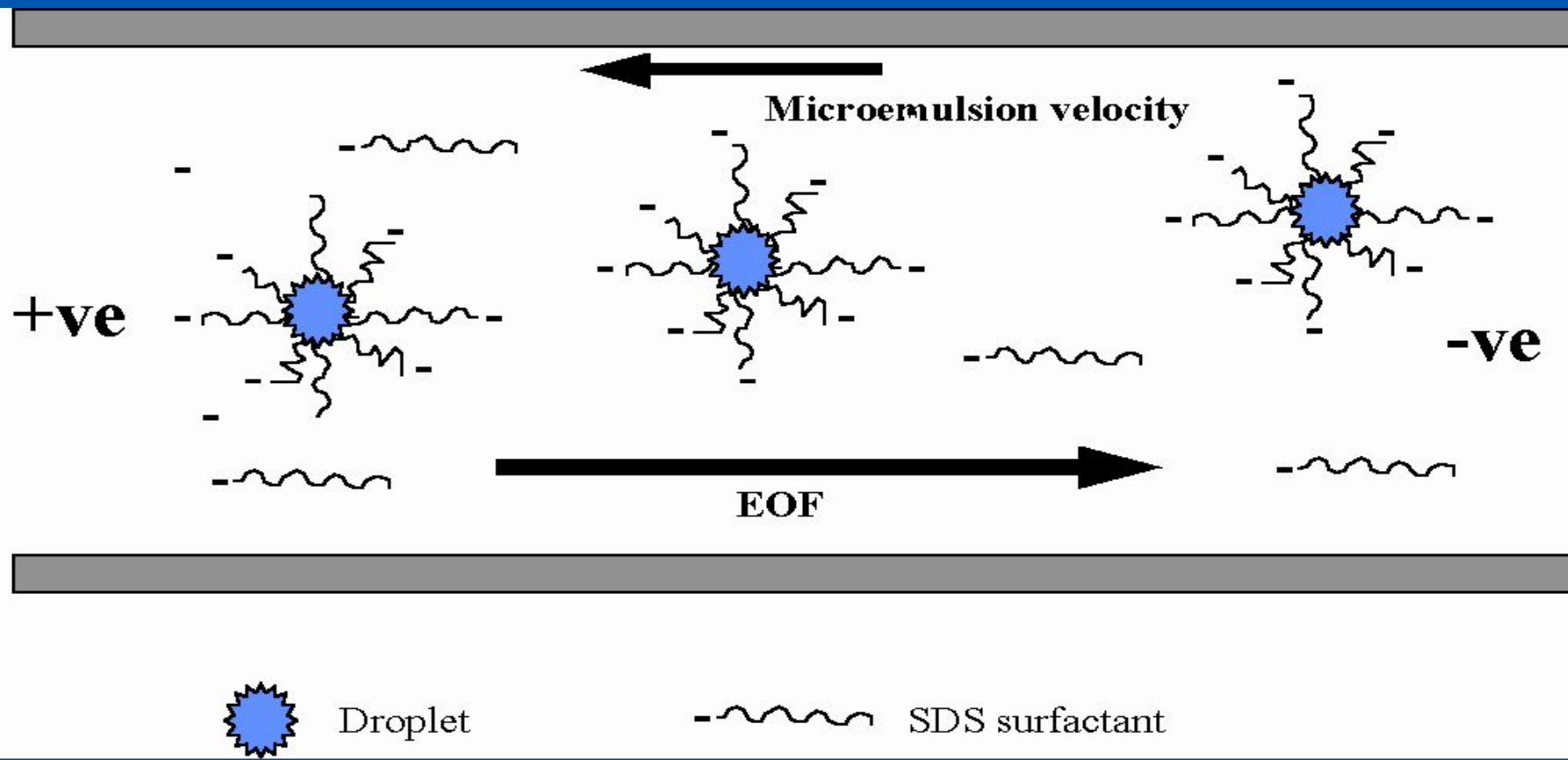
Микроэмульсионная
электрокинетическая
хроматография

Принципы метода МЭЭКС

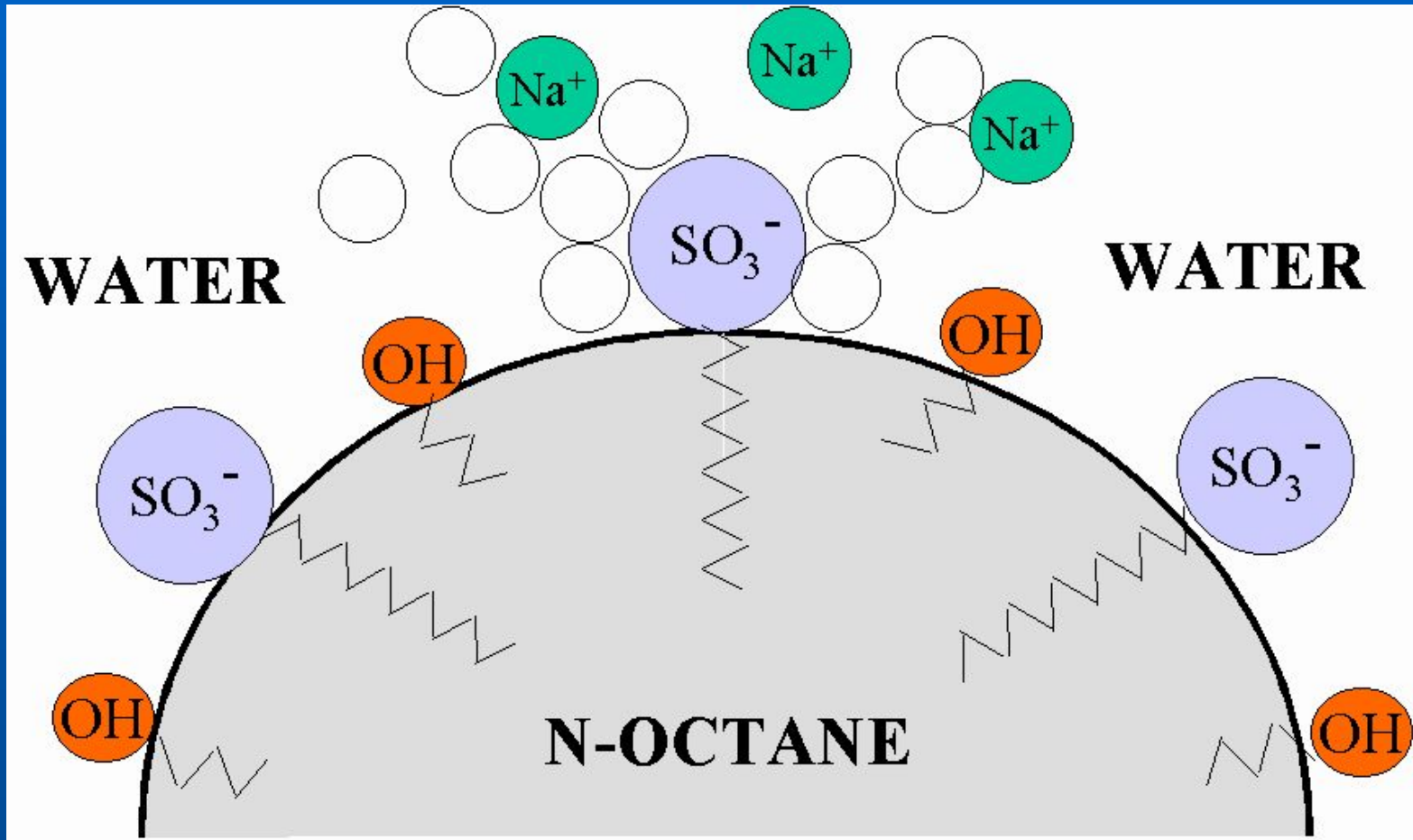
В капилляре создается устойчивая микроэмульсия несмешивающейся в водой жидкости (масло).

