



Н.В. Комарова

Я.С. Каменцев

**ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
СИСТЕМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
«КАПЕЛЬ»**

Санкт-Петербург

2008

УДК 615.844.6
ББК 24.46
П69

Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» — СПб.: ООО «Веда», 2006. — 212 с. Тираж 2000 экз. (доп. тираж)

Книга представляет собой практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель», первых и единственных серийно выпускаемых в России приборов для реализации различных вариантов современного инструментального метода — капиллярного электрофореза.

Материал книги включает физико-химические основы метода, его аналитические возможности, описание аппаратуры. На примере методик, разработанных специалистами фирмы «Люмэкс», описаны стратегии разработок с указанием методических особенностей и наших практических рекомендаций. Значительное место в руководстве отведено примерам использования метода капиллярного электрофореза в различных областях. Особое внимание уделено вопросам подготовки капилляра и оценке его работоспособности.

Книга написана ведущими специалистами по капиллярному электрофорезу научно-производственной фирмы «Люмэкс» с привлечением материалов, наработанных пользователями систем капиллярного электрофореза «Капель» в нашей стране и за рубежом.

Книга предназначена, в первую очередь, для инженеров-химиков и лаборантов аналитических лабораторий, только приступающих к изучению или уже использующих в своей ежедневной практике приборы серии «Капель» и разработанные для них методики. Она может быть полезна также исследователям и специалистам, областью интересов которых являются методы разделения и их применение для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов, лекарственных препаратов, биопроб и т. д.; а также тем, кто занят поиском новых областей использования метода капиллярного электрофореза.

Авторы: Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев

ISBN 5-903297-01-3

© ООО «Люмэкс», 2006
© ООО «Веда», 2006

Оглавление

Предисловие	3
Список принятых терминов и сокращений	5
Введение	10
Глава 1. Физико-химические основы метода капиллярного электрофореза	15
Глава 2. Основные варианты капиллярного электрофореза	26
Глава 3. Аппаратура	28
3.1. Общее устройство систем капиллярного электрофореза	28
3.2. Капилляры	29
3.3. Источники высокого напряжения	30
3.4. Ввод пробы	31
3.5. Детекторы	32
3.6. Системы сбора и обработки данных	35
3.7. Автосемплеры	36
3.8. Системы термостабилизации	36
Глава 4. Эффективность, чувствительность, разрешение и селективность в капиллярном электрофорезе	37
4.1. Эффективность разделения	37
4.2. Чувствительность метода	38
4.3. Разрешение и селективность разделения	39
Глава 5. Обработка результатов в капиллярном электрофорезе. Качественный и количественный анализ	44
5.1. Качественный анализ. Характеристики миграции/удерживания	44
5.2. Количественная обработка результатов анализа	45
Глава 6. Объекты для анализа методом капиллярного электрофореза. Подготовка пробы	47
Глава 7. Области применения метода капиллярного электрофореза и примеры использования систем КЭ «Капель»	50
7.1. Анализ объектов окружающей среды	52
7.2. Комбикормовая промышленность	68
7.3. Пищевая промышленность	80
7.4. Ветеринария	102
7.5. Фармация	103
7.6. Клиническая биохимия	116
7.7. Криминалистическая экспертиза	125
7.8. Технологические задачи	135
7.9. Некоторые методические возможности	145
7.10. Возможности прибора	149

Глава 8. Некоторые аналитические приложения метода капиллярного электрофореза, разработанные фирмой «Люмэкс»	155
8.1. Анализ ионного состава воды	155
8.1.1. Определение неорганических катионов	155
8.1.2. Определение неорганических анионов	159
8.1.3. Одновременное определение катионов калия, натрия, магния, кальция и анионов хлорида и сульфата в водных средах с использованием электроинжекционного анализатора «Капель-103PE»	166
8.2. Анализ безалкогольных, слабоалкогольных и алкогольных напитков (соков, водок, вин и виноматериалов, пива, бренди и др.)	169
8.2.1. Определение кофеина, аскорбиновой кислоты, консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) и подсластителей (сахарина, аспартама и ацесульфам К)	169
8.2.2. Определение органических кислот	172
8.2.3. Определение синтетических красителей	174
8.3. Анализ гербицидов классов феноксикарбоновых кислот и симметричных триазинов	178
8.4. Анализ кормов, комбикормов, сырья для их производства, премиксов	182
8.4.1. Анализ аминокислот	182
8.4.2. Анализ свободных форм водорастворимых витаминов	188
Глава 9. Общие рекомендации по работе с системами капиллярного электрофореза, возможные трудности и пути их преодоления	194
9.1. Подготовка капилляра к работе, проверка его кондиционного состояния, хранение, пути восстановления работоспособности, замена	194
9.2. Подготовка буферных и анализируемых растворов	198
9.3. Возможные трудности при работе с системами капиллярного электрофореза «Капель» и программами сбора данных, причины и способы устранения	198
Приложения	
А. Хорошая лабораторная практика	202
Б. Тестирование систем капиллярного электрофореза «Капель»: проверка работоспособности прибора, контроль качества подготовки капилляра	203
В. Ручная промывка капилляра с помощью медицинского шприца	207

Предисловие

С начала 80-х годов XX века получил становление и активное развитие новый инструментальный метод, относящийся к комбинированным методам разделения и анализа — капиллярный электрофорез.

Фирма «Люмэкс» с 1996 года является первым и до сих пор единственным производителем серийных систем капиллярного электрофореза в СНГ. Следуя традиции предлагать к прибору методическое обеспечение, первыми были разработаны методики анализа катионного и анионного состава водных объектов. Совершенствуя и наращивая потенциал приборов «Капель», мы не забывали также о расширении областей применения этого относительно нового в мире и абсолютно нового на тот момент в России инструментального метода анализа. Эта цель достигалась как в лаборатории нашей фирмы, так и за ее пределами: в исследовательских и производственных лабораториях организаций, сделавших ставку на метод КЭ и на выпускаемую нами аппаратуру. Был накоплен достаточно большой материал, позволявший оценить возможности использования капиллярного электрофореза в самых разных областях. Полученные результаты в 2001 году были представлены нами в сборнике «Система капиллярного электрофореза. Основы метода. Аппаратура. Примеры использования систем капиллярного электрофореза „Капель-103, -104, -105“».

За последние пять лет фирма «Люмэкс» значительно расширила круг пользователей приборов «Капель», провела модернизацию имеющегося модельного ряда систем капиллярного электрофореза и выпустила новые модификации, в том числе управляемые от компьютера. Нами были усовершенствованы методики анализа ионного состава воды, разработаны новые методики определения (аминокислот, витаминов, органических кислот, красителей и др.), накоплены материалы, демонстрирующие широкие аналитические возможности метода.

Безусловно, все эти годы мы поддерживаем тесную связь с нашими коллегами, которые используют приборы «Капель» для решения рутинных задач по аттестованным методикам, а также для научных и прикладных исследований. При этом мы понимаем, что пользователями «Капелей» могут быть как начинающие аналитики, так и опытные исследователи, но все они, безусловно, нуждаются в литературе по капиллярному электрофорезу, которой на русском языке все еще непросто найти.

Приступая к написанию этой книги, авторы ставили перед собой 3 цели. Во-первых, нам хотелось в доступной форме дать представление о научных основах капиллярного электрофореза, что послужило бы фундаментом для понимания решаемых с его помощью практических задач. Во-вторых, на конкретных аналитических примерах, в основе которых лежат разработанные фирмой методики, продемонстрировать стратегию разработки каждого из анализов с указанием методических особенностей и наших практических рекомендаций. В-третьих, привести многочисленные (но далеко не все возможные) примеры практического использования метода, реализованные на системах капиллярного электрофореза «Капель».

Авторы выражают признательность своим коллегам Соломоновой А. П., Ширяеву А. В., Ивановой И. В., Адамсон В. Г., Морозовой О. В., Гремякову А. И., Лебедеву М. Ю., Шапу А. В., Окуню В. М. за помощь в подготовке глав 7 и 8. Мы благодарны также Дружихиной В. М. и Родионенко Е. В. за подготовку материалов к печати, Бурлешину А. В. за внимательное прочтение материалов и высказанные замечания.

Нам хотелось бы особенно поблагодарить наших коллег из других организаций, любезно предоставивших свои материалы для этого издания, и пожелать им дальнейших успехов в продвижении метода капиллярного электрофореза.

Наталья Викторовна Комарова
Ярослав Сергеевич Каменцев

Список принятых терминов и сокращений

Капиллярный электрофорез, являясь относительно молодым методом разделения и анализа, поначалу заимствовал большую часть терминов из наиболее близкого сепарационного метода — ВЭЖХ. Со временем, учитывая основной принцип разделения в КЭ — электромиграционный, была сформирована собственная терминологическая база метода капиллярного электрофореза, которая с 2002 г. рекомендована к использованию ИЮПАК.

В этом разделе мы приведем лишь те основные термины и сокращения, которые будут активно использоваться в данном Практическом руководстве. В связи с тем, что подавляющее большинство публикаций по КЭ продолжает выходить на английском языке, мы приведем наряду с русскими названиями английские общепринятые эквиваленты.

Термины

› *Время миграции* t_m (*migration time*, t_m) — время, необходимое компоненту для прохождения им эффективной длины капилляра ($L_{эфф}$, $L_{эф}$) от зоны ввода пробы (начала капилляра) до зоны детектирования.

› *Электроосмотический поток ЭОП* (*electroosmotic flow*, *EOF*) — течение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля. Время, необходимое жидкости для преодоления эффективной длины капилляра вследствие возникающего ЭОП, называют временем ЭОП ($t_{зон}$, $t_{эф}$) и экспериментально определяют из электрофореграммы (*electropherogram*) по времени миграции нейтрального компонента — маркера ЭОП.

› *Подвижность ЭОП* $\mu_{зон}$ (*electroosmotic mobility*, $\mu_{эф}$) — представляет собой отношение скорости ЭОП к напряженности электрического поля. Скорость ЭОП (*electroosmotic velocity*, $v_{эф}$) положительна при направлении движения жидкости от входного участка капилляра к детектору и отрицательна при обратном направлении. Скорость ЭОП вычисляют как: $v_{эф} = L_{эфф}/t_{эф}$. Напряженность электрического поля представляет собой отношение приложенной разности потенциалов (U) к общей длине капилляра ($L_{общ}$, L_{tot}). Таким образом, подвижность ЭОП вычисляют из экспериментальных данных: $\mu_{эф} = L_{эфф} \times L_{эфф} / t_{эф} \times U$. Традиционно при расчете подвижностей длину капилляра выражают в сантиметрах, время миграции в секундах, а разность потенциалов в вольтах.

Примечание. Время миграции как параметр качественного анализа принято выражать в минутах, однако для скоростных анализов, общее время которых не превышает 2–3 минут, время миграции приводят в секундах.

› *Электрофоретическая подвижность частицы* $\mu_{эф}$ (*electrophoretic mobility*, $\mu_{эф}$) — по аналогии с предыдущей величиной представляет собой отношение электрофоретической скорости частицы к напряженности электрического поля и может быть вычислена: $\mu_{эф} = L_{эфф} \times L_{эфф} / t_m \times U$.

В отличие от $\mu_{эф}$ электрофоретическую подвижность частицы нельзя определить непосредственно из электрофореграммы, поскольку время миграции частицы t_m в

этом случае представляет собой сумму времен миграции собственно частицы и маркера ЭОП. Из эксперимента можно найти так называемую общую подвижность, которая выражается (при положительной скорости ЭОП): $\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{зон}} + \mu_{\text{эф}}$.

Зная из эксперимента $\mu_{\text{общ}}$ и $\mu_{\text{зон}}$ можно легко рассчитать $\mu_{\text{эф}}$.

› *Капиллярный электрофорез КЭ (Capillary Electrophoresis, CE)* — метод разделения, реализуемый в капиллярах и основанный на различиях в электрофоретических подвижностях заряженных частиц как в водных, так и в неводных буферных электролитах. Буферные растворы (ведущие электролиты, рабочие буферы, background electrolyte, run buffer) могут содержать добавки (например, макроциклы, органические растворители, полимеры и др.), которые способны взаимодействовать с анализируемыми частицами и изменять их электрофоретическую подвижность.

Примечание 1. Этот метод известен также как *капиллярный зонный электрофорез (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)*. Нейтральные компоненты не могут быть разделены этим методом, все они мигрируют в зоне ЭОП.

Примечание 2. Использование термина *капиллярный электрофорез* в качестве общего термина для всех капиллярных электромиграционных методов не рекомендуется, поскольку многие из этих методов (капиллярный гель-электрофорез, капиллярный аффинный электрофорез, капиллярная изоэлектрическая фокусировка, капиллярный изотахофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, микроэмульсионная электрокинетическая хроматография, капиллярная электрохроматография) основаны на отличных от КЭ принципах разделения.

› *Мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC)* — метод разделения, основанный на комбинации электрофоретического и хроматографического принципов разделения. В состав буферного раствора вводят поверхностно-активное вещество, которое при определенных концентрациях формирует псевдостационарную мицеллярную фазу, и компоненты пробы распределяются между этой фазой и фазой буферного раствора согласно их гидрофобности.

Примечание 1. Этот метод также называют *мицеллярной электрокинетической хроматографией МЭКХ (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)*.

Примечание 2. *Время миграции мицеллы (migration time of the micelles, t_{mc})* экспериментально определяют как время миграции компонента, полностью удерживаемого мицеллярной фазой. Маркером мицелл, например, является *судан 3*.

Сокращения

Сокращение	Полное название
2М-4Х	2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота
2,4-Д	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
2,4-ДМ	2,4-дихлорфеноксимасляная кислота
2,4-ДП	2,4-дихлорфеноксипропионовая кислота
2,4-ДХФ	2,4-дихлорфенол
2,4,5-Т	2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота
АПАВ	анионное поверхностно-активное вещество
АК	аминокислоты
БИА	бензимидазол
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГК	гуминовые кислоты
ДДСН	додecilсульфат натрия
ДЭА	диэтанолламин
ДЭС	двойной электрический слой
и.э.т.	изоэлектрическая точка
КЗЭ	капиллярный зонный электрофорез
ККМ	критическая концентрация мицеллообразования
КПАВ	катионное поверхностно-активное вещество
КЭ	капиллярный электрофорез
МВИ	методика выполнения измерений
МС	масс-спектрометрия
МЦ	макроцикл
МЭКХ	мицеллярная электрокинетическая хроматография
ПЗУ	постоянное запоминающее устройство
ТФЭ	твердофазная экстракция
ФИТЦ	фенилизотиоцианат
ФКК	феноксикарбоновые кислоты
ФТГ	фенилтиогидантоин
ФТК-производные	фенилтиокарбамильные производные

ФУК	феноксиксусная кислота
ЦД	циклодекстрин
ЦТАБ	цетилтриметиламмония бромид
ЦТАОН	цетилтриметиламмония гидроксид
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота (и ее соли)
ЭОП	электроосмотический поток
Ala	аланин
Arg	аргинин
Asn	аспарагин
Asp	аспарагиновая кислота
Cys-Cys	цистин
D	коэффициент диффузии
Gln	глутамин
Glu	глутаминовая кислота
Gly	глицин
His	гистидин
ID	внутренний диаметр капилляра
Ile	изолейцин
k'	фактор емкости
L _{общ}	общая длина капилляра
L _{эфф}	эффективная длина капилляра
Leu	лейцин
Lys	лизин
Met	метионин
N	эффективность
Phe	фенилаланин
pK _a	константа диссоциации
Pro	пролин
q	заряд частицы
r	радиус частицы
R _s	разрешение соседних пиков
Ser	серин

t _m	время миграции
Thr	треонин
Trp	триптофан
Tyr	тирозин
U	разность потенциалов
Val	валин
W _{1/2}	ширина пика на половине высоты
α	фактор селективности
ΔΨ	межфазная разность потенциалов
ε	диэлектрическая константа
ζ	дзета-потенциал
η	вязкость раствора
μ _{общ}	общая подвижность частицы
μ _{эоп}	подвижность электроосмотического потока
μ _{эф}	электрофоретическая подвижность частицы

Введение

В последние два десятилетия в мире отмечен активный интерес к новому, интенсивно развивающемуся методу разделения сложных смесей — капиллярному электрофорезу, позволяющему анализировать ионные и нейтральные компоненты различной природы с высокой экспрессностью и уникальной эффективностью.

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления — *электромиграция ионов* и других заряженных частиц и *электроосмос*. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. В то же время, такие возмущающие факторы, как диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п., в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигаются рекордные эффективности разделений.

Традиционно капиллярный электрофорез сравнивают с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), поскольку в обоих методах разделение происходит в ограниченном пространстве (капилляре или колонке) с участием движущейся жидкой фазы (буферного раствора или подвижной фазы (элюента)) и для регистрации сигналов используют схожие принципы детектирования и программы обработки данных. Тем не менее у методов есть отличия, которые, безусловно, относятся к достоинствам капиллярного электрофореза:

- ▶ высокая эффективность разделения (сотни тысяч теоретических тарелок), недоступная ВЭЖХ и связанная с плоским профилем ЭОП,
- ▶ малый объем анализируемой пробы и буферов (не более 1–2 мл в день), при этом практически не требуется применение высокочистых, дорогостоящих органических растворителей,
- ▶ отсутствие колонки, сорбента, проблем с его старением и, значит, заменой колонки,
- ▶ простая и недорогая аппаратура,
- ▶ экспрессность и низкая себестоимость единичного анализа.

Из ограничений КЭ следует отметить невысокую, по сравнению с ВЭЖХ, концентрационную чувствительность и требование к анализируемым соединениям растворяться в воде и разбавленных водно-органических смесях. В то же время эти ограничения не являются непреодолимыми. Так, недостаточную чувствительность определения при использовании УФ-детектирования (из-за малой длины оптического пути, равного внутреннему диаметру капилляра) может скомпенсировать использование таких видов детектирования, как лазерно-индуцированное флуориметрическое или масс-спектрометрическое в сочетании с различными приемами on-line концентрирования пробы (т. н. стэкинг и свиппинг). А вариант неводного капиллярного электрофореза успешно позволяет разделять и анализировать сильно гидрофобные, нерастворимые в водных растворах компоненты пробы.

Метод капиллярного электрофореза сегодня с успехом применяется для анализа разнообразных веществ (неорганических и органических катионов и анионов, аминокислот, витаминов, наркотиков, красителей, белков и т. д.) и объектов (для контроля качества вод и напитков, технологического контроля производства, входного контроля сырья, анализа фармпрепаратов и пищевых продуктов, в криминалистике, медицине, биохимии и т. д.).

В России работы, связанные с изучением возможностей метода КЭ и его аналитических приложений, стали появляться лишь в последние годы, что в существенной степени инициировалось созданием отечественных приборов для капиллярного электрофореза.

Системы капиллярного электрофореза «Капель», разработанные и выпускаемые фирмой «Люмэкс», являются первым в России и СНГ серийным семейством приборов, внесенных в Госреестр средств измерений и предназначенных для реализации этого метода. В состав семейства на сегодняшний день входят следующие модификации, аттестованные как средства измерения: «Капель-103Р», «Капель-103РТ», «Капель-104Т», «Капель-104М», «Капель-105» и «Капель-105М». Фирма выпускает также опытные модификации — электроинжекционные анализаторы «Капель-РЕ». Разрабатываются модели с встроенным блоком измерения потенциала течения «Капель-ПТ».

Системы капиллярного электрофореза «Капель» предназначены для количественного и качественного определения состава проб веществ в водных и водно-органических растворах методом капиллярного электрофореза. На приборах любой из модификаций без ограничений могут быть реализованы методики, использующие основные варианты КЭ — капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) или мицеллярную электрокинетическую хроматографию (МЭКХ). Первый вариант предназначен для анализа только ионных компонентов проб, второй — для анализа как ионных соединений, так и молекулярных форм веществ.

Разнообразие технических решений, использованных специалистами фирмы «Люмэкс» при создании приборов семейства «Капель», **табл. 1**, позволяет потребителю выбрать ту систему, которая в наибольшей степени соответствует характеру решаемой задачи.

Таблица 1. Технические характеристики приборов серии «Капель».

Характеристики	Капель®-103P	Капель®-103PT	Капель®-104T	Капель®-105 Капель®-105M
фотометрический детектор	254 нм			190–380 нм
высоковольтный блок	постоянное напряжение 1–25 кВ, с шагом 1 кВ, сменная полярность, ток 0–200 мкА			
ввод пробы	гидродинамический или электрокинетический			
смена проб	ручная		автоматическая с двумя автосемплерами на 10 входных и 10 выходных пробирок	
промыть	при постоянном давлении ~1000 мбар			
капилляр	кварцевый (длина 30–100 см, внутренний диаметр 50 или 75 мкм)			
охлаждение капилляра	принудительное воздушное	жидкостное с заданием и контролем температуры теплоносителя (диапазон от –10 до +30 °С от температуры окружающей среды)		
возможность задания и/или изменения параметров в ходе анализа	время анализа давление напряжение	время анализа давление температура напряжение	время анализа длина волны давление температура напряжение	
питание	187–242 В, 50/60 Гц			
потребляемая мощность, Вт	80	150	200	
габариты, мм	420×330×360	420×350×360	500×500×500	
масса, кг	16		25 30 (105M)	
Сбор, обработку и вывод данных осуществляется с помощью персонального компьютера с операционной системой «Windows® 98/ME/NT/2000/XP», на котором установлена программа сбора и обработки хроматографических данных «МультиХром® для Windows®», версия 1,5х.				
Для модификаций «КАПЕЛЬ®-105M/104M» управление прибором, сбор и обработка данных осуществляется с помощью ПО «Эльфوران®».				
Для модификации «КАПЕЛЬ®-105M» управление прибором, сбор и обработка данных возможны с помощью ПО «МультиХром® для Windows®», версия 2,5х.				

> «Капель-103P» наиболее простая модель с ручным управлением и пошаговым принципом работы. В прибор можно установить только одну пробирку с анализируемым раствором. «Капель-103P» идеально подходит для обучения методу капиллярного электрофореза в университетах, технических лицеях и лабораториях благодаря наглядности всех процедур и простоте управления.

> «Капель-103PT» отличается от предыдущей модели наличием жидкостной системы охлаждения капилляра, которая позволяет поддерживать температуру теплоносителя на заданном уровне независимо от температуры лабораторного помещения, благодаря чему повышается воспроизводимость результатов измерения. Эффективное охлаждение капилляра позволяет использовать для анализа более высокие напряжения, что влечет за собой возрастание эффективности разделения и уменьшение времени анализа.

> «Капель-104T» предназначена для выполнения серийных анализов. Она снабжена двумя автосемплерами, системой жидкостного охлаждения капилляра, имеет удобный интерфейс, позволяющий создавать программы работы прибора в автоматическом режиме. Более простая модель «Капель-104» (с воздушным, менее эффективным охлаждением капилляра) в настоящее время снята с производства.

> «Капель-104M», сохраняя все возможности «Капели-104T», имеет самую современную на сегодня электронику, полностью управляется от компьютера, снабжена единой программой управления, сбора и обработки электрофоретических данных. Усовершенствованная конструкция кассеты с капилляром позволяет быстро и надежно проводить замену капилляра.

> «Капель-105» — прибор с наиболее широкими возможностями. В нем сохранены наилучшие качества предыдущих моделей — жидкостная система охлаждения капилляра, автосемплеры, возможность работы в программируемом автоматическом режиме. В дополнение к этому прибор имеет спектрофотометрический детектор на основе дейтериевой лампы и монохроматора с дифракционной решеткой, благодаря чему рабочий диапазон длин волн охватывает область от 190 до 400 нм. Всё это делает «Капель-105» незаменимым прибором для исследовательской работы как в области разработки новых методик, так и в аналитической практике.

> Самой последней из аттестованных моделей в серии «Капель» на сегодняшний день является «Капель-105M». В ней наряду с новейшей электронной базой реализованы полное управление прибором, сбор и обработка данных с помощью собственного программного обеспечения, а также возможность регистрации спектров поглощения компонентов анализируемой пробы во время анализа.

> Опытные модификации «Капель-PE» представляют собой электроинжекционные анализаторы — приборы для реализации нового метода капиллярного электрофореза. В этом методе электрокинетическим способом в капилляр с двух концов вводят компоненты, которые способны взаимодействовать друг с другом. Встречаясь в капилляре эти компоненты образуют новые соединения, которые обладают иной подвижностью, чем исходные, и, следовательно, могут быть зарегистрированы при прохождении через зону детектирования. Прибор может быть интересен тем, кто занимается проблемами химической кинетики, реакционной способности, комплек-

сообразования и т. п. Особенностью прибора является специальная кассета, в которой окно детектора расположено в середине капилляра, благодаря чему эффективная длина капилляра одинакова как для катионных, так и для анионных компонентов проб. Кроме ртутной лампы прибор снабжен сменной лампой накаливания и набором светофильтров, которые позволяют расширить рабочий диапазон длин волн на видимую и ближнюю инфракрасную область спектра.

› Модификация «Капель-ПТ» оборудована блоком измерения потенциала течения. Потенциал течения (в англ. литературе — *streaming potential*), по физической сущности — явление обратное электроосмотическому потоку, возникает на концах капилляра, когда в нём создается поток электролита. Он возникает и при промывке капилляра ведущим буферным раствором при кондиционировании капилляра. Измерение потенциала течения (ПТ) в этот момент позволяет оценить степень готовности капилляра к очередному анализу, и, тем самым, повысить воспроизводимость времени выхода компонентов в серии однотипных электрофореграмм. В свою очередь улучшение воспроизводимости времён выхода сопровождается улучшением воспроизводимости количества вещества в пике, т. е. воспроизводимости количественной оценки концентрации вещества в пробе.

В любой модели системы «Капель» можно задавать или изменять в ходе анализа: давление, напряжение, время анализа, температуру (для систем с жидкостным охлаждением капилляра), длину волны (для моделей 105/105М).

Таким образом, широкие возможности метода в сочетании с многофункциональностью аппаратного оформления позволяют использовать капиллярный электрофорез и приборы «Капель» для решения самых разнообразных аналитических задач.

Глава 1. Физико-химические основы метода капиллярного электрофореза

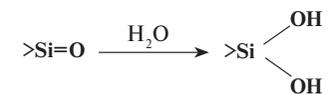
Движение заряженных коллоидных частиц под действием внешнего электрического поля носит название электрофореза. Электрофорез как метод разделения предложен в 30-х годах XX в. Тизелиусом. Он поместил смесь белков сыворотки крови в буферный раствор и при наложении электрического поля обнаружил, что компоненты пробы мигрируют в направлении и со скоростью, определяемыми их размером, формой и электрическим зарядом. В 1948 г. работа была удостоена Нобелевской премии по химии. Главным ограничением широкого использования метода была низкая эффективность разделения из-за тепловых эффектов и конвекции жидкости. Эта проблема была частично решена благодаря использованию неконвективной среды (полиакриламидные гели) в *гель-электрофорезе*. Несмотря на то, что разделение в геле довольно широко распространено, особенно в биохимии, очевидны и его ограничения: длительное время анализа, недостаточная эффективность, трудности при детектировании и автоматизации.

В 1967 г. шведский ученый Хиртен предложил проводить электрофоретическое разделение не на плоскости, а в открытых трубках — капиллярах с внутренним диаметром 1–5 мм, тем самым положив начало методу капиллярного электрофореза. Позже Виртанен и Миккерс использовали стеклянные и тефлоновые капилляры с внутренним диаметром 200 мкм, и, наконец, в начале 80-х гг. XX в. Йоргенсон и Лукас продемонстрировали сепарационные возможности кварцевого капилляра с внутренним диаметром 75 мкм, использовав последние достижения в изготовлении кварцевых капилляров очень малых и равномерных внутренних диаметров (~ десятки мкм), прозрачных в ультрафиолетовой области спектра. Кроме того, в мире был уже накоплен значительный опыт по возможностям детектирования аналитических сигналов в потоке. С этого момента начинается активное развитие метода капиллярного электрофореза в его современном формате, продолжающееся по настоящее время.

Метод КЭ основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора (~2 нл) вводят в кварцевый капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером — электролитом. После подачи высокого напряжения (до 30 кВ) к концам капилляра компоненты смеси начинают двигаться 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; качественной характеристикой вещества является время миграции, а количественной — высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

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

Находящиеся на поверхности плавленного кварца силоксановые группы при контакте с водой или водными растворами гидролизуются с образованием удвоенного количества силанольных групп, которые затем гидратируются.



Скорость и степень гидролиза зависят от температуры и pH водных растворов и, в меньшей степени, от концентрации солевого фона раствора. В водном растворе силанольные группы способны к кислотной диссоциации. Константа первой ступени имеет величину $K_{a1} = 2,5 \times 10^{-3}$. Это означает, что при pH водного раствора больше 2,5 поверхность кварца приобретает некоторый отрицательный заряд, который возрастает при увеличении pH раствора. Наоборот, при pH ~2 и меньше диссоциация силанольных групп практически полностью подавлена, и поверхность кварца становится нейтральной.

Диссоциация силанольных групп вызывает на границе раздела кварц–водный раствор электролита образование *двойного электрического слоя (ДЭС)*, **рис. 1а**. Первую его обкладку составляют неподвижные отрицательно заряженные силанольные группы. Вторую обкладку двойного слоя составляют положительно заряженные катионы, существующие в растворе. Диэлектриком, разделяющим обкладки этого конденсатора, являются молекулы воды, гидратирующие как силанольные группы, так и катионы.

Положительная часть ДЭС, в свою очередь, делится на две части: первую (или неподвижную), непосредственно примыкающую к поверхности кварца, и вторую (или диффузную), располагающуюся на некотором удалении от поверхности. В неподвижной части количество положительных зарядов меньше, чем отрицательных зарядов на поверхности кварца из-за увеличения размеров катионов вследствие гидратации. В результате в диффузной части ДЭС образуется некоторая избыточная концентрация катионов. Между этими двумя слоями проходит т. н. *граница скольжения* — при наложении вдоль капилляра электрического поля неподвижная часть остается на месте, в то время как диффузная часть начинает мигрировать к катоду, увлекая за собой в силу межмолекулярного сцепления всю массу жидкости в капилляре. Возникает *электроосмотический поток (ЭОП)*, который осуществляет пассивный перенос раствора внутри капилляра. Скорость ЭОП в сильной степени зависит от pH раствора: в сильнокислых растворах ЭОП отсутствует, в слабокислых — его скорость незначительна, а при переходе в нейтральную и щелочную область pH скорость ЭОП возрастает до максимально возможной. С другой стороны, эта величина зависит от концентрации электролита в ведущем буфере: чем она больше, тем выше становится доля катионов в неподвижной части ДЭС, а толщина диффузной части уменьшается и, соответственно, уменьшается скорость электроосмотического потока.

На **рис. 1б** показано распределение зарядов в ДЭС. Общий потенциал (Ψ), создаваемый диссоциированными силанольными группами, пропорционален заряду. Часть этого потенциала ($\Delta\Psi$) нейтрализуется положительными зарядами ионов неподвижной части второй обкладки двойного слоя. Остальная часть положительных зарядов создает в приповерхностном слое раствора электрокинетический или ζ -потенциал (дзета-потенциал).

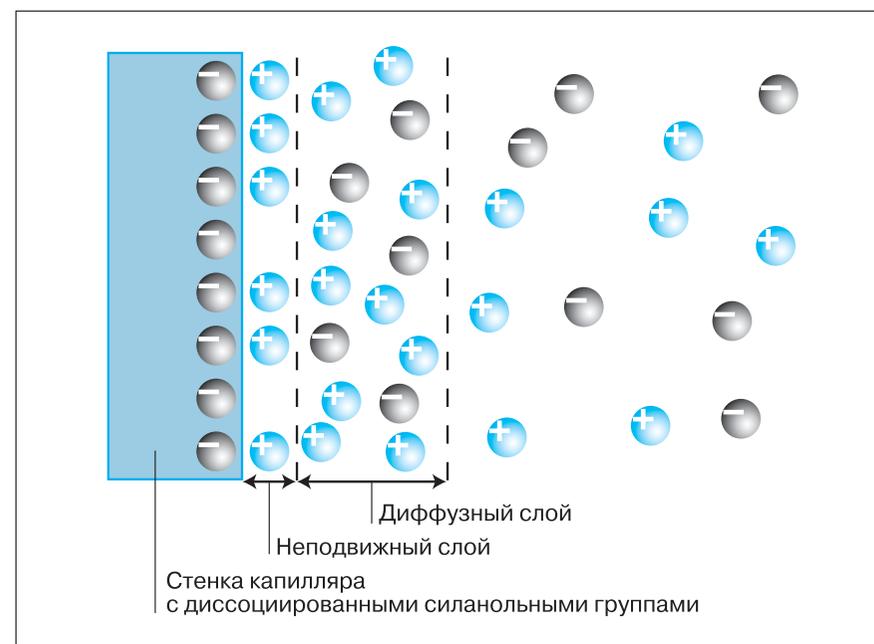


Рис. 1а. Строение двойного электрического слоя.

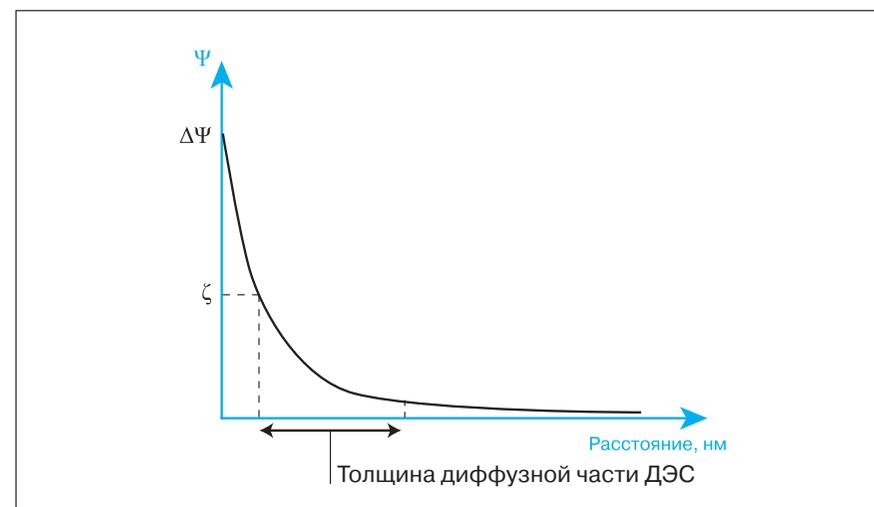


Рис. 1б. Распределение зарядов в ДЭС.

Уникальное свойство ЭОП заключается в плоском профиле потока (в отличие от параболического в ВЭЖХ), который при движении зон компонентов внутри капилляра практически не вызывает их уширения (рис. 2). Благодаря этому метод КЭ характеризуется высочайшей эффективностью (~ сотни тысяч теоретических тарелок).

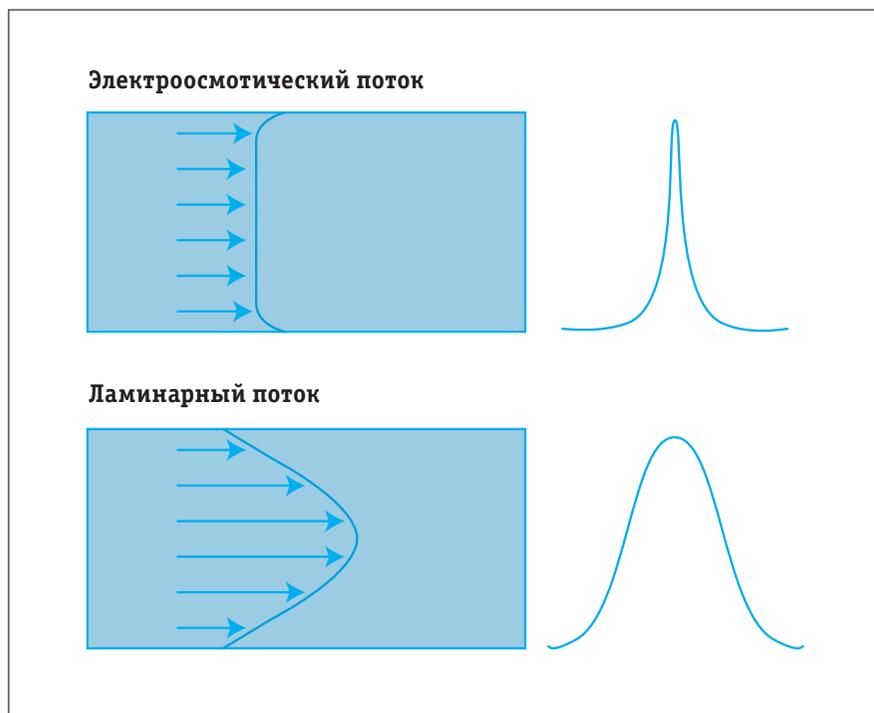


Рис. 2. Влияние профиля потока на ширину зоны вещества.

В приборах для капиллярного электрофореза капилляр, заполненный раствором электролита, своими концами опущен в два содержащих тот же электролит сосуда, в которые введены электроды. Электролит 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: через капилляр протекает постоянный электроосмотический поток, на который накладывается взаимно противоположная электромиграция катионов и анионов.

Если в капилляр со стороны анода ввести небольшой объем раствора пробы, то ЭОП будет переносить эту зону к катоду (в область детектирования), и зона некоторое время может находиться в капилляре под воздействием электрического поля высокого напряжения. В течение этого времени заряженные компоненты пробы будут перемещаться в соответствии с их электрофоретическими подвижностями.

Катионные компоненты пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять электроосмотический поток (рис. 3). Скорость их движения складывается из скорости ЭОП и скорости электромиграции, поэтому на выходе капилляра катионы появляются первыми и тем раньше, чем больше их электрофоретическая подвижность.

Нейтральные компоненты пробы способны перемещаться только под действием электроосмотического потока, тогда как анионные будут перемещаться к аноду со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП. Медленно мигрирующие анионы появятся на выходе после ЭОП, а те, чья скорость электромиграции по абсолютной величине превышает скорость ЭОП, будут выходить из капилляра в прианодное пространство.

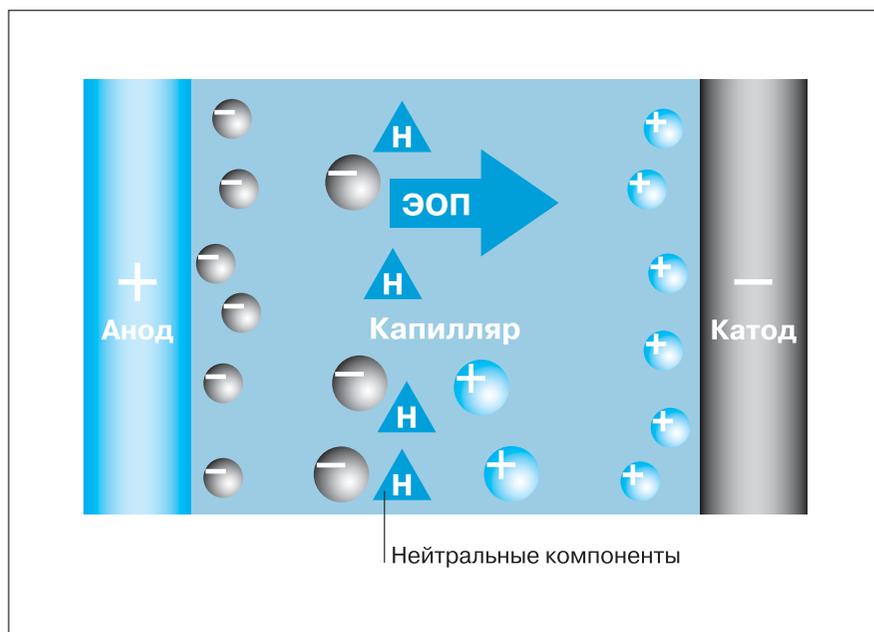


Рис. 3. Электрофоретическая миграция ионов в присутствии электроосмотического потока.

Если время нахождения пробы в капилляре (которое можно регулировать изменением напряжения, величины рН и концентрации ведущего электролита) достаточно, чтобы проявились различия в подвижности ионов, то на выходе капилляра вблизи катода можно наблюдать зоны раствора, в которых находятся индивидуальные компоненты пробы.

Ведущий электролит (его называют также рабочим буферным раствором) должен иметь такую концентрацию, при которой электрическое сопротивление раствора в капилляре будет достаточно велико. Это требование связано с тем, что при прохождении электрического тока в проводнике выделяется тепло. Если ток достаточно велик, то жидкость в капилляре может даже закипеть. Традиционно считается, что электрический ток в капилляре подчиняется закону Ома, хотя известно, что линейная связь тока и напряжения существует в растворе только в ограниченном диапазоне напряжений. Рассмотрим некоторые аспекты этого явления на конкретном примере.