Вещества разделяются в соответствии с коэффициентами распределения в системе масло-вода.

Если они заряжены и не распределяются в масло, то двигаются в соответствии с их ионными подвижностями.



Эмульсия масло-вода



Необходимы: масло, раствор электролита в воде,
ионогенное ПАВ, неионогенное ПАВ

Хорошие начальные условия для МЭЭКС:

Капилляр: 50 мкм внутренний диаметр, 60 см длина

Электролит: 0.81 г октана,
6.61 г н-бутанола,
3.31 г SDS,
89.27 г тетрабората натрия (ультразвук)

Напряжение: + 20 kV

Разделение смеси хинолинов методом МЭЭКС с Brij-35 в качестве ПАВ

6 2 5 1 3+4 7 10 8 9

Brij35-МЭЭКС
pH 4

Электролит: 50 мМ ацетата натрия, pH 4.0 (уксус), гептан, Brij-35,
н-бутанол

Разделение смеси хинолинов методом МЭЭКС с SDS в качестве ПАВ

10 6 2 58 79 43 1

SDS-МЭЭКС
pH 9.4

Электролит: 50 мМ борная кислота, pH 9.4 (NaOH), гептан, SDS, н-бутанол

Капиллярный гель-электрофорез

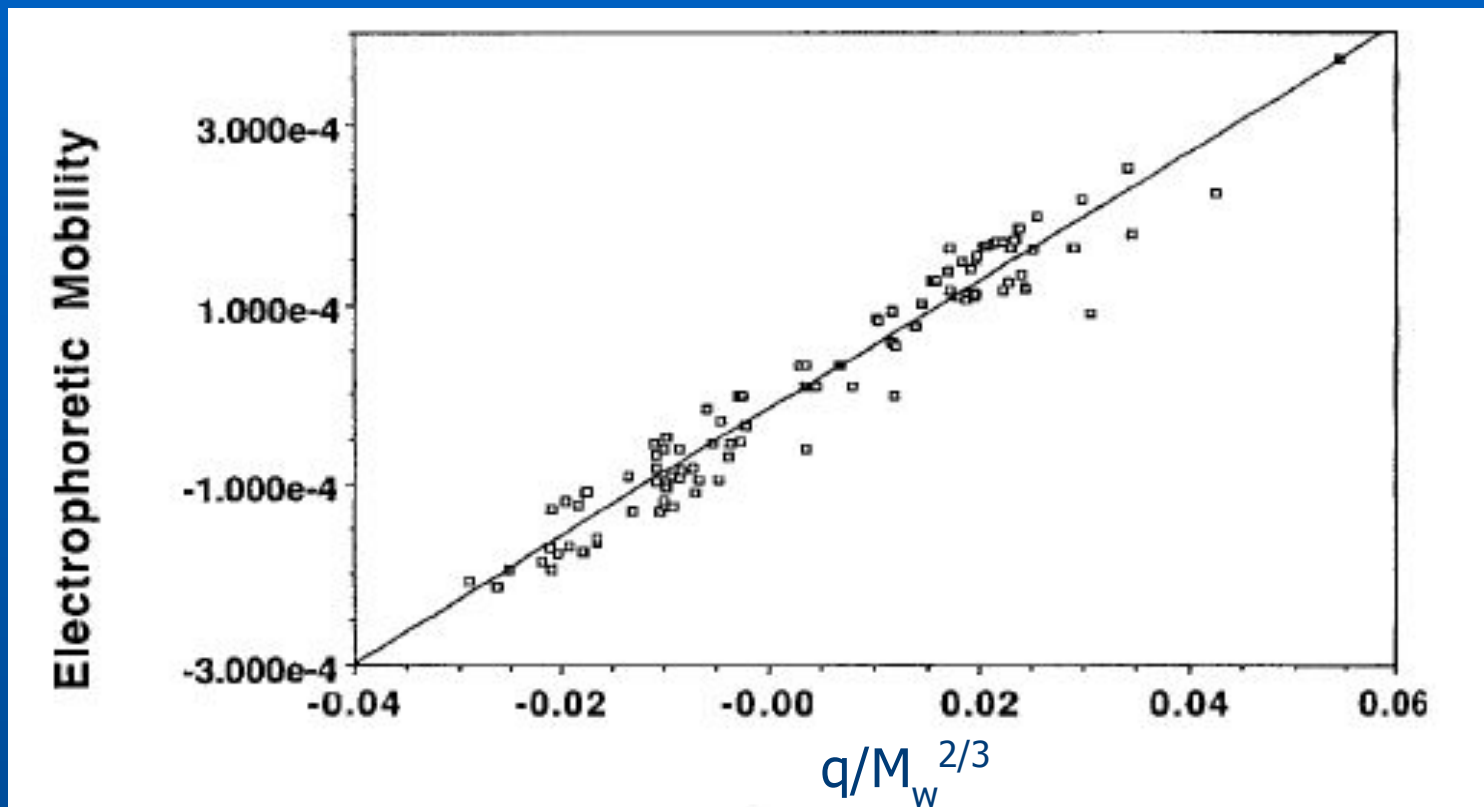
Особенности CGE

- Разделение основано на эксклюзии
- ЭОП подавлен или изменен
- Капилляры заполнены полимером
 - Линейный полиакриламид
 - Сшитые полимеры (3-х мерная структура)
 - Смеси полимеров
- Целесообразен для больших молекул с подобными соотношениями m/z
 - ДНК
 - Белки

Механизм CGE

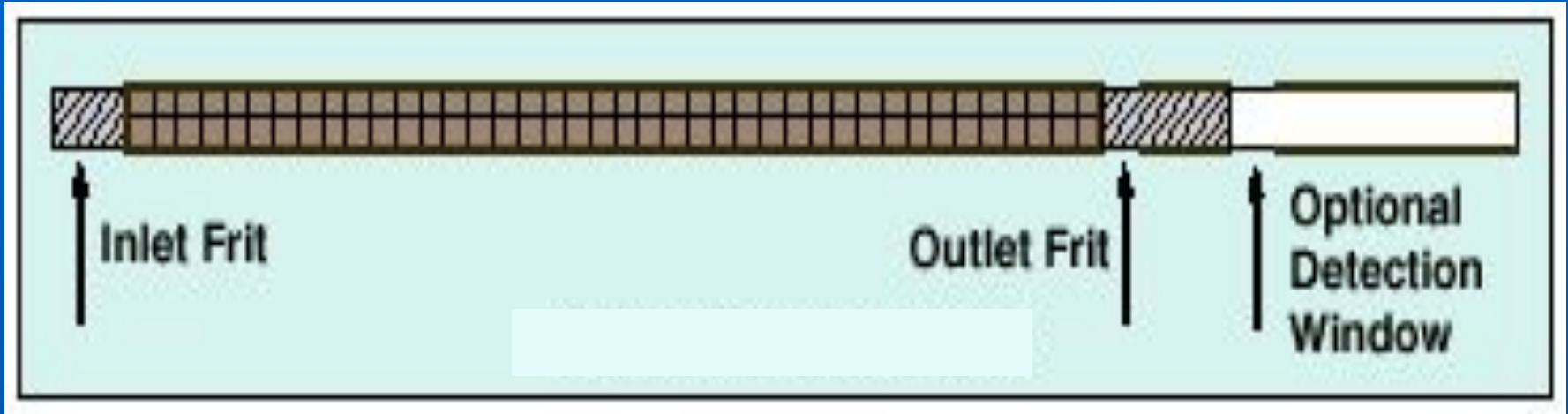
- Разделяемые вещества движутся по капилляру в зависимости от собственной подвижности и способности проникать в гель.
 - Малые молекулы мигрируют первыми
 - Большие молекулы мигрируют последними
- pH буферного электролита
 - Необходимо ионизовать аналиты
 - Оставить поверхность капилляра незаряженной (нет ЭОП)

Разделение пептидов (с флуоресцентной меткой) методом CGE



Капиллярная электрохроматография в заполненных капиллярах

Принципы метода СЕС



- СЕС является гибридным методом
 - Комбинация КЗЭ и ВЭЖХ
 - Электрофоретическое движение подвижной фазы
 - Неподвижные фазы от ВЭЖХ
- Цели
 - Получить селективность от ВЭЖХ ($\alpha \neq 1$)
 - Получить эффективность от КЗЭ ($N \sim 500\ 000$)

Профили потоков в μ -ВЭЖХ и СЕС

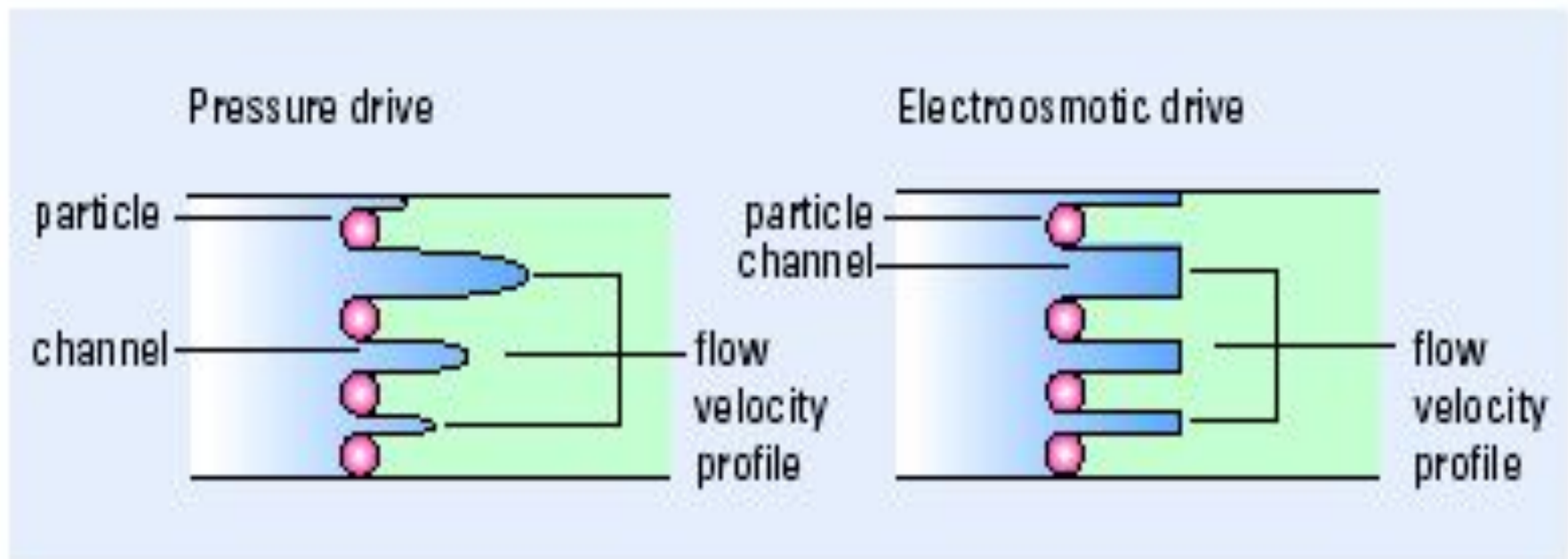


Figure 2.5: Depiction of the flow velocity profile in a packed bed in electro drive and pressure drive.

- Капилляры в СЕС могут быть:
 - Заполнены сферическим сорбентом
 - Монолитные

Теоретические предпосылки о преимуществах СЕС

- Плоский профиль потока подвижной фазы
- Размер частиц сорбента