Пусть полная длина капилляра равна 60 см, эффективная длина (т. е. длина от входа до окна детектора) — 50 см, рабочее напряжение, поданное на электроды, равно 25 кВ, сила тока в капилляре составляет 100 мкА. Сила тока в капилляре зависит от его длины и диаметра, а также от концентрации электролита в растворе. Для капилляра с внутренним диаметром 75 мкм сила тока 100 мкА при напряжении 25 кВ достигается при концентрации соли в электролите 0,03–0,04 моль/л. В выбранных условиях электрическое сопротивление цепи составляет 250 МΩ (мегаОм), градиент напряжения, который практически совпадает с градиентом поля, составляет 416 В/см. Мощность, выделяющаяся в капилляре, в этом случае равна 2,5 Вт. Так как вся она превращается в тепловую энергию, её удобнее пересчитать в тепловые единицы — калории. Пересчет показывает, что в капилляре каждую секунду выделяется 0,6 калории — гигантское количество, если учесть, что объём жидкости в капилляре диаметром 75 мкм составляет всего 2,65 мкл. Если не принимать в расчет перенос тепла через стенку капилляра, то такого количества достаточно, чтобы в течение 1 секунды температура жидкости в капилляре возросла на 225 °С (!).

Этот формальный расчет показывает, насколько серьёзна проблема охлаждения капилляра в КЭ. В действительности выделяющаяся теплота расходуется не только на нагревание раствора, но также на нагрев кварцевых стенок и полиимидной оболочки. Нужно также учесть, что теплоёмкость кварца в ~6 раз меньше, чем водного раствора, а теплопроводность плавленого кварца в 16 раз больше, чем у воды. Все эти обстоятельства способствуют эффективному отводу тепла во внешнюю среду, однако, если не принять специальных мер, жидкость в капилляре очень скоро закипит. Поэтому в приборах для КЭ всегда присутствуют либо системы охлаждения капилляра энергичным воздушным обдувом, либо системы жидкостного охлаждения.

Тепловое равновесие в капилляре устанавливается достаточно быстро. Оно характеризуется сравнительно малым различием температуры раствора в радиальном направлении во внутреннем канале капилляра и устойчивым градиентом температур между внутренней и внешней стенками капилляра. Нагрев жидкости не вызывает появления конвективных потоков, так как нагревание происходит равномерно по всему просвету капилляра. В результате не происходит перемешивания жидкости, приводящее к размыванию зон определяемых компонентов. При чрезмерном нагреве возможно закипание жидкости, и пузыри пара прерывают ток в капилляре, что дела-

ет анализ невозможным. Поэтому при выборе условий электрофоретического разделения следует стремиться к минимизации тока соответствующим выбором концентрации ведущего электролита.

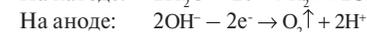
В зависимости от концентрации электролитов в растворах буфера и пробы поведение компонентов при разделении может несколько различаться. Если электропроводности ведущего электролита и пробы одинаковы, то падение напряжения на всей длине капилляра равномерно, и компоненты пробы равномерно перемещаются каждый с присущей ему скоростью. В этом случае на выходе капилляра (точнее, в зоне окна детектора) ширина пика будет приблизительно равна ширине зоны пробы (если пренебречь размыыванием). Следовательно, эффективное разделение может быть достигнуто при введении возможно меньшего объема пробы (но для обеспечения необходимой чувствительности концентрация определяемых компонентов в пробе должна быть возможно выше).

Иное поведение наблюдается в случае, если электропроводность раствора пробы меньше электропроводности ведущего электролита. В этом случае в капилляре появляется участок с высоким сопротивлением и сила тока через капилляр уменьшается, но в соответствии с законом Ома падение напряжения на участке, занятом пробой, возрастает во столько раз, во сколько раз сопротивление пробы больше, чем сопротивление равного участка ведущего электролита. Таким образом, если сопротивление раствора пробы в капилляре будет в 10 раз больше, чем сопротивление ведущего электролита, градиент потенциала в зоне пробы будет в 10 раз выше, чем в остальной части капилляра. Высокий градиент потенциала в зоне пробы заставляет компоненты пробы быстрее мигрировать к границе зоны, где они в сконцентрированном и предварительно разделенном виде переходят в ведущий электролит, и там продолжают, но уже медленнее, движение к детектору. Описанное явление носит название *стекинга* и широко используется в практике электрофоретических разделений. Оно позволяет получать очень узкие пики определяемых компонентов и, как следствие, концентрация их в пике оказывается значительно выше, чем в исходной пробе. Практически стекинг осуществляют таким образом, что перед вводом пробы разбавляют специальным буферным раствором (концентрация которого в 10 раз меньше, чем концентрация рабочего буферного раствора) или даже дистиллированной водой.

В том же случае, когда электропроводность раствора пробы больше, чем электропроводность ведущего электролита, падение напряжения на участке, занятом пробой, резко уменьшается. В результате скорость электромиграции компонентов пробы уменьшается, они медленнее достигают границы зоны, а при переходе в ведущий электролит скорость их движения увеличивается. Происходит размазывание пиков, они накладываются друг на друга, эффективность разделения резко ухудшается.

В методе капиллярного электрофореза применяются открытые системы в том смысле, что раствор электролита, в котором происходит разделение, не отделен от электродов, на которые подается напряжение, хотя приэлектродные пространства соединяются через тонкий кварцевый капилляр, выполняющий основную разделяющую функцию, но также служащий электролитическим мостиком, замыкающим электрическую цепь. В электрических цепях, содержащих одновременно проводники первого и второго рода, протекание тока невозможно без электрохимических реакций на границах металл–раствор. В капиллярном электрофорезе стараются ис-

пользовать такие составы буферных ведущих электролитов, в которых на электродах происходит разложение воды (одним из самых распространенных буферов для КЭ является раствор бора). На катоде происходит восстановление ионов водорода, выделение на поверхности катода молекулярного водорода и образование в прикатодном пространстве гидроксильных ионов. На аноде — окисление гидроксильных ионов, выделение на поверхности анода молекулярного кислорода и образование в прианодном пространстве ионов водорода.



При высоких разностях потенциалов, которые применяются в КЭ, на электродах могут протекать и другие параллельные электрохимические реакции, но приведённые выше являются основными.

Образующиеся и гидроксильные и водородные ионы нейтрализуются буферными компонентами ведущего электролита: при использовании боратного буфера в прикатодном слое борной кислотой, в прианодном — борат-ионом. Таким образом, в приэлектродных пространствах происходит лишь изменение мольного соотношения компонентов буферной смеси, приводящее лишь к незначительному изменению pH раствора.

На рис. 4 показано типичное расположение капилляра и электрода в пробирке с раствором электролита, принятое в системах «Капель».

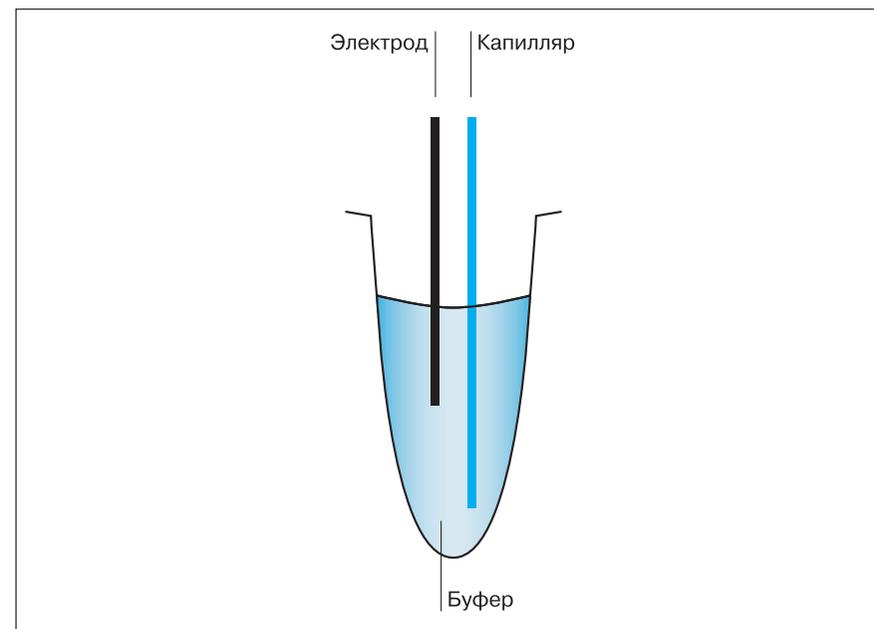


Рис. 4. Типичное расположение капилляра и электрода в пробирке с раствором.

Устье капилляра располагается в нижней трети объёма пробирки; нижний срез электрода находится приблизительно на нижнем уровне верхней трети раствора. При таком расположении продукты электрохимических реакций, в частности, пузырьки газов, не могут проникнуть в просвет капилляра, также как и раствор ведущего электролита, содержащий продукты нейтрализации и отличающийся по составу от первоначального. В то же время расход ведущего электролита вследствие ЭОП происходит за счет неизменённого раствора из средней трети объёма. Сохранению описанного состояния способствует отсутствие перемешивания раствора в процессе анализа.

Предположим, что анализ проходит при токе 100 мкА в течение 15 минут. За это время через раствор пройдет $1 \times 10^{-4} \text{А} \times 900 \text{сек} = 0,09$ кулона электричества, что эквивалентно $9,33 \times 10^{-7}$ моля. Такое же количество молей ионов водорода и гидроксидов образуется в пробирках, в которых находится по 500 мкл буферного раствора. Следовательно, в течение одного анализа концентрация одного из компонентов буферного раствора изменится на $9,33 \times 10^{-7} / 5 \times 10^{-4} = 1,86 \times 10^{-3}$ моль/л. Если исходная общая концентрация компонентов буферного раствора составляет $\sim 0,02 \text{ М}$, то за 5–6 анализов буферная емкость ведущего электролита будет исчерпана полностью.

Приведенный пример показывает, что при анализе существенно меняются концентрации компонентов ведущего электролита. Следовательно, для получения воспроизводимых результатов необходимо регулярно, в среднем через каждые 3–4 анализа, заменять свежими порциями растворы ведущего электролита в рабочих пробирках. Это тем более важно, что в прикатодном пространстве накапливаются катионные компоненты проб, которые могут восстанавливаться на катоде до элементного состояния при последующих анализах. Равным образом в прианодном пространстве могут накапливаться анионные компоненты проб. Одним из самых неприятных из них является анион Cl^- , который, окисляясь на электроде до свободного хлора, вызывает коррозию платинового электрода.

Применительно к капиллярному электрофорезу физическая картина происходящих процессов выглядит следующим образом. Наложение потенциала на электроды системы вызывает образование в непосредственной близости от поверхности электродов двойного электрического слоя. Градиенты потенциала на границах приэлектродных двойных слоев превышают потенциал разложения воды, и на электродах начинаются электрохимические реакции. На катоде происходит восстановление ионов водорода, а на аноде — окисление ионов гидроксидов. Восстановление одного иона водорода на катоде сопровождается образованием в прикатодном слое одного иона гидроксидов, а окисление одного иона гидроксидов на аноде сопровождается образованием в прианодном слое одного иона водорода. Эти два элементарных акта электрохимических реакций на электродах эквивалентны переходу через раствор одного электрона. Образовавшиеся в результате электродных реакций ионы являются избыточными — они нарушают материальный и электрический баланс в приэлектродных слоях. Эти ионы отторгаются противоположно заряженной поверхностью электродов, и быстро, практически не покидая приэлектродные слои, нейтрализуются буферными компонентами ведущего электролита — в прикатодной зоне кислотным компонентом, а в прианодной зоне основным компонентом. При том расположении капилляра и электродов, которое описано выше, изменение кислотно-основного баланса будет происходить только в верхних слоях резервуаров. Нарушение стехиометрии растворов, т. е. образование в приэлектродных слоях избыточных концентраций катионов (в прианодном) и анионов (в прикатодном), а также нарушение электри-

ческого баланса в приэлектродных слоях вызывают электромиграцию избыточных ионов ведущего электролита во взаимно противоположных направлениях. Внутри капилляра к этим потокам избыточных ионов присоединяется миграция избыточной концентрации катионов диффузной части двойного слоя капилляра.

Механизм перемещения носит, по-видимому, эстафетный характер. Каждый элементарный акт электродных реакций заставляет всю массу ионов в растворе переместиться на величину межионного расстояния в растворе. Скорость перемещения такова, что во всём объёме капилляра в любой его точке и в любой момент времени соблюдается электронейтральность раствора. Таким образом, роль этих потоков состоит в выравнивании стехиометрических нарушений, имеющих место в приэлектродных пространствах. Факторами, ограничивающими и регулируемыми скорость электромиграции, являются электрохимические реакции у поверхности электродов. Поступление катионов в прикатодное пространство стехиометрически компенсируется, электрохимической реакцией, в результате которой некоторое количество катионов восстанавливается до молекулярного состояния и образуется эквивалентное количество анионов, которые в свою очередь компенсируют убыль анионов из прикатодного пространства. В прианодном пространстве в то же время и в том же количестве осуществляется электрохимическая реакция окисления анионов и образование эквивалентного количества катионов.

Если в капилляр введена проба, то она потоком жидкости переносится к детектору. Те ионы, которые отличаются от ионов ведущего электролита, мигрируют под действием электрического поля во взаимно противоположных направлениях, причём скорости миграции будут специфичны для каждого сорта ионов.

Глава 2. Основные варианты капиллярного электрофореза

Мы уже упоминали выше, что наиболее распространенными вариантами метода капиллярного электрофореза являются капиллярный зонный электрофорез и мицеллярная электрокинетическая хроматография.

Самым простым вариантом КЭ является *капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ)*. Компоненты сложной смеси движутся в среде электролита с разными скоростями, образуя дискретные зоны. Отличительная особенность КЗЭ состоит в том, что он пригоден для разделения только ионогенных компонентов пробы, тогда как нейтральные соединения, не обладающие собственной электрофоретической подвижностью, движутся со скоростью ЭОП и выходят в зоне нейтральных компонентов, зоне маркера ЭОП.

В приборах капиллярного электрофореза, в которых используется кварцевый капилляр, полярность входного конца чаще всего положительная (анод), и ЭОП переносит зону пробы к катоду. Вблизи катодного выхода установлен детектор. При этих условиях катионные компоненты пробы, тоже мигрируя к катоду, обгоняют ЭОП и первыми достигают детектора в виде отдельных зон, которые на электрофореграмме регистрируются индивидуальными пиками. Через некоторое время детектора достигает и зона исходного раствора, в которой остались нейтральные компоненты пробы. В зависимости от того, поглощают они или нет, на электрофореграмме регистрируется прямой (в некоторых случаях обратный) пик, который часто называют системным. Иногда для идентификации системного пика в пробу добавляют специальные вещества — маркеры ЭОП, например, бензиловый спирт. Что касается анионных компонентов пробы, то их поведение зависит от соотношения скоростей ЭОП и электромиграции анионов. Если скорость миграции аниона превышает скорость ЭОП, то такой анион рано или поздно выйдет из капилляра в прианодное пространство (это нежелательно, т. к. некоторые анионы, например хлорид, попадая в рабочий буферный раствор, будут, разряжаясь на аноде, вызывать коррозию платинового электрода). Если же скорость электромиграции аниона меньше скорости ЭОП, то такой анион может быть зарегистрирован на той же электрофореграмме после выхода системного пика. В этом варианте КЗЭ с положительной полярностью могут определяться катионные компоненты проб и большинство органических анионов.

Чтобы методом КЗЭ можно было определять анионные компоненты проб (в основном, неорганического происхождения) необходимо изменить полярность прикладываемого напряжения. Однако в этом случае изменится не только направление миграции анионов, но также направление ЭОП. Для преодоления этого противоречия необходимо модифицировать поверхность кварцевого капилляра так, чтобы знаки зарядов двойного электрического слоя поменялись на обратные. Это достигается введением в рабочий буферный раствор катионного поверхностно-активного вещества, например, бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ). Катион ЦТА⁺ активно сорбируется на кварцевой поверхности, занимая при достаточной его концентрации все вакансии в ближайшем к поверхности слое. Поверхность как бы «ощетинивается» длинными цетильными (C₁₆H₃₃—) цепочками. Ставшая гидрофобной поверхность при дальнейшей промывке рабочим буферным раствором сорбирует еще один слой поверхностно-активного катиона, ориентированного аммонийным концом наружу

(сорбция «щетка в щетку»). В результате первый слой двойного электрического слоя становится положительным, а второй, в том числе и диффузная его часть, — отрицательным, и ЭОП снова движется от входного конца к детектору, несколько отставая от мигрирующих быстрее анионов.

Несмотря на то, что в последние годы вернулось первоначальное, предложенное Хиртеном более корректное название *электрофорез в свободном растворе*, подавляющая часть публикаций в области КЭ продолжает использовать традиционное название — *«капиллярный зонный электрофорез»*.

Основным достоинством КЗЭ является высокая эффективность (сотни тысяч теоретических тарелок), при этом селективность, определяемая механизмом разделения внутри одной фазы, в КЗЭ недостаточна. Повышение селективности может быть достигнуто за счет изменения pH ведущего электролита, введения в состав буфера различных добавок: поверхностно-активных веществ, макроциклов, органических растворителей и т. д.

Мицеллярная электрокинетическая хроматография объединяет электрофорез и хроматографию. Введенная в 1984 г. японским ученым Терабе, МЭКХ получила наиболее широкое распространение среди других вариантов капиллярного электрофореза, в первую очередь, за счет способности разделять как ионогенные, так и незаряженные компоненты пробы. Разделение нейтральных соединений стало возможным благодаря введению в состав ведущего электролита поверхностно-активных веществ (ПАВ) — мицеллообразователей. Чаще всего используют анионные ПАВ (например, додецилсульфат натрия — ДДСН, англ. SDS) в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ), которая, например, для ДДСН в водном растворе составляет 8 мМ. В этом случае в растворе электролита находятся преимущественно мицеллы и небольшая доля мономерной формы ПАВ. Мономеры состоят из гидрофобного «хвоста» и гидрофильной (в случае анионного поверхностно-активного вещества отрицательно заряженной) «головы». При формировании прямых мицелл мономерные фрагменты агрегируются неполярными концами внутрь, а внешняя сферическая поверхность мицеллы становится отрицательно заряженной. Каждая мицелла окружена собственным двойным электрическим слоем, внешнюю диффузную часть которого формируют катионы, присутствующие в растворе ведущего электролита. Число мономеров, образующих мицеллу, может колебаться от 60 до 100 молекул, однако общий заряд мицеллы существенно меньше из-за наличия в неподвижной части второго слоя ДЭС гидратированных катионов. Ни мицеллярная, ни мономерная форма АПАВ не взаимодействуют со стенкой кварцевого капилляра, но при подаче на капилляр высокого напряжения обе формы мигрируют к аноду, в то время как ЭОП направлен к катоду. Если в капилляр на анодной стороне ввести пробу, содержащую нейтральные и заряженные компоненты, то ЭОП будет переносить их к катоду, а навстречу будет двигаться поток отрицательно заряженных мицелл АПАВ. Нейтральные компоненты пробы могут распределяться между фазой раствора и мицеллярной фазой, причем константа этого распределения специфична для каждого сорта молекул пробы. В результате на выходе капилляра регистрируется электрофореграмма нейтральных компонентов, а также медленно мигрирующих анионов пробы.

Глава 3. Аппаратура

3.1. Общее устройство систем КЭ

Минимальный состав системы, реализующей метод капиллярного электрофореза, должен включать следующие узлы: кварцевый капилляр, источник высокого напряжения, устройство ввода пробы, детектор и систему сбора, обработки и вывода информации (рис. 5).

Дополнительными устройствами в системах капиллярного электрофореза являются, например, автосемплер и блок жидкостного охлаждения капилляра, которые позволяют:

- ▶ автоматизировать подачу образцов,
- ▶ осуществить эффективный отвод тепла от капилляра.

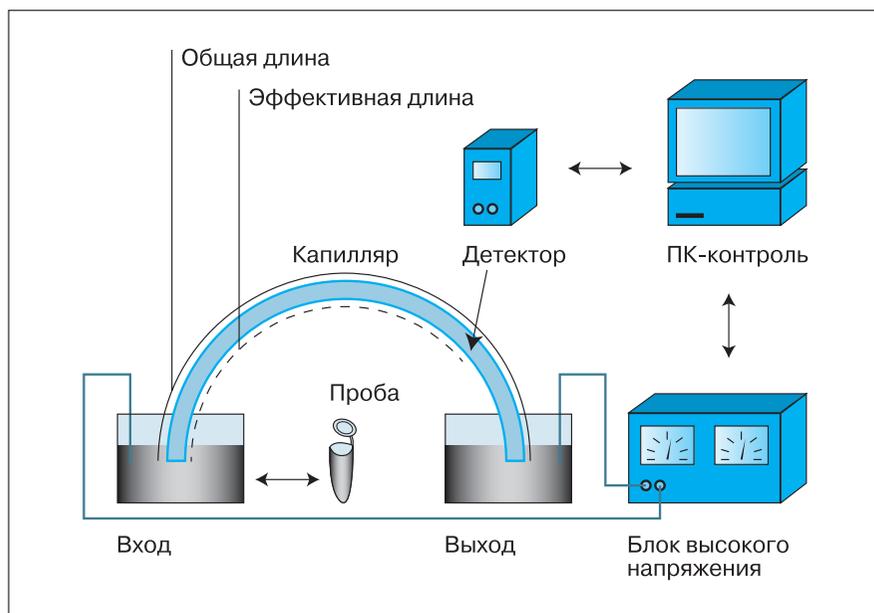


Рис. 5. Устройство системы капиллярного электрофореза.

3.2. Капилляры

В системах капиллярного электрофореза используют, как правило, капилляры из высокочистого плавленого кварца, прозрачного в УФ-области спектра, с внешним полимерным, чаще полиимидным, защитным покрытием. В случае детектирования внутри капилляра (on-line) полиимидное покрытие в зоне детектирования снимают, оставляя для прохождения света зону чистого кварца. Внутренний диаметр капилляров может варьироваться от 20 до 100 мкм, но чаще всего используют 50 и 75 мкм. Внешний диаметр составляет 365 мкм, длина капилляров 20–100 см. Различают общую ($L_{\text{общ}}$) и эффективную ($L_{\text{эфф}}$) длину капилляра: в первом случае речь идет о полной длине капилляра от входного до выходного конца, а во втором — об участке от входного конца до зоны детектирования (рис. 5).

Доминирующее число разделений в КЭ ведут на непокрытых изнутри капиллярах, так называемых немодифицированных. Их подготовка к анализу начинается, как правило, с промывки раствором щелочи для обеспечения диссоциации силанольных групп кварца и возникновения ЭОП. Тем не менее, анализ соединений, способных адсорбироваться на стенках кварцевого капилляра (например, белки, красители), или необходимость обращения ЭОП требуют использования покрытых капилляров (ковалентные покрытия или динамические).

Капилляр является сердцем системы КЭ, как хроматографическая колонка в ВЭЖХ. В принципе, кварцевый капилляр имеет неограниченный ресурс использования при соблюдении основных правил работы. Тем не менее, замена капилляра (или переход к другой геометрии или типу) возможна и представляет собой несложную процедуру. Важной характеристикой капилляра является состояние его концов, особенно в зоне ввода пробы: торцевой срез должен быть выполнен строго под углом 90° к боковым стенкам капилляра. В противном случае можно наблюдать пики с «хвостами» или невозпроизводимый ввод пробы.

Анализ методом КЭ можно проводить только тогда, когда капилляр находится в кондиционном состоянии. С точки зрения анализа кондиционное состояние капилляра следует понимать так, что выполняемые последовательно анализы должны быть воспроизводимы как по временам миграции пиков, так и по площадям пиков. Мы говорили выше, что общая скорость электромиграции иона складывается из двух величин: скорости движения иона под действием электрического поля и скорости движения ЭОП. Первая зависит от природы иона, а вторая — от свойств диффузной части двойного электрического слоя в капилляре, мерой которой является ζ -потенциал поверхности. Причиной нестабильности времен миграции может служить изменение диффузной части второй обкладки двойного электрического слоя. Различные примеси, которые могут находиться как в ведущем электролите, так и в растворах проб, сорбируясь на поверхности капилляра, уменьшают ζ -потенциал и, как следствие, увеличивают времена миграции компонентов. Сорбция может быть обратимой или практически необратимой в зависимости от химической природы примесей и состава ведущего электролита. Одновременно изменение времени миграции пика изменяет и его площадь (площадь пика пропорциональна времени миграции: поздно мигрирующие компоненты перемещаются через зону детектирования медленнее).

При подготовке к работе капилляр обычно промывают раствором кислоты, водой и раствором щелочи. Цель первой операции заключается в удалении с поверхности примесей, в частности, многовалентных катионов, и первичном гидролизе силоксановых групп. Промывка водой способствует удалению кислоты и дальнейшему гидролизу поверхности. Наконец, щелочная промывка предназначена для удаления примесей, не реагирующих с кислотой, и максимальной диссоциации образовавшихся силанольных групп. Финишная промывка водой имеет целью удалить из капилляра щелочь. Для того чтобы теперь привести очищенную и подготовленную поверхность в равновесие с раствором ведущего электролита, капилляр промывают собственно раствором ведущего электролита. При правильно проведенном кондиционировании времена миграции контрольных или тестовых веществ остаются постоянными при последовательных вводах. Если времена миграции тестовых веществ уменьшаются, это свидетельствует о недостаточном времени кондиционирования.

При анализе на поверхности кварца могут сорбироваться различные примеси: многовалентные катионы, склонные к образованию гидроксокомплексов, катионные поверхностно-активные вещества, вещества белковой природы, обладающие свойствами амфолитов, нефтепродукты, некоторые полимеры и т. п. Все они нарушают структуру диффузного слоя и уменьшают ζ -потенциал, что приводит к уменьшению скорости ЭОП и к увеличению времени миграции анализируемых ионов. Часть сорбированных примесей удаляется с поверхности при промывке раствором ведущего электролита (если сорбция обратимая), и тогда, подбирая время промывки, удается при последовательных анализах сохранять постоянными времена миграции компонентов. Если же в пробах имеются примеси, сорбирующиеся практически необратимо, приходится периодически промывать капилляр растворами, которые способны удалить накопившиеся примеси. Состав этих растворов следует выбирать, сообразуясь с химическими свойствами сорбированных веществ, и далее снова кондиционировать капилляр относительно раствора ведущего электролита. Часто более эффективным средством борьбы с такими примесями является их предварительное удаление на этапе подготовки пробы к анализу.

Наши более подробные рекомендации по подготовке капилляра к работе, проверке его кондиционного состояния, хранению, способах восстановления работоспособного состояния, замене изложены в главе 9 и в Приложениях Б и В.

3.3. Источники высокого напряжения

В первую очередь, источники напряжения должны обеспечивать регулируемую подачу напряжения в диапазоне от -25 до $+25$ кВ и при заданной величине напряжения поддерживать постоянство этого значения. Максимально допустимый ток в капилляре при этом не должен превышать 200 мкА. В целом, что касается величины тока в капилляре при анализе, ориентироваться можно на следующие данные:

<50 мкА	отлично
50–75 мкА	хорошо
75–100 мкА	нормально
100–125 мкА	допустимо
>125 мкА	плохо

Как правило, переключение полярности происходит в ручном режиме, что сопровождается сменой высоковольтных блоков. Тем не менее, существуют приборы с автоматическим переключением полярности, что в ряде анализов позволяет добиться эффекта концентрирования пробы на этапе ее ввода (внутри капилляра), так называемое on-line концентрирование.

Безопасность работы с высоким напряжением для человека и самой аппаратуры достигается автоматическим отключением напряжения при открывании крышки прибора или при достижении максимально допустимого тока нагрузки.

Запись кривых тока и напряжения (или визуальный контроль за их значениями на дисплее прибора или мониторе компьютера) может указать на случайные нарушения во время анализа и быть полезной при поиске ошибки.

3.4. Ввод пробы

Типичный объем вводимой пробы в капиллярном электрофорезе составляет 1–20 нл. Общепринято заполнять пробой не более 2 % объема капилляра с тем, чтобы изначально, до анализа, не создавать широкую зону компонентов и обеспечить достаточное время нахождения зоны пробы в капилляре для установления значимых различий в электрофоретических подвижностях.

Непосредственно перед вводом пробы капилляр промывают рабочим буферным раствором, удаляя остатки пробы от предыдущего ввода.

Различают три способа ввода пробы:

- ▶ гидродинамический,
- ▶ электрокинетический,
- ▶ гидростатический.

Первые два способа реализованы во всех коммерческих системах капиллярного электрофореза, гидростатический, напротив, не нашел широкого применения.

> *Ввод пробы давлением (гидродинамический, пневматический)* обеспечивается созданием разницы давлений между сосудом для пробы и выходным концом капилляра, при этом давление либо повышается в сосуде для пробы, либо снижается на конце капилляра. Первый вариант наиболее распространен в коммерческих системах КЭ, в том числе в приборах «Капель». Объем вводимой пробы зависит только от разницы давлений и времени ввода пробы, при временах ввода порядка нескольких секунд разность давлений лежит в области нескольких миллибар (1000 мбар \approx 1 атм). Не зная точного значения объема введенной пробы, мы, тем не менее, всегда уверены в точности дозирования, поскольку все системы КЭ оперируют величиной произведения давления на время ввода. Гидродинамический способ ввода не нарушает состав пробы, что позволяет вводить пробу из одной пробирки несколько раз.

Важно! Последовательность операций при гидродинамическом вводе: сначала на выходе погружают конец капилляра в рабочий буферный раствор, затем на входе — в пробу. Автоматически или в ручном режиме вводят пробу, после чего на входе заменяют пробу на рабочий буфер и переходят к анализу.

> *Электрокинетический ввод пробы.* При этом способе ввод пробы осуществляется путем подачи высокого напряжения на электроды, когда на входе установлена пробирка с раствором пробы, а на выходе — с рабочим буфером. За счет возникающего при этом ЭОП компоненты пробы перемещаются в капилляр. Количество введенной пробы при этом способе зависит от величины приложенного напряжения, времени, в течение которого приложено напряжение, и подвижности компонентов пробы. Особенностью этого ввода пробы является то, что компоненты с большей подвижностью будут концентрироваться в капилляре по сравнению с малоподвижными ионами, которые в случае недостаточного времени ввода, вообще могут не попасть в капилляр. Т. е. по сравнению с гидродинамическим способом ввода мы имеем в большей или меньшей степени дифференциацию состава пробы в капилляре и в исходном растворе. Это означает, что электрокинетический способ ввода пробы подразумевает только однократный ввод образца из одной пробирки. Этот способ ввода пробы наименее воспроизводим.

> *Гидростатический ввод пробы.* В этом способе для ввода пробы используют разницу в высоте между буферным сосудом и сосудом для проб. Гидростатическое давление способно создать поток жидкости в капилляре («сифонный» эффект) и, следовательно, ввести пробу в капилляр. Вводимое количество пробы зависит от разницы в высоте (обычно 5–10 см), времени (5–45 с.) и гидродинамических свойств раствора электролита и пробы (вязкость, плотность). Попутно отметим, что гидростатическое давление может послужить причиной невоспроизводимости времен миграции, если во время анализа уровни буферного раствора во входной и выходной пробирках окажутся разными. Поэтому необходимо обращать внимание на правильное заполнение пробирок раствором ведущего электролита перед анализом (равными порциями, например по 500 мкл), своевременное их перезаполнение (через 5–7 анализов), а также следует тщательно выверять установку прибора на горизонтальной плоскости.

Примечание. Используя тот или иной способ ввода пробы, следует иметь в виду объемную и концентрационную перегрузку капилляра, которые оказывают влияние на уширение зон компонентов в ходе анализа и, следовательно, снижают эффективность разделения. Объемная перегрузка возникает при слишком большом времени ввода, а концентрационная — при вводе растворов с высокой концентрацией анализируемых компонентов.

3.5. Детекторы

Некоторые характеристики методов детектирования, используемых в капиллярном электрофорезе, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Некоторые характеристики методов детектирования, применяемых в КЭ.

Детектирование	Селективность	Универсальность	Качественная информация о веществе	Детектирование в капилляре	Примерный предел детектирования, моль/л	Примерный процент использования, %
фотометрическое в УФ-В области спектра (прямое)	+	–	+*	+	10^{-5} – 10^{-7}	55
фотометрическое в УФ-В области спектра (косвенное)	–	+	–	+	10^{-4} – 10^{-6}	5
флуориметрическое (прямое)	+	–	–	+	10^{-7} – 10^{-9}	15
флуориметрическое (косвенное)	–	+	–	+	10^{-6} – 10^{-8}	2
флуориметрическое (индуцированное лазером)	+	–	–	+	10^{-13} – 10^{-16}	5–7
масс-спектрометрическое	+	+	+	–	10^{-8} – 10^{-10}	10
амперометрическое (прямое)	+	–	–	–	10^{-7} – 10^{-10}	2
амперометрическое (косвенное)	–	+	–	–	10^{-6} – 10^{-8}	<1
кондуктометрическое	–	+	–	–	10^{-7} – 10^{-9}	<1
рефрактометрическое	–	+	–	+	10^{-6} – 10^{-8}	<1
радиометрическое	+	–	–	+	10^{-10} – 10^{-12}	<1

* диодная матрица

Указанные пределы детектирования позволяют оценить чувствительность того или иного детектора, при этом следует учитывать, что предел обнаружения определяется большим числом параметров, включая объем вводимой пробы, эффективность разделения, температурные эффекты, физико-химические свойства анализируемых веществ (молярный коэффициент поглощения, квантовый выход и т. п.) и другие.

Детектирование в системах капиллярного электрофореза может осуществляться различными способами:

- ▶ непосредственно в капилляре в части, близкой к выходному концу, в режиме реального времени (*on-capillary*). В зоне детектирования с внешней стенки капилляра снимают защитное полиимидное покрытие. Этот способ характерен для большинства коммерческих систем капиллярного электрофореза;
- ▶ непосредственно на выходном конце капилляра (*end-capillary*);

- ▶ вне системы КЭ (*off-capillary*, при этом, как правило, детектор представляет собой отдельный самостоятельный прибор (например, масс-спектрометр) и соединен с системой капиллярного электрофореза специальным интерфейсом).

В капиллярном электрофорезе используют те же принципы детектирования, что и в ВЭЖХ. Важным преимуществом КЭ перед ВЭЖХ, помимо плоского профиля ЭОП, о котором мы уже упоминали выше, является отсутствие соединительных гидравлических линий между узлами *ввод пробы—капилляр* и *капилляр—детектор*, которые в случае ВЭЖХ могут приводить к уширению зоны вещества за счет внекolumnочного размывания.

Основными принципами детектирования в КЭ являются:

- ▶ фотометрическое в УФ-видимой области спектра (прямое и косвенное),
- ▶ флуориметрическое (прямое и косвенное),
- ▶ масс-спектрометрическое,
- ▶ кондуктометрическое,
- ▶ амперометрическое (прямое и косвенное),
- ▶ радиометрическое,
- ▶ рефрактометрическое.

Мы остановимся только на тех, которые реализованы в системах капиллярного электрофореза «Капель».

Наиболее распространенным вариантом детектирования продолжает оставаться фотометрическое, основанное на поглощении веществом УФ или видимого света. Фотометрические детекторы в КЭ, как и в ВЭЖХ, подразделяют на:

› *Детекторы с фиксированной длиной волны*: источники света с линейчатым спектром (ртутная лампа (254 нм), кадмиевая лампа (229 нм) и цинковая лампа (214 нм)). Это наиболее простые и недорогие системы; в приборах «Капель-103, -104» фотометрический детектор работает на длине волны 254 нм (строго 253,7 нм), поэтому отклик детектора будет наблюдаться только в том случае, если определяемый компонент имеет заметное поглощение на указанной длине волны. Этот случай называется прямым детектированием, электрофореграмма представляет собой набор положительных пиков, возвышающихся над базовой линией. Круг определяемых веществ достаточно широк и включает органические соединения с ароматической структурой, соединения с сопряженными двойными связями, некоторые неорганические соединения и др.

› *Детекторы с изменяемой длиной волны*: источниками света служат дейтериевые и вольфрамовые лампы (рабочий диапазон длин волн 190–350 нм и 340–850 нм, соответственно). Необходимая спектральная селекция достигается применением монохроматоров или узкополосных светофильтров.

› *Детекторы на диодной матрице (ДМД)*. В таких детекторах световой поток, прошедший через капилляр, разлагается в спектр с помощью высококачественного светосильного монохроматора, а матрица фотодиодов постоянно регистрирует сиг-

налы в ультрафиолетовой и видимой частях спектра (УФ-В-детекторы), обеспечивая запись в режиме сканирования. Данные, полученные одновременно на различных длинах волн (до 5), обрабатываются с помощью компьютеров, выделяющих сигнал на оптимальной длине волны и вычитающих фон. Применение детекторов на диодной матрице обеспечивает получение аналитических данных с гораздо большей степенью достоверности. Например, при определении гомогенности пика (однородности, *peak purity*) осуществляется спектральный контроль в максимуме и по обоим склонам пика. Если пик однороден, то все три спектра будут идентичны. Для данного вещества отношение высот пиков на электрофореграммах, записанных при двух различных длинах волн, есть величина постоянная. Гомогенность пика можно проверить также при сравнении параметров миграции анализируемого вещества, полученных при двух разных длинах волн (для ДМД обе электрофореграммы могут быть получены в ходе одного анализа). Идентификацию пика проводят путем сравнения времен миграции и спектров стандарта и компонента проанализированной пробы.

Для соединений, анализируемых с помощью КЭ и не поглощающих в УФ-диапазоне, существует возможность регистрации методом *косвенного УФ-детектирования*. В этом случае в состав ведущего электролита вводят небольшое количество хромофора — вещества, поглощающего на требуемой длине волны. Так, в случае определения анионов поглощающий ион тоже должен быть анионом, например, хромат-ион, фталат-ион, а при определении катионов чаще всего используют катионы ароматических аминов или гетероциклов, в частности, ион протонированного бензимидазола. Так как ионная сила ведущего электролита в процессе разделения остается постоянной, в зоне, где находится непоглощающий ион, уменьшается концентрация поглощающего иона. Обмен происходит строго эквивалентно, на электрофореграмме наблюдаются обратные (отрицательные) пики, площади которых пропорциональны концентрациям определяемых ионов. Косвенное УФ-детектирование является универсальным вариантом детектирования, т. к. позволяет регистрировать все присутствующие в анализируемом растворе компоненты.

3.6. Системы сбора и обработки данных

Для записи электрофоретических данных можно использовать:

- ▶ самописец (аналоговый сигнал),
- ▶ принтер (через LPT- или USB-порт, встроенный в прибор),
- ▶ компьютер (через АЦП или встроенный в прибор RS 232 или USB-порт).

Безусловно, первые два способа являются очень трудоемкими при обработке данных, кроме того, характеризуются большими погрешностями измерения площадей или высот пиков, и в настоящее время уже не используются. Все коммерческие приборы КЭ на сегодняшний день комплектуются собственными или заимствованными программными продуктами, позволяющими записывать данные, проводить их качественную и количественную обработку, формировать отчеты. Некоторые из этих программ способны также управлять системами капиллярного электрофореза.

3.7. Автосемплеры

После загрузки в автосемплеры образцов пробы, рабочих буферов и вспомогательных растворов можно проводить измерения в автоматическом режиме по заданным программам. В коммерческих системах автосемплеры реализованы в самых различных видах: единый блок с большим количеством разных или одинаковых по объему ячеек или отдельные автосемплеры для входного и выходного узлов прибора.

3.8. Системы термостабилизации

Термостатирование служит, главным образом, для отведения Джоулева тепла. Самым простым вариантом охлаждения капилляра является сильный обдув комнатным воздухом. Кроме того, используют воздушные и жидкостные системы термостатирования капилляров, температура при этом может варьироваться от +4 до +70 °С и поддерживаться постоянной на уровне 0,1 °С. В коммерческих приборах, как правило, термостатируют только капилляры (или их часть), а в сосуде для буфера не всегда поддерживается такая же температура, как в капилляре. В ряде приборов имеется возможность термостатировать автозагрузчик пробы, что особенно полезно при анализе термолабильных образцов.

Глава 4. Эффективность, чувствительность, разрешение и селективность в капиллярном электрофорезе

Капиллярный электрофорез относится к группе комбинированных методов анализа, в которых объединены два основных процесса: предварительное разделение компонентов сложной смеси и их определение/детектирование. Важными характеристиками разделения являются разрешение, эффективность и селективность. Для конечного определения наиболее актуален параметр чувствительности, в первую очередь зависящий от типа используемого детектора.

В этой главе будут рассмотрены основные факторы, влияющие на разделение, и пути повышения чувствительности определения.

4.1. Эффективность разделения

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью. Эффективность N , выраженная числом теоретических тарелок, может быть определена непосредственно из электрофореграммы по уравнению (1):

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

где t_m — время миграции аналита,
 $w_{1/2}$ — ширина пика на половине высоты.