 - Нет ограничений по давлению
 - Используют частицы размером < 1.5 мкм
 - Экспрессность анализа
 - Большая поверхность приводит к коротким колонкам
- Хорошо стыкуется с MS (можно использовать большие концентрации орг. растворителей для управления селективностью)

Теоретические предпосылки о преимуществах СЕС

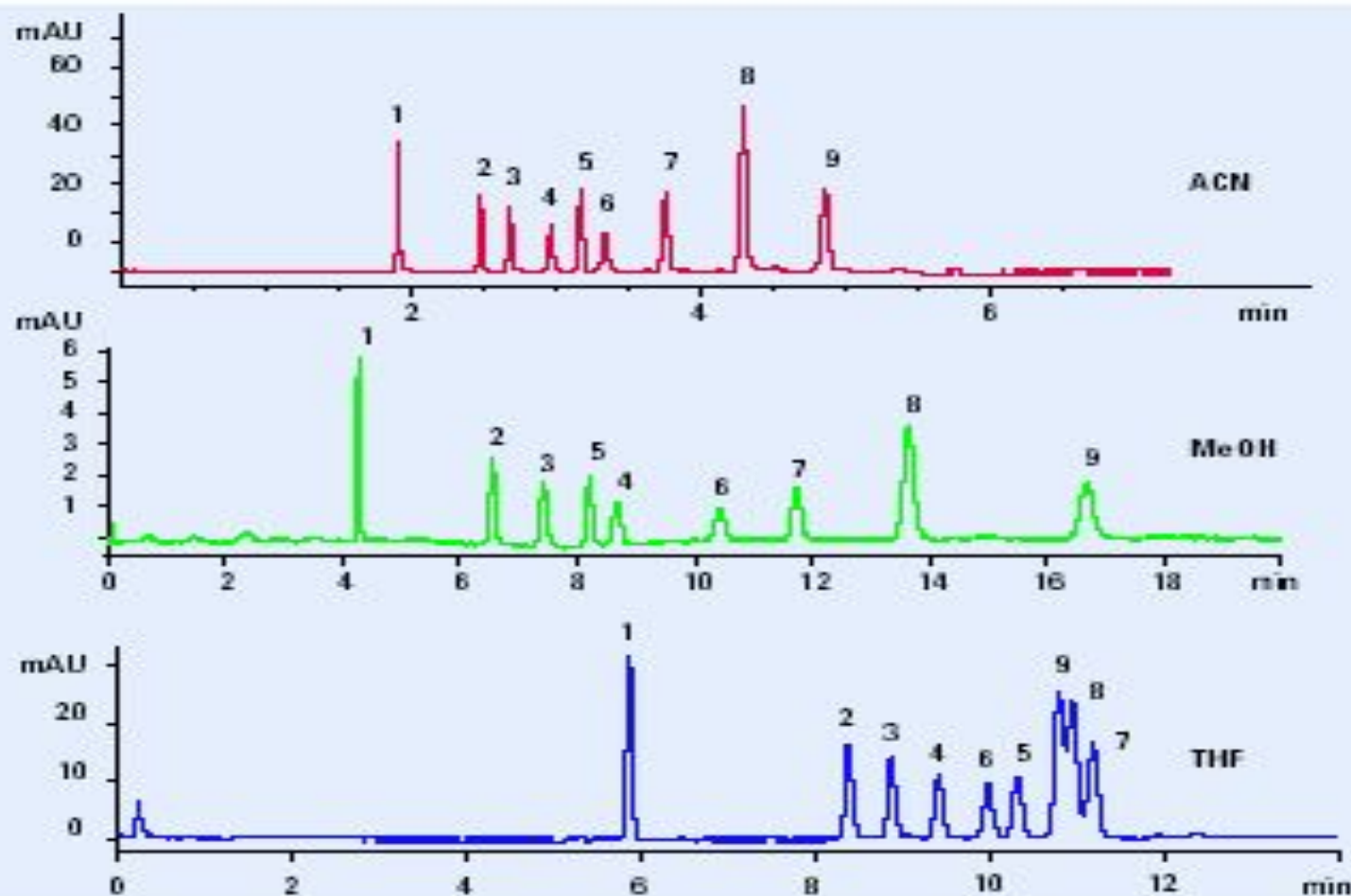
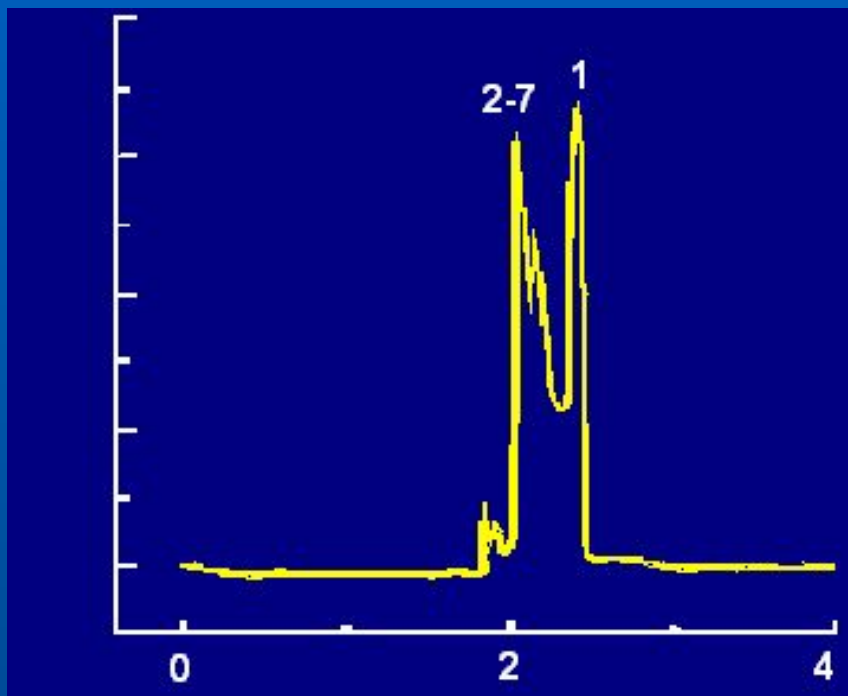


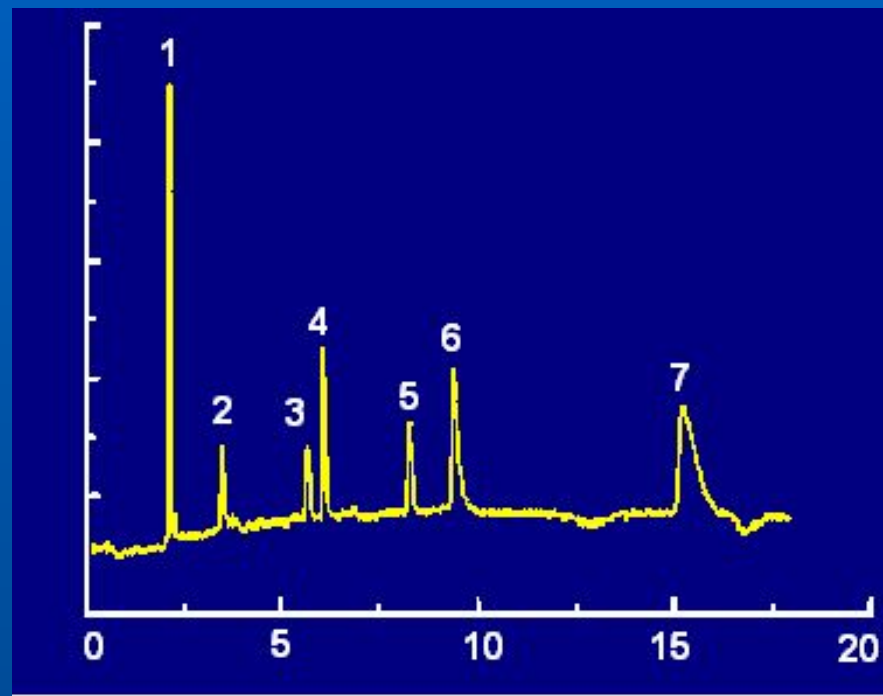
Figure 5.6: Separation of a neutral test mixture with various organic modifiers. Conditions: CEC Hypersil C8, 3 μm , 250(335) x 0.1 mm, 80/20 organic modifier/Tris.HCl, 50 mM, pH 8. 30 kV, 10 bar both sides, 20°C. Sample: 1 thiourea, 2 methylparabene, 3 ethylparabene, 4 propylparabene, 5 naphthalene, 6 butylparabene, 7 fluorene, 8 anthracene, 9 fluoranthene (with permission of J. Microcolumn Separations).

Электрофореграммы ароматических кислот в вариантах КЗЭ (А) и СЕС (Б)

(А)



(Б)



Mobile phase: 0.1% solution of 2,10-ionene (PO_4 -form) - 1 mM KH_2PO_4 - 10% acetonitrile, pH adjusted to 6.4 with TRIS.