Какие же факторы оказывают влияние на эффективность разделения в капиллярном электрофорезе? Основными причинами, приводящими к снижению N , являются:

> *величина зоны вводимой пробы*, определяемая длительностью ввода: в идеале она должна быть как можно меньше, однако, достижение низких пределов обнаружения требует увеличения объема пробы или ее концентрирования;

> *температурный градиент*, при наложении электрического поля в капилляре, заполненном буфером, протекает электрический ток, величина которого зависит от удельной проводимости буфера и диаметра капилляра. Отвод тепла происходит через стенки капилляра, что приводит к возникновению в буфере радиального температурного градиента. Разница в температуре между серединой и стенками капилляра возрастает пропорционально квадрату диаметра капилляра. Температура в центре капилляра может быть на 10 °С выше, чем на внутренней стенке. Возникающий вследствие этого градиент вязкости приводит к тому, что вещество у стенки перемещается медленнее, чем в центре, что влечет за собой уширение полос и снижение эффективности;

> *адсорбция на стенках капилляра*; взаимодействие веществ со стенками капилляра, ведущее к искажению формы пиков (появление «хвостов»);

> различия в электропроводности пробы и ведущего электролита: уширение пика, обусловленное электрофоретическими эффектами, пропорционально проводимости (и, таким образом, ионной силе) раствора образца относительно буфера. В случае высокой концентрации пробы сила электрического поля (и, следовательно, линейные скорости) в зоне образца много ниже, чем в ведущем электролите. Благодаря этому происходит разбавление образца (дестэкинг) — уширение. Обратная ситуация в соотношении проводимостей (стэкинг), наоборот, приводит к формированию узких пиков на электрофореграмме;

> наличие гидродинамического потока из-за различия в уровне жидкостей (незначительная разность между уровнями буферов во входном и выходном сосудах приводит к возникновению гидродинамического потока с параболическим профилем; чем больше диаметр капилляра, тем значительней это сказывается на эффективности разделения).

Всеми этими параметрами можно управлять, создавая оптимальные схемы разделения.

Примечание. Такой фактор как продольная диффузия в капиллярном электрофорезе практически не привносит вклад в уширение зоны вещества, что обусловлено, в первую очередь, плоским профилем ЭОП.

4.2. Чувствительность метода

Основным способом детектирования в капиллярном электрофорезе является фотометрический, чувствительность которого не всегда достаточна, поскольку:

- ▶ детектирование происходит в слое малой толщины (что обусловлено внутренним диаметром капилляра);
- ▶ вводят очень малые объемы пробы.

Подходы к увеличению чувствительности можно разделить на 3 категории:

- ▶ стратегия концентрирования образца;
- ▶ увеличение длины оптического пути;
- ▶ использование высокочувствительных селективных детекторов.

> *Стэкинг (stacking)* — один из наиболее общих подходов к увеличению концентрационной чувствительности в КЭ. Стэкинг образца происходит, когда ионы аналитов пересекают границу, которая отделяет зону низкой проводимости раствора образца и высокой — ведущего электролита. В случае если матрица образца имеет значительно более низкую проводимость (обычно за счет разбавления буфером или водой), чем ведущий электролит, в зоне образца возникает относительно высокое электрическое поле. Аналиты внутри зоны образца движутся с более высокой локальной скоростью, и, замедляясь на границе с зоной ведущего электролита концентрируются. Стэкинг образца применителен только к заряженным анализам.

> *Сви́пинг (sweeping)* — техника концентрирования нейтральных частиц в МЭКХ, суть которой заключается в том, что аналиты концентрируются псевдостационарной

фазой (мицеллой), которая проникает в зону образца, где псевдостационарная фаза отсутствует. При этом (в отличие от стэкинга) проводимость раствора образца близка проводимости ведущего электролита. В ряде случаев сви́пинг позволяет получать 100-кратные концентрирования (on-line) без использования стадии предварительного концентрирования пробы.

Чувствительность метода КЭ с УФ-детектированием может быть повышена за счет увеличения длины оптического пути при использовании капилляров с расширенным световым путем. Предложено несколько способов: зону детектирования выполняют в форме пузырька (*bubble cell*), используют капилляры Z-формы (*Z-shaped capillaries*). Увеличение внутреннего диаметра капилляра в зоне детектирования позволяет вырасти сигналу в 3–5 раз, применение Z-ячейки позволяет увеличить чувствительность в 20–40 раз.

Увеличению чувствительности определения способствует также снижение уровня шума детектора. На этом пути разработчики фирмы «Люмэкс» добились ощутимых результатов в деле стабилизации светового потока ламп и адекватного учета флуктуаций интенсивности потоков в каналах фотометра.

4.3. Разрешение и селективность разделения

Конечной целью любого сепарационного метода является полное или частичное разделение компонентов пробы, характеризующееся параметром R_s (разрешение). Чаще всего в капиллярном электрофорезе разрешение двух компонентов определяют так же, как в ВЭЖХ:

$$R_s = \frac{2 \times (t_1 - t_2)}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

где t_1 и t_2 — времена миграции первого и второго компонента, мин.;
 w_1 и w_2 — ширина пиков 1 и 2 при основании, мин.

Разрешение в КЭ, в первую очередь, управляет эффективностью, а не селективностью. В этом заключается важное отличие КЭ от ВЭЖХ, где картина прямо противоположная. Благодаря узким зонам компонентов в капиллярном электрофорезе даже очень малые различия в электрофоретической подвижности веществ (в некоторых случаях <0,05 %) оказываются достаточны для полного разделения.

Если выразить R_s через эффективность:

$$R_s = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \right) \quad (3)$$

где $\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2$

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2}$$

то становится очевидным, что в противоположность эффективности, линейно возрастающей при увеличении рабочего напряжения, разрешение будет расти не так заметно.

Существующее многообразие вариантов капиллярного электрофореза обеспечивает различную селективность разделения вследствие отличающихся механизмов разделения. Так, в зонном варианте КЭ при разделении компонентов 1 и 2 фактор селективности (α) определяется выражением:

$$\alpha = \mu_1 / \mu_2 \quad (4)$$

где μ_1 — электрофоретическая подвижность компонента 1,

μ_2 — электрофоретическая подвижность компонента 2.

При концентрации ПАВ в растворе электролита больше ККМ реализуется вариант мицеллярной электрокинетической хроматографии с главным принципом разделения на основе распределения компонентов пробы между гидрофильной (водной) и гидрофобной (мицеллярной) фазами, селективность которого будет определяться отношением факторов емкости двух компонентов: $\alpha = k'_2 / k'_1$. В свою очередь, k' в режиме МЭКХ можно найти по уравнению (5):

$$k' = \frac{t_a - t_0}{t_0 \times \left(1 - \frac{t_a}{t_m}\right)} \quad (5)$$

где t_a — время удерживания анализируемого вещества,

t_0 — время удерживания компонента, абсолютно не удерживаемого мицеллой,

t_m — время удерживания компонента, полностью удерживаемого мицеллой.

Для нахождения t_0 и t_m в пробу вводят маркер ЭОП (ацетон) и метку мицелл (судан 3 или судан 4), соответственно.

Несмотря на высокую эффективность, достигаемую в капиллярном электрофорезе, селективность разделения, особенно в зонном варианте может быть недостаточна, в первую очередь, из-за осуществления процесса разделения внутри одной фазы. Задача повышения селективности разделения в том или ином варианте КЭ требует знания факторов, ее определяющих, и может быть решена за счет изменения pH ведущего электролита, введения в состав буфера различных добавок, например, ПАВ, макроциклов, органических растворителей (более полная информация о добавках представлена в табл. 3). Следует иметь в виду, что все эти факторы будут сказываться также на скорости ЭОП, однако, сам по себе электроосмотический поток не ответственный за изменение селективности разделения и определяет лишь изменение времени миграции (на равную величину для всех компонентов пробы).

Таблица 3. Факторы, определяющие параметры разделения в капиллярном электрофорезе.

Параметры, влияющие на селективность	Характер влияния
pH ведущего электролита	изменение формы нахождения вещества (заряда), скорости ЭОП
ионная сила ведущего электролита	изменение скорости ЭОП
вязкость буфера	изменение скорости ЭОП
напряжение, кВ	скорость и направление ЭОП и электромиграции ионов, градиент температуры в капилляре
способ ввода пробы (гидродинамический, электрокинетический) и его параметры	селективное концентрирование при вводе пробы, объемная и концентрационная перегрузка системы разделения
геометрические характеристики кварцевого капилляра	изменение времени нахождения зоны вещества в капилляре и скорости ЭОП градиент температуры
температура	вязкость электролита химические равновесия, сольватация
добавки в ведущий электролит (их природа и концентрация), смешанные добавки:	комплексобразование, распределение аналитов между «фазами», образование ионных пар, сольватация
▶ ПАВ	▶ мицеллообразование при концентрации >ККМ ▶ ион-парные взаимодействия ▶ модификация ЭОП
▶ органические растворители	▶ изменение скорости ЭОП (чаще снижение) ▶ сольватация
▶ макроциклы	▶ образование комплексов включения ▶ растворимость гидрофобных компонентов ▶ хиральное распознавание

Выбор ведущего электролита является чрезвычайно важной задачей для успешного разделения в любом варианте КЭ. Величина pH ведущего электролита определяет как скорость течения жидкости в капилляре (величину ЭОП), так и форму нахождения компонента в растворе (заряд). Чувствительность ЭОП к изменению pH раствора заставляет использовать ведущие электролиты с высокой буферной емкостью, при этом диапазон pH, как правило, имеет значения $pK_a \pm 1$. Благодаря высокой стабильности кварцевого капилляра при электрофоретическом разделении можно использовать буферные системы с pH от 2 до 12. В табл. 4 приведены наиболее распространенные электролиты.

Таблица 4. Наиболее распространенные буферные системы в КЭЭ.

Буфер	pK _a
фосфатный	2,12 (pK _{a1})
ацетатный	4,75
имидазольный	7,00
фосфатный	7,21 (pK _{a2})
TRIS (триоксиметиламинометан)	8,30
боратный	9,24
CHES (2-[N-циклогексиламино]этансульфоная кислота)	9,50

Идеальный буфер для капиллярного электрофореза должен обладать следующими свойствами:

- ▶ достаточная буферная емкость в выбранном диапазоне pH,
- ▶ малое поглощение на длине волны детектирования,
- ▶ низкая подвижность ведущего иона.

Список так называемых «подходящих» буферов возглавляют боратный буфер и TRIS, так как они могут использоваться в широком диапазоне концентраций без существенного увеличения тока, что позволяет, в свою очередь, применять максимально высокие напряжения в ходе анализа.

Среди используемых в капиллярном электрофорезе добавок наиболее популярны поверхностно-активные вещества. Их введение в состав буферных растворов позволяет в разной степени влиять на селективность, причем определяющими факторами являются тип ПАВ и его концентрация. В КЭЭ могут быть использованы как ионогенные (катионные (КПАВ) и анионные (АПАВ), а также цвиттер-ионные), так и нейтральные поверхностно-активные вещества.

При концентрации ниже ККМ мономерные формы ионогенных ПАВ могут выступать как ион-парные добавки (различные АПАВ, КПАВ), а также влиять на растворимость гидрофобных компонентов смеси и модифицировать стенки капилляра (например, ЦТАБ). Возможные при этом механизмы взаимодействий поверхностно-активного вещества и пробы — ионные и/или гидрофобные. Добавки ПАВ в ведущий электролит влияют не только на поведение зоны пробы в капилляре, но и на стенки самого капилляра, модифицируя ЭОП (уменьшая, увеличивая или обращая).

Органические растворители (метанол, ацетонитрил, изопропанол и др.), которые вводят в буферный раствор в концентрации от нескольких долей процента до 30 % (об.) могут, с одной стороны, повышать растворимость анализируемых соединений, делая капиллярный электрофорез пригодным для анализа веществ с ограниченной растворимостью в водных средах. С другой стороны, органические добавки могут уменьшать гидрофобные взаимодействия между анализируемым компонентом и мицеллой в МЭКХ, а также влиять на подвижность ЭОП и собственную электрофоретическую подвижность аналита.

Макроциклические реагенты как компоненты ведущих электролитов широко распространены в КЭЭ. Макроциклическими называют циклические органические соединения, молекулы которых содержат не менее 9 атомов в цикле, причем не ме-

нее 3 из них — гетероатомы. В качестве последних чаще всего выступают O, N и S. К макроциклическим соединениям относят циклодекстрины, краун-эфиры, криптанды, каликсарены и др. Все они способны взаимодействовать как с неорганическими веществами, так и с органическими субстратами различной природы, при этом происходит включение фрагментов анализируемых веществ в полость макроцикла (МЦ). В образующихся при этом комплексах включения по типу «гость—хозяин» «хозяином» служит макроцикл, а «гостем» — субстрат. В зависимости от своего строения МЦ могут связывать молекулярные, катионные или анионные субстраты. Движущей силой ассоциации макроцикла и субстрата могут быть нековалентные взаимодействия самых разных типов: ион-ионные, ион-дипольные, гидрофобные, водородные связи. Соотношение размеров полости МЦ и субстрата, конформация макроцикла и возможность ее изменения при комплексообразовании, а также природа и концентрация используемого макроцикла считаются важными факторами, влияющими на селективность разделения.

Некоторые макроциклические реагенты (краун-эфиры, циклодекстрины и макроциклические антибиотики) могут выступать также в качестве хиральных селективов. В капиллярном электрофорезе они являются составной частью ведущего электролита, и селективность разделения будет определяться типом и концентрацией макроцикла, а также добавками органических модификаторов, ПАВ и температурой. Использование макроциклических добавок как для хиральных, так и ахиральных разделений возможно в зонном и мицеллярном вариантах, причем селективность последнего будет выше за счет распределения компонентов смеси между тремя фазами: водной, псевдостационарной мицеллярной и псевдостационарной фазой макроцикла.

Глава 5. Обработка результатов в капиллярном электрофорезе. Качественный и количественный анализ

Целью любого анализа является получение ответов на вопросы: какие компоненты присутствуют в анализируемом образце и какова величина их концентраций? Первый из вопросов есть задача *качественного* анализа, второй — *количественного*. Для решения обеих задач в КЭ перед анализом пробы обязательно проводят процедуру градуировки системы путем измерения одной или нескольких смесей с известным качественным и количественным составом. Результатом градуировки являются формирование таблицы компонентов (содержит времена миграции и имена определяемых компонентов) и построение *градуировочной зависимости* (показывает зависимость сигнала детектора от концентрации/содержания вещества).

В капиллярном электрофорезе используют те же принципы интегрирования пиков, методы градуировки, способы формирования отчетов, как в газовой хроматографии и ВЭЖХ. По аналогии с ВЭЖХ большинство детекторов в капиллярном электрофорезе являются концентрационными, для которых высота или площадь пика прямо пропорциональны концентрации вещества, образующего пик.

5.1. Качественный анализ. Характеристики миграции/удерживания

Качественный анализ обычно состоит в сравнении времен миграции (в случае капиллярного зонного электрофореза) или времен удерживания (в случае мицеллярной электрокинетической хроматографии), полученных для стандарта и пробы, измеренных в одинаковых условиях. Если эти времена совпадают с заданной точностью (обычно окно идентификации не превышает 5 %), то считают, что искомое вещество в пробе найдено и переходят к количественному анализу. Тем не менее, такой способ идентификации вещества не всегда надежен, особенно в случае анализа проб со сложной матрицей.

Несмотря на высокую разделительную способность капиллярного электрофореза, качественный анализ близкорасположенных пиков может вызывать некоторые трудности. В этом случае можно рекомендовать использование метода добавок. В пробу, для которой затруднена идентификация анализируемого вещества, вносят это вещество и проводят повторный анализ. Если на электрофореграмме появляется новый пик, это означает, что анализируемый компонент ранее в пробе отсутствовал. Если же один из бывших пиков увеличился по высоте (площади), то можно утверждать, что это и есть анализируемый компонент. Величину добавки обычно выбирают так, чтобы высота (площадь) интересующего нас пика увеличилась не более чем в 2–3 раза.

Зачастую приходится сталкиваться с ситуацией, когда время миграции компонента не стабильно от анализа к анализу, что связано, в том числе, с нестабильностью электроосмотического потока. Причин этому несколько, от недостаточно кондиционного состояния капилляра, использования модификации внутренней поверхности капилляра или введения добавок в состав буферного электролита до температурных эффектов и влияния матричных и сопутствующих компонентов. Использование в таких ситуациях маркера ЭОП (например, ацетона) как в растворе стандарта, так и в пробе, позволит вычислить *исправленные времена миграции*, представляющие собой разность времен миграции анализируемого вещества и метки ЭОП.

Еще одним из вариантов повышения достоверности идентификации анализируемого компонента является введение в стандартный раствор и раствор пробы маркера — внутреннего стандарта. Это должно быть вещество, заведомо отсутствующее в анализируемых пробах, но имеющее схожие с определяемым веществом физико-химические свойства. Для стандарта и пробы вычисляют относительные времена миграции (можно арифметически поделить время миграции компонента на время миграции ЭОП и, наоборот, но для пробы и для стандарта это должно быть сделано одинаково) и находят в пробе близкие по численному значению результаты.

Наиболее полную и достоверную идентификацию вещества на сегодняшний день можно получить при использовании диодно-матричного детектора, который по результату одного анализа может предоставить информацию:

- ▶ по сопоставлению времени миграции вещества и его спектра в пробе и стандартном растворе (при этом дополнительно будет дана оценка чистоты пика пробы, например, по наложению спектров, снятых в трех точках пика: на обоих склонах и в максимуме);
- ▶ по отношению откликов пика (например, площади) на двух разных длинах волн, полученных для стандарта и пробы. Для одного и того же вещества на двух разных длинах волн *при неизменном времени миграции* отношение площадей в стандартном растворе и растворе пробы должно быть постоянным. Длины волн выбирают так, чтобы компонент имел при этом разное поглощение, т. е. высота или площадь пика при двух разных длинах волн были бы различными.

Примечание. Известно, что и площадь и высота пика определяются величиной введенной в капилляр пробы. В то же время площадь пика зависит от ЭОП и электрофоретической подвижности иона, которые влияют на его скорость. Чем медленнее движется ион по капилляру, тем шире в конечном итоге пик и больше его площадь. Для корректировки нестабильности скорости движения иона в предыдущем варианте идентификации можно рекомендовать сравнивать для двух разных длин волн отношения площади пика к его времени миграции.

Принято также считать, что использование электрофоретической подвижности вместо времени миграции позволяет корректно идентифицировать компоненты сложных смесей.

Мы уже упоминали, что в варианте МЭКХ по сравнению с капиллярным зонным электрофорезом из-за различий в принципе разделения качественную характеристику вещества называют временем удерживания, а не временем миграции. Однако для большей корректности в МЭКХ в качестве идентификационного параметра рекомендуют использовать фактор емкости k' (формула 5, с. 40).

5.2. Количественная обработка результатов анализа

Как было сказано выше, количественный анализ в капиллярном электрофорезе принципиально не отличается от такового в ВЭЖХ, поскольку в основе лежит прямо пропорциональная зависимость высоты (площади) пика от концентрации вещества при использовании концентрационных детекторов, какими являются, например, фотометрические и флуориметрические детекторы.

Суть количественного определения сводится к следующему: сначала выбирают метод градуировки (внешнего стандарта (абсолютной градуировки), внутреннего стандарта, метод добавок и т. д.); определяют какую величину отклика детектора — высоту пика или площадь пика — будут использовать; затем анализируют стандартные растворы с известными концентрациями веществ и для каждого компонента строят градуировочную зависимость отклика детектора от концентрации вещества; после чего анализируют пробу неизвестного состава и по градуировочному графику находят концентрацию определяемых веществ.

Основным методом градуировки является *метод внешнего стандарта* (абсолютной градуировки), для которого необходимо иметь ГСО или химически чистые стандарты всех определяемых компонентов. Градуировка может быть одноточечной и многоточечной. Одноточечная означает, что для градуировки компонента используется только один градуировочный раствор, зависимость носит строго линейный характер и, как правило, выходит из начала координат. Это частный случай многоточечной градуировки, для построения которой анализируют несколько специально подобранных по концентрациям градуировочных растворов, после чего с помощью метода наименьших квадратов рассчитывают коэффициенты прямой, наилучшим образом описывающей экспериментальные данные. Правильное и тщательное проведение градуировки является необходимым условием точности получаемых количественных результатов анализа.

Современные программные комплексы позволяют собирать и обрабатывать электрофоретические данные, хранить их, а также формировать и выдавать отчеты. Такие программные продукты предлагают на выбор самые разные варианты проведения качественного и количественного анализа, от стандартных до эксклюзивных. В качестве примера можно привести программу «МультиХром[®]» фирмы «Амперсенд» (Москва), которая ориентирована, в первую очередь под ВЭЖХ, но практически идеально подходит и для капиллярного электрофореза. Мы рекомендуем эту программу для систем капиллярного электрофореза «Капель-103Р, -103РТ, -104, -104Т, -105»). Приборы «Капель» модификации «М» снабжаются собственным программным продуктом «Эльфоран[®]», который, наряду со сбором и обработкой данных, позволяет также управлять самой системой капиллярного электрофореза.

Глава 6. Объекты для анализа методом КЭ. Подготовка пробы

Первые аналитические приложения капиллярного электрофореза были связаны с разделением полярных заряженных компонентов: наиболее подходящими оказались неорганические катионы и анионы, а также низкомолекулярные карбоновые кислоты. В это же время происходит частичная замена традиционного электрофореза его капиллярным исполнением, поэтому КЭ начинают использовать в биотехнологии для анализа макромолекул: белков, углеводов, нуклеиновых кислот. Еще одной важной областью применения КЭ стала фармация: оценка чистоты лекарственных препаратов и хиральные разделения до сегодняшнего дня в мире на 90 % выполняются различными вариантами капиллярного электрофореза.

Развитие новых возможностей метода привело к расширению круга соединений, доступных для анализа с использованием КЭ. Например, повышение чувствительности определения как за счет появления современных способов детектирования (индуцированная лазером флуоресценция и масс-спектрометрия), стэкинга, так и вследствие разработки экспрессных вариантов концентрирования пробы (твердофазная экстракция) обеспечили доступ капиллярному электрофорезу к следовому анализу. Разработка принципов неводного КЭ позволила снять ограничение по растворимости анализируемых образцов в водных системах.

Для образцов неизвестного состава можно применить следующую схему предварительного анализа с помощью метода капиллярного электрофореза (рис. 6).

Первым этапом любого анализа, в том числе с использованием метода капиллярного электрофореза, является отбор и подготовка пробы. Отобранная проба должна быть представительной (т. е. не отличаться по качественному и количественному составу от анализируемого материала), а процедура отбора пробы — легко воспроизводимой. При необходимости проводят консервацию пробы. Время хранения отобранных проб перед анализом должно быть минимальным, а условия и способы хранения должны исключать неконтролируемые изменения состава пробы за счет испарения, окисления и фотодеградаци и т. д.

На этапе подготовки пробы к анализу проводят удаление мешающих веществ, выделение и концентрирование определяемых соединений, их превращение в более удобные аналитические формы (необходимость выполнения всех или только некоторых из перечисленных процедур обуславливается природой анализируемого объекта и свойствами содержащегося в нем доминирующего вещества). Так, например, зонный вариант капиллярного электрофореза с косвенным УФ-детектированием позволяет анализировать неорганические анионы в водных объектах на уровне десятых долей мг/л при прямом определении. В этом случае подготовка образца воды (питьевой, природной и сточной) к КЭ-анализу будет заключаться в фильтровании пробы через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и дегазировании фильтрата путем его центрифугирования (4–5 тыс. об/мин., 2 мин.). Однако, с целью повышения чувствительности и селективности метода КЭ, прибегают к следующим способам отделения пробы от ее матрицы: адсорбции; твердофазной и жидкофазной экстракции, СВЧ-минерализации и др. При этом часто используют комбинацию отдельных названных методов и их разновидностей, включая обработку порции анализируемого материала специфическими химическими реагентами (derivatизацию).

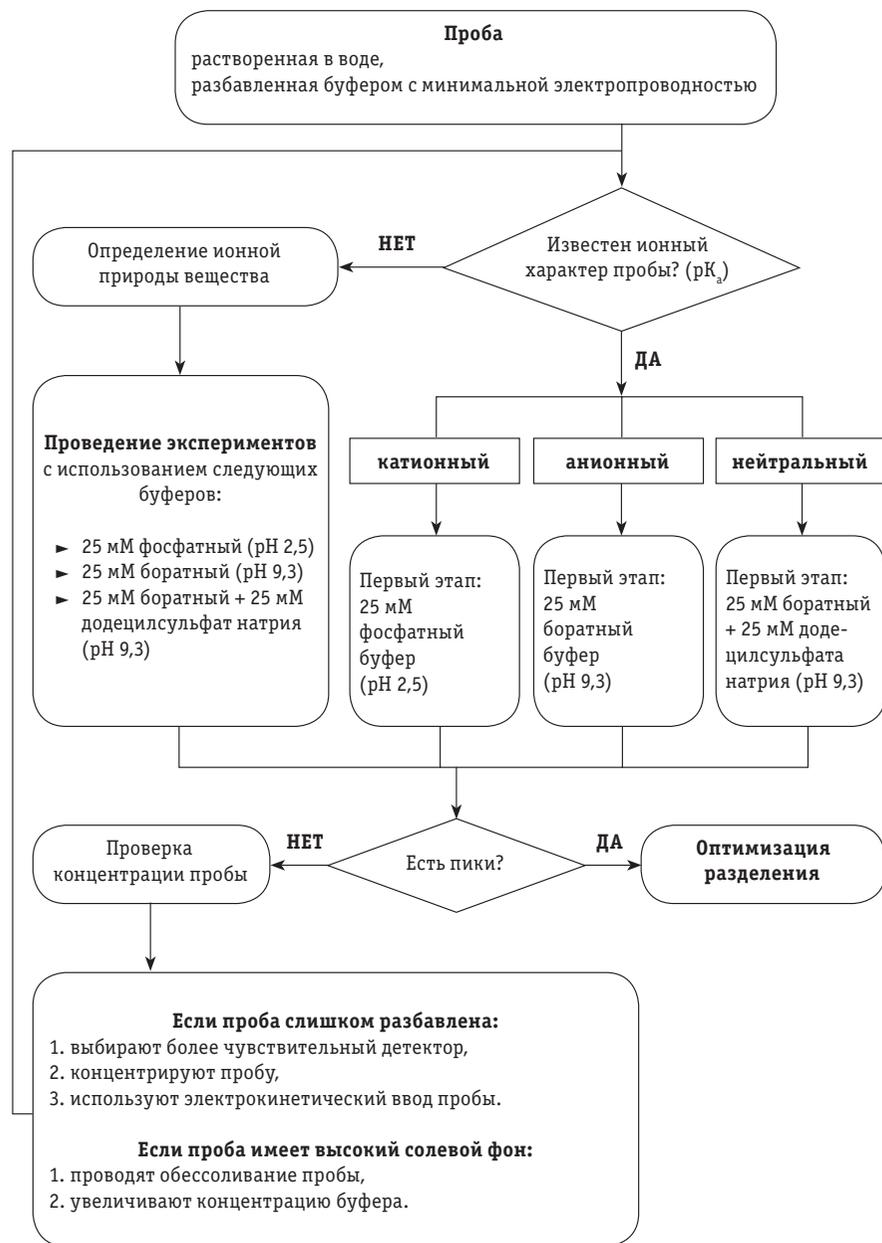


Рис. 6. Схема пробного КЭ-анализа образца неизвестного состава.

Дериватизация широко используется в КЭ для повышения чувствительности детектирования, особенно в комбинации с селективным детектором (например, флуориметрическим): в анализируемое соединение «вводят» хромофорные или флуорофорные группы. Другие причины, по которым прибегают к дериватизации: изменение характеристик вещества (летучести, заряда, массы, гидрофобности, оптических свойств и т. д.). Например, сильнополярные группы моносахаридов модифицируют длинными углеводородными радикалами, что позволяет применять для разделения полученных производных МЭКХ.

Всю информацию по дериватизации принято классифицировать по 3 признакам:

- ▶ схема получения производных (предкапиллярная, посткапиллярная, on-line),
- ▶ реагенты для дериватизации,
- ▶ природа функциональной группы, по которой идет реакция.

Дериватизация может быть выполнена перед, в процессе и после электрофоретического разделения. Тем не менее, как и в ВЭЖХ, в капиллярном электрофорезе наибольшую популярность снискал вариант предкапиллярного получения производных. Он может быть выполнен как в режиме *off-line* (вручную), так и *at-line* (автоматизированный вариант). Недостаток этого варианта дериватизации может заключаться в необходимости удаления избытка реагента перед электрофоретическим разделением. Получающиеся производные не всегда термически и гидролитически стабильны. Пост-электрофоретическая дериватизация в основном осуществляется в режиме *on-line*. Этот вариант предпочтителен, когда производные нестабильны или когда аналит имеет несколько центров для дериватизации.

Отличительной особенностью капиллярного электрофореза является высокая скорость анализа при малом расходе реактивов. В связи с этим, основные требования, предъявляемые в КЭ к стадии пробоподготовки, следующие:

- ▶ минимальный расход используемых реагентов (водных и органических),
- ▶ экспрессность стадии подготовки пробы,
- ▶ все промежуточные операции по концентрированию (отделению мешающих компонентов от определяемых и/или получению производных) должны быть унифицированными и как можно более простыми.

Отчасти всем этим требованиям отвечает метод твердофазной экстракции (ТФЭ), широко используемый на стадии подготовки пробы и хорошо зарекомендовавший себя в жидкостной и газовой хроматографии, а также в капиллярном электрофорезе. Метод ТФЭ основан на специфических взаимодействиях выделяемого вещества с сорбентом, находящимся в патроне или картридже, при пропуске раствора, содержащего анализируемые вещества и примеси, через патрон (картридж). Широкий выбор сорбентов для проведения ТФЭ позволяет реализовывать различные механизмы: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, ионообменный, комплексообразующий, эксклюзионный и т. д.

Глава 7. Области применения метода капиллярного электрофореза и примеры использования систем КЭ «Капель»

Среди большого многообразия методов, используемых сегодня в аналитической практике, капиллярный электрофорез снискал признание и активно используется при решении задач, связанных, прежде всего, с разделением и анализом многокомпонентных проб сложного и/или близкого по физико-химическим свойствам состава.

Еще раз напомним основные преимущества капиллярного электрофореза, реализованные в системах КЭ «Капель»:

- ▶ за один анализ *одновременно* определяется *несколько компонентов* пробы,
- ▶ в кварцевом капилляре достигаются *рекордные эффективности разделения* — сотни тысяч теоретических тарелок,
- ▶ благодаря многообразию вариантов метода КЭ *разделяются ионные, нейтральные, гидрофильные, гидрофобные, хиральные компоненты*, от наночастиц до макромолекул,
- ▶ для проведения одного анализа требуется чрезвычайно *малый расход реактивов* (микролитры),
- ▶ дозируется *минимальный объем* анализируемого образца,
- ▶ достигаются *высокие скорости* анализа,
- ▶ для большинства объектов используется *простая подготовка пробы* — в основном фильтрование и дегазирование,
- ▶ в приборах с жидкостным охлаждением капилляра *улучшается воспроизводимость* результатов измерений,
- ▶ с использованием автоматического режима *повышается точность анализа*, снижается его трудоемкость и роль человеческого фактора, увеличивается производительность,
- ▶ обеспечивается *надежная работа капилляра* с экономичными водными буферами,
- ▶ реализуется *возможность задания и/или изменения условий в ходе анализа*,
- ▶ достигается рекордно *низкая себестоимость* анализа.

Наиболее востребованным методом капиллярного электрофореза оказался в анализе ионного состава воды, составив достойную конкуренцию ионной хроматографии. Тем не менее, возможности метода выходят далеко за рамки анализа ионов, открывая перспективу его применения в самых разных отраслях для решения стандартных и эксклюзивных задач.

Основными областями применения метода КЭ (и некоторыми решаемыми задачами) являются:

Анализ объектов окружающей среды:

- ▶ **природные, питьевые, сточные воды** (анионы (*хлорид, сульфат, нитрат, нитрит, фторид, фосфат, бромид, иодид, хлорит, хлорат, ацетат*), катионы (*аммоний, калий, натрий, литий, магний, стронций, барий, кальций*) и другие неорганические и органические анионы и катионы), гербициды (классов феноксикарбоновых кислот, симметричных триазинов и др.)),
- ▶ **почвы** (подвижные формы *Co, Cu, Ni, Zn*; водорастворимые формы анионов и катионов).

Контроль качества пищевой продукции и продовольственного сырья:

- ▶ **минеральная и бутилированная вода** (неорганические катионы и анионы),
- ▶ **безалкогольные напитки и соки** (неорганические катионы и анионы, консерванты, органические кислоты, подсластители, синтетические красители, антиоксиданты, витамины, углеводы),
- ▶ **вина, коньяки и коньячные спирты, водки** (неорганические катионы и анионы, органические кислоты, ароматические альдегиды, аминокислоты, синтетические красители, консерванты),
- ▶ **пиво** (неорганические катионы и анионы, органические кислоты, горькие пивные кислоты, аминокислоты, амины, витамины, консерванты, синтетические красители),
- ▶ **чай, кофе** (кофеин, катехины),
- ▶ **пищевые продукты** (аминокислоты, синтетические красители, органические кислоты, амины, белки).

Анализ показателей качества кормов, комбикормов и сырья для их производства:

- ▶ **корма и сырье** (аминокислоты, белки),
- ▶ **премиксы** (аминокислоты, витамины),
- ▶ **витаминные концентраты** (витамины).

Ветеринария:

- ▶ **корма и сырье** (аминокислоты),
- ▶ **премиксы** (аминокислоты, витамины),
- ▶ **витаминные концентраты** (витамины),
- ▶ **биопробы** (аминокислоты в сыворотке крови).

Фармация:

- ▶ технологический контроль и анализ готовых лекарственных форм,
- ▶ разделение оптических изомеров.

Клиническая биохимия:

- ▶ определение неорганических катионов и анионов, аминокислот, белков в биологических жидкостях,
- ▶ определение фармакокинетики лекарственных препаратов.

Криминалистическая экспертиза:

- ▶ обнаружение остаточных количеств взрывчатых веществ,
- ▶ анализ наркотических средств.

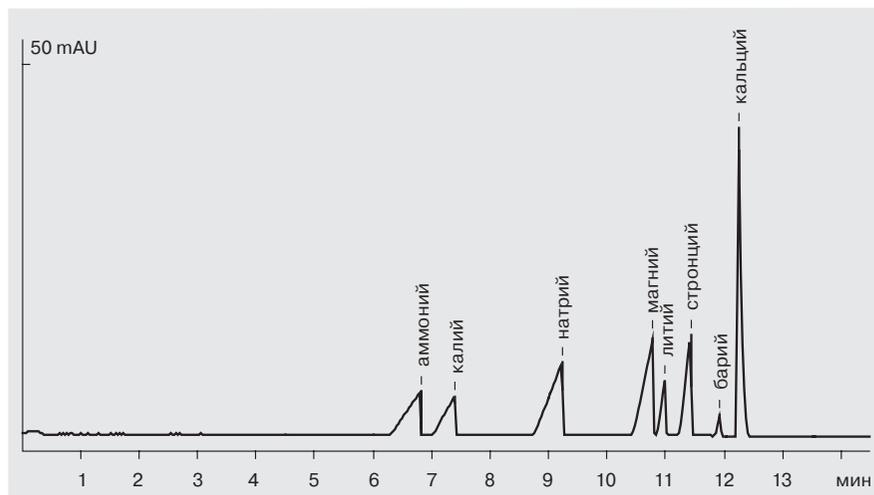
Химическая промышленность:

- ▶ технологический контроль,
- ▶ определение состава сырья и полупродуктов.

В этом разделе приведены многочисленные (но далеко не все возможные) примеры практического использования систем КЭ «Капель» в аналитической практике для целей разделения и количественного определения компонентов сложных смесей.

7.1. Анализ объектов окружающей среды

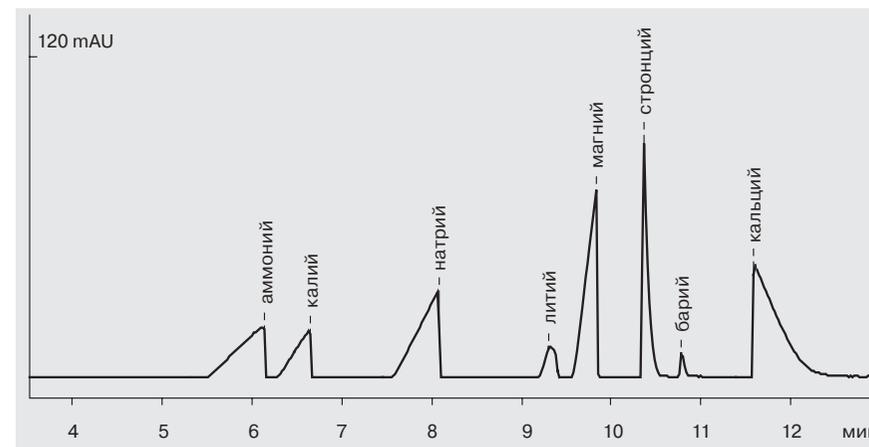
Анализ аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов (Схема 1)



Буфер	6 мМ бензимидазол (БИА), 2,5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Одновременное разделение восьми катионов из одной порции пробы. Макроциклический реагент 18-краун-6 введен в состав буферного раствора в качестве селективной добавки для разделения ионов калия и аммония.

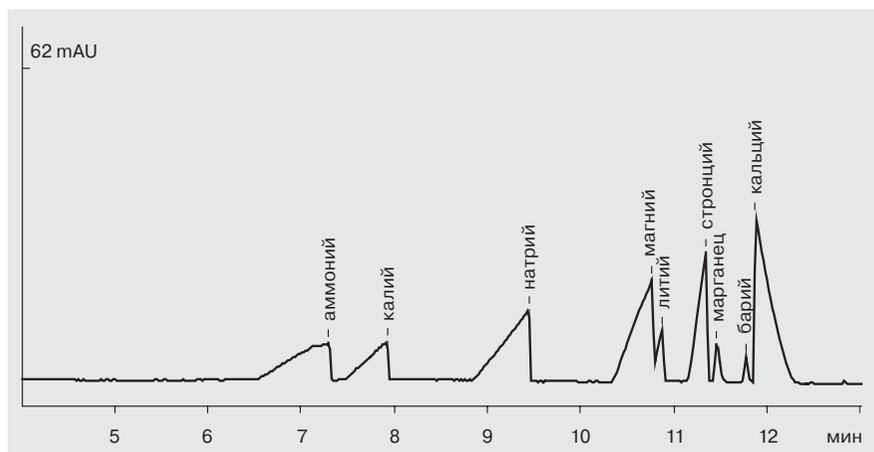
Анализ аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов (Схема 2)



Буфер	10 мМ БИА, 5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+13 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Повышение в буфере концентрации винной кислоты с 2,5 мМ (стр. 52) до 5 мМ приводит к инверсии пиков лития и магния, что упрощает разметку лития и снижает ошибку его количественного определения на фоне больших концентраций магния, характерных для реальных проб.

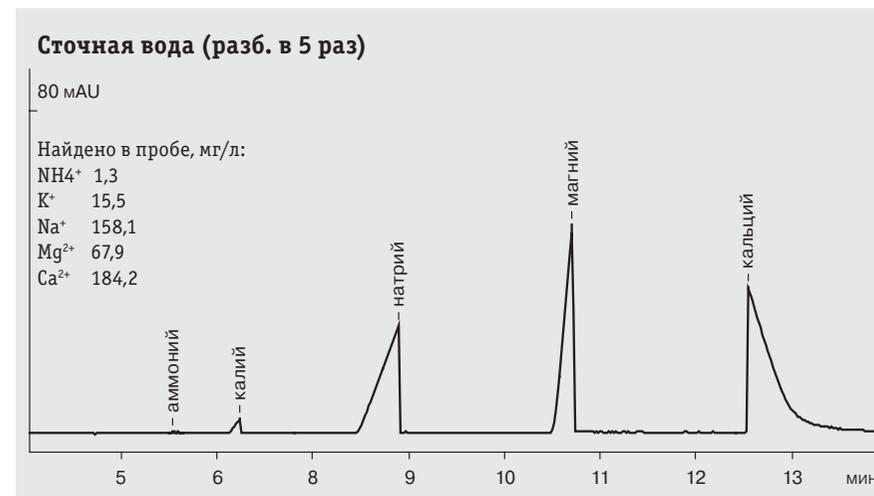
Возможность анализа марганца (II) совместно со щелочными и щелочно-земельными металлами



Буфер	6 мМ БИА, 2,5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

При анализе неорганических катионов в ряде реальных образцов на электрофореграммах кроме щелочных и щелочно-земельных металлов могут наблюдаться пики, принадлежащие, в частности, двухвалентным катионам марганца и железа. Пик марганца выходит вслед за пиком стронция, а пик железа — после пика кальция.

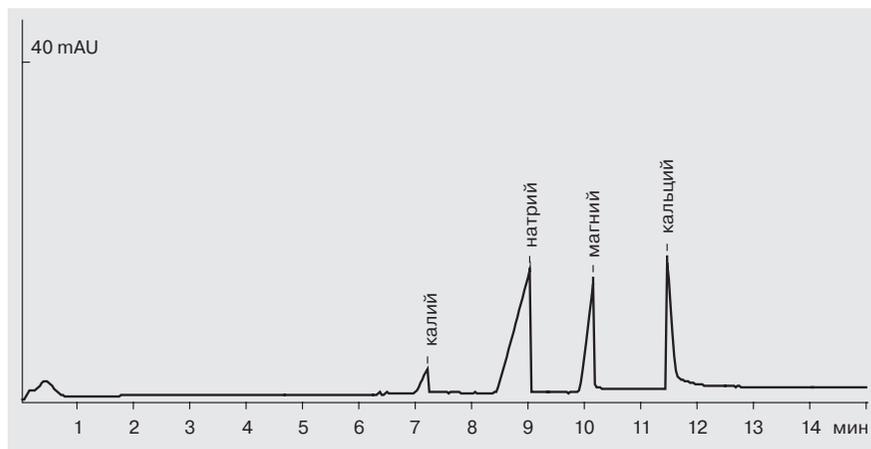
Анализ аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов в реальных водах



Буфер	10 мМ БИА, 5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	очищенная сточная вода
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+13 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Предложенная схема анализа применима к питьевым, природным и сточным водам. Подготовка пробы заключается в обязательном ее фильтровании, при необходимости разбавлении, центрифугировании.

Анализ щелочных и щелочно-земельных металлов в водных вытяжках почв



Буфер	6 мМ БИА, 2,5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	водный экстракт почвы
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Навеска воздушно-сухой пробы почвы в статических условиях встряхивается с водой. В водной вытяжке по стандартной схеме проводят анализ катионов.

Анализ неорганических анионов (классический вариант с обращением ЭОП)



Буфер	5 мМ CrO_3 , 20 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

При анализе основных неорганических анионов применяют косвенное детектирование. Используемый в качестве модификатора ЭОП цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) служит источником отрицательного пика (бромид-иона), расположенного между пиками хлорида и нитрита. Другой отрицательный пик (последний на приведенной электрофореграмме) обусловлен избытком карбонат-иона в буфере по сравнению с раствором пробы.

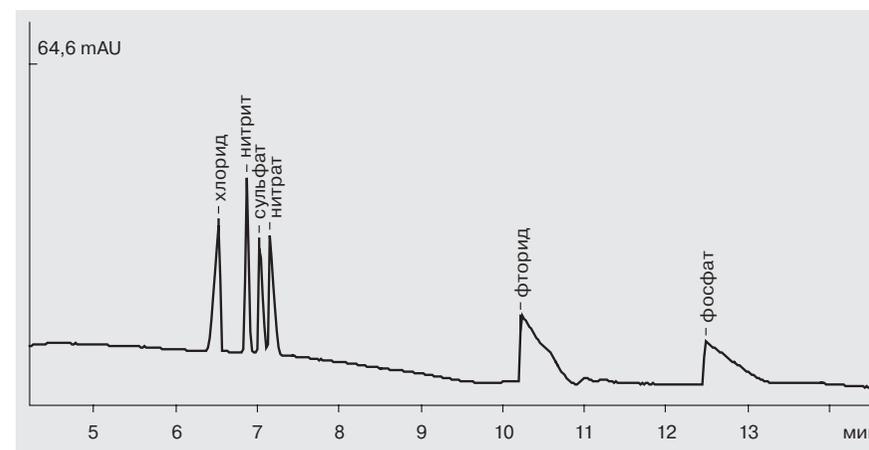
Анализ неорганических анионов (классический вариант с обращением ЭОП)



Буфер	7 мМ CrO_3 , 20 мМ ДЭА, 2 мМ ЦТАОН, 0,25 мМ глюконат кальция
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Использование в качестве модификатора ЭОП цетилтриметиламмония гидроксида (ЦТАОН) вместо ЦТАБ упрощает автоматическую разметку пиков в целом, снижает погрешность определения нитрит-иона, обеспечивает потенциальную возможность определения бромид-иона.

Анализ неорганических анионов (без обращения ЭОП)

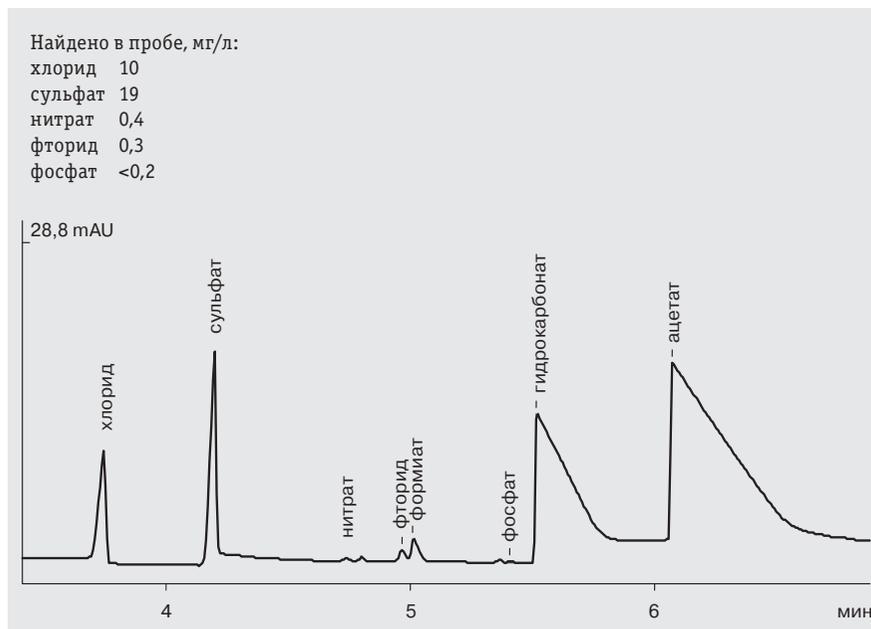


Буфер	5 мМ CrO_3 , 20 мМ ДЭА (без модификатора ЭОП)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Как видно из представленной электрофореграммы, разделение неорганических анионов можно проводить и без модификации внутренней поверхности кварцевого капилляра. При этом полярность высокого напряжения продолжает оставаться отрицательной, режим детектирования — косвенным.

Условия, приведенные к электрофореграмме, не оптимизировались.

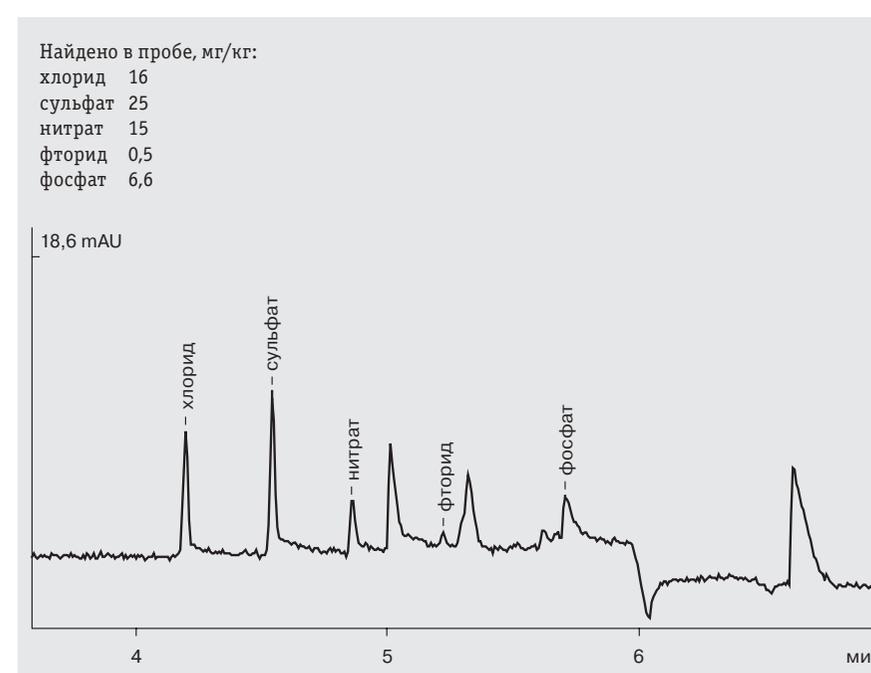
Анализ анионов в сточной воде



Буфер	7 мМ CrO ₃ , 20 мМ ДЭА, 2 мМ ЦТАОН, 0,25 мМ глюконат кальция
Проба	сточная вода, очищенная
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

В реальных пробах наряду с определяемыми компонентами могут идентифицироваться сопутствующие анионы, например, формиат-ион (после фторида) и ацетат-ион (после карбоната).

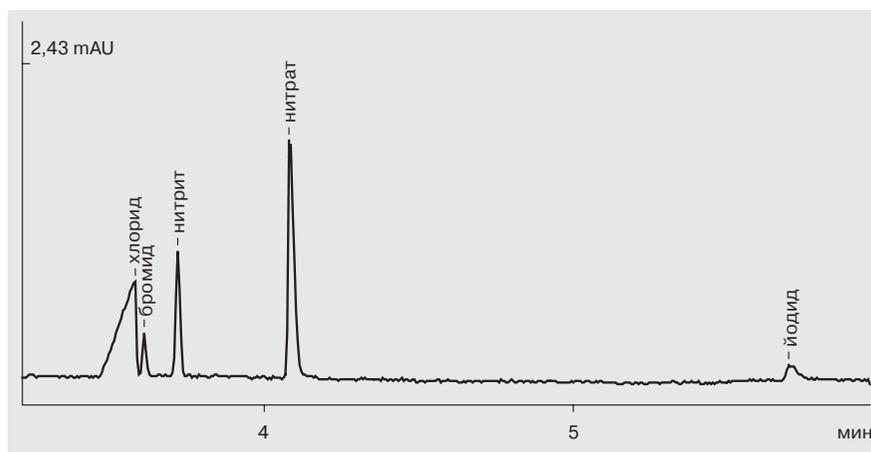
Анализ неорганических анионов в водной вытяжке почв



Буфер	7 мМ CrO ₃ , 20 мМ ДЭА, 2 мМ ЦТАОН, 0,25 мМ глюконат кальция
Проба	дерново-подзолистая тяжелосуглинистая почва (5 г.), экстрагент — дистиллированная вода (25 мл)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	17 °С

Анализ ионного состава почв является одним из этапов почвенно-экологического мониторинга. В этом случае капиллярный электрофорез успешно конкурирует с ионной хроматографией, обеспечивая высокоточные результаты с минимальной себестоимостью анализа.

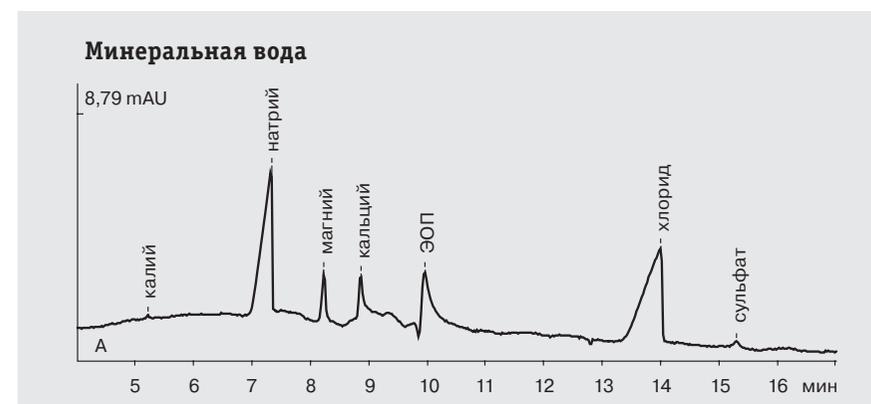
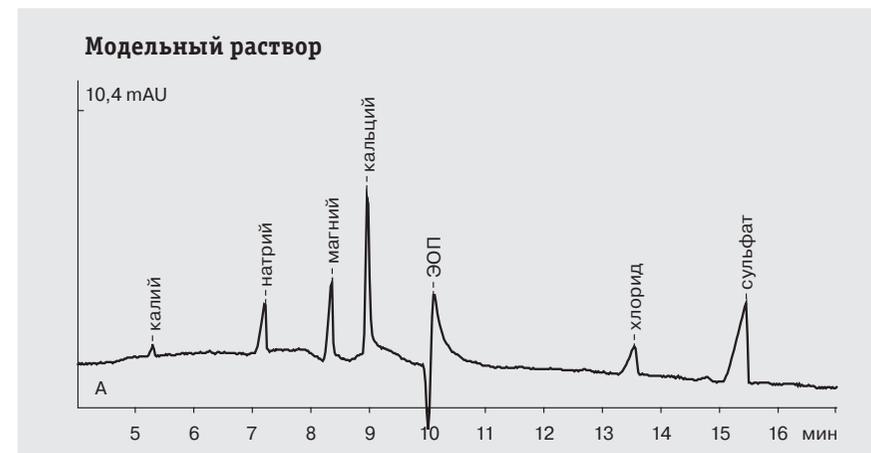
Анализ бромида и йодида с другими неорганическими анионами



Буфер	50 мМ сульфата натрия, 2 мМ ЦТАОН
Проба	модельный раствор: бромид и йодид — по 1 мг/л, нитрит и нитрат — по 5 мг/л, хлорид — 500 мг/л
Капилляр	$L_{эф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	-20 кВ
Детектирование	200 нм
Температура	20 °С

При 200 нм продемонстрирована возможность разделения бромида и йодида с сопутствующими неорганическими анионами, при этом избыточные концентрации хлорид-иона (500 мг/л) не мешают определению бромида.

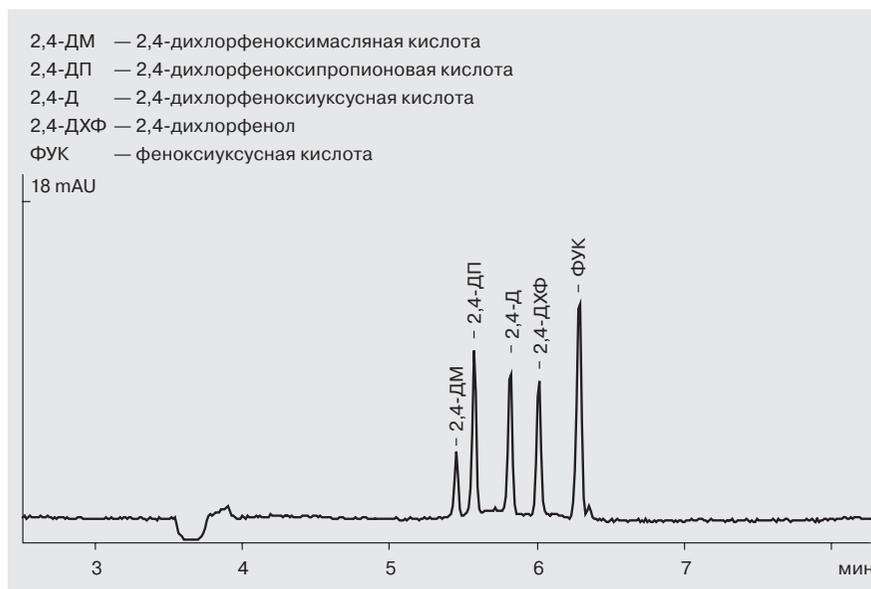
Одновременный анализ неорганических анионов и катионов (Капель-РЕ)



Буфер	6 мМ БИА, 5 мМ хромат, 2,5 мМ винная кислота, 15 мМ ДЭА
Проба	модельный раствор и проба минеральной воды (разбавление 1:9)
Капилляр	$L_{эф}$ слева/ $L_{эф}$ справа = 30/60 см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	15 кВ×с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

Одновременное определение катионов и анионов поможет существенно снизить себестоимость анализа и значительно повысить производительность лаборатории.

Анализ гербицидов класса 2,4-Д (феноксикарбоновые кислоты) в природных, питьевых и очищенных сточных водах



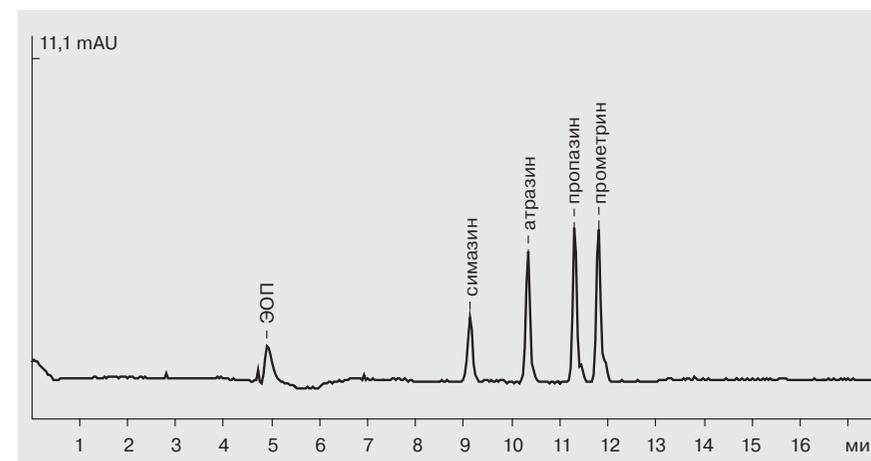
Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	205 нм
Температура	20 °С

Для разделения гербицидов класса феноксикарбоновых кислот (ФКК) предложен вариант капиллярного зонного электрофореза. Анализ низких концентраций гербицидов возможен только с предварительным концентрированием пробы (предложен вариант твердофазной экстракции). Гуминовые кислоты при концентрации менее 50 мг/л в природной воде не мешают определению анализируемых веществ. Конечным продуктом разложения ФКК в водной среде является 2,4-дихлорфенол.

В приведенных условиях возможно также разделение и других гербицидов этой группы (например, 2,4,5-Т, 2М-4Х).

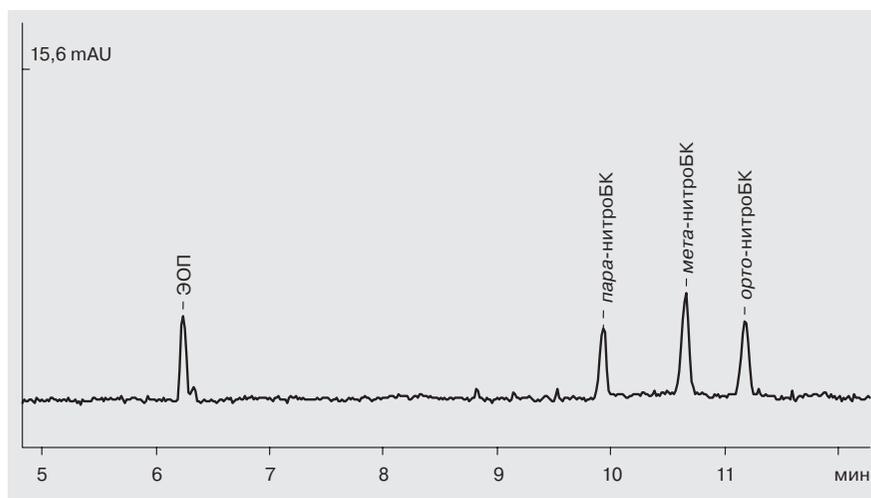
С 1 июля 2008 года в Российской Федерации действует ГОСТ Р 52730-2007 «Вода питьевая. Методы определения содержания 2,4-Д», в который включен метод КЭ.

Анализ гербицидов класса симметричных триазинов методом МЭХ



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый, 30 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	900 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	229 нм
Температура	20 °С

Разделение основных гербицидов класса симметричных триазинов (*симм*-триазинов) возможно только с использованием мицеллярной электрокинетической хроматографии. Вариант капиллярного зонного электрофореза, несмотря на способность нахождения этих гербицидов в форме органических катионов в кислой среде, позволяет провести лишь групповое разделение метилтио- и хлор-*симм*-триазинов.

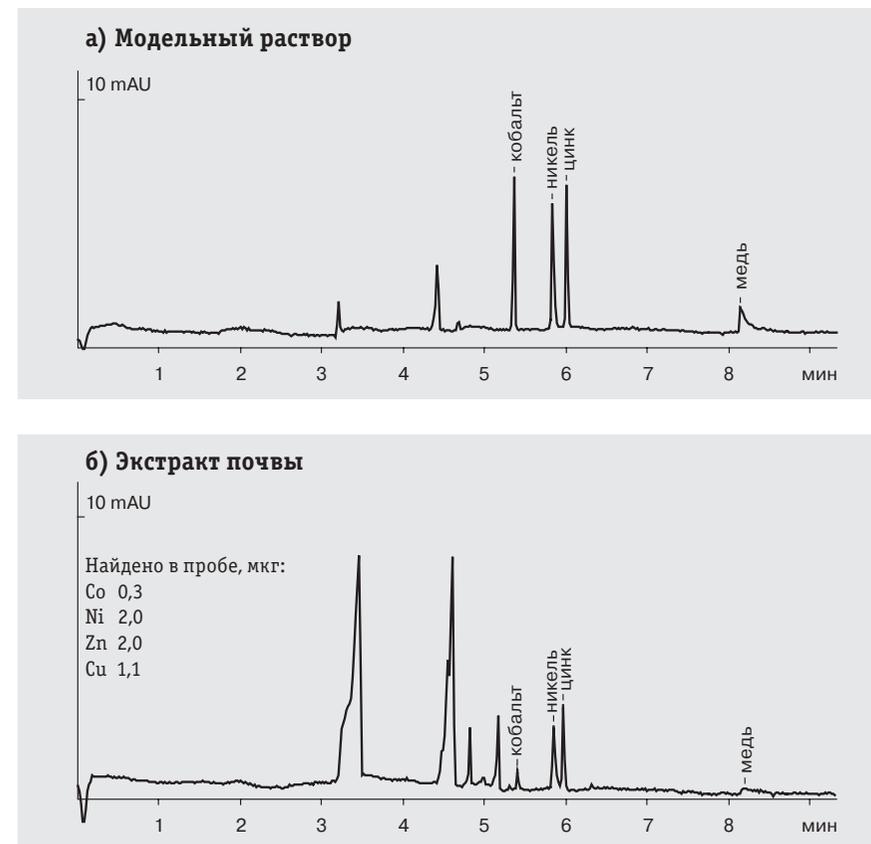
Анализ *пара*-нитробензойной кислоты в сточных водах

Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 5 мМ β-ЦД (рН 9,2)
Проба	модельный раствор <i>пара</i> -, <i>мета</i> - и <i>орто</i> -нитробензойных кислот
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

При анализе *пара*-нитробензойной кислоты методом КЗЭ в сточных водах возможные мешающие влияния могут быть связаны с присутствием в пробах органических кислот ароматического ряда (в том числе других производных бензойной кислоты (амино-, хлор-, гидрокси-) и позиционных изомеров нитробензойной кислоты (*орто*- и *мета*-), а также гуминовых и фульвиновых кислот, фенолов и их производных). Благодаря высокой разрешающей способности капиллярного электрофореза проблема разделения близких по электрофоретическим подвижностям компонентов, как правило, всегда решается положительно. Так, при введении в состав ведущего электролита макроцикла β-ЦД достигается, например, полное разделение смеси трех позиционных изомеров нитробензойной кислоты.

Предварительное концентрирование пробы позволяет снизить предел обнаружения до 200 раз.

Анализ подвижных форм Co, Cu, Ni, Zn в почвах

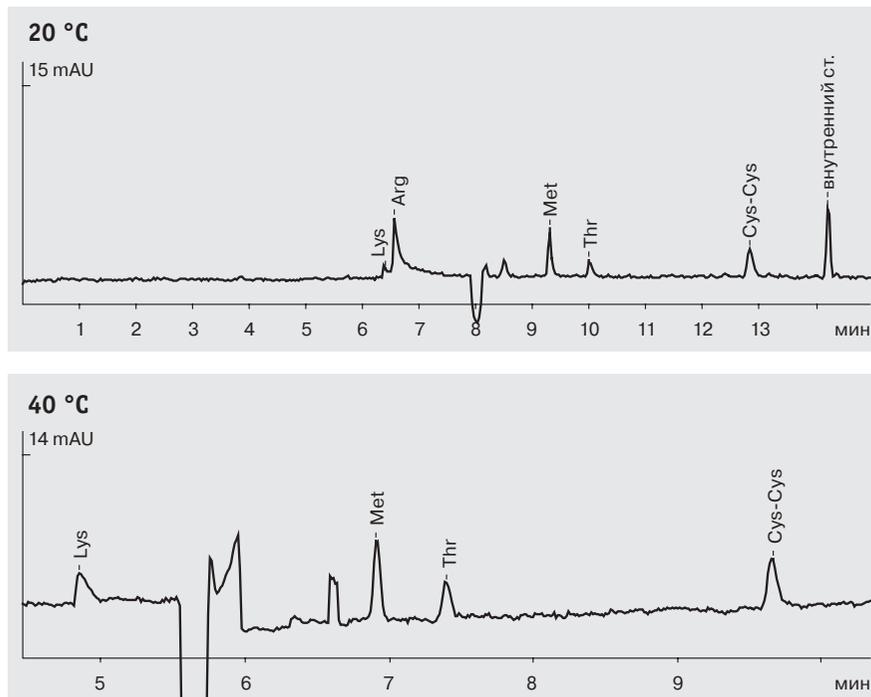


Буфер	12,8 мМ БИА, 8,3 мМ гликолевая кислота, 23 мМ уксусная кислота
Проба	а) модельный раствор, б) экстракт почвы (исходная навеска почвы 5 г.)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

Анализ подвижных форм металлов необходим для гигиенической оценки почв, используемых для выращивания сельскохозяйственных растений. Определяемые компоненты извлекаются из почв аммиачно-ацетатным буферным раствором. Для группового концентрирования металлов их переводят в комплексы с диэтилдитиокарбаматом натрия.

7.2. Комбикормовая промышленность

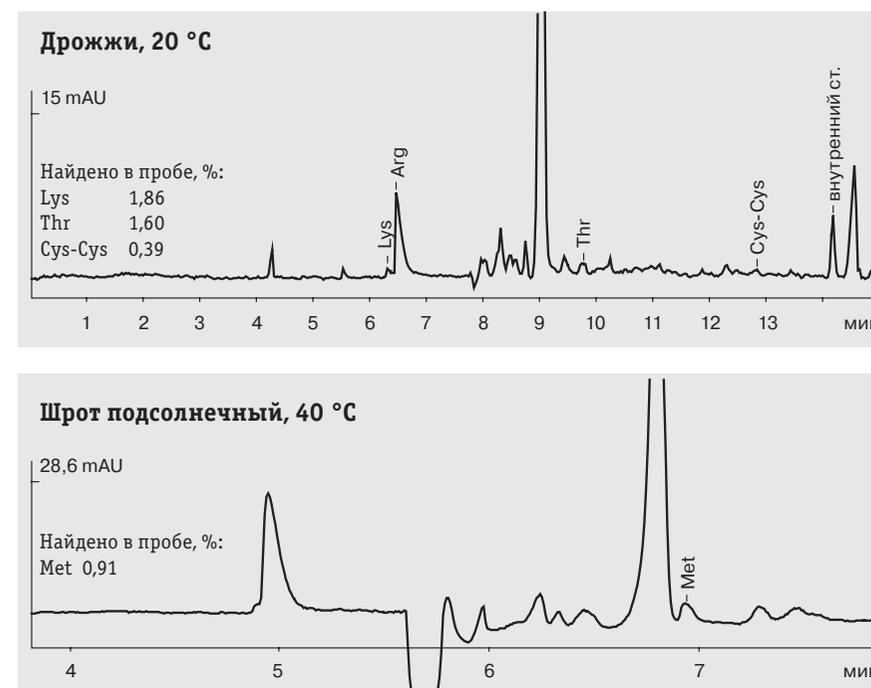
Прямой анализ технологически важных аминокислот — лизина, метионина, треонина и цистина в кормах, комбикормах и комбикормовом сырье



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый, 10 мМ β-ЦД (рН 9,2)
Проба	модельный раствор (с внутренним стандартом (бензойная кислота) или без него)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	190 нм
Температура	20 °C или 40 °C

В пробах с высоким и низким содержанием белка возможен прямой анализ технологически важных аминокислот по собственному поглощению аминогруппы. Lys и Arg согласно их и. э. т. в условиях анализа находятся в форме органических катионов и мигрируют до зоны ЭОП, все другие аминокислоты существуют в форме органических анионов и мигрируют после зоны нейтральных компонентов. Arg является аминокислотой, сопутствующей технологически важным, и введен для простоты разметки Lys.

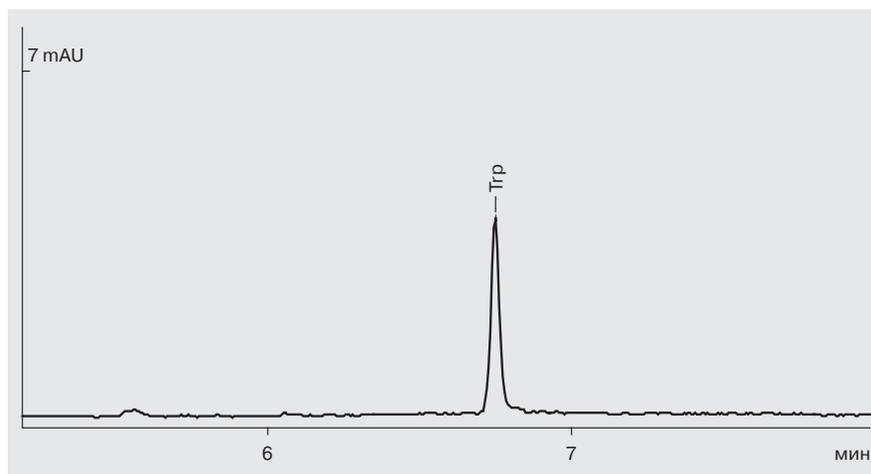
Прямой анализ технологически важных аминокислот — лизина, метионина, треонина и цистина в кормах, комбикормах и комбикормовом сырье



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый, 10 мМ β-ЦД (рН 9,2)
Проба	подготовленные кислотные гидролизаты дрожжей и шрота подсолнечного (по 100 мг каждой пробы)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	190 нм
Температура	20 °C или 40 °C

Пробоподготовка включает в себя кислотный гидролиз белков и удаление избытка кислоты. Введение макроцикла (β-циклодекстрина) в состав буфера позволило обеспечить высокую селективность разделения технологически важных аминокислот и других протеиногенных аминокислот, которые присутствуют в кислотном гидролизате. При повышении температуры обеспечивается высокая точность определения метионина.

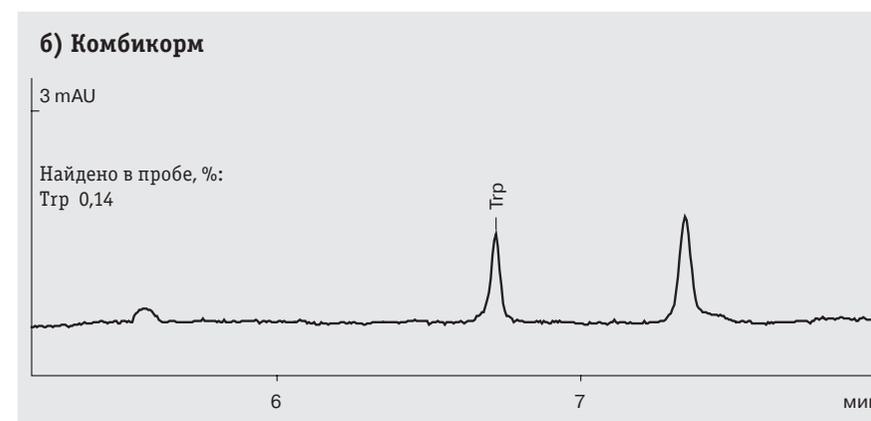
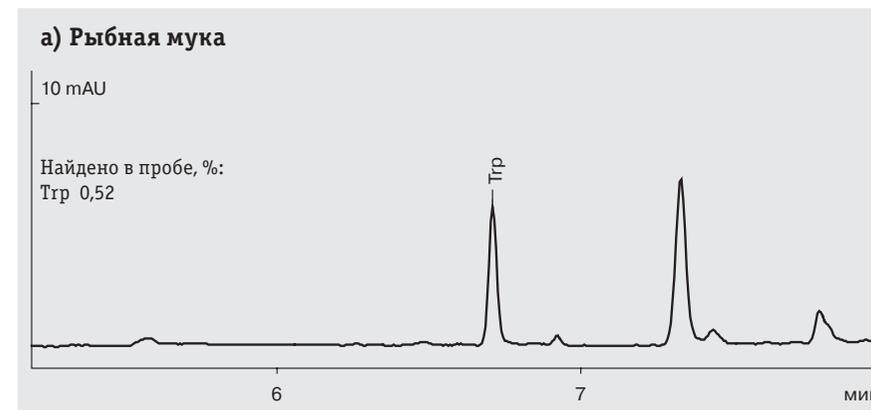
Прямой анализ триптофана (технологически важной аминокислоты) в кормах, комбикормах и комбикормовом сырье



Буфер	20 мМ натрий тетраборнокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	219 нм
Температура	40 °С

Вследствие разрушения триптофана при кислотном гидролизе для его определения используют щелочной гидролиз, который разрушает большую часть остальных протеиногенных аминокислот. Отсутствие их мешающего влияния упрощает состав используемого буфера. В то же время более оптимальной длиной волны для триптофана является 219 нм, что позволяет существенно снизить предел обнаружения.

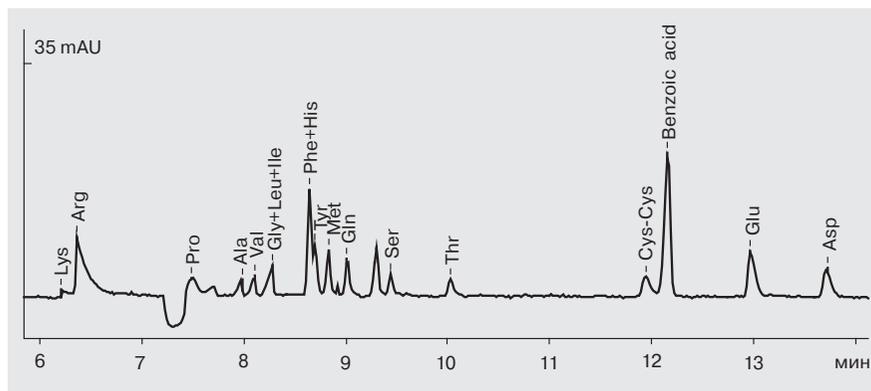
Прямой анализ триптофана (технологически важной аминокислоты) в кормах, комбикормах и комбикормовом сырье



Буфер	20 мМ натрий тетраборнокислый (рН 9,2)
Проба	а) рыбная мука, 100 мг (щелочной гидролизат) б) комбикорм, 100 мг (щелочной гидролизат)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	219 нм
Температура	40 °С

Пробоподготовка основана на щелочном гидролизе навески образца и нейтрализации гидролизата.

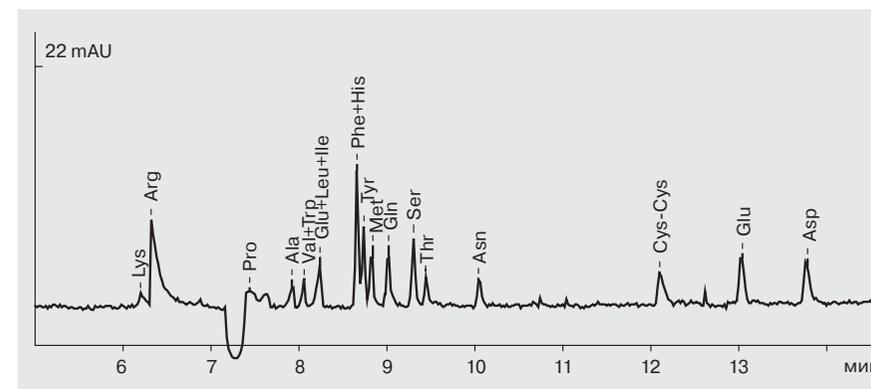
Прямой анализ 19-ти протеиногенных аминокислот в кислотном гидролизате



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 10 мМ β-ЦД (рН 9,2)
Проба	модельный раствор аминокислот с внутренним стандартом
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	190 нм
Температура	20 °С

В условиях прямого анализа технологически важных аминокислот, определяемых в кислотном гидролизате, показан порядок миграции всех сопутствующих аминокислот. Бензойная кислота введена в анализируемую смесь в качестве внутреннего стандарта.

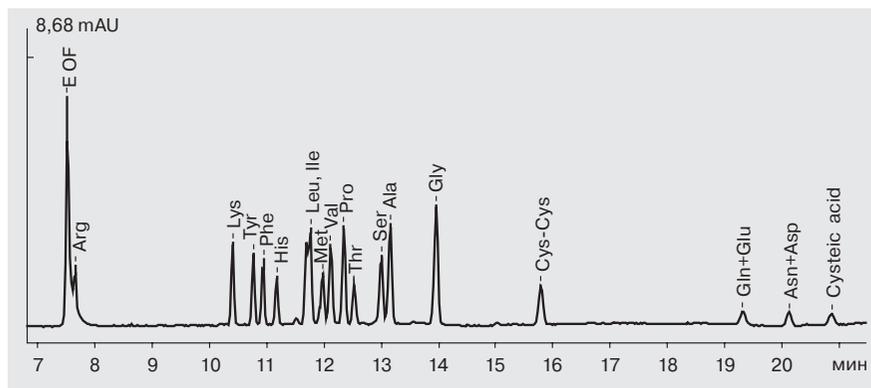
Прямой анализ свободных форм аминокислот



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 10 мМ β-ЦД (рН 9,2)
Проба	модельный раствор 20-ти протеиногенных аминокислот, включая триптофан
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	190 нм
Температура	20 °С

В отсутствие кислотного и щелочного гидролиза белков в пробах можно анализировать свободные формы всех двадцати протеиногенных аминокислот (индивидуально или в группах). Если чувствительности определения недостаточно, можно использовать вариант анализа свободных аминокислот по их ФТК-производным (стр. 75).

Анализ всех протеиногенных аминокислот в форме ФТК-производных в кормах, комбикормах и комбикормовом сырье

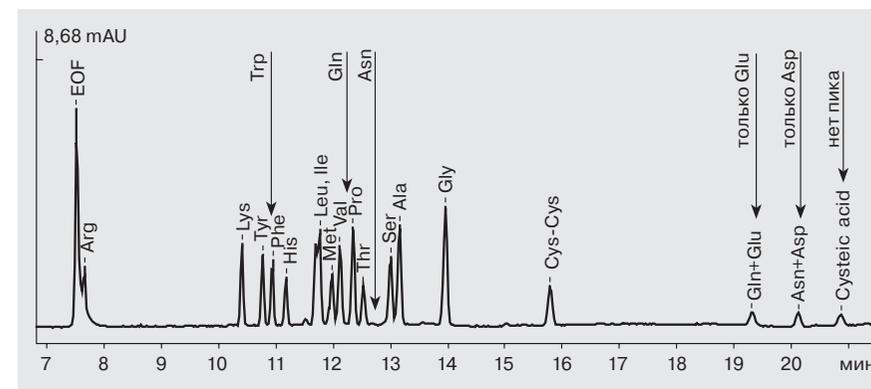


Буфер	30 мМ фосфатный, 4 мМ β-ЦД (pH 7,4)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	30 °С

Полное разделение всех 20-ти протеиногенных аминокислот возможно только в форме их производных.

Нами предложены условия разделения аминокислот по их ФТК-производным, при этом в результате кислотного гидролиза глутамин и аспарагин переходят в форму соответствующих им кислот (глутаминовой и аспарагиновой) и определяются по их пикам. Цистин (Cys-Cys) перед кислотным гидролизом предпочтительно переводит в форму цистеиновой кислоты. Триптофан анализируют в отдельном растворе после проведения щелочного гидролиза.