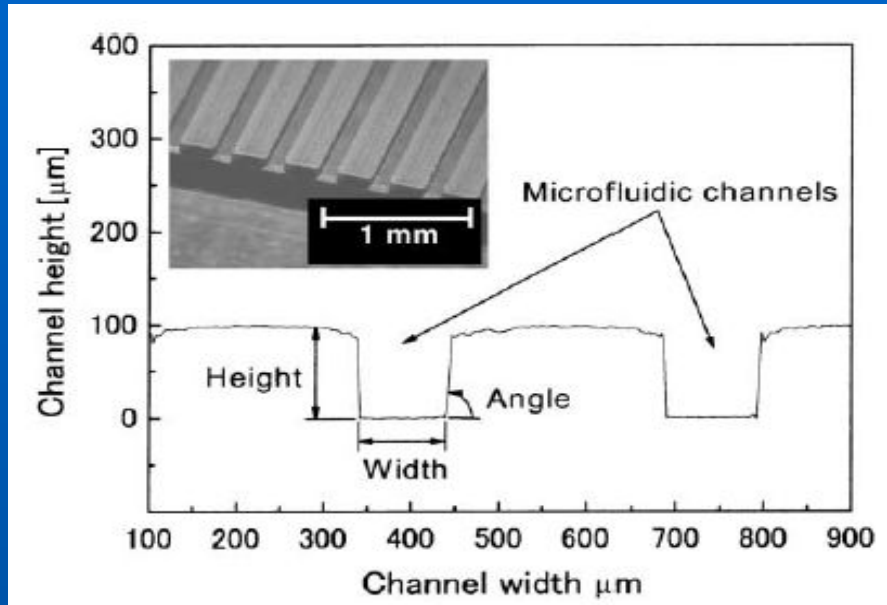
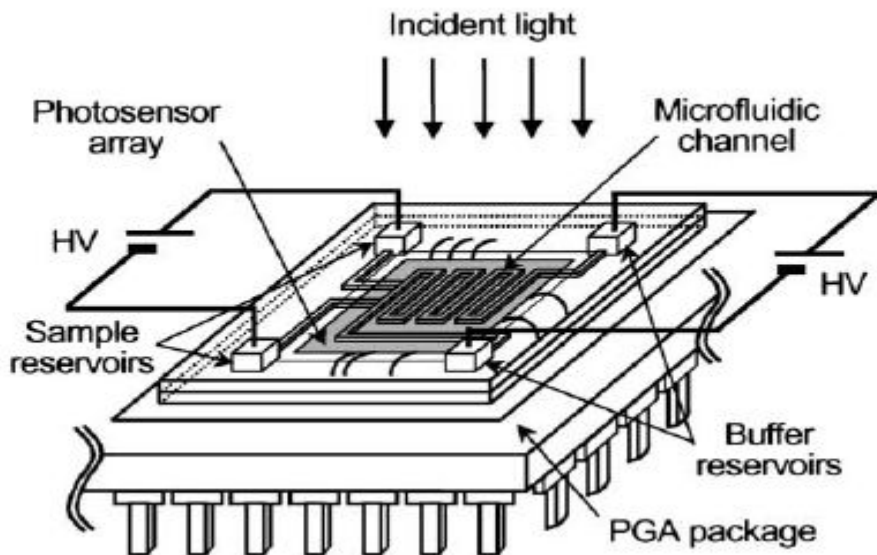
1 = EOF (Acetone), 2 = *p*-hydroxybenzoic acid, 3 = salicylic acid, 4 = benzoic acid, 5 = *o*-Br-benzoic acid, 6 = *p*-aminosalicylic acid, 7 = *p*-aminobenzoic acid.