Анализ свободных форм аминокислот по их ФТК-производным

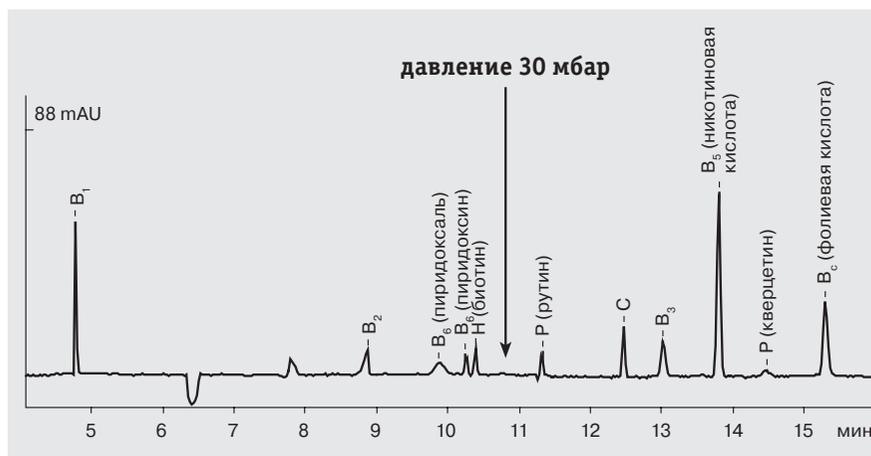


Буфер	30 мМ фосфатный, 4 мМ β-ЦД (pH 7,4)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	30 °С

При анализе свободных форм аминокислот не требуется проведения гидролиза белков. В связи с этим в приведенных выше условиях Trp мигрирует между Tyr и Phe, Gln — между Val и Pro, Asn — между Thr и Ser. Для цистина не нужен перевод в цистеиновую кислоту.

β-ЦД, как компонент буфера, проявляет хиральную активность по отношению к Trp, Tyr и Phe. Порядок миграции оптических изомеров всегда одинаков: сначала *D*-форма, затем сразу же *L*-форма. Для полного разделения оптических изомеров требуется оптимизация условий.

Анализ свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных добавках, концентратах и смесях методом капиллярного зонного электрофореза



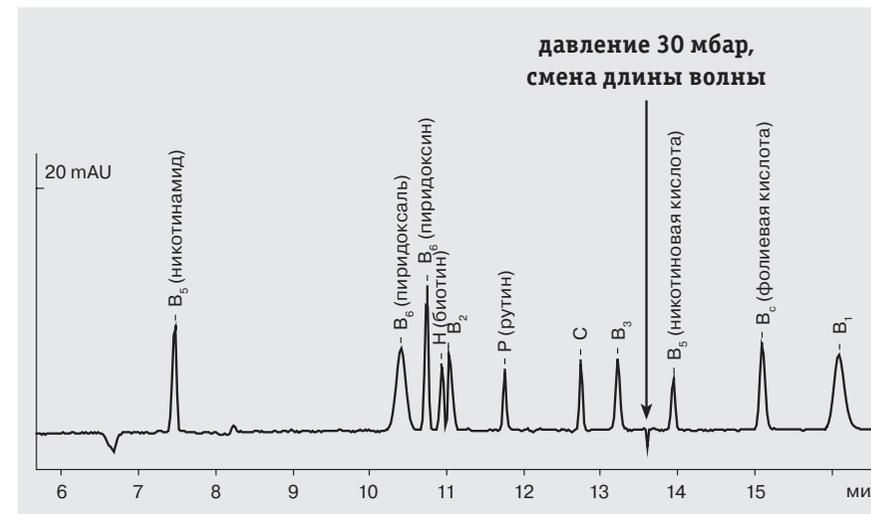
Буфер	боратный (рН 9,0)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм
Давление	30 мбар после выхода пика биотина
Температура	30 °С

Метод капиллярного зонного электрофореза предложен для анализа водорастворимых витаминов и их витаминных комплексов (кроме никотинамида — нейтрального компонента).

Использование давления в ходе анализа позволяет повысить экспрессность определения без потери эффективности разделения.

Подготовка образца заключается в экстракции витаминов раствором буры в присутствии сульфит-иона и фильтровании экстракта.

Анализ свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных добавках, концентратах и смесях методом мицеллярной электрокинетической хроматографии

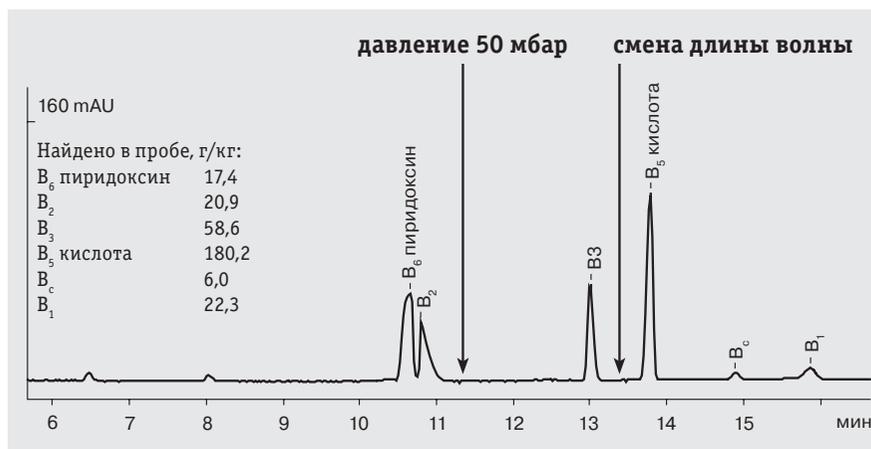


Буфер	боратный, 80 мМ ДДСН (рН 9,0)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм, переключение на 240 нм после выхода пика B ₃
Давление	50 мбар после выхода пика B ₃
Температура	30 °С

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии универсален при анализе ионных и нейтральных форм водорастворимых витаминов.

Увеличение селективности разделения достигается повышением концентрации ДДСН в буфере, снижение времени анализа обеспечивается, с одной стороны, выбором рабочей температуры, а, с другой стороны, использованием в ходе анализа давления.

Анализ свободных форм водорастворимых витаминов в премиксах, витаминных добавках, концентратах и смесях методом мицеллярной электрокинетической хроматографии

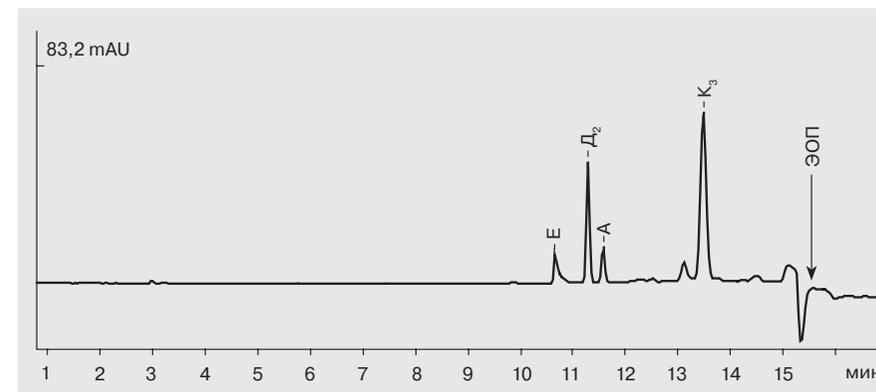


Буфер	боратный, 54 мМ ДДСН (рН 9,0)
Проба	витаминный концентрат (0,2 г)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм, переключение на 240 нм после выхода пика B_3
Давление	50 мбар после выхода пика B_2
Температура	30 °С

Подготовка образца заключается в экстракции витаминов раствором буры в присутствии сульфит-иона и фильтровании экстракта.

Для устранения мешающего эффекта матрицы при анализе реальных проб предусмотрено программируемое переключение длин волн в ходе анализа.

Анализ свободных форм жирорастворимых витаминов методом электрокинетической хроматографии гидрофобных взаимодействий

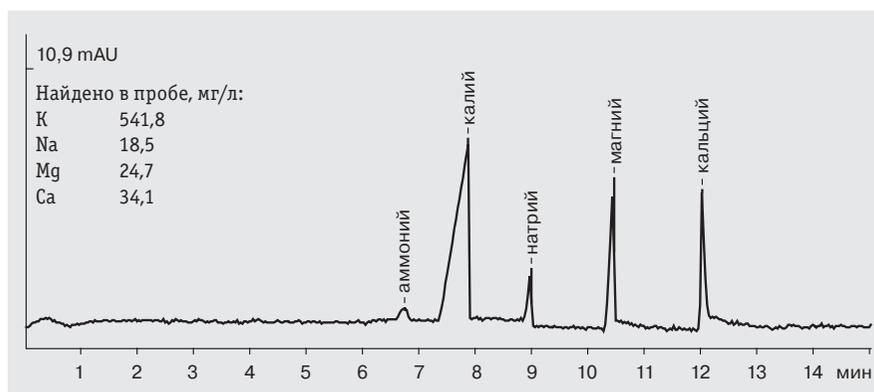


Буфер	ацетонитрил/вода = 80:20 (об.), 80 мМ тетрадециламмония бромид
Проба	модельный раствор (для витаминов А и Е использованы ацетатные формы)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	60 мбар×с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	250 нм
Температура	30 °С

Одна из разновидностей капиллярного электрофореза — электрокинетическая хроматография (ЭКХ) гидрофобных взаимодействий (англ. *hydrophobic interaction electrokinetic chromatography*) — наиболее подходящий метод разделения и определения неполярных компонентов пробы. В основе разделения лежат различные гидрофобные взаимодействия аналитов с псевдостационарной фазой буферного раствора (рабочий «буфер» на 60 % и более состоит из органического растворителя и содержит псевдостационарную фазу, образованную ионами тетраалкиламмония). Гидрофобные компоненты пробы выходят до ЭОП в порядке снижения их гидрофобности. Такое обращение порядка выхода по сравнению с мицеллярной ЭКХ и микроэмульсионной ЭКХ позволяет резко сократить время анализа.

7.3. Пищевая промышленность

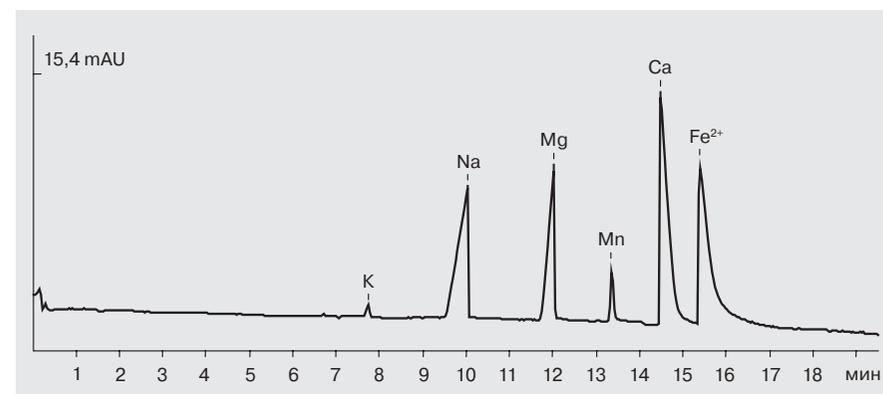
Анализ неорганических катионов в яблочном соке



Буфер	6 мМ БИА, 2,5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	свежевыжатый сок из яблока (сорт Беркутовское), разбавление 1:9
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Показана возможность определения неорганических катионов в соках, в том числе свежевыжатых.

Анализ неорганических катионов в минеральной воде

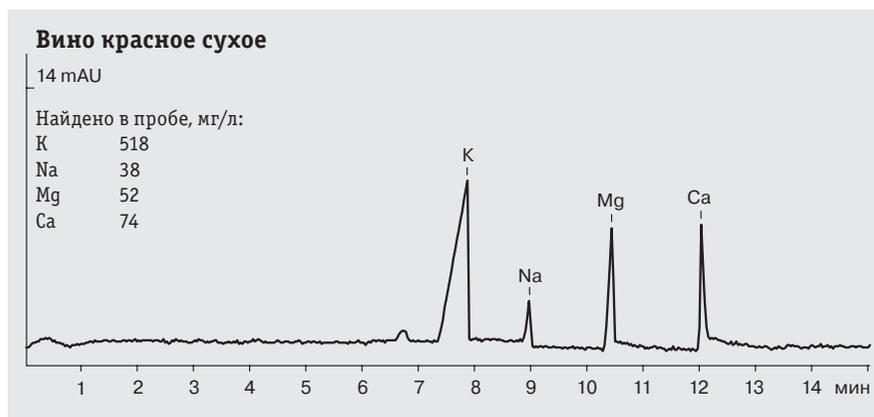


Буфер	6 мМ БИА, 2,5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6
Проба	минеральная вода «Полюстрово»
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

На этапе подготовки пробы минеральные воды при необходимости дегазируют и разбавляют.

Анализ неорганических катионов в винах, виноматериалах, коньяках и коньячных спиртах

(Якуба Ю. Ф., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)



Условия анализа как на стр. 80.

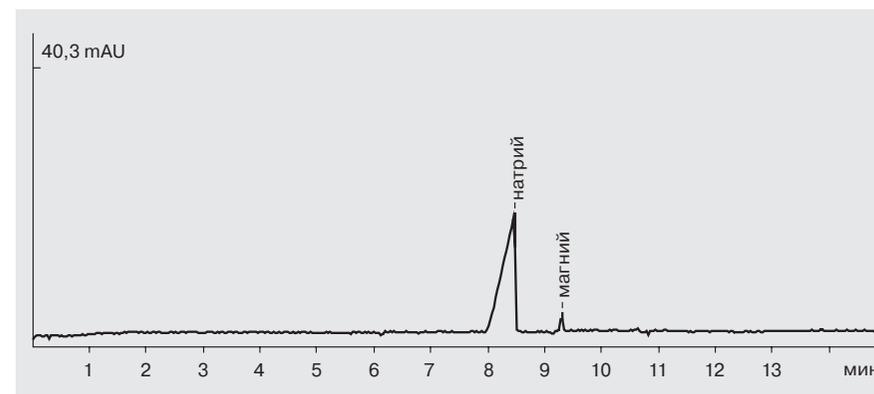
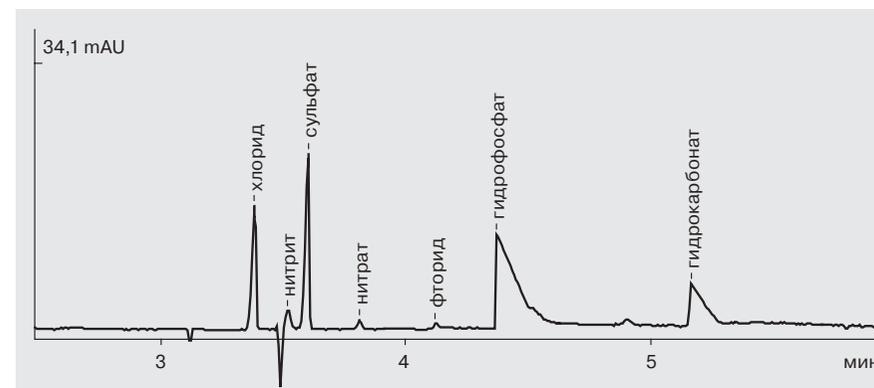
Определение содержания неорганических катионов и сравнение электрофореграммы образца с электрофореграммой эталонных образцов вин, виноматериалов, коньяков и коньячных спиртов позволяет установить подлинность анализируемых образцов.

Диапазон массовых концентраций катионов, характерных для виноматериалов, вин виноградного происхождения и коньячных спиртов Юга России (Якуба Ю. Ф. и др., 2002) приведен в таблице.

Катионы	Диапазон концентраций, мг/дм ³	
	вина и виноматериалы	коньяки и коньячные спирты
аммоний	1–80	<1,5
калий	400–1100	0,5–4,0
натрий	10–90	10–40
магний	30–150	0,5–5
кальций	30–180	1–5

При превышении верхней границы диапазона концентраций по любому из катионов виноматериал или вино следует считать натуральным, но подверженным помутнениям в течение гарантийного срока хранения. При обнаружении массовой концентрации калия менее 400 мг/л виноматериал или вино следует признать разбавленным водно-спиртовой смесью. Пониженные концентрации остальных катионов отражают технологические особенности производства. Отсутствие или наличие массовых концентраций всех катионов менее 10 мг/л свидетельствуют о полной фальсификации напитка. Отсутствие катионов в коньяках и коньячных спиртах также свидетельствует о фальсификации напитка.

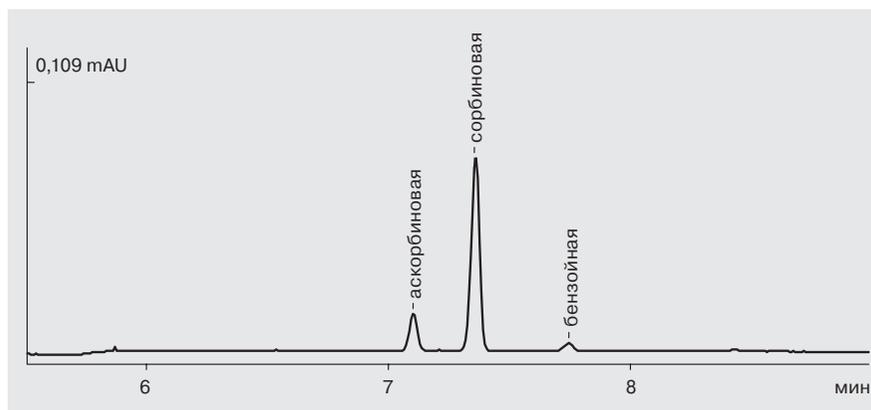
Контроль качества водки. Анализ ионного состава



Буфер	для катионов и для анионов
Проба	водка производства РФ
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	согласно методикам
Напряжение	согласно методикам
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Состав воды для производства ликеро-водочных изделий во многом определяет технологические и органолептические параметры последних. Метод КЭ может успешно применяться в алкогольной промышленности для контроля качества сырья и готовой продукции. Особенностью водоподготовки в ликероводочной промышленности является использование водоумягчающих установок, действующих по принципу ионного обмена. Водки, произведенные с использованием воды, очищенной таким образом, имеют характерный катионный профиль.

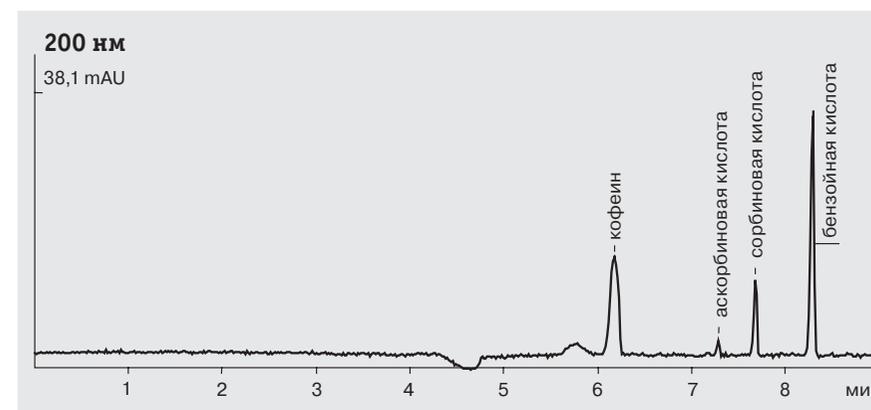
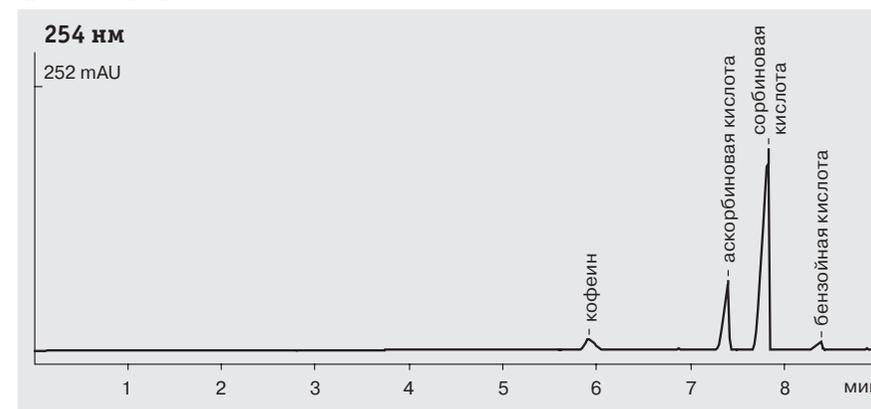
Анализ аскорбиновой кислоты и консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) методом капиллярного зонного электрофореза



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

В щелочной среде анализируемые кислоты существуют в форме органических анионов, что позволяет использовать для их разделения вариант капиллярного зонного электрофореза.

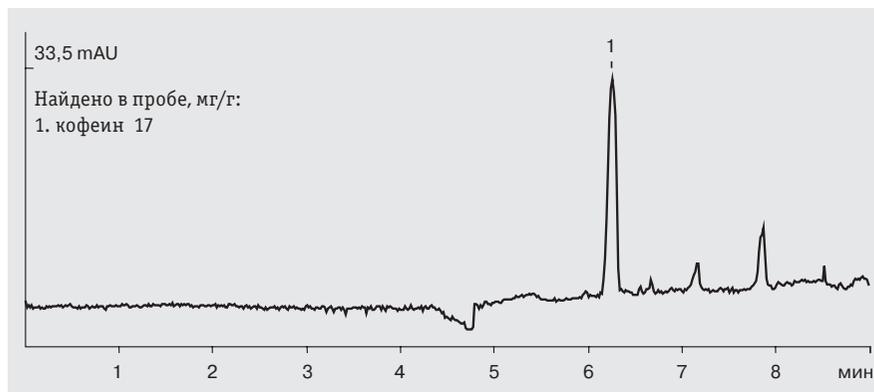
Анализ кофеина, аскорбиновой кислоты и консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) методом мицеллярной электрокинетической хроматографии



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый, 40 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм или 200 нм
Температура	23 °С

Нейтральные и заряженные компоненты могут быть разделены в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии. В данном случае анионы органических кислот (аскорбиновой, сорбиновой и бензойной) мигрируют после нейтрального кофеина. Показана возможность детектирования при разных длинах волн в зависимости от целевых компонентов.

Анализ кофеина в растворимом кофе

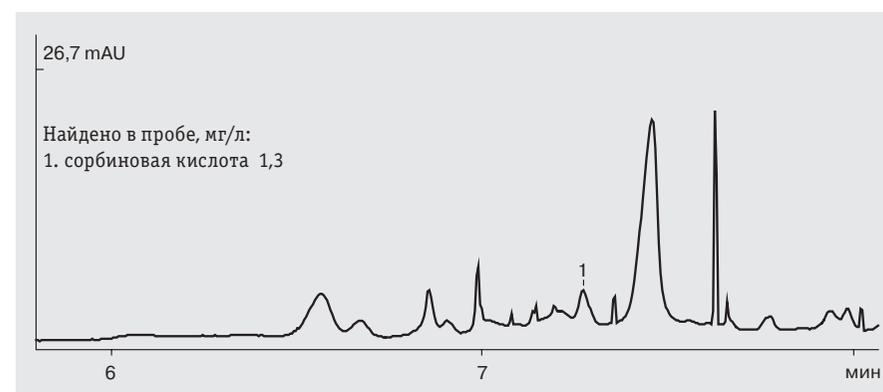


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	кофе растворимый
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	200 нм
Температура	23 °С

Содержание кофеина является одной из важнейших характеристик кофе и растворимых кофейных напитков.

Для анализа кофеина необходимо использовать вариант МЭКХ.

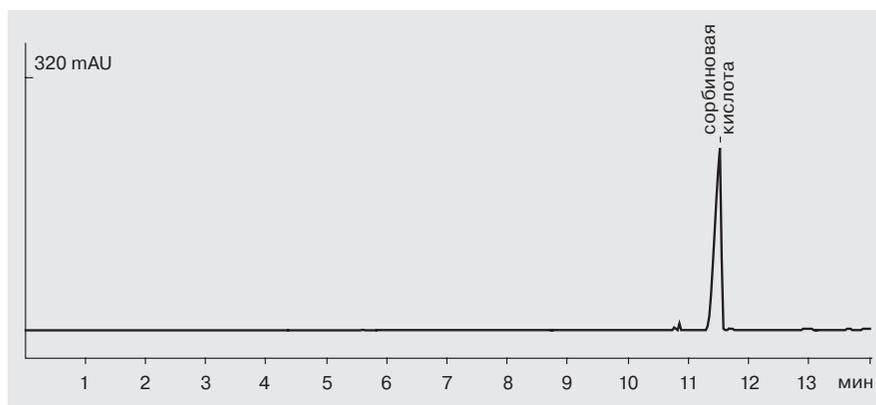
Анализ консервантов в безалкогольных напитках и соках



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый (рН 9,2)
Проба	персиковый нектар
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Для анализа консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) используют зонный вариант с простым буфером на основе буры. Подготовка пробы — стандартная: фильтрация образца и при необходимости разбавление. В случае сильногазированных напитков необходимо провести дегазирование образца.

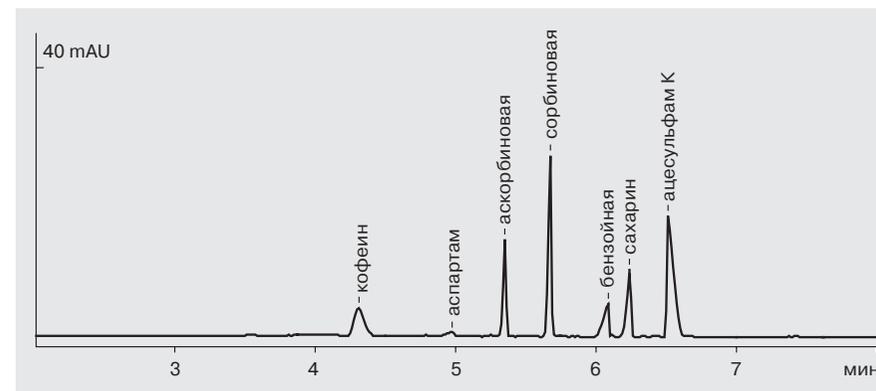
Анализ консервантов в гранатовом соке



Буфер	боратный
Проба	гранатовый сок
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Недекларируемое производителями использование консервантов в соках, в том числе предназначенных для детского питания, является одной из острых проблем современного потребительского рынка. При использовании метода КЭ возможно определение консервантов и антиоксидантов в напитках без предварительной отгонки или экстракции. Простота пробоподготовки делает анализ экспрессным и снижает его себестоимость.

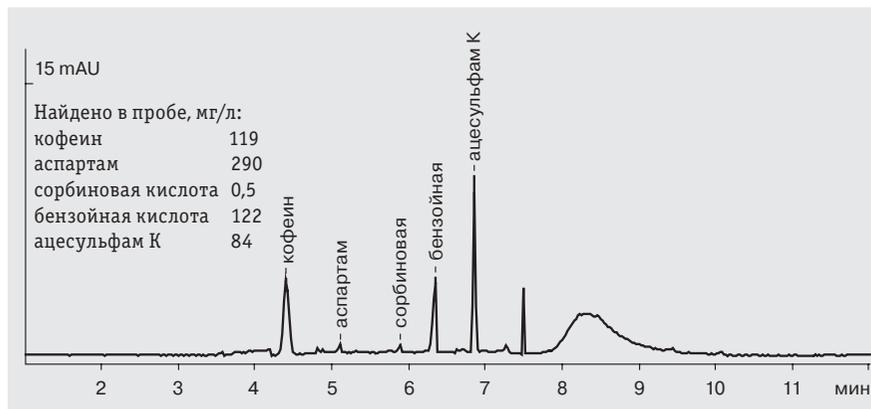
Одновременное определение консервантов, антиоксидантов, подсластителей и кофеина



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	27 °С

Вариант МЭКХ позволяет одновременно определять в напитках консерванты (сорбиновую и бензойную кислоты), антиоксидант (аскорбиновую кислоту), подсластители (сахарин, аспартам и ацесульфам К), а также кофеин.

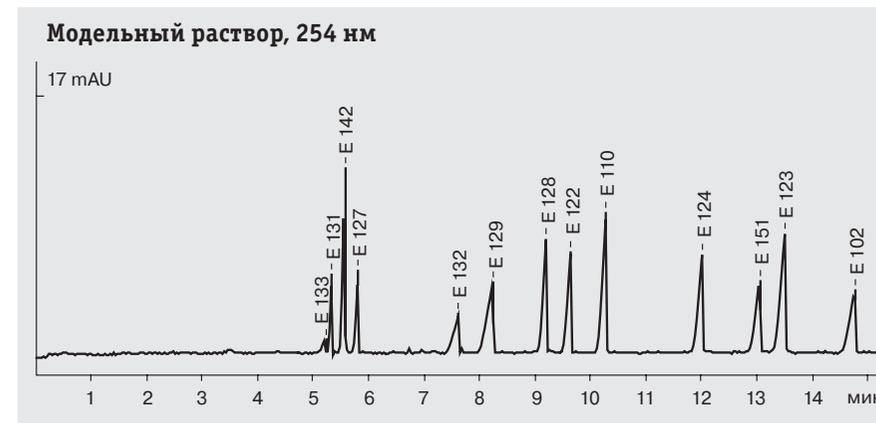
Анализ консервантов, антиоксидантов, подсластителей и кофеина в напитках



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	напиток «Кола лайт», разбавление водой в 5 раз
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	27 °С

Непосредственно перед анализом пробу дегазируют, при необходимости разбавляют дистиллированной водой, фильтруют и центрифугируют.

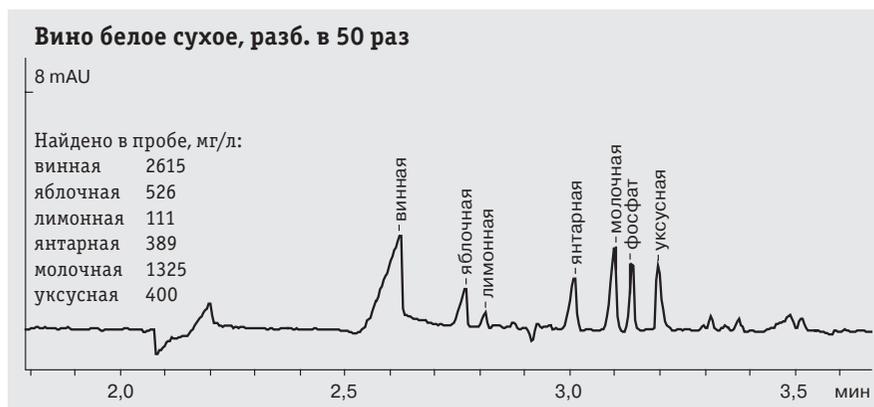
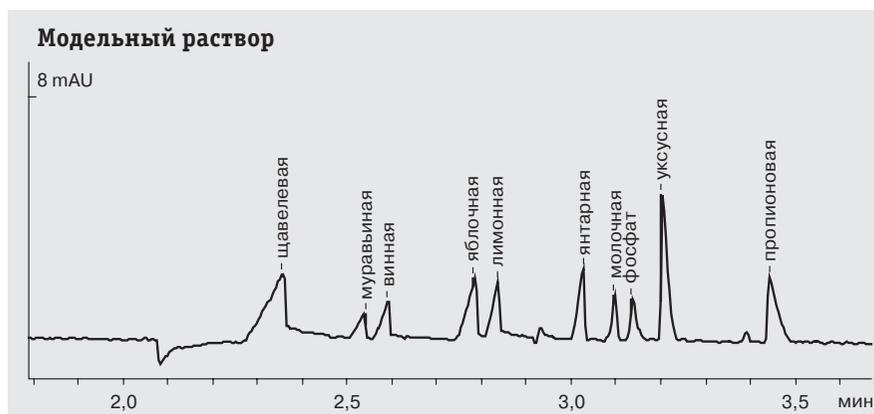
Анализ синтетических красителей в безалкогольных и алкогольных напитках



Буфер	карбонатный
Проба	модельный раствор и проба
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм или 215 нм
Температура	20 °С

Анализ пищевых синтетических красителей важен при контроле качества и безопасности напитков. Подготовка пробы заключается в селективном выделении красителей на оксиде алюминия с последующей их десорбцией водным раствором аммиака.

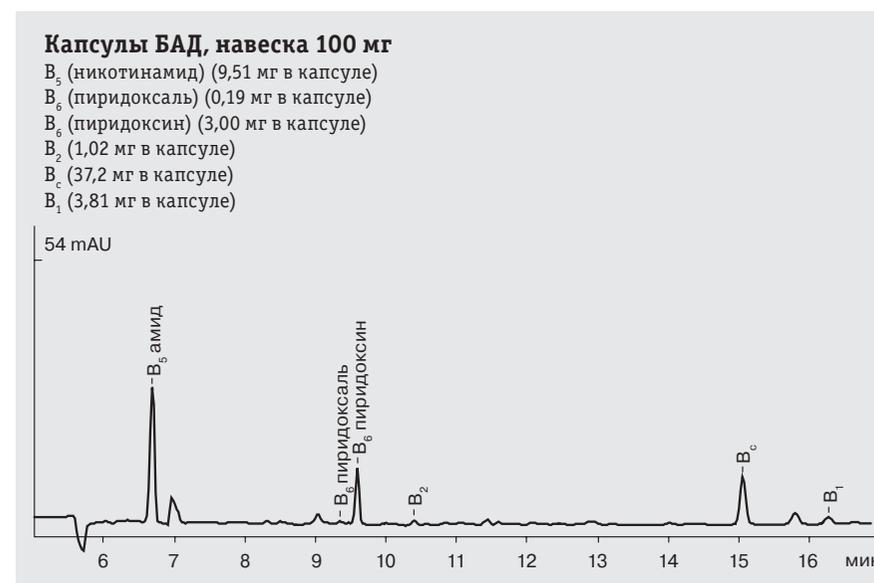
Анализ органических кислот в безалкогольных и алкогольных напитках



Буфер	10 мМ бензойная кислота, 9 мМ ДЭА, 0,5 мМ ЦТАБ, 0,1 мМ ЭДТА (рН 5,1)
Проба	модельный раствор и проба вина
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	-20 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	23 °С

Наличие или отсутствие органических кислот в пробе, а также их количественное содержание и соотношение позволяют определять натуральность и качество напитков, контролировать ферментативные процессы и проводить корреляцию со вкусом конечного продукта. Подготовка пробы: разбавление и центрифугирование. Отсутствует мешающее влияние неорганических анионов, бензойной, аскорбиновой и сорбиновой кислот. Фосфат-ион может количественно определяться в рамках приведенных условий анализа.

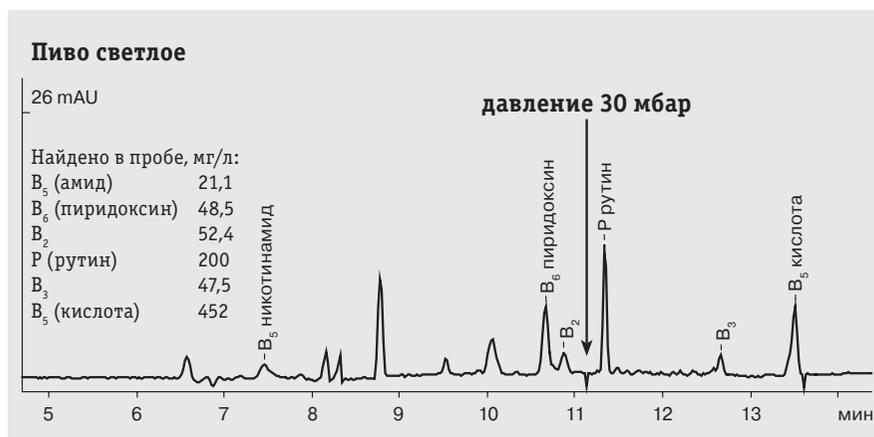
Анализ свободных форм водорастворимых витаминов в биологически активных пищевых добавках



Буфер	боратный, 80 мМ ДДСН (рН 9,0)
Проба	БАД (капсулы), навеска 100 мг, экстракт
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм, переключение на 240 нм после выхода пика V_3
Давление	50 мбар после выхода пика V_3
Температура	30 °С

Подготовка пробы: экстракция витаминов смесью буры и сульфата натрия, фильтрование, центрифугирование.

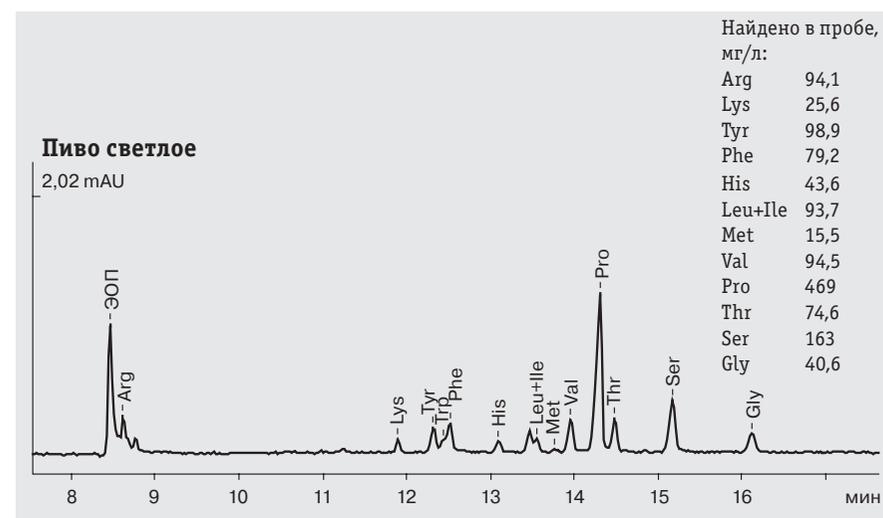
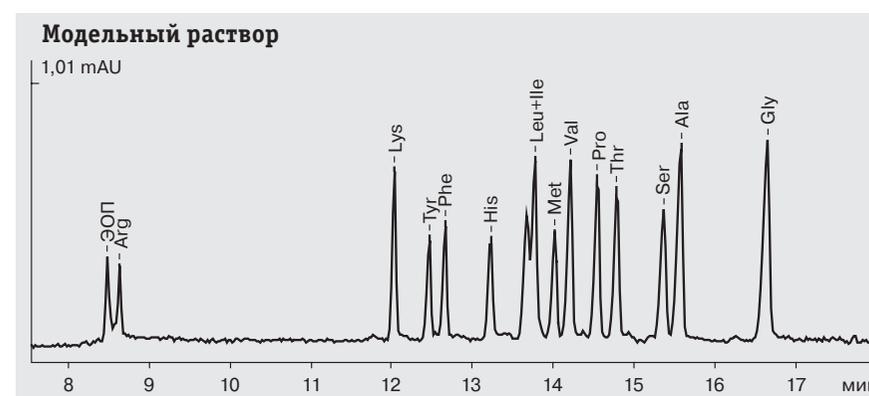
Анализ свободных форм водорастворимых витаминов в пиве



Буфер	боратный, 80 мМ ДДСН (рН 9,0)
Проба	пиво светлое, 5 мл
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм
Давление	30 мбар после выхода пика V ₂
Температура	30 °С

Подготовка пива к анализу — дегазирование и фильтрование.

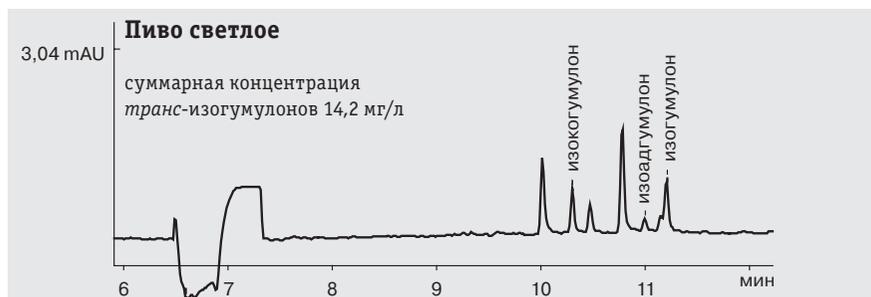
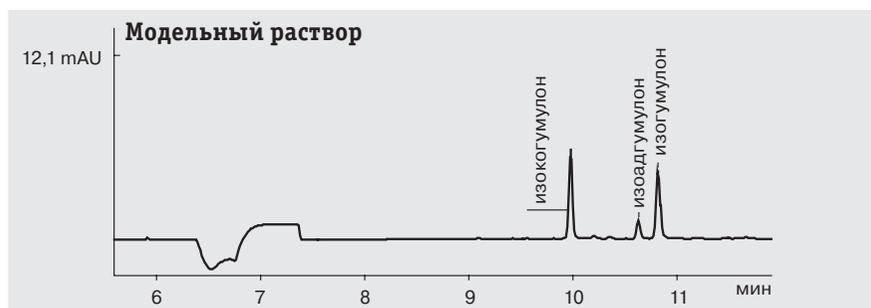
Анализ свободных форм аминокислот в пиве (по ФТК-производным)



Буфер	30 мМ фосфатный, 4 мМ β-ЦД (рН 7,4)
Проба	модельный раствор и проба светлого пива (50 мкл)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	25 °С

Пиво предварительно дегазировали, отбирали аликвоту (50 мкл) и проводили стадию дериватизации, получая фенилтиокарбамильные производные аминокислот, которые разделяли в режиме КЗЭ.

Анализ горьких пивных кислот



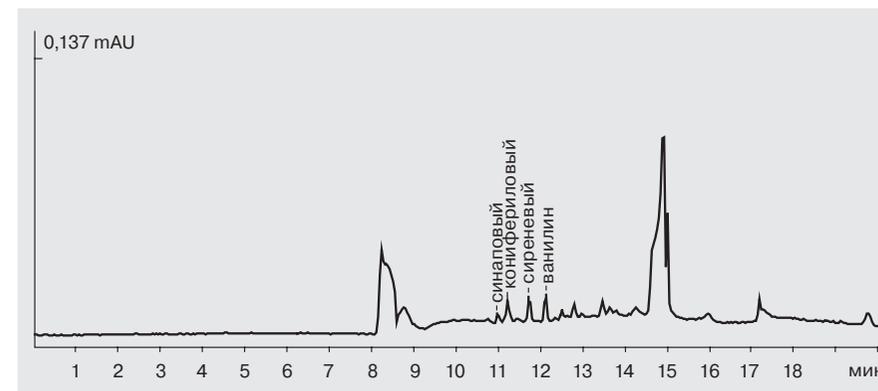
Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 60 мМ ДДСН (рН 9,2)
Проба	модельный раствор, пробы пива и пива с добавкой стандарта
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	255 нм
Температура	20 °С

Не обладающие вкусом хмелевые кислоты (α - и β -) при длительном кипячении сула изомеризуются до горьких пивных кислот, в частности, до изо- α -кислот, представленных, в основном, транс-изогумулонами, транс-изокогумулонами и транс-изоэдгумулонами.

Подготовка пива: дегазирование, подкисление, экстракция в изоктан, упаривание.

Анализ ароматических альдегидов в коньяке и коньячном спирте

(Якуба Ю. Ф., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

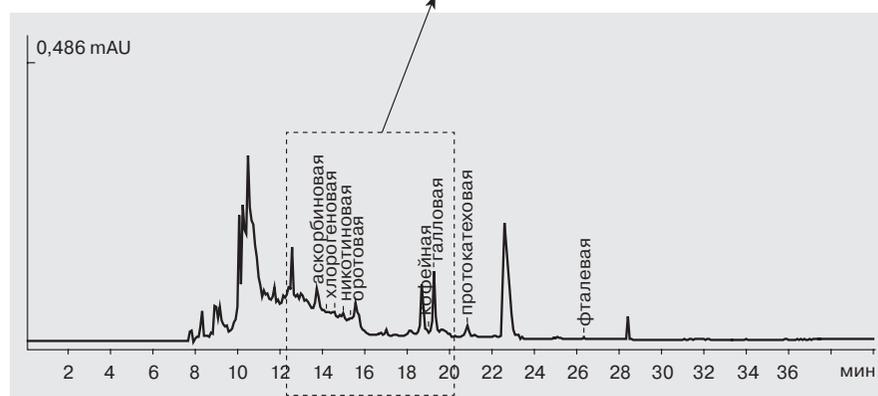
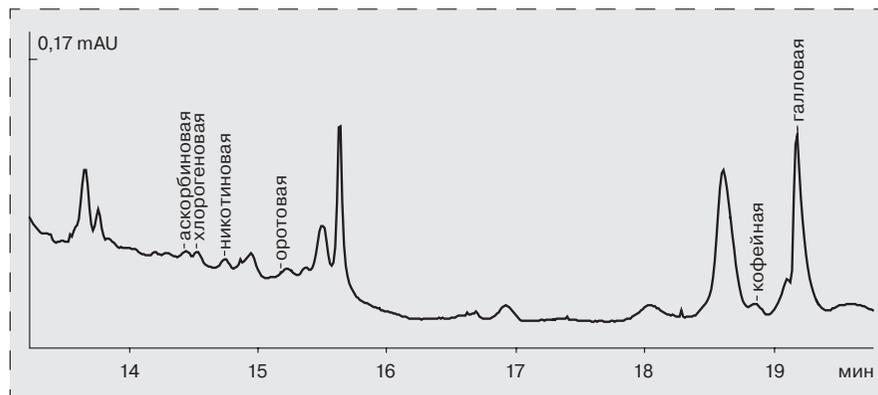


Буфер	бура-БИА
Проба	коньячный спирт, 5 лет выдержки
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар × с
Напряжение	+8 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

Маркерами качества и возраста коньяков в мире признаны ароматические альдегиды (ванилин, синаповый, конифероловый, сиреневый).

Анализ биологически активных веществ в винах и виноградных соках

(Якуба Ю. Ф., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

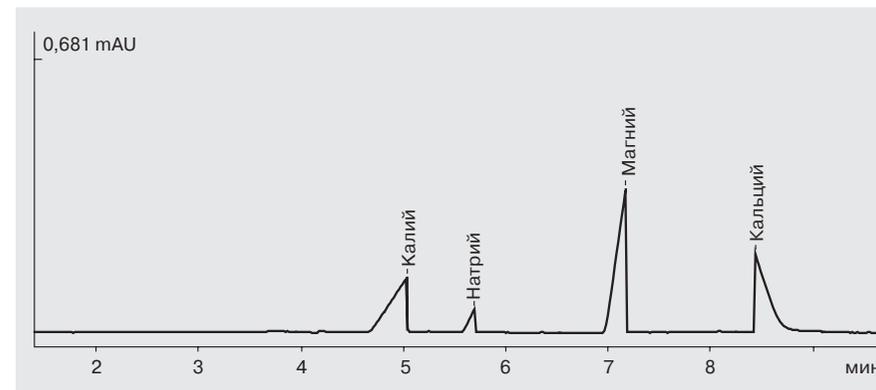


Буфер	бура
Проба	вино красное
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	+12 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

Виноградные соки и вина содержат в себе большое количество биологически активных веществ, включая витамины и витаминоподобные соединения, а также фенолкарбоновые кислоты.

Анализ неорганических катионов в растительном материале

(Якуба Ю. Ф., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)



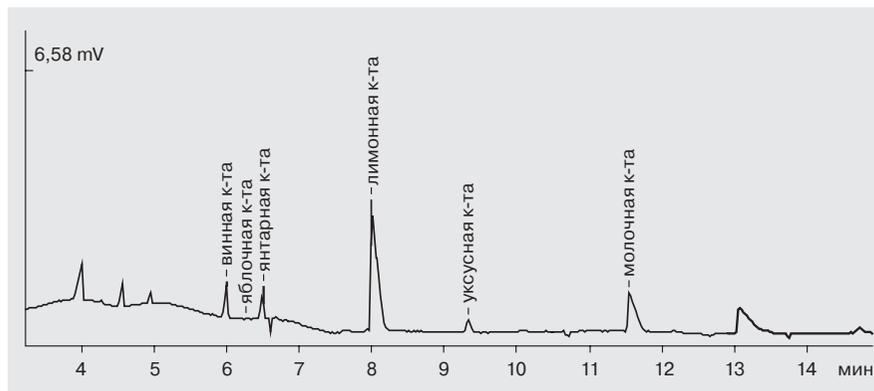
Буфер	катионный
Проба	лист вишни (после СВЧ-экстракции)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар×с
Напряжение	+16 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

Проведение листовой диагностики на основе определения подвижных форм щелочных и щелочно-земельных металлов представляет собой оперативный метод контроля физиологического состояния плодовых, ягодных, цветочных культур и винограда, а также может служить критерием иммунной устойчивости сорта.

Высушенную, гомогенизированную и усредненную пробу листьев, побегов или виноградной лозы подвергали СВЧ-гидролизу в среде 5 %-ной уксусной кислоты (использовали СВЧ-минерализатор «Минотавр®-1» производства фирмы «Люмэкс»).

Анализ органических кислот в растительном материале

(Марковский М. Г., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

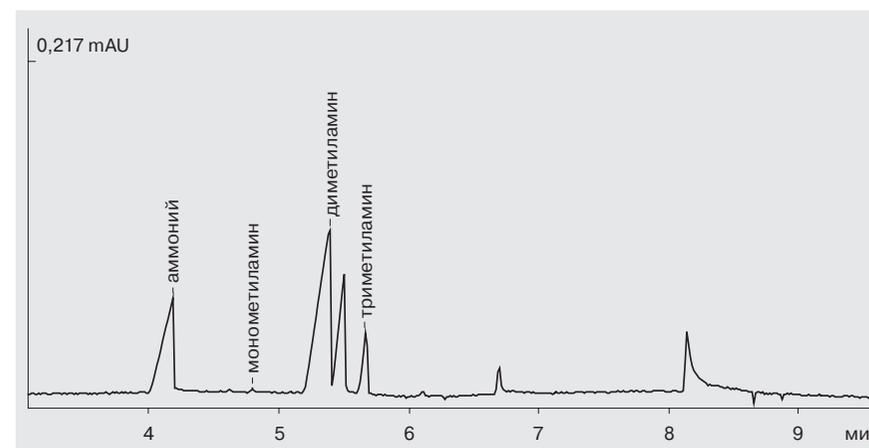


Буфер	буфер на основе пиромеллитовой кислоты
Проба	растительный образец
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	-25 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

На этапе подготовки пробы использована спиртовая экстракция в СВЧ-поле.

Анализ аминов в рыбе

(Якуба Ю. Ф., Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

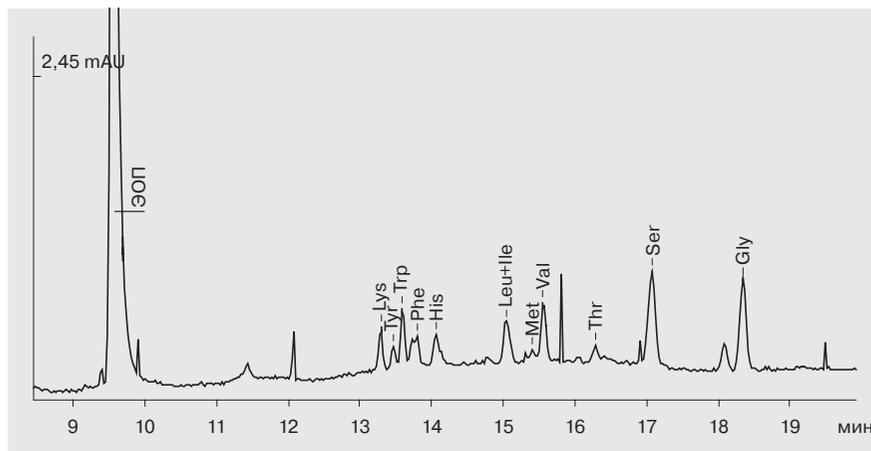


Буфер	катионный
Проба	рыба (после отгонки аминов с водяным паром)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+16 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

На этапе подготовки пробы проводят отгонку с водяным паром. Условия капиллярного электрофоретического разделения аналогичны катионной схеме.

7.4. Ветеринария

Анализ свободных форм аминокислот (в форме ФТК-производных) в сыворотке крови животных

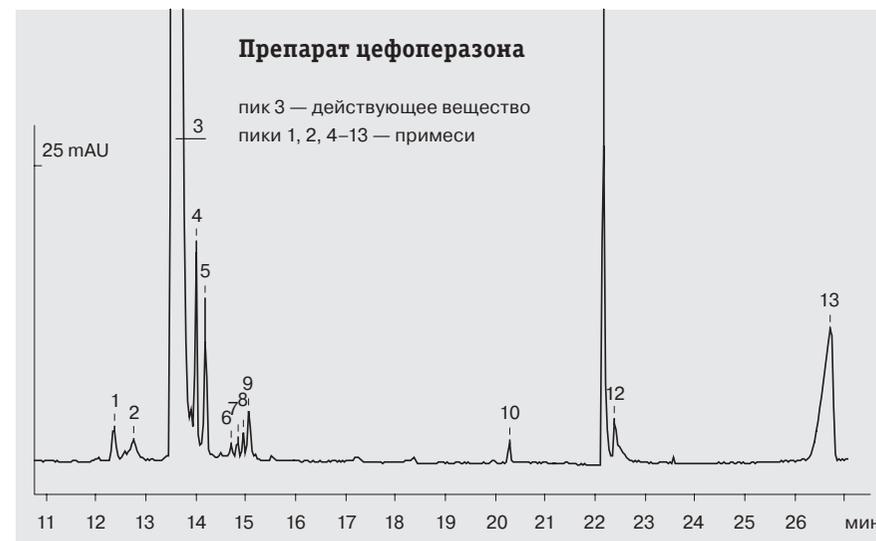


Буфер	30 мМ фосфатный, 4,5 мМ β-ЦД (рН 7,7)
Проба	сыворотка
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	30 °С

При определении свободных форм аминокислот в сыворотке крови аликвоту пробы (100 мкл) непосредственно использовали для получения ФТК-производных аминокислот, после чего анализировали методом капиллярного зонного электрофореза. Предел обнаружения каждой из протеиногенных аминокислот в среднем составляет 1–2 мкмоль/л.

7.5. Фармация

Анализ лекарственных препаратов с использованием МЭКХ (Гремяков А. И., Шпак А. В., Шпигун О. А., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)



Буфер	боратный с ДДСН
Проба	порошок для инфузий
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	100 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Определение чистоты и подлинности современных фармацевтических препаратов, таких как цефалоспориновые антибиотики, представляет сложную аналитическую задачу. Капиллярный электрофорез в варианте МЭКХ успешно применяется для ее решения.

Анализ лекарственных препаратов с использованием КЗЭ

(Гремяков А. И., Шпак А. В., Шпигун О. А., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)



Буфер	фосфатный (pH 7,8)
Проба	раствор смеси соответствующих препаратов
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Благодаря высокой эффективности и отличным от ВЭЖХ принципам разделения достигается высокая селективность при анализе соединений, имеющих сходную структуру.

Анализ лекарственных препаратов с использованием МЭКХ

(Гремяков А. И., Шпак А. В., Шпигун О. А., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)

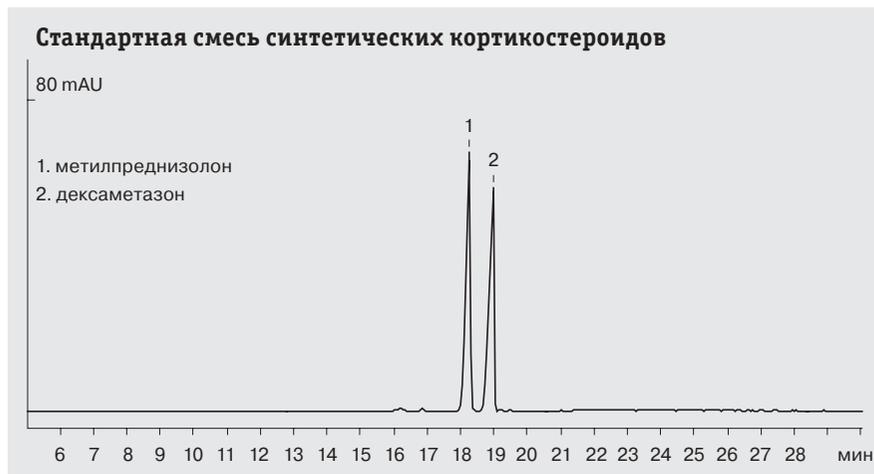


Буфер	боратный, с добавкой ДДСН
Проба	раствор комбинированного препарата цефалоспоринового антибиотика
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	90 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	200 нм
Температура	20 °С

Современные медицинские препараты могут содержать компоненты, усиливающие активность действующего вещества. При использовании МЭКХ со спектрофотометрическим детектированием возможно одновременное определение содержания как активного компонента, так и вспомогательных.

Анализ лекарственных препаратов с использованием МЭКХ

(Гремяков А. И., Шпак А. В., Шпигун О. А., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)

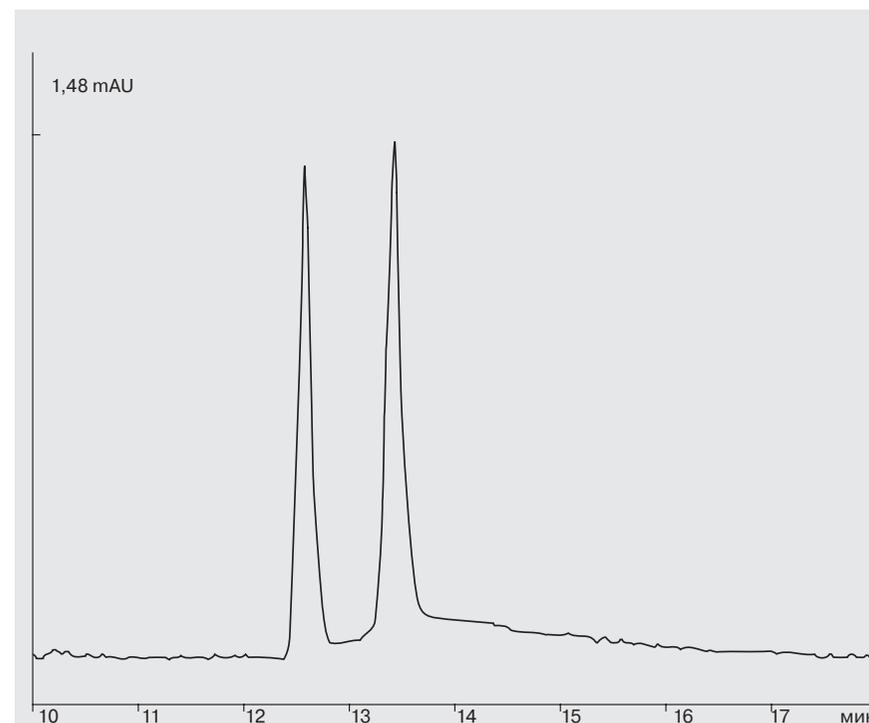


Буфер	фосфорная кислота с добавкой ДДСН
Проба	стандартная смесь дексаметазона и метилпреднизолона
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Напряжение	-25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С
On-line концентрирование компонентов методом SRW (Stacking using reversed-migrating micelles)	

Использование различных вариантов on-line концентрирования позволяет многократно повысить чувствительность определения и проводить анализ препаратов с низким содержанием действующего вещества без предварительного концентрирования методами экстракции или хроматографии.

Разделение оптических изомеров (энантиомеров) лекарственных препаратов

(Буданова Н. Ю., Шаповалова Е. Н., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)



Буфер	10 мМ фосфатный, 2 % декстран сульфата, (рН 6,8)
Проба	модельный раствор энантиомеров флуоксетина
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	гидродинамический
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	200 нм
Температура	20 °С

Важным направлением в фармакологии являются исследования в области разделения оптических изомеров биологически активных соединений.

Определение флавоноидов в экстракте цветков бессмертника

(Гаврилин М. В., Пятигорская государственная фармацевтическая академия, кафедра фармацевтической химии, г. Пятигорск)

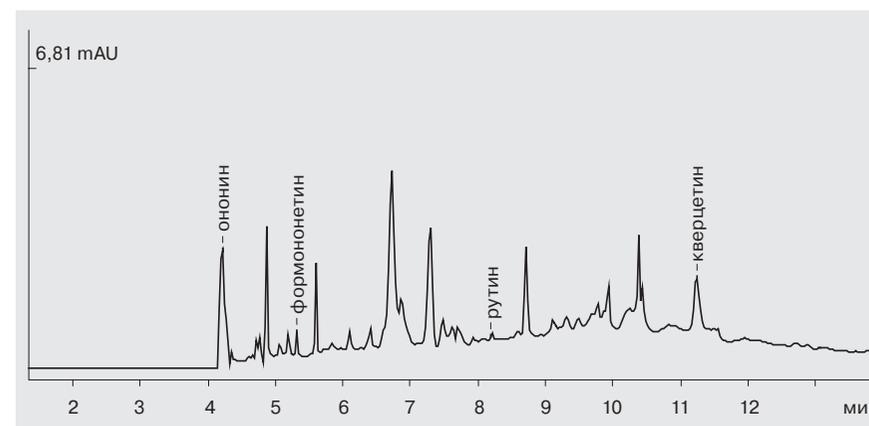


Буфер	боратный
Проба	экстракты бессмертника
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	22 °С

Использование боратного электролита позволяет разделять флавоноиды в зависимости от количества и расположения гидроксильных групп. Сравнивали содержание флавоноидов в спиртовой вытяжке из цветков бессмертника и в сухом экстракте этих же цветков.

Определение флавоноидов в экстракте клевера

(Гаврилин М. В., Пятигорская государственная фармацевтическая академия, кафедра фармацевтической химии, г. Пятигорск)

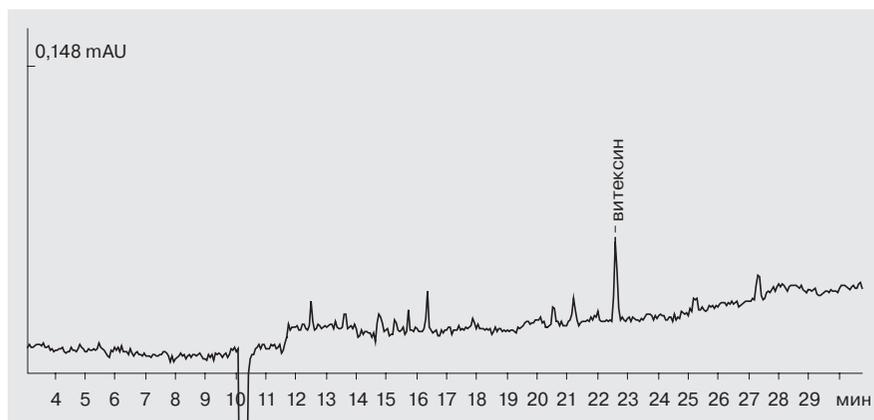


Буфер	боратный
Проба	спиртовой экстракт
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	22 °С

Получали спиртовой экстракт клевера (спирт 40 %), разбавляли водой 1:1.

Определение флавоноидов в траве овса

(Гаврилин М. В., Пятигорская государственная фармацевтическая академия, кафедра фармацевтической химии, г. Пятигорск)

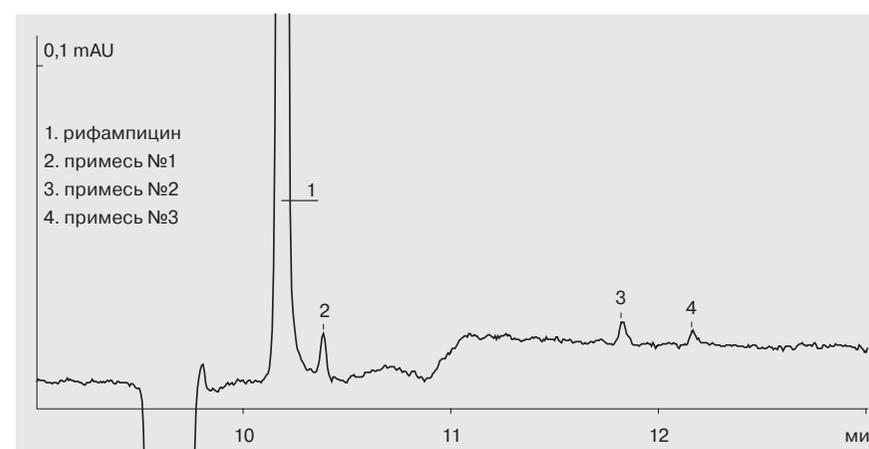


Буфер	боратный
Проба	спиртовой экстракт
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	22 °С

Из травы овса был получен спиртовой экстракт, который разбавили водой 1:1. С помощью КЗЭ определяли витексин-2'-О-рамнозид.

Определение примесей в рифампицине

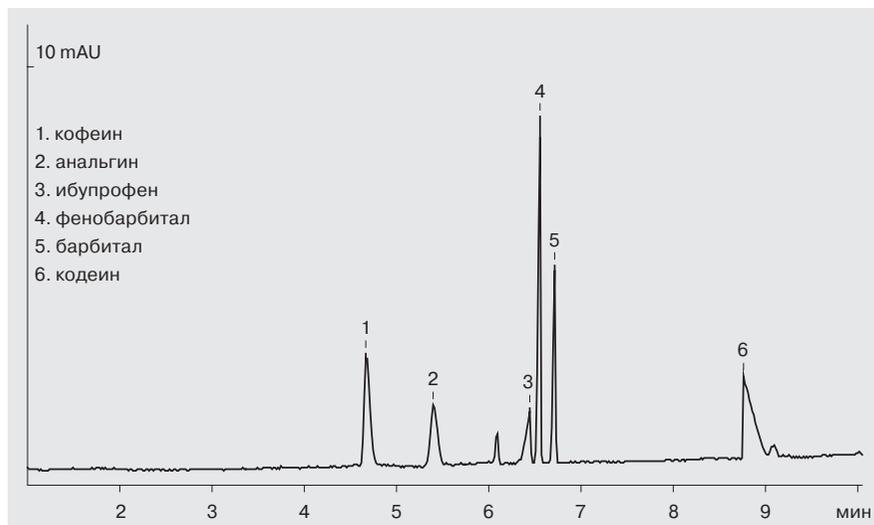
(Сенченко С. П., Овчаренко Л. П., Пятигорская государственная фармацевтическая академия, кафедра фармацевтической химии, г. Пятигорск)



Буфер	фосфатный с β-ЦД
Проба	стандартный раствор рифампицина
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	23 °С

Использование добавок макроциклических реагентов позволяет разделять примеси лекарственных веществ, в том числе и изомеры, что можно использовать для установления сроков хранения лекарственных средств.

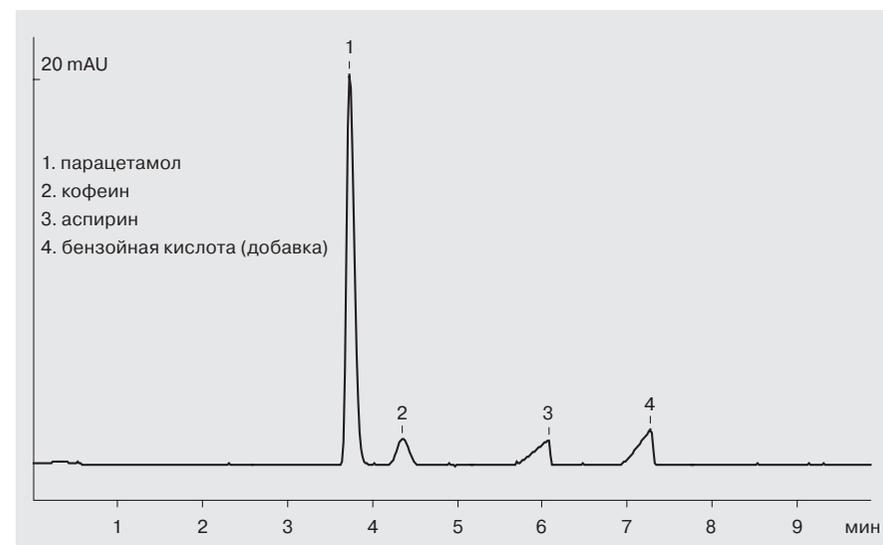
Анализ лекарственных препаратов



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 15 мМ ДДСН
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии чаще всего используется для анализа лекарственных препаратов.

Анализ лекарственных препаратов

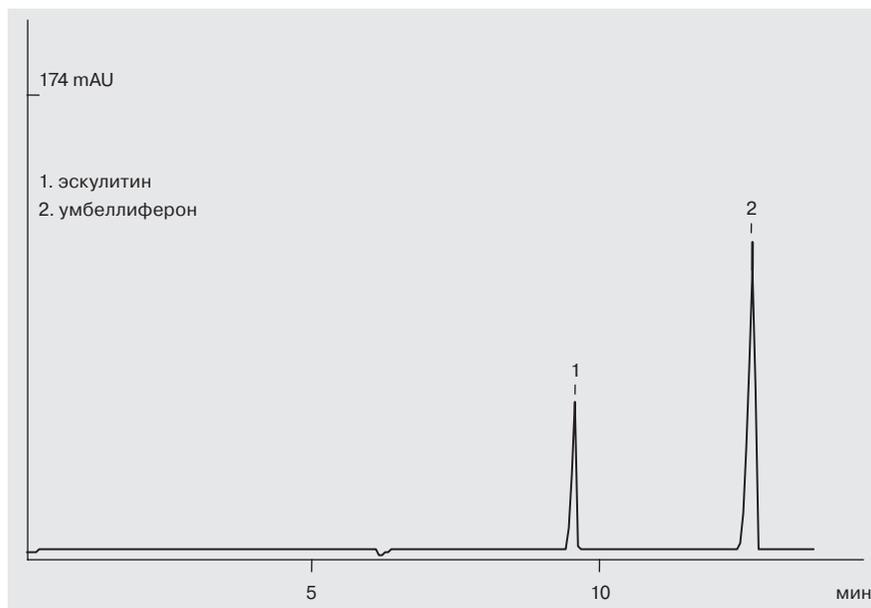


Буфер	50 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	таблет-масса «Цитрамона-П»
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	900 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

Гомогенизированную пробу лекарственного препарата встряхивают с дистиллированной водой, фильтруют и анализируют методом МЭХ.

Анализ кумаринов в экстрактах растительного сырья

(Кокорина Н. О., Новосибирское областное Бюро судебно-медицинской экспертизы и Новосибирский государственный медицинский университет кафедра фармакогнозии, судебно-химическое отделение, г. Новосибирск)



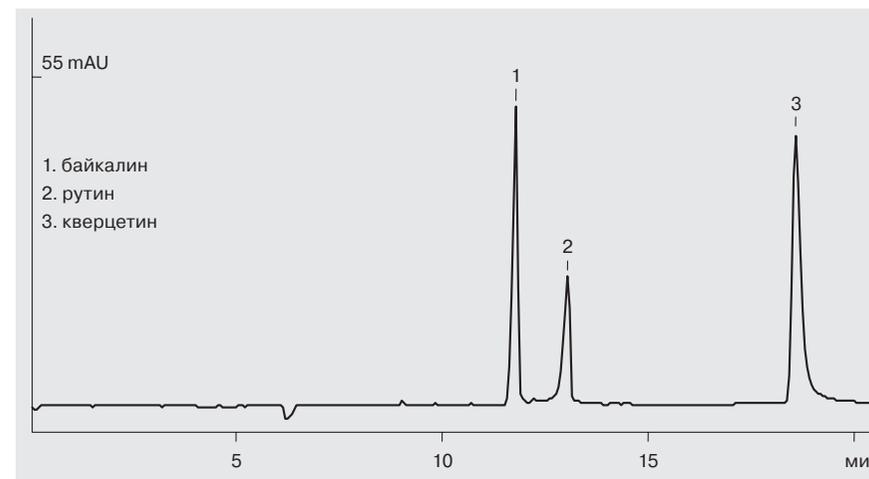
Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	210 нм
Температура	20 °С

Анализ растительного сырья для использования в фитотерапии.

Подготовка пробы: экстракция растительного сырья 96 % этиловым спиртом при нагревании на водяной бане.

Анализ флавоноидов в экстрактах растительного сырья

(Кокорина Н. О., Новосибирское областное Бюро судебно-медицинской экспертизы и Новосибирский государственный медицинский Университет кафедра фармакогнозии, судебно-химическое отделение, г. Новосибирск)



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	210 нм
Температура	20 °С

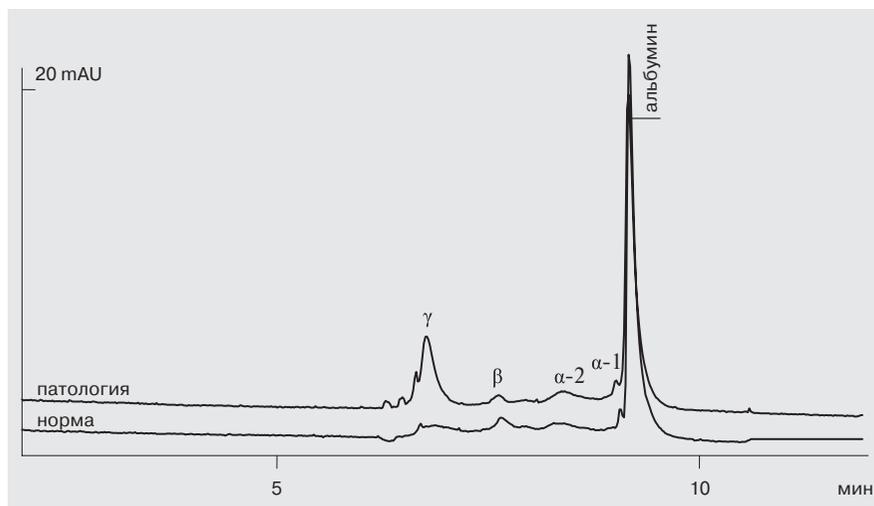
Анализ растительного сырья для использования в фитотерапии.

Подготовка пробы: экстракция растительного сырья 96 % этиловым спиртом при нагревании на водяной бане.

7.6. Клиническая биохимия

Определение белков в биологических жидкостях

(Козлов А. В., Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования (МАПО), кафедра клинической лабораторной диагностики и Королева Е. М., ООО «Центр биохимических исследований», г. Санкт-Петербург)



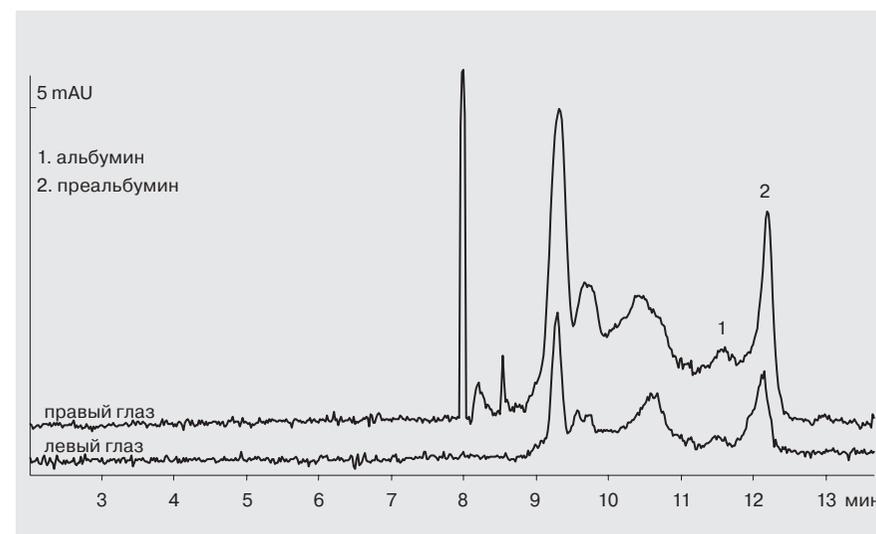
Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый
Проба	сыворотка крови здорового человека и больного с миеломой
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	+15 кВ
Детектирование	215 нм
Температура	20 °С

Определение концентрации альбумина и его отдельных фракций является очень важным диагностическим параметром при целом ряде заболеваний, особенно заболеваний почек и выделительной системы, а также других патологий, приводящих к выраженным нарушениям метаболизма.

Подготовка пробы представляет собой разбавление сыворотки в 50 раз дистиллированной водой.

Определение альбумина в слезной жидкости

(Козлов А. В., Семеско С. Г., Адамсон В. Г., Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования (МАПО), кафедра клинической лабораторной диагностики, г. Санкт-Петербург)

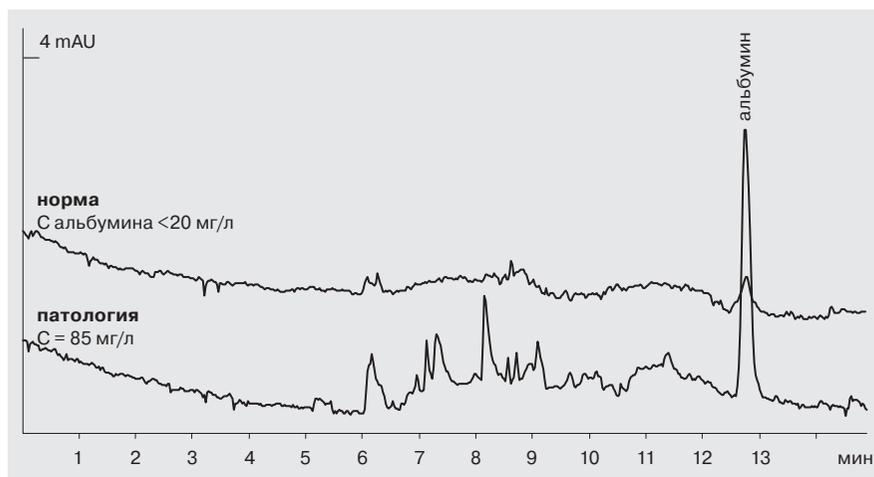


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 5 мМ ДДСН
Проба	слезная жидкость из левого и правого глаза
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+15 кВ
Детектирование	215 нм
Температура	20 °С

Обнаружение альбумина и определение белкового состава слезной жидкости позволяет осуществлять раннюю диагностику диабетического поражения органа зрения.

Диагностика микроальбуминурии (альбумин в моче)

(Козлов А. В., Адамсон В. Г., Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования (МАПО), кафедра клинической лабораторной диагностики, г. Санкт-Петербург)



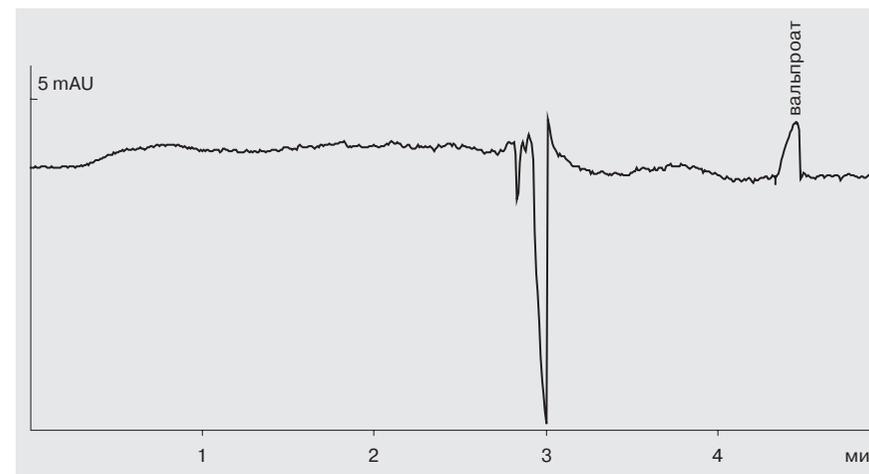
Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 5 мМ ДДСН
Проба	экстракты мочи здорового человека и больного сахарным диабетом
Капилляр	$L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 50/60 \text{ см}$, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар \times с
Напряжение	+15 кВ
Детектирование	215 нм
Температура	20 °С

Обнаружение белка в моче в ряде случаев может оказаться первым и часто единственным признаком не только почечной патологии, но и таких заболеваний, как сахарный диабет, диффузные заболевания соединительной ткани, артериальная гипертония, миелома и т. д. Особый интерес вызывает определение альбумина в моче для выявления диабетической нефропатии.

Подготовка пробы: обессоливание мочи на хроматографической колонке (10 \times 1 см), заполненной гелем Sephadex G-25 и центрифугирование элюата.

Определение фармакокинетики вальпроевой кислоты в сыворотке крови

(Никитина Т. Г., Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Санкт-Петербург)



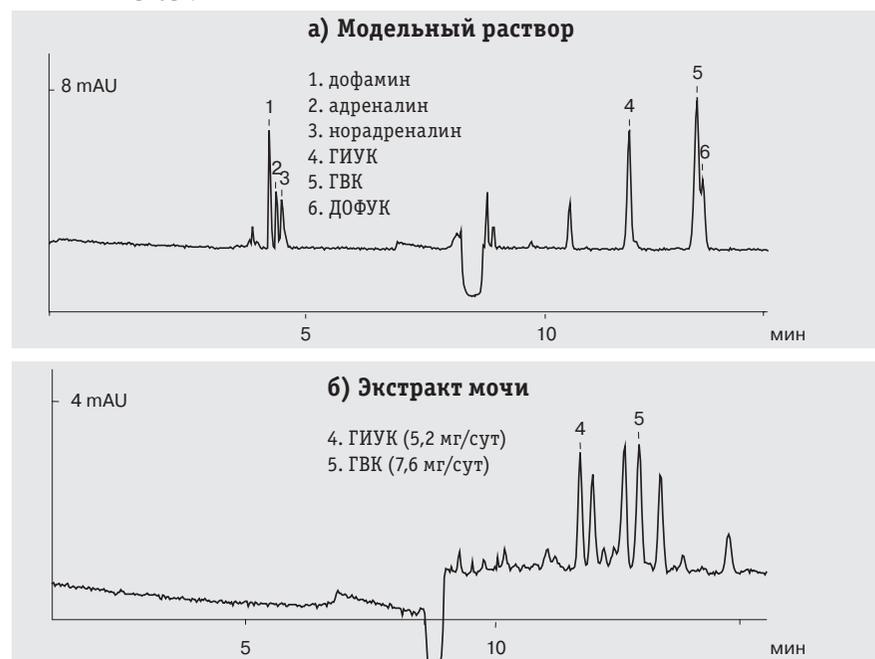
Буфер	10 мМ фенилантраниловой кислоты (рН 9,25)
Проба	экстракт сыворотки
Капилляр	$L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}} = 50/60 \text{ см}$, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар \times с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Вальпроевая кислота и ее соли, вальпроаты, входят в состав антиэпилептических препаратов. Мониторинг уровня вальпроатов в биологических жидкостях обусловлен наличием зависимости клинического эффекта от концентрации и выраженной индивидуальной вариабельности между дозой препарата и содержанием в сыворотке.