Схема выбора метода электрофореза



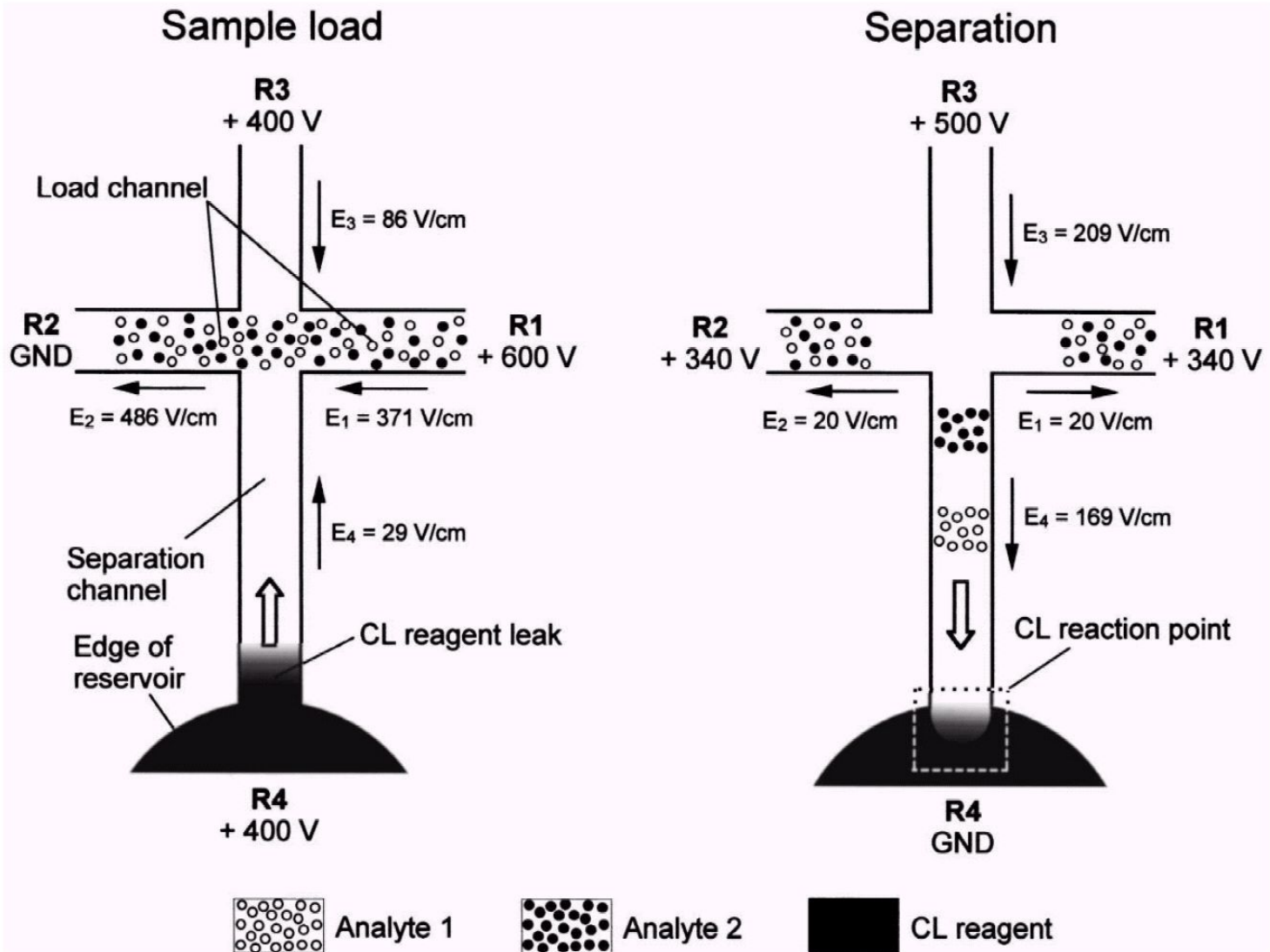
Электрофорез на микрочипе

Схема производства микрочипа

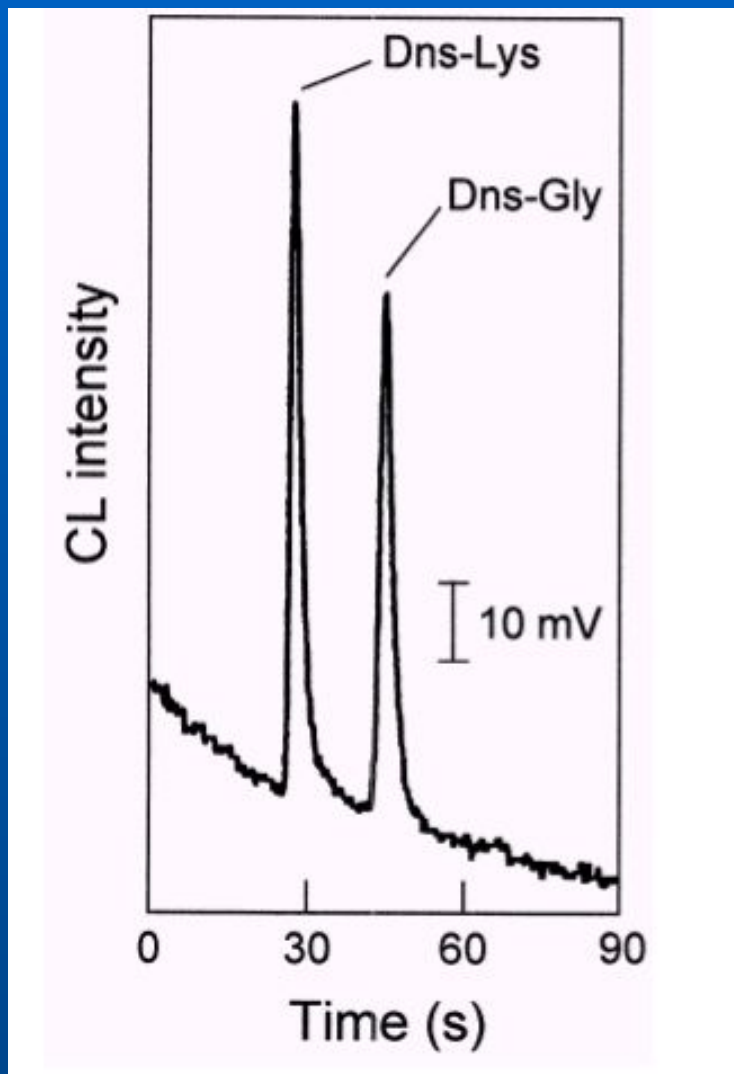


- **Стекло**
 - Первый использованный материал
 - Отработана технология травления
 - Хрупкость и отсутствие хим. инертности
- **Полимеры**
 - Менее дороги, гибки
 - Большие возможности варьирования состава
 - Сложности с контролем ЭОП
- **Кварц**
 - Отработана технология травления
 - Достаточно дорог
 - Плохо «сваривается» с полимерными материалами

Электрофорез на чипе



Типичная электрофореграмма



- Приложенное напряжение **400 В**
- Размеры капилляра **20x50 μm**
- Путь разделения **18-25 мм**
- Напряженность поля **$\sim 200 \text{ В/см}$**

Эффективность (ТТ)
На капилляр - 500-1000
На метр - 40 000

Типичная структура капилляра «песочные часы»



- Длина пути «до разделения» **9 μm**
- Напряженность поля **100 кВ/см**
- Скорость переноса **1.3 м/сек**
- Время анализа **20 μсек**
- Приложенное напряжение **20 кВ**