Подготовка биологических образцов: селективное выделение вальпроатов из подкисленной сыворотки гексаном и последующая реэкстракция в раствор ведущего электролита.

Определение катехоламинов и кислотных метаболитов тирозина и триптофана в моче

(Королева Е. М., Адамсон В. Г., ООО «Центр биохимических исследований», г. Санкт-Петербург)



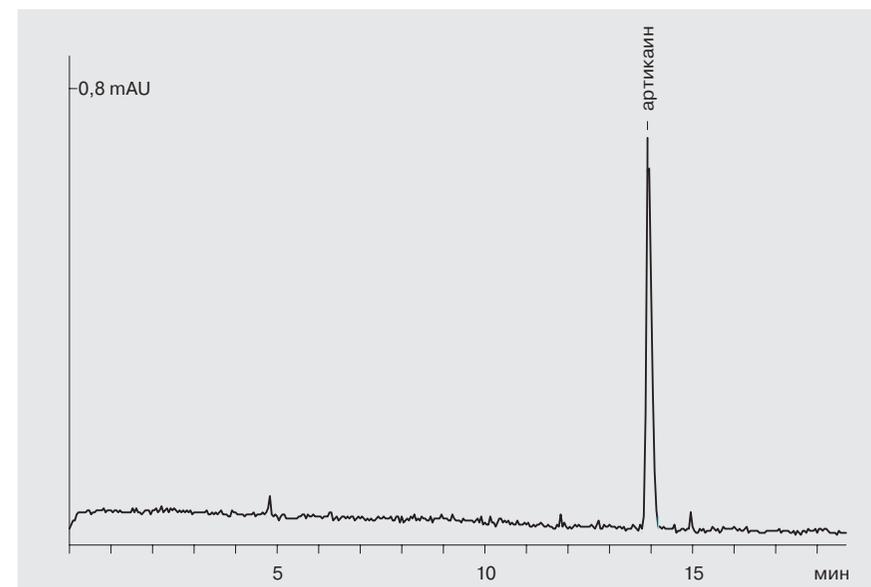
Буфер	30 мМ натрия ацетат (рН 4,0)
Проба	а) модельный раствор (ГИУК — 5-гидроксииндолуксусная кислота, ГВК — гомованилиновая кислота, ДОФУК — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота) б) экстракт мочи больного нейробластомой
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	600 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	220 нм
Температура	20 °С

Измерение содержания катехоламинов и кислотных метаболитов широко применяется в диагностике различных неврологических и онкологических заболеваний, особенно феохромоцитомы, нейробластомы, карциноида. Однако одновременное определение этих компонентов в пробе невозможно из-за различных условий их выделения из биологической матрицы.

Подготовка биологической пробы: экстракция из подкисленного образца в этилацетат, удаление органического растворителя и растворение сухого остатка в буферном растворе.

Определение артикаина в клинических биологических образцах

(Джурко Ю. А., Фомин А. Н., Ярославская государственная медицинская академия, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, г. Ярославль)



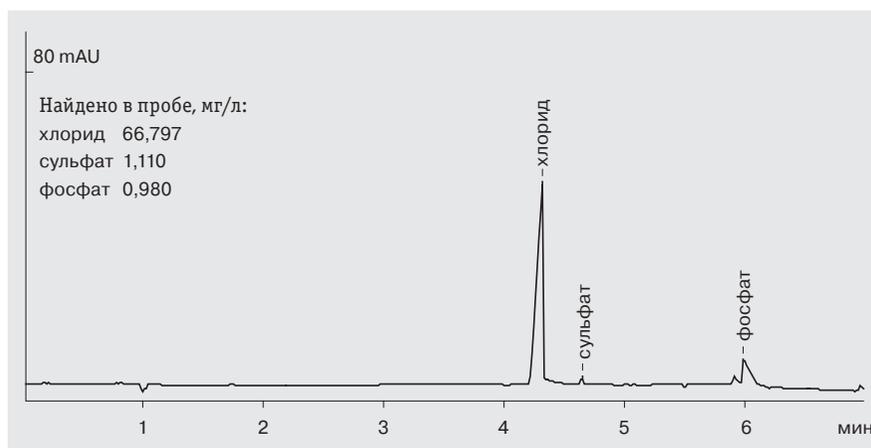
Буфер	раствор Бриттона-Робинсона
Проба	кровь (клинический объект)
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	270 нм
Температура	20 °С

С помощью системы КЭ «Капель-105» изучались новые анестезирующие средства для местного обезболивания.

Показана возможность анализа артикаина в крови в условиях клиники с целью объективного контроля уровня анестетика в организме при хирургических вмешательствах под местной анестезией.

Анализ неорганических анионов в диализных растворах

(Суглобова Е. Д., Левыкина Е. Н., Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург)



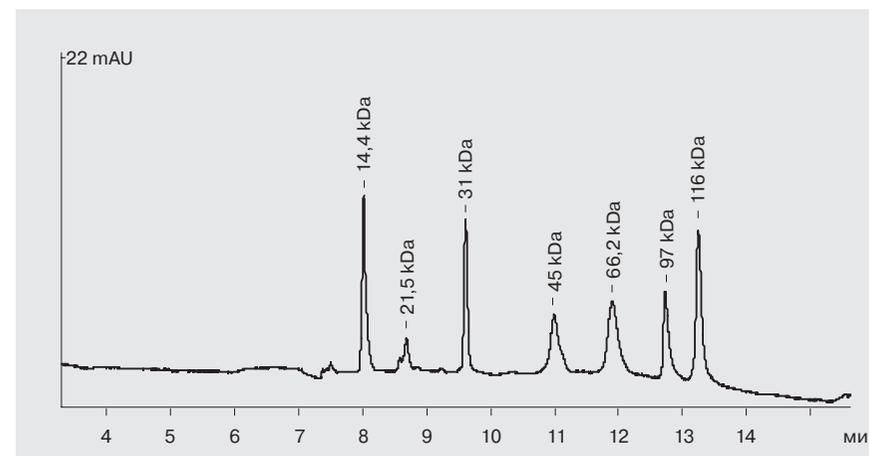
Буфер	анионный
Проба	диализат, разбавлен в 50 раз дистиллированной водой
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Кальций-фосфорный обмен является уязвимым у пациентов, находящихся на длительном, регулярном гемодиализе. Изменения некоторых ключевых параметров Са–Р обмена приводят к увеличению риска смертности у диализных больных. Для наиболее полного и быстрого выведения фосфора необходимо контролировать условия протекания сеанса гемодиализа.

Анализируемыми образцами являются — раствор Моргана (электролитический аналог сыворотки крови) и диализирующие растворы (до и после диализа).

Разделение белков по их молекулярной массе

(Окунь В. М. для концерна BASF (Германия), «Капель-105М»)

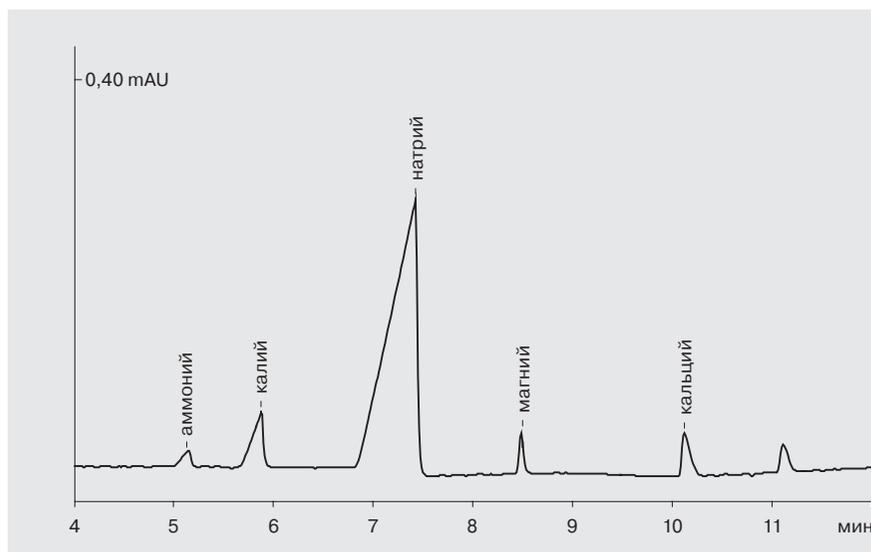


Буфер	для разделения белков на основе нештитого геля
Проба	стандартная смесь белков
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 31/40$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	электрокинетический
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	220 нм
Температура	20 °С

Предложенное решение в варианте капиллярного гель-электрофореза может быть успешно применено для определения молекулярной массы неизвестного белка. Однако более важной общей задачей многих биотехнологических производств является возможность разделения конечного продукта в виде мономера, обладающего фармацевтической активностью, от его димера, таковой активностью, как правило, не обладающего. В условиях зонного КЭ это разделение практически невозможно ввиду равного отношения заряда к массе у мономера и димера.

Катионы желудочного сока при патологии гастродуоденального комплекса

(Коротыко Г. Г., Российский центр функциональной хирургической гастроэнтерологии, г. Краснодар)



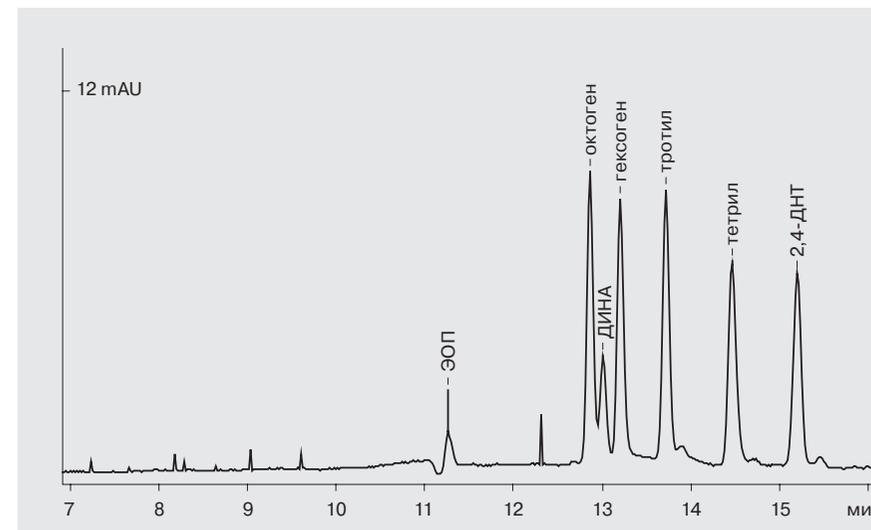
Буфер	для анализа катионов
Проба	натошачовое содержимое желудка
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	гидродинамический
Напряжение	+10 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

В составе содержимого желудка (СЖ) определяются катионы аммония 2–8 мг%, Na^+ 23–276 мг%, Ca^{2+} 1–1,5 мг%, Mg^{2+} 1–5 мг%. Натощачовое содержимое желудка лиц с патологией гастродуоденального комплекса содержит значительное количество кальция. Концентрация аммония в натощачовом содержимом желудка в большей мере имеет экскреторное происхождение и в незначительной степени связано с контаминацией *Helicobacter pylori* (НР). Концентрация натрия натощачового содержимого желудка при высоких рН повышена, и понижена при низких, что подтверждает связь кислотопродукции с транспортом натрия. Содержание калия в натощачовом содержимом желудка стабильно и не зависит от величины его рН.

7.7. Криминалистическая экспертиза

Анализ взрывчатых веществ

(Будников В. Н., ГУ Средне-Волжский региональный центр судебной экспертизы Министерства Юстиции РФ, г. Казань)

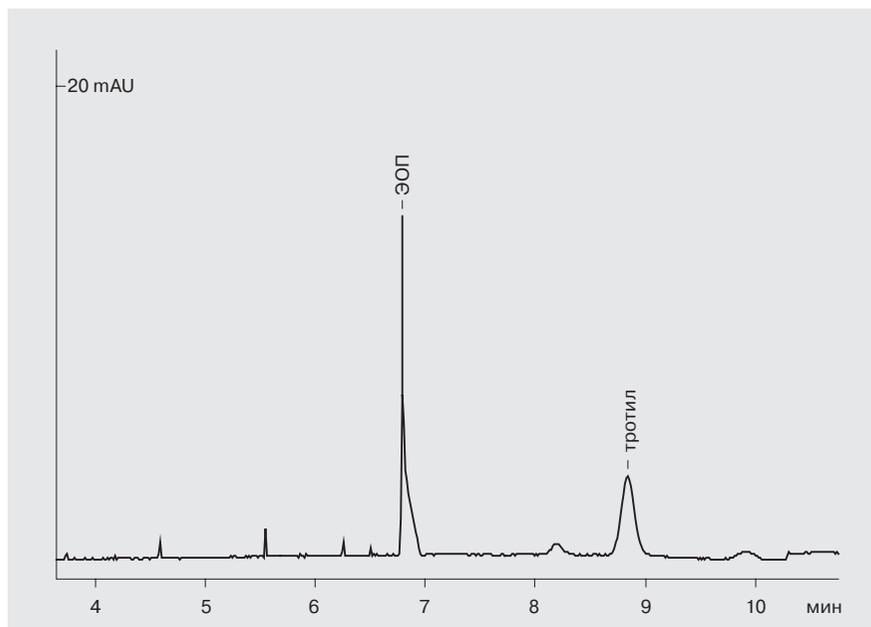


Буфер	боратный с добавками ДДСН и метанола
Проба	смесь взрывчатых веществ
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	18 кВ×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии позволяет идентифицировать и разделять взрывчатые вещества и их компоненты в объектах с места взрыва.

Обнаружение следов тротила на осколках ручной гранаты РГД-5 после ее взрыва

(Будников В. Н., ГУ Средне-Волжский региональный центр судебной экспертизы Министерства Юстиции РФ, г. Казань)

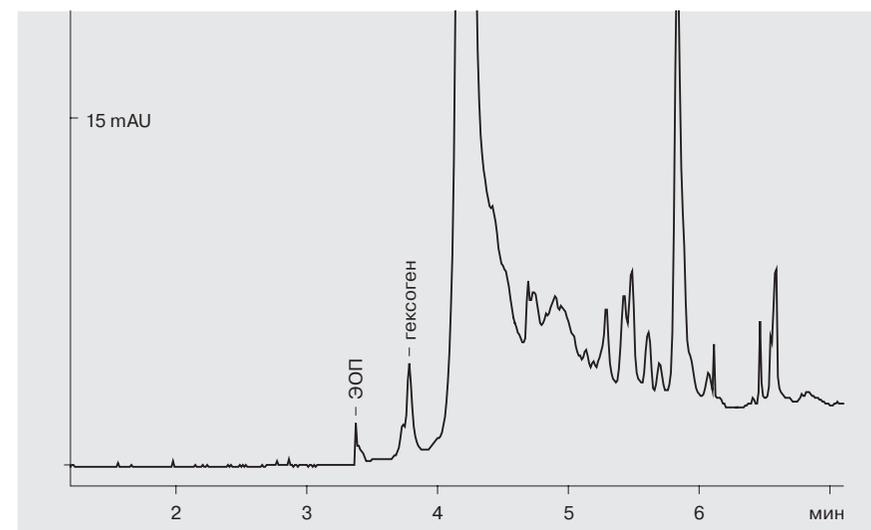


Буфер	боратный с добавками ДДСН и метанола
Проба	осколки гранаты РГД-5, обнаружено 3,6 мкг тротила
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	60 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

После подрыва ручной гранаты РГД-5 с поверхности образовавшейся в результате взрыва воронки были извлечены осколки корпуса, полученный в результате пробоподготовки раствор был проанализирован методом МЭКХ на предмет присутствия непродетонированного тротила.

Обнаружение следов гексогена в грунте после взрыва

(Будников В. Н., ГУ Средне-Волжский региональный центр судебной экспертизы Министерства Юстиции РФ, г. Казань)

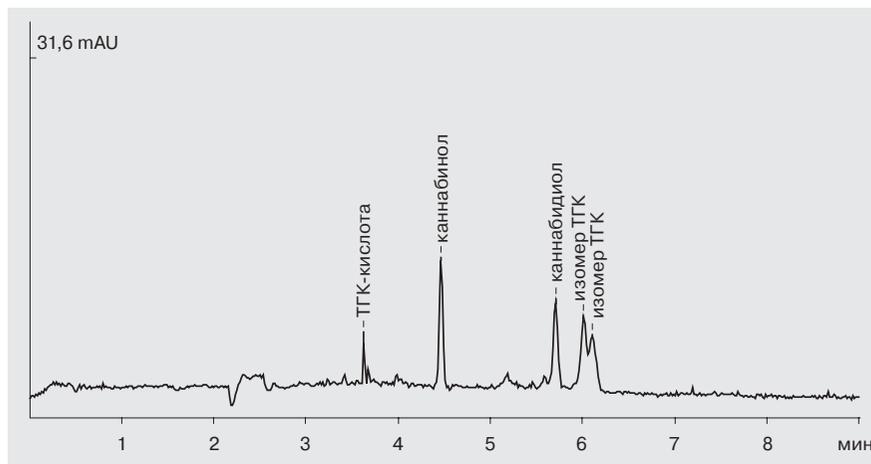


Буфер	боратный с добавками ДДСН
Проба	грунт с места взрыва, обнаружено 4,1 мкг гексогена
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	80 мбар×с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	комнатная

После взрыва разрывного заряда из флегматизированного гексогена из образовавшейся воронки был снят поверхностный слой грунта. После подготовки пробы в полученном экстракте были обнаружены следы гексогена.

Анализ наркотических средств растительного и синтетического происхождения

(Король А. А., Шелудько В. В., Управление Федеральной Службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Краснодарскому краю, г. Краснодар)



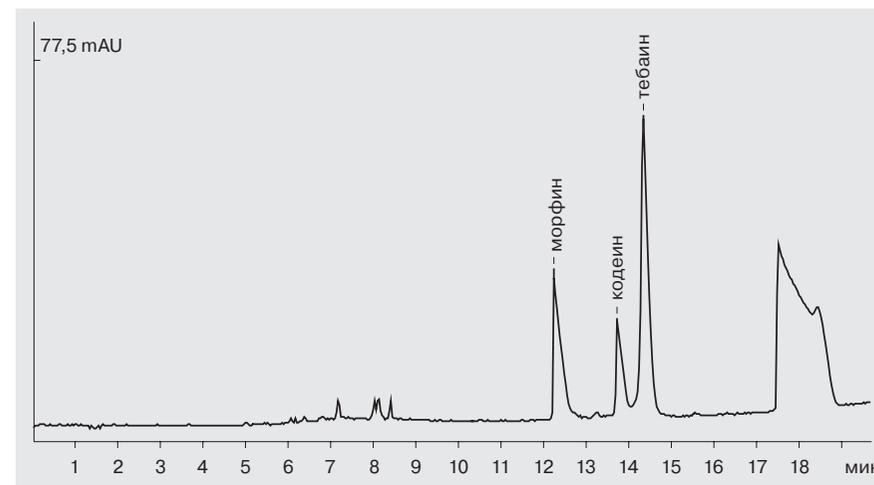
Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	конопля, экстракция этанолом, разбавление водой ТТК-кислота — тетрагидроканнабиноловая кислота ТКГ — тетрагидроканнабинол КБ — каннабинол, КБД — каннабидиол
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	+50 °С

Метод капиллярного электрофореза может быть использован в криминалистических исследованиях наркотических средств на этапе предварительных исследований изымаемых из незаконного оборота препаратов с целью установления факта присутствия наркотических средств и количественного определения действующих (активных) компонентов, а также для установления единства источника происхождения наркотиков.

Возможен анализ таких классов наркотических средств и психотропных веществ, как: опиаты, каннабиноиды, амфетамины, барбитураты, бензодиазепины, галлюциногены (мескалин, псилоцибин) и их прекурсоров. При этом образцами для контроля могут выступать пробы растительного происхождения, объекты тонкого органического синтеза (порошки, таблетки, экстракты).

Анализ опиоя

(Король А. А., Шелудько В. В., Управление Федеральной Службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Краснодарскому краю, г. Краснодар)

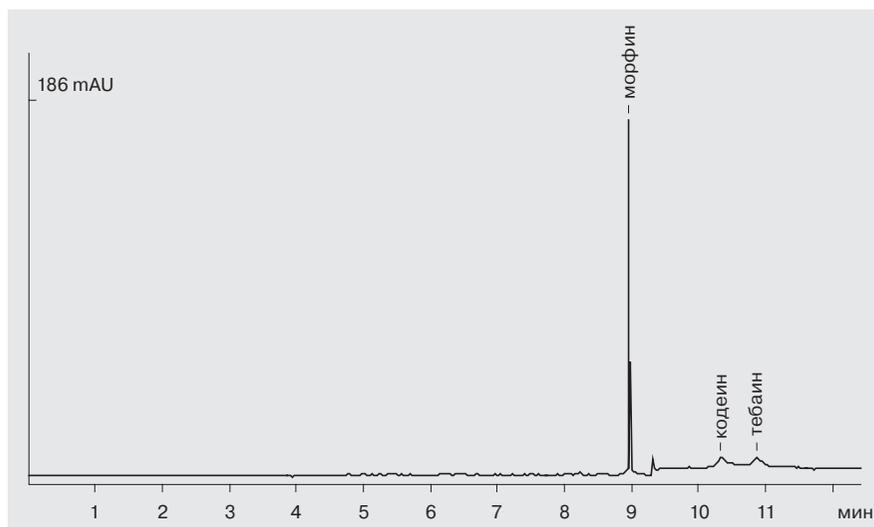


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	водно-спиртовой экстракт опиоя
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	+20 °С

В образце растительного происхождения обнаружены основные опиаты. На этапе подготовки пробы проводили ее гомогенизацию, экстракцию водно-спиртовым раствором, фильтрование и дегазирование.

Анализ маковой соломой

(Король А. А., Шелудько В. В., Управление Федеральной Службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Краснодарскому краю, г. Краснодар)

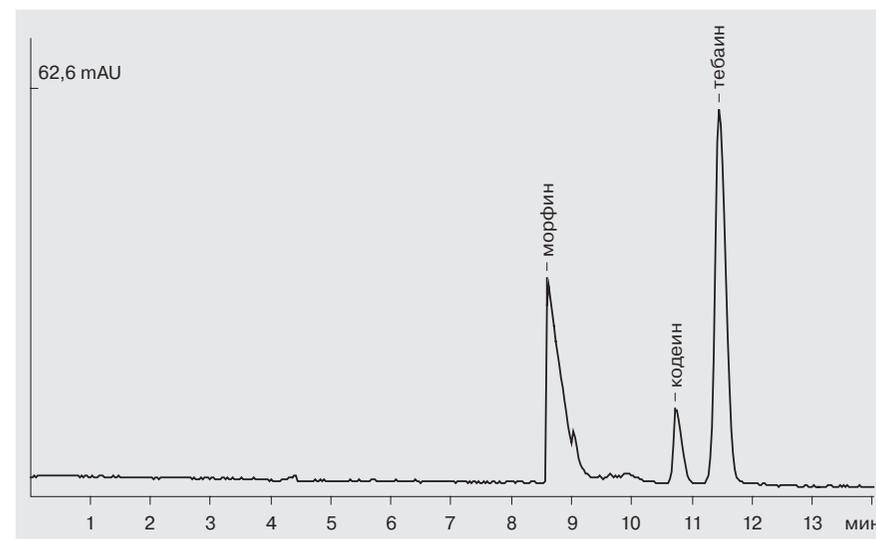


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	водно-спиртовой экстракт маковой соломой
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	+45 °С

Повышение температуры позволяет сократить время анализа опиатов.

Анализ лекарственного препарата — омнопон

(Король А. А., Шелудько В. В., Управление Федеральной Службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Краснодарскому краю, г. Краснодар)

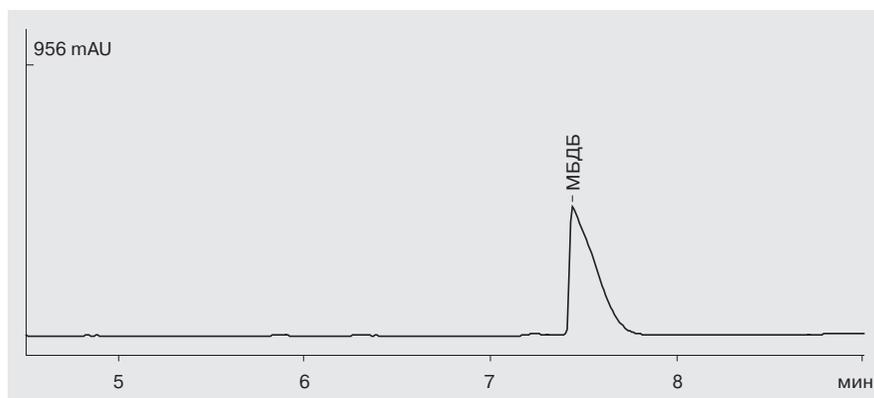
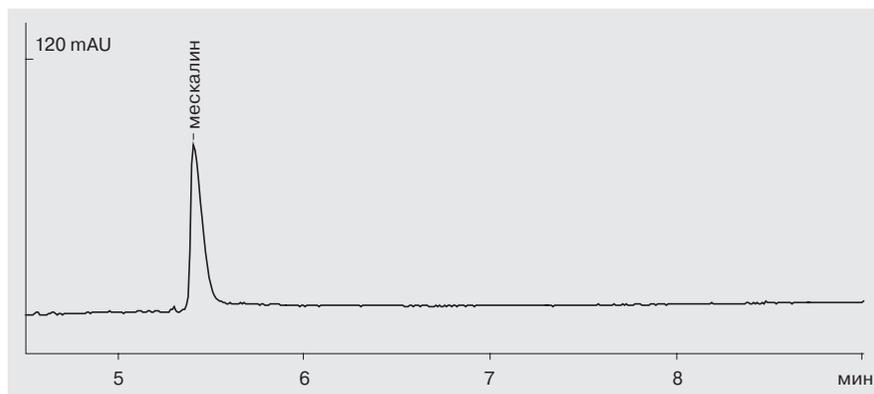


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	омнопон
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	+45 °С

Показана возможность анализа опиатов в лекарственном препарате.

Анализ амфетаминов

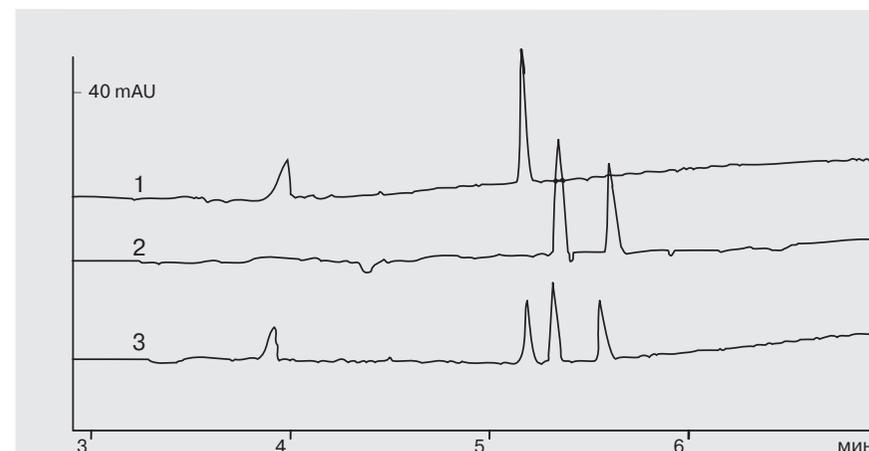
(Король А. А., Шелудько В. В., Управление Федеральной Службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Краснодарскому краю, г. Краснодар)



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	амфетамины, таблет-массы
Капилляр	Лэфф/Лобц = 50/60 см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар x с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	210 нм
Температура	+50 °С

Для анализа различных амфетаминов рекомендован вариант МЭКХ при повышенной температуре.

Идентификация маркеров фосфорорганических отравляющих веществ



Буфер	5 мМ сорбиновая кислота, 20 мМ ДЭА, 1,65 мМ ЦТАБ
Проба	1. смесь метилфосфоновой кислоты (МФК) и изопропилМФК 2. смесь изобутилМФК и пинаколилМФК 3. смесь МФК, изопропилМФК, изобутилМФК и пинаколилМФК
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	600 мбар x с
Напряжение	-20 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	+30 °С

Схема предназначена для идентификации маркеров фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ): изопропилметилфосфоновой кислоты (зарин), пинаколилметилфосфоновой кислоты (зоман), изобутилметилфосфоновой кислоты (русский Vx) и метилфосфоновой кислоты (универсальный маркер группы ФОВ) в воде. Объектами анализа могут быть грунтовые, поверхностные и питьевые воды. Область применения — мониторинг окружающей среды в районах уничтожения химического оружия, а также расследование случаев несанкционированного применения ФОВ как для доказательства факта применения, так и для определения уровня загрязнения территории.

Анализ неорганических анионов в сыворотке крови

(Кокорина Н. О., Новосибирское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, судебно-химическое отделение, г. Новосибирск)

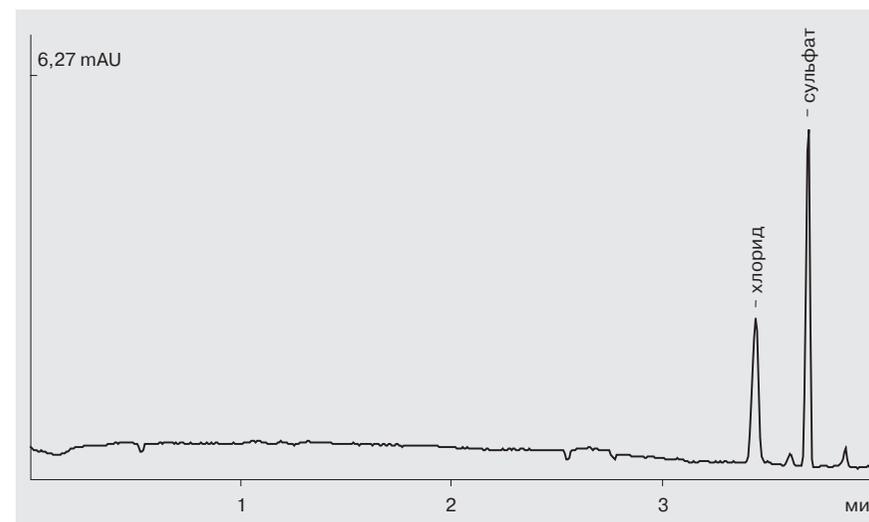


Буфер	для анионов
Проба	раствор сыворотки крови с осажденными белками
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Экспрессный количественный анализ крови при отравлении сульфатами, фторидами и нитритами. Подготовка пробы включает в себя осаждение белков сыворотки ацетонитрилом (1:2), центрифугирование и разбавление супернатанта в 20 раз.

7.8. Технологические задачи

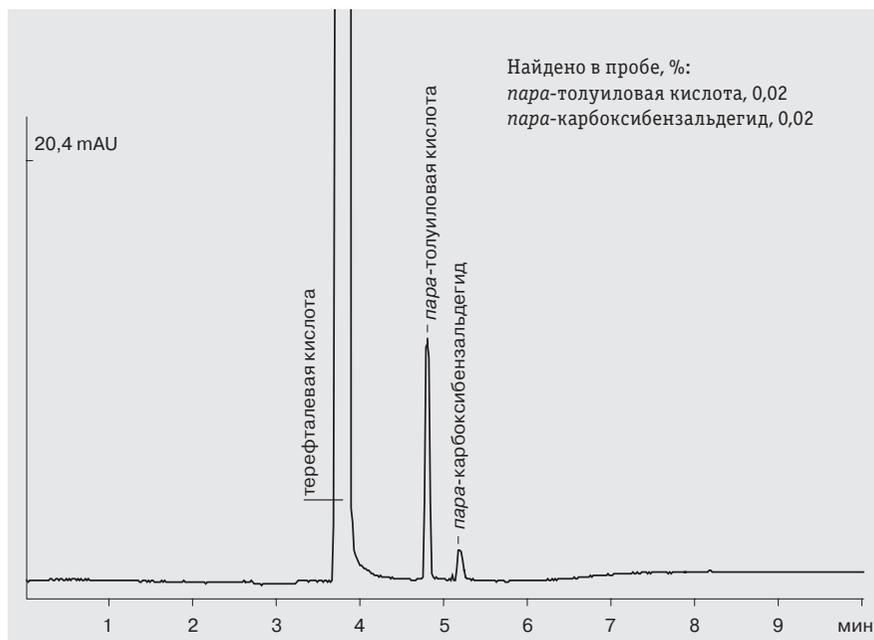
Определение низких концентраций примесей на фоне основного компонента. Анализ хлорид- и сульфат-ионов на фоне гидроксида лития



Буфер	10 мМ хроматный буфер, 2,5 мМ, ЦТАОН, 50 мМ ДЭА
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	240 кВ×с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	20 °С

Для повышения чувствительности определения выбран электрокинетический ввод пробы.

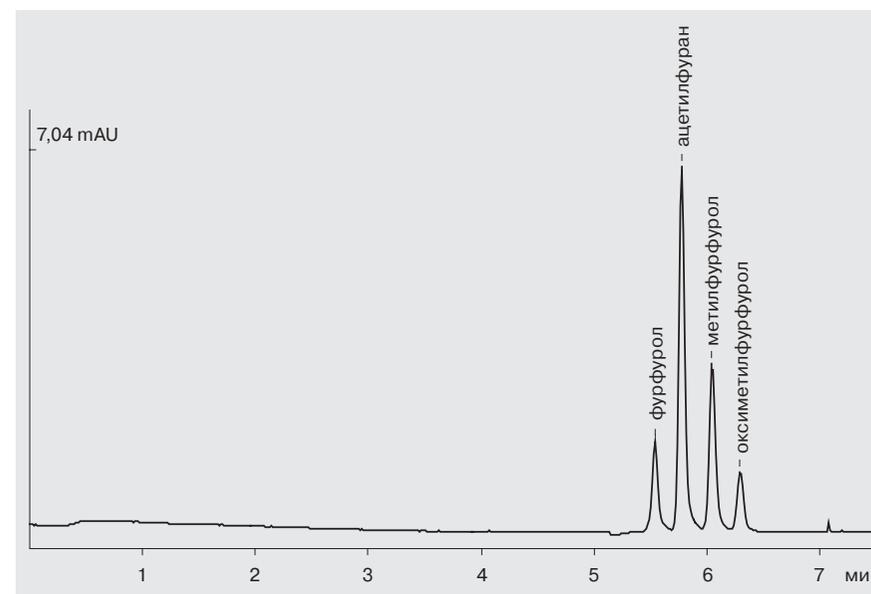
Анализ микропримесей *para*-толуиловой кислоты и *para*-карбокситолуальдегида при синтезе терефталевой кислоты



Буфер	пробковая кислота, гидроксид лития (рН 10,7)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	900 мбар \times с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Контроль за побочными продуктами реакции при синтезе терефталевой кислоты ведут на уровне десятых долей процента. Показана возможность разделения и количественного определения примесей на фоне основного вещества на уровне 0,008–0,02%.

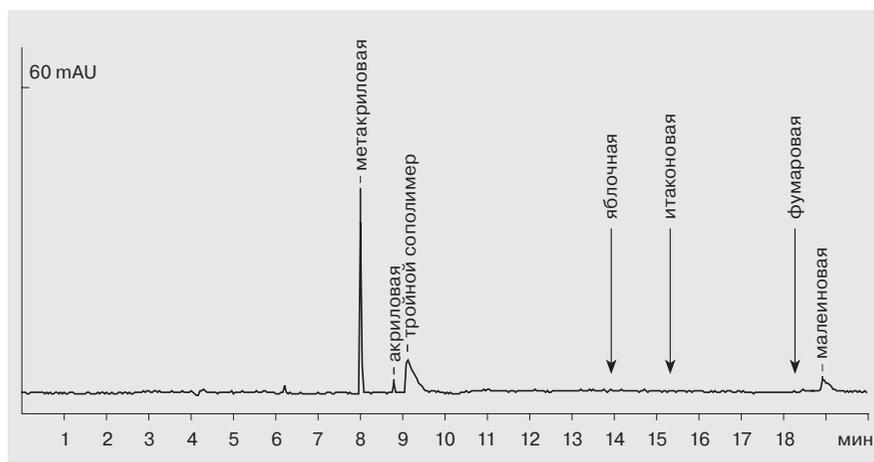
Анализ фурановых производных



Буфер	буфер для анализа фуранов
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	150 мбар \times с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Анализ фурановых производных необходим при контроле за рабочим состоянием трансформаторов.

Анализ остаточных мономеров в полимерной матрице



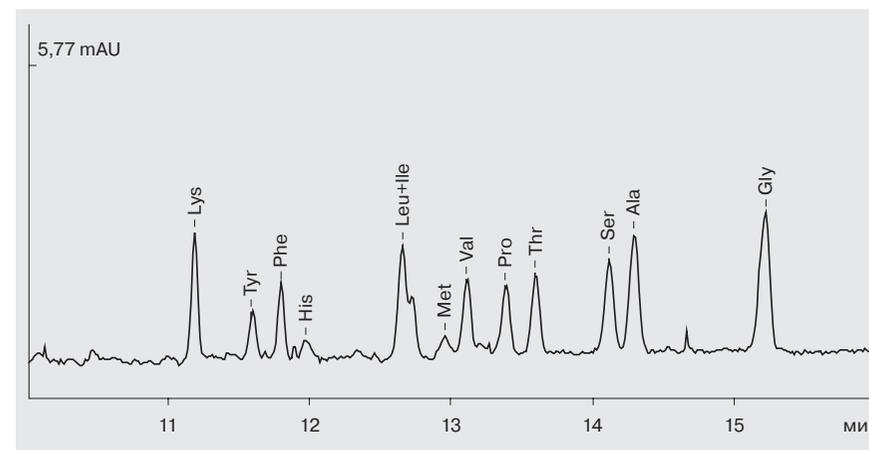
Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый
Проба	проба тройного сополимера на основе метакриловой, акриловой и малеиновой кислот
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	205 нм
Температура	40 °С

При синтезе полимерных матриц важно контролировать полноту реакций по отсутствию или минимальному содержанию исходных мономеров. Капиллярный зонный электрофорез обеспечивает высокую селективность разделения полимерной и индивидуальных мономерных форм.

При синтезе двойных и тройных сополимеров на основе акриловой, малеиновой и метакриловой кислот следовало также оценить возможное мешающее влияние компонентов, являющихся продуктами гидролиза, изомеризации и других сопутствующих синтезу реакций. Показано отсутствие такого влияния для фумаровой, яблочной и итаконовой кислот.

Исследование аминокислотного состава табака

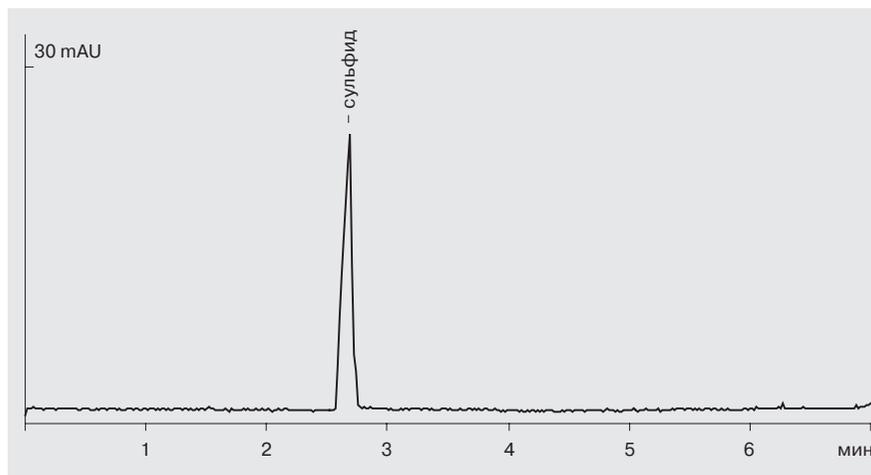
(Лебедев М. Ю. для Погарской сигаретно-сигарной фабрики)



Буфер	боратный с добавкой β-ЦД
Проба	кислотный гидролизат листьев табака с дериватизацией ФИТЦ
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	25 °С

Аминокислотный профиль листьев табака дает информацию о качестве сырья, степени его готовности и соблюдении технологии при его уборке, хранении и сушке. С использованием метода капиллярного электрофореза возможно определение до 20 аминокислот в форме ФТК-производных за один анализ.