Устройство для оттягивания микропипеток

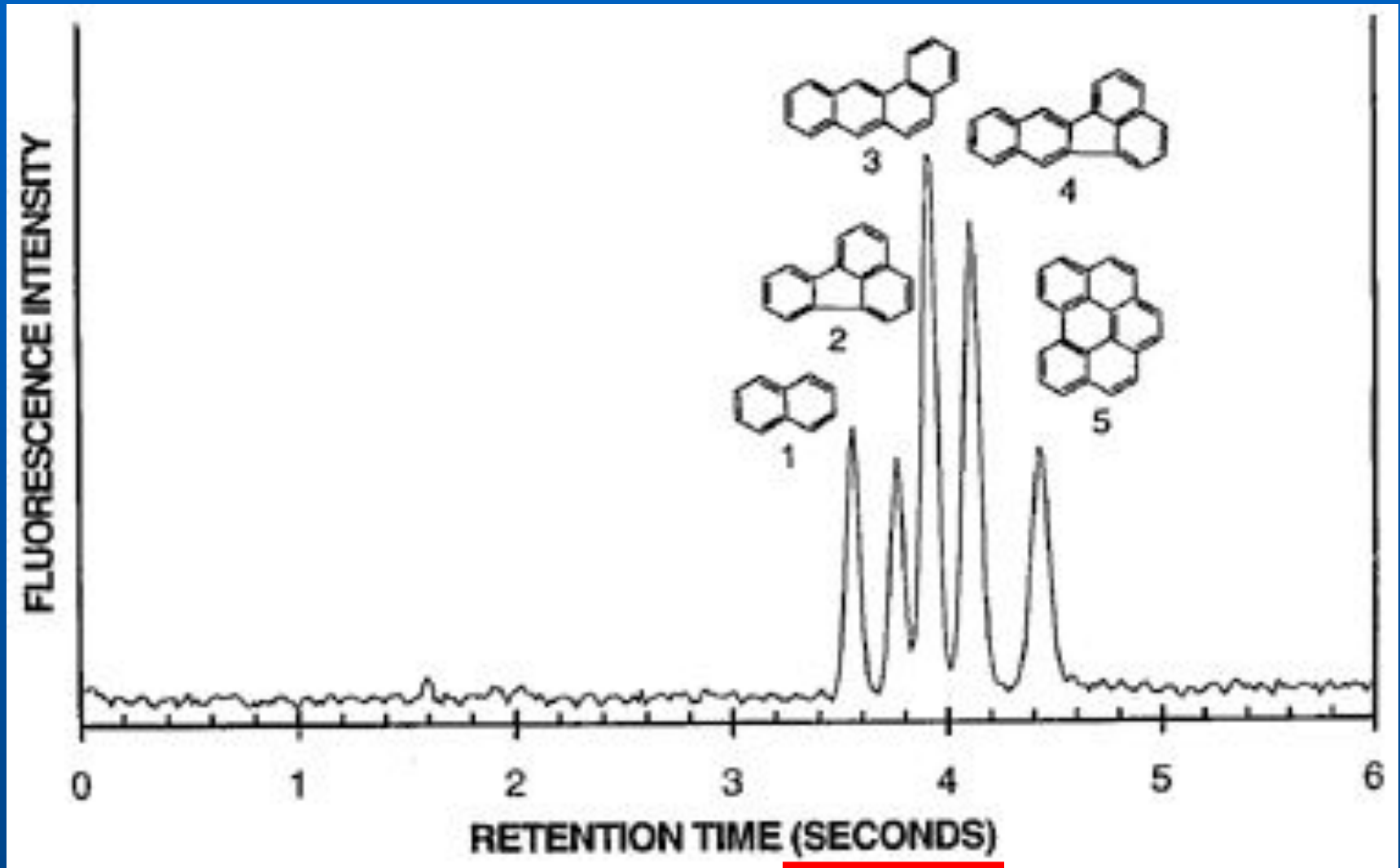


Контролируются

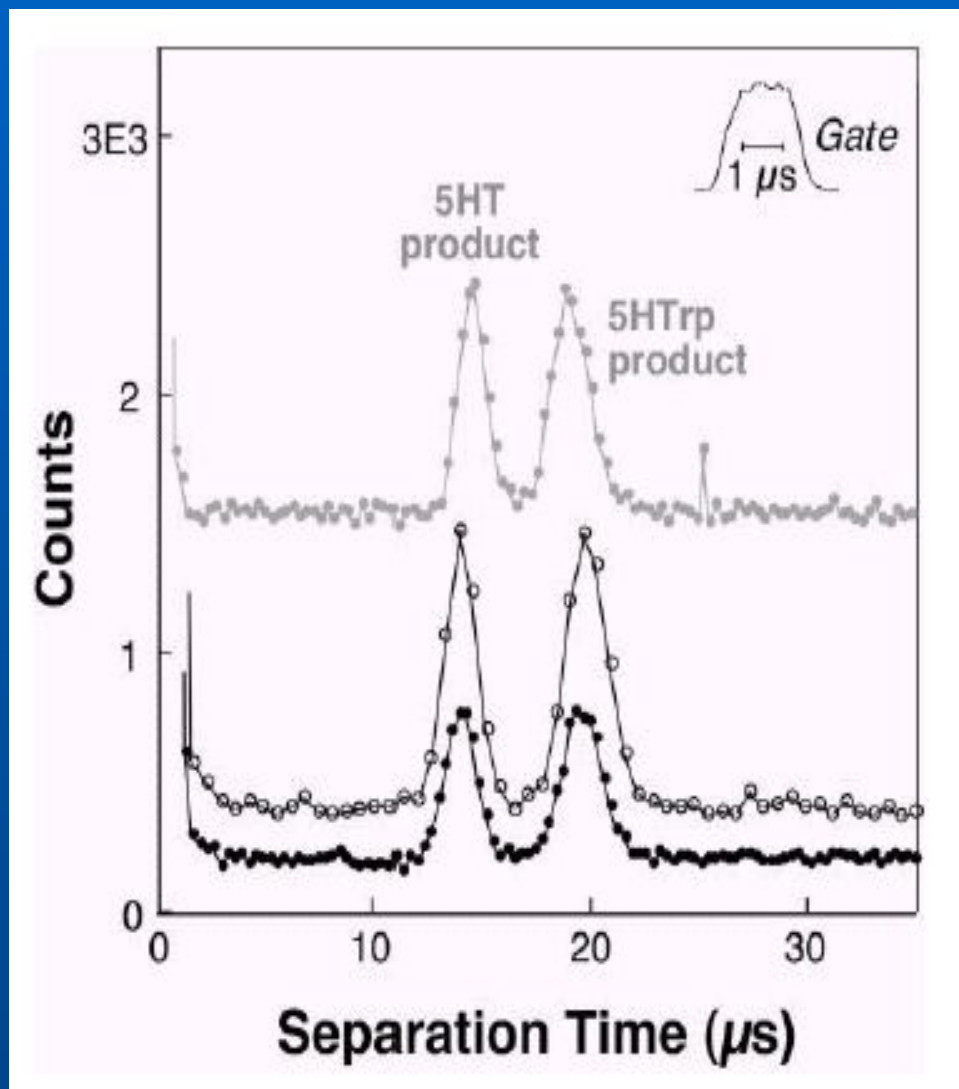
- Температура
- Скорость нагрева
- Зона нагрева
- Величина растягивания
- Получаемый диаметр (до 0.1 мкм)
- Подача газа
- Влажность

10 встроенных программ

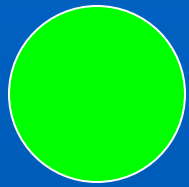
Основное преимущество микрочипового электрофореза - экспрессность



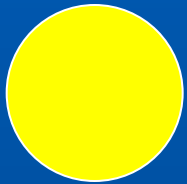
Микросекундное разделение



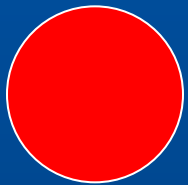
Эффективность (ТТ)
На капилляр - 120-150
На метр - 12 000 000



Уникальный метод контроля и анализа
чрезвычайно нестойких
и короткоживущих соединений (новизна)



Стоимость оборудования / цена чипа
Воспроизводимость
Материал чипа



Нет необходимости использовать
при анализе обычных веществ

Приборы для капиллярного электрофореза

Agilent 3D



Капель 103-105