Прямое спектрофотометрическое детектирование неорганических анионов

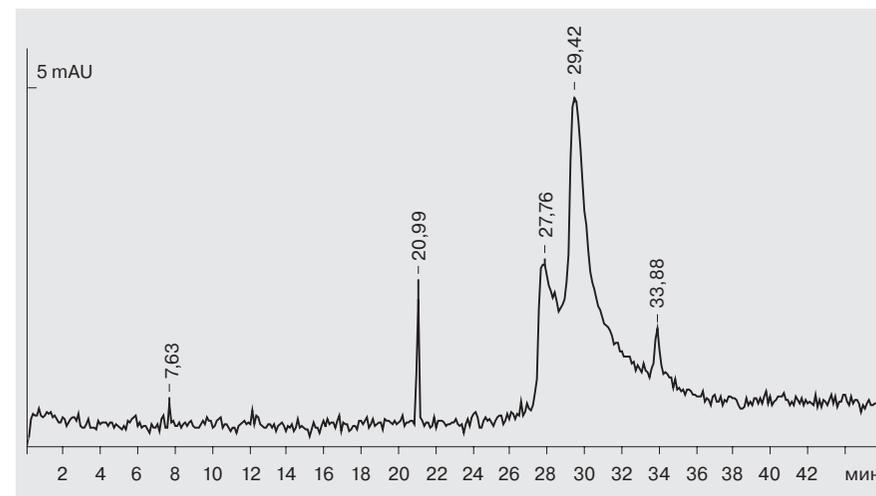


Буфер	2 мМ ЦТАБ, 24 мМ ДЭА
Проба	раствор сульфида натрия
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	230 нм
Температура	20 °С

В некоторых случаях возможно прямое спектрофотометрическое детектирование неорганических анионов (хромат, сульфид, нитрит, нитрат и др.). При этом достигается дополнительная, спектральная селективность определения.

Определение подвижности полиакриловой кислоты с разной степенью полимеризации

(Шпак А. В., Пирогов А. В., Шпигун О. А., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)



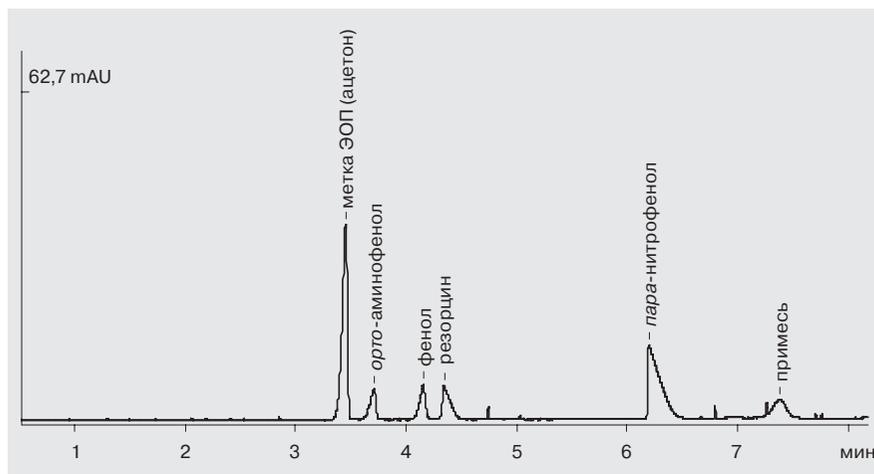
Буфер	боратный
Проба	смесь ПАК 130 000, 250 000 и 5 100 г/моль
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	гидродинамический
Напряжение	25 кВ
Детектирование	210 нм
Температура	20 °С

В качестве новых псевдостационарных фаз для МЭКХ предложены фазы на основе полиэлектролитных комплексов полиакриловой кислоты и четвертичных аммониевых оснований. Эти фазы обладают рядом преимуществ, имеют больше варьируемых параметров и проявляют уникальную селективность.

Проведенный анализ важен для оценки собственной подвижности псевдостационарной фазы и выяснения природы взаимодействий разделяемых компонентов с псевдостационарной фазой.

Уникальная селективность разделения фенолов с новым типом псевдостационарной фазы на основе полиэлектролитных комплексов

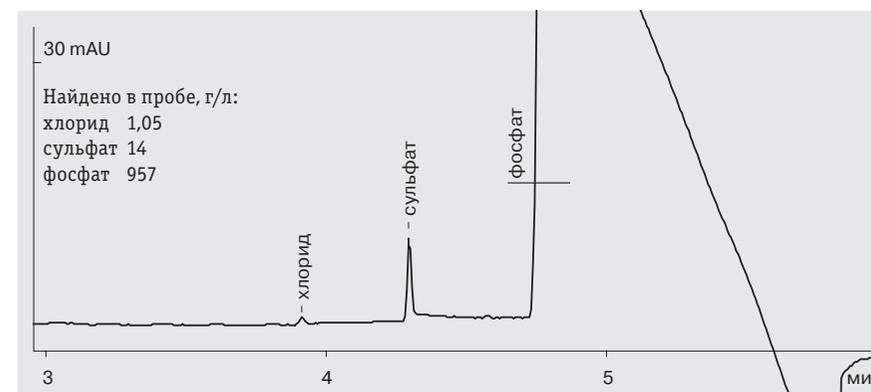
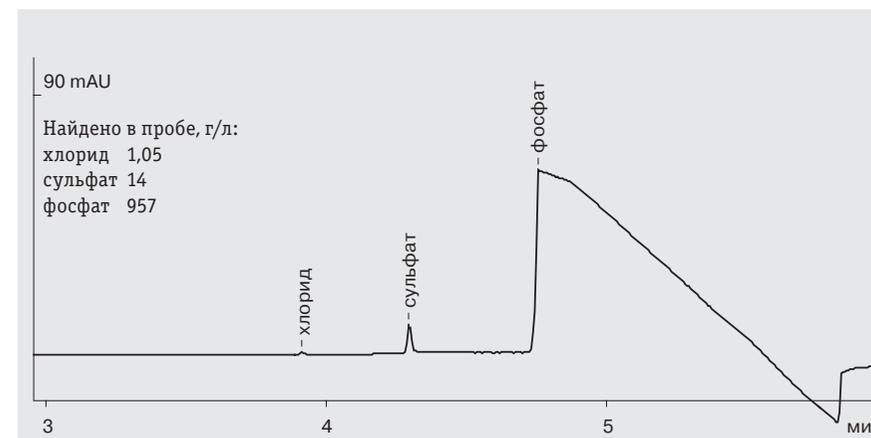
(Шпак А. В., Пирогов А. В., МГУ, химический факультет, кафедра аналитической химии, г. Москва)



Буфер	дигидрофосфат 10 мМ, ПАК-С12 ($f = 0,3$), (рН 5,8–6,2)
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 42/50$ см, ID = 100 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	17 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Предложен новый тип псевдостационарной фазы для МЭКХ на основе полиэлектролитных комплексов полиакриловой кислоты и четвертичных аммониевых оснований.

Определение сульфат-иона на фоне концентрированной орто-фосфорной кислоты



Буфер	для анионов
Проба	модельный раствор на основе концентрированной орто-фосфорной кислоты с добавкой серной кислоты (по сульфат-иону ~10 г/л); перед анализом пробу разбавляли в 1000 раз.
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	150 мбар·с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	30 °С

Технологическая задача — анализ серной кислоты в концентрированной фосфорной — может быть успешно решена при выборе стандартных условий разделения и определения неорганических анионов.

Анализ экстрактов полыни методом МЭКХ

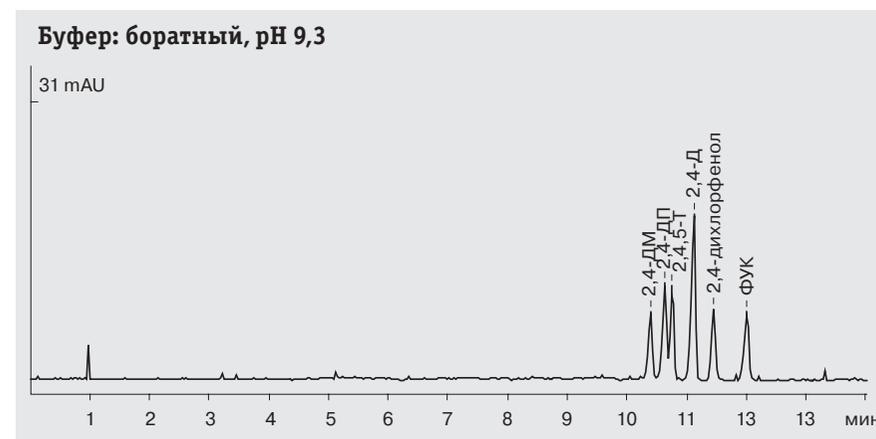
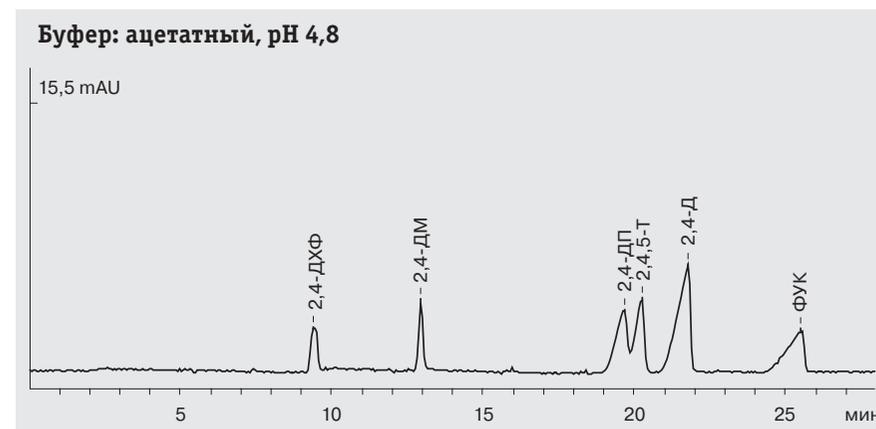


Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый, 40 мМ ДДСН
Проба	экстракты полыни, разбавлены в 5 раз
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+25 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Выбор экстрагента во многом влияет на качественный и количественный состав получаемых экстрактов, что в целом определяет их потребительские свойства (вкус, цвет, аромат, срок хранения и т. д.).

7.9. Некоторые методические возможности

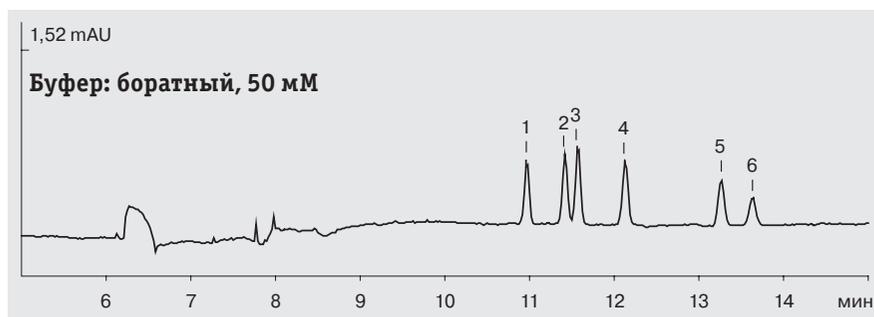
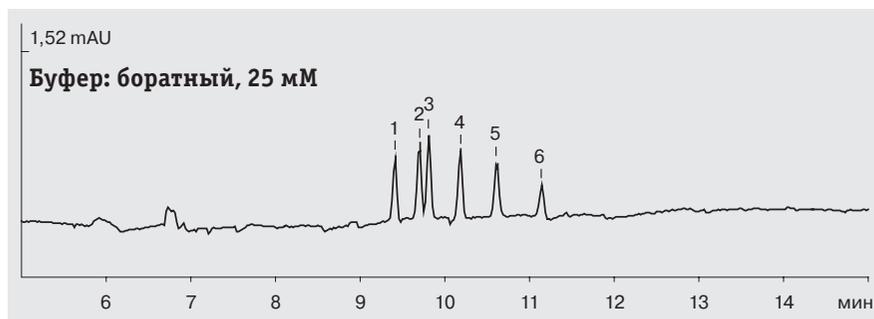
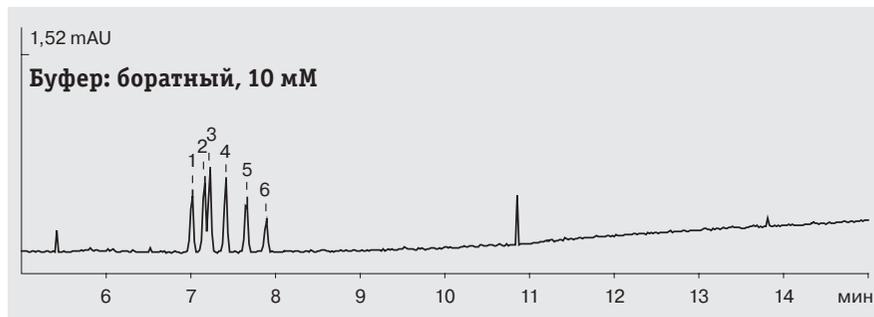
Влияние pH ведущего электролита на разделение компонентов



Буфер	боратный или ацетатный
Проба	модельный раствор феноксикарбоновых кислот и 2,4-дихлорфенола
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	205 нм
Температура	20 °С

Выбор оптимальной величины pH ведущего электролита является залогом успешного разделения, особенно в варианте КЗЭ. Величина pH буфера определяет как скорость ЭОП, так и форму нахождения компонентов в растворе (заряд).

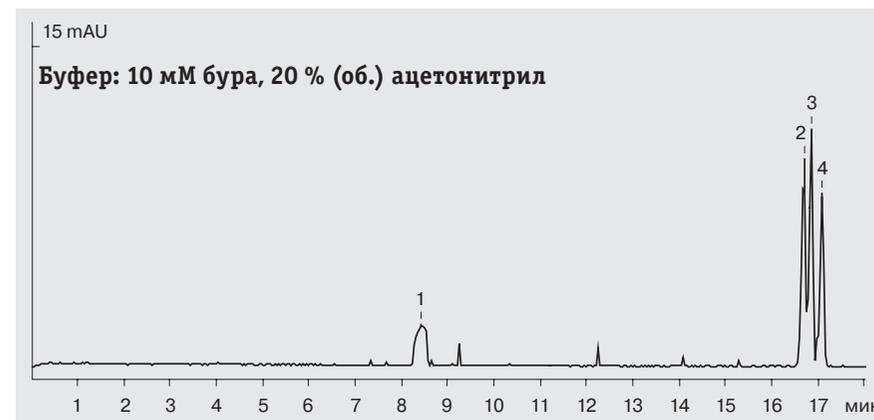
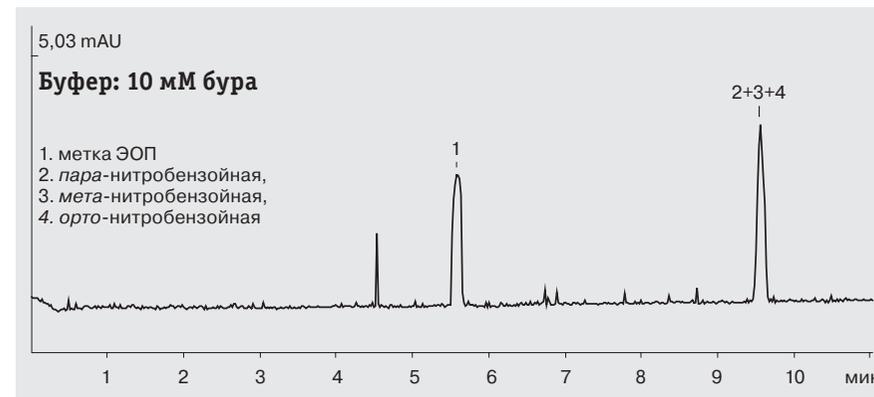
Влияние концентрации ведущего электролита на разделение компонентов



Буфер	боратный, концентрацию варьировали
Проба	модельный раствор феноксикарбоновых кислот и 2,4-дихлорфенола
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 65/75$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	229 нм
Температура	20 °С

На примере гербицидов группы 2,4-Д показано влияние на их электрофоретическое разделение концентрации рабочего буфера.

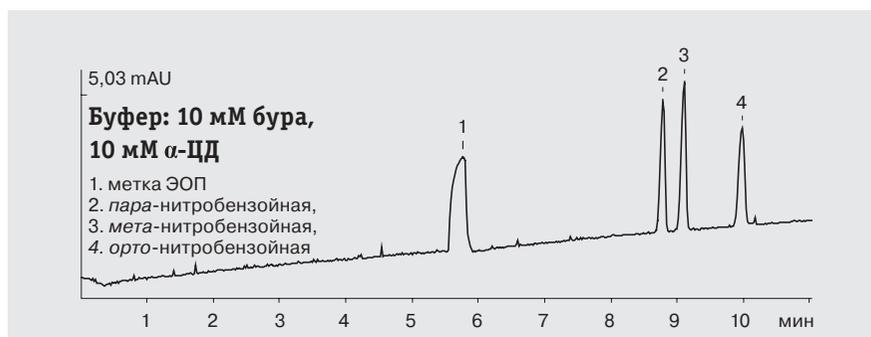
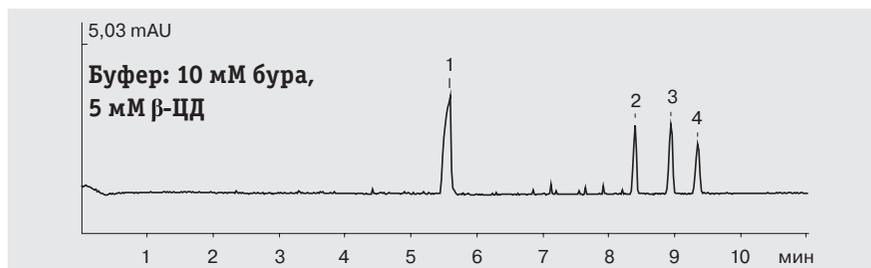
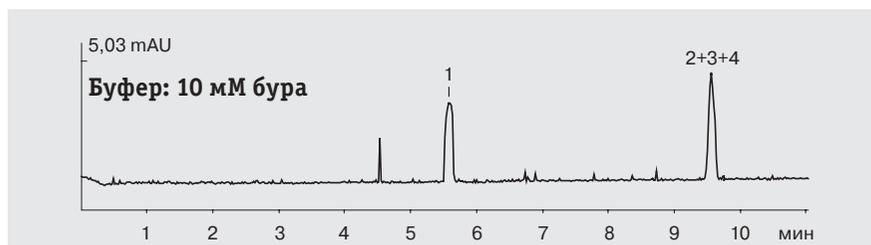
Влияние органических модификаторов в составе буфера на разделение компонентов



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый с добавкой органического растворителя или без него
Проба	модельный раствор позиционных изомеров нитробензойной кислоты
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 60/70$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Введение в состав буфера добавок органических растворителей (ацетонитрила, метанола, изопропанола и др.) может обеспечить полное разделение даже очень близких по электрофоретическим подвижностям веществ, таких как, например, позиционные изомеры. Часто это сопровождается увеличением времени анализа и некоторым снижением эффективности разделения.

Влияние циклодекстринов в составе ведущего электролита на разделение компонентов

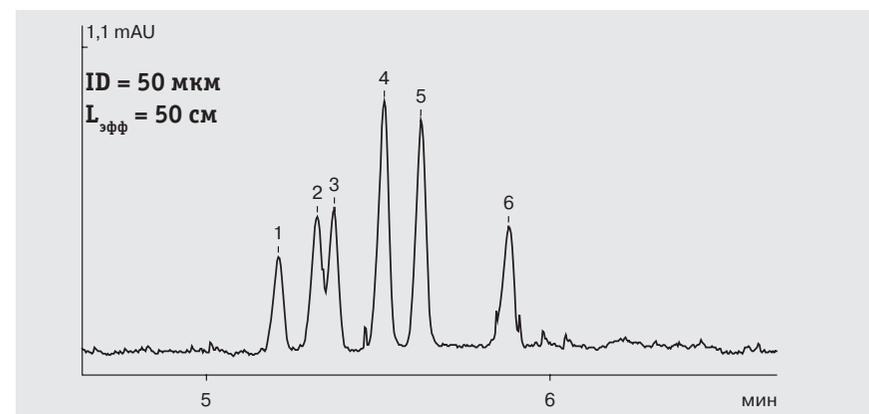
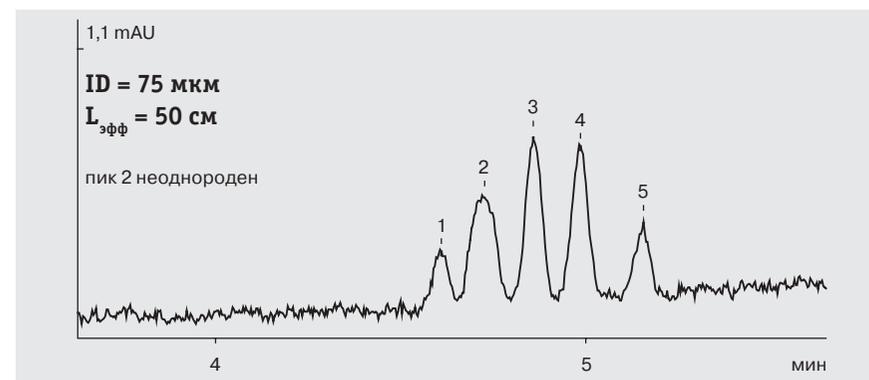


Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый с добавкой ЦД или без них
Проба	модельный раствор позиционных изомеров нитробензойной кислоты
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 60/70$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм
Температура	20 °С

Одним из эффективных способов влияния на селективность разделения является добавление в ведущий электролит макроциклов, в частности, циклодекстринов (ЦД), способных образовывать с аналитами комплексы включения. На примере замещенных бензойных кислот показано, что β-ЦД удерживает компоненты более прочно, чем α-ЦД, благодаря более подходящему для анализируемых веществ размеру полости.

7.10. Возможности прибора

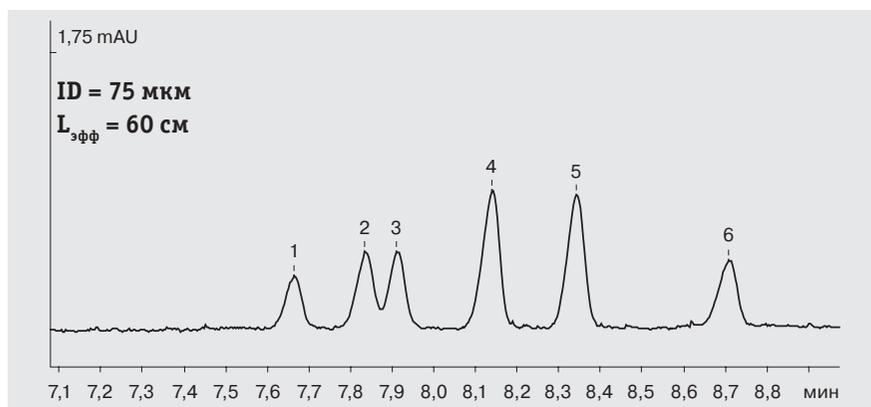
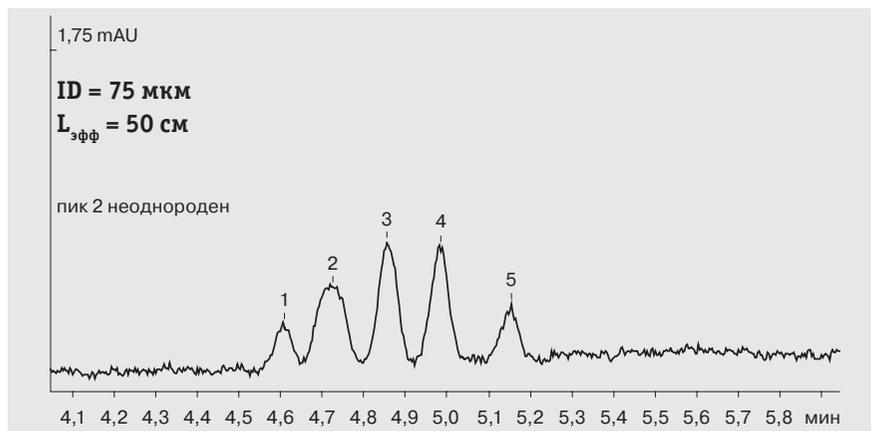
Влияние геометрии капилляра на разделение компонентов (равные длины, различные внутренние диаметры)



Буфер	10 мМ натрий тетраборноокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор шести феноксикарбоновых кислот
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = варьировали
Ввод пробы	900 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	229 нм
Температура	20 °С

Использование капилляра с внутренним диаметром 50 мкм по сравнению с 75 мкм обеспечивает лучшее разрешение компонентов, но при этом следует иметь в виду, что будет снижена чувствительность УФ-детектирования.

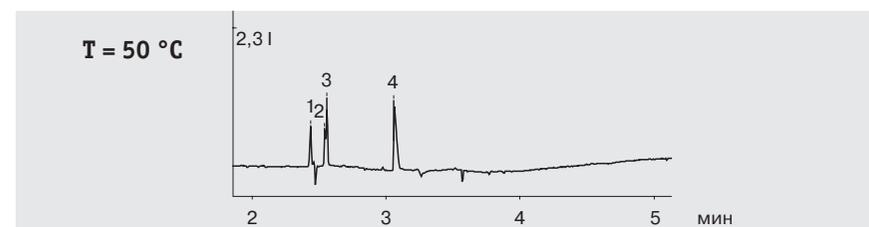
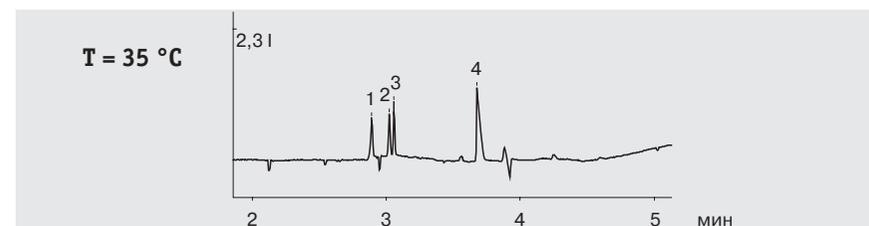
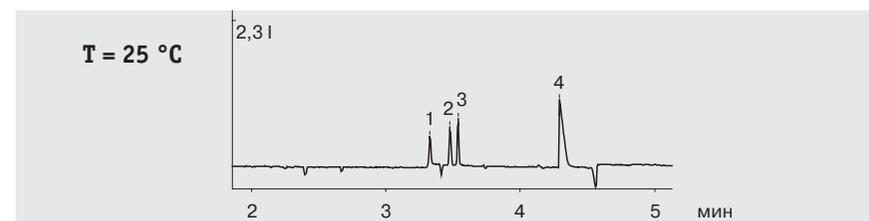
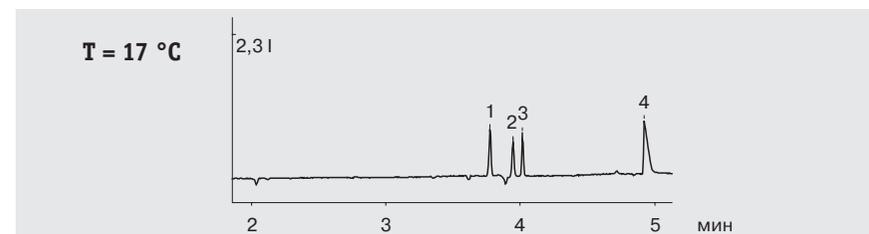
Влияние геометрии капилляра на разделение компонентов (равные внутренние диаметры, различные длины)



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор шести феноксикарбоновых кислот
Капилляр	L _{эфф} варьировали, ID = 75 мкм
Ввод пробы	900 мбар×с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	229 нм
Температура	20 °С

Уменьшение длины используемого капилляра приводит к росту эффективности разделения, но часто для разделения веществ с близкими электрофоретическими подвижностями следует увеличить длину капилляра, чтобы успели сформироваться зоны этих веществ.

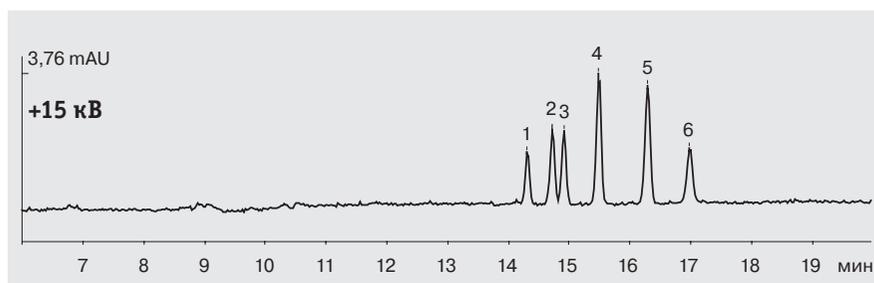
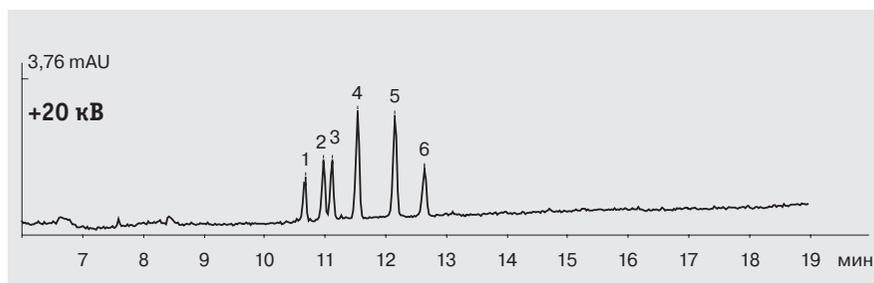
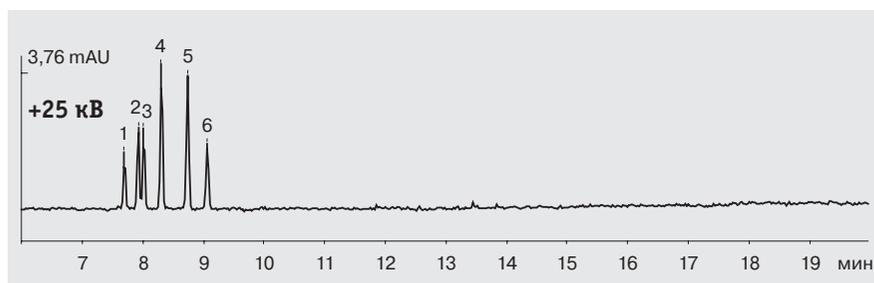
Влияние температуры на разделение компонентов



Буфер	для анионов
Проба	модельный раствор анионов: 1. хлорид, 2. нитрит, 3. сульфат, 4. фосфат
Капилляр	L _{эфф} /L _{общ} = 50/60 см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар×с
Напряжение	-17 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	варьировали

Температура является достаточно важным фактором, определяющим разделение компонентов смеси, влияя на скорость ЭОП, процессы сольватации, кинетику реакций, растворимость веществ и т. д.

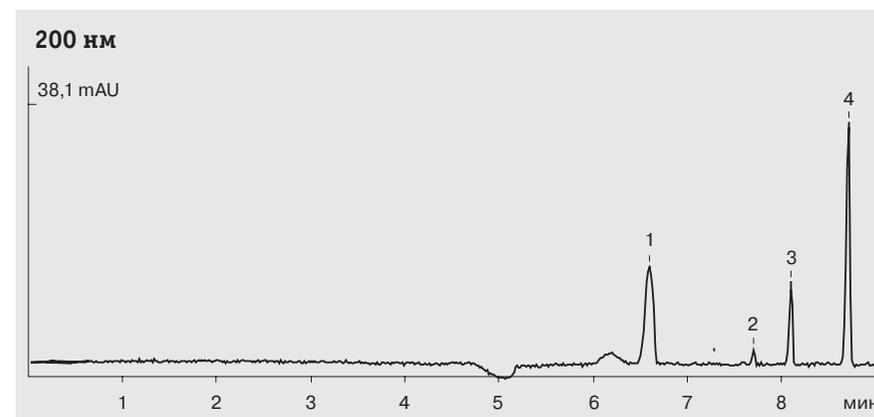
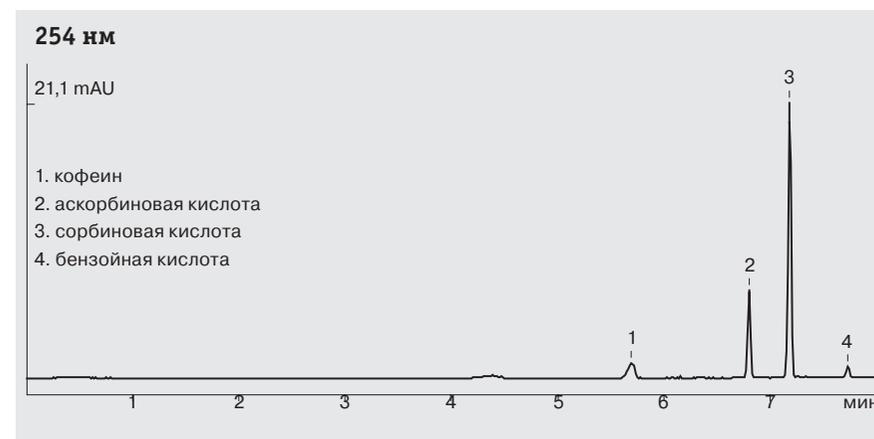
Влияние напряжения на разделение компонентов



Буфер	10 мМ натрий тетраборнокислый (рН 9,2)
Проба	модельный раствор шести феноксикарбоновых кислот
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 60/70$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	варьировали
Детектирование	229 нм
Температура	20 °С

При возрастании рабочего напряжения увеличивается эффективность разделения компонентов и снижается время анализа. При этом важно контролировать рабочие токи, используя в качестве оптимальных напряжения, при которых можно пренебречь влиянием температурного градиента внутри капилляра на уширение зон компонентов.

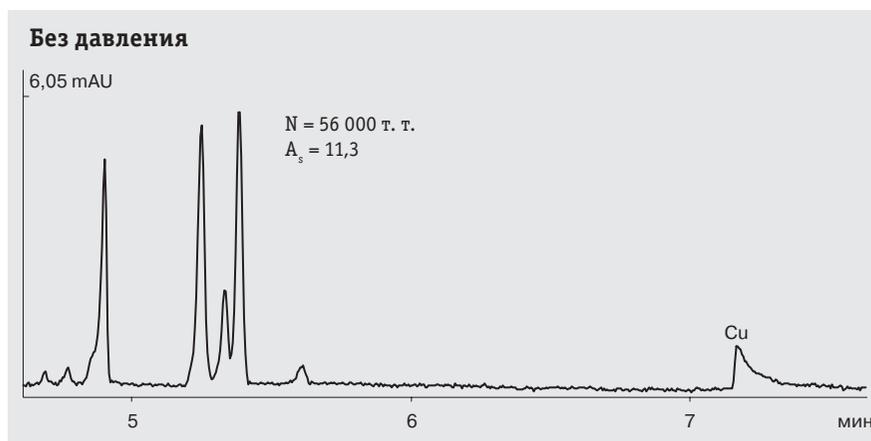
Оптимизация длины волны детектирования



Буфер	боратный с ДДСН
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	450 мбар·с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	длину волны варьировали
Температура	без термостатирования

При анализе смесей, содержащих компоненты с различными оптическими свойствами, большие возможности по детектированию предоставляет Капель-105 (-105М). В этих приборах можно программно изменять длину волны в ходе анализа.

Возможность приложения давления во время анализа



Буфер	для анализа подвижных форм металлов
Проба	модельный раствор
Капилляр	$L_{эф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм
Ввод пробы	300 мбар \times с
Напряжение	+20 кВ
Детектирование	254 нм, косвенное
Температура	комнатная

При анализе подвижных форм металлов методом капиллярного зонного электрофореза обнаружено, что пик меди имеет форму с размытым задним фронтом («хвостом»). Повысить эффективность и симметрию пика удалось при использовании давления во время анализа.

Глава 8. Некоторые аналитические приложения метода капиллярного электрофореза, разработанные фирмой «Люмэкс»

Особенностью российского рынка аналитического приборостроения является то, что интерес к прибору, как «железу», со стороны аналитических лабораторий чаще всего проявляется только в том случае, если это «железо» будет сопровождаться методическими разработками. Мы уже отмечали, что системы капиллярного электрофореза серии «Капель» были первыми в России приборами, реализующими широкие возможности метода КЭ. Перед специалистами фирмы «Люмэкс» стояла задача разработать для приборов «Капель» практические приложения. И если в предыдущем разделе мы привели только схемы конечного электрофоретического определения, акцентируя внимание больше на многообразии матриц и анализируемых соединений, то целью данной главы является описание стратегии разработки каждого из анализов, ставшего полноценной методикой выполнения измерений (МВИ), с указанием методических особенностей и наших практических рекомендаций.

8.1. Анализ ионного состава воды

Наиболее подходящим аналитическим применением метода капиллярного электрофореза, безусловно, является определение катионного и анионного состава воды. В первую очередь фирмой «Люмэкс» были разработаны методики определения катионов щелочных и щелочно-земельных металлов и важнейших неорганических анионов. Эти методики нашли широкое применение в экологическом контроле природных, питьевых, сточных и технологических вод, метрологически аттестованы и реализованы на классических системах КЭ «Капель».

Здесь же мы рассмотрим вариант одновременного определения ряда катионов и анионов с использованием прибора «Капель-103PE».

8.1.1. Определение неорганических катионов (аммония, калия, натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция). Особенности методики, практические рекомендации

Для определения катионов ряда щелочных и щелочно-земельных металлов в водных объектах в приборе «Капель» используют источник высокого напряжения положительной полярности. Это так называемая классическая схема, которая подразумевает, что детектор находится вблизи катода и ЭОП движется от анода к катоду (рис. 7).

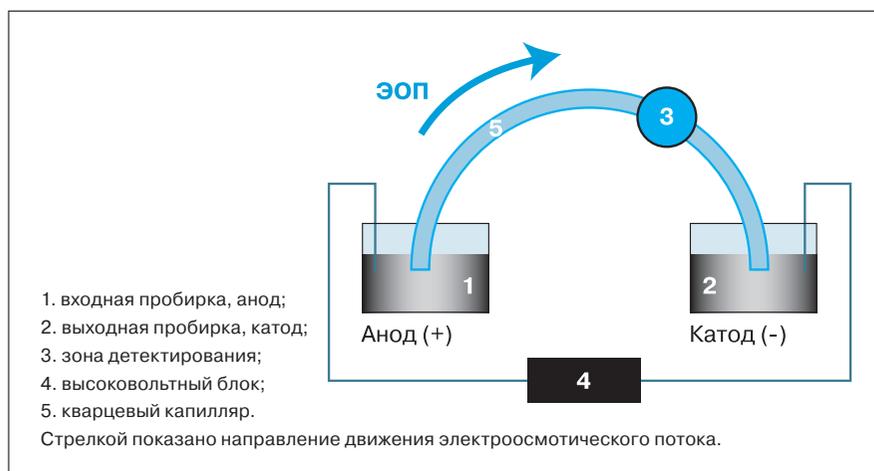


Рис. 7. Классическая схема прибора для анализа неорганических катионов (с положительным высоковольтным блоком).

В этом случае катионы будут двигаться к катоду в том же направлении, что и ЭОП, но быстрее него.

Чтобы зарегистрировать пики катионов, применяют косвенное детектирование: в состав ведущего электролита вводят поглощающий катион бензимидазола (БИА) в концентрации 0,01 М, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного раствора. При разделении катионы пробы эквивалентно замещают в растворе катион бензимидазолия, что приводит к снижению оптической плотности в зоне каждого катионного компонента.

Примечание. В косвенном варианте детектирования электрофореграмма представляет собой базовую линию с отрицательными пиками. Для удобства визуализации и разметки электрофореграммы современные программы сбора и обработки данных имеют опцию «Перевернуть», что позволяет представить электрофореграмму в привычном виде (с «положительными» пиками).

Бензимидазол в водном растворе является слабым основанием, pK_a которого равен 5,8. Это означает, что при pH 5,8 в растворе в равных концентрациях находятся молекулярная и катионная формы бензимидазола, а при pH 4,8 концентрация катионной формы в 10 раз превышает концентрацию формы молекулярной. Так как для эквивалентного обмена катионов необходимо, чтобы концентрация катионной формы БИА в электролите была как можно больше, электролит должен быть слабокислым. Однако в таком случае резко уменьшается скорость ЭОП, а также возрастает общая концентрация электролита, что приводит к возрастанию тока в капилляре. На практике ведущий электролит готовят на основе винной кислоты, анионы которой обладают малой подвижностью и, следовательно, увеличивают сопротивление электролита, а соотношение кислоты и основания подбирают так, чтобы был достигнут необходимый компромисс между временем анализа и величиной тока.

При электрофорезе катионы регистрируются в последовательности, которая определяется их электрофоретической подвижностью. Первыми мигрируют пики аммония и калия. Их электрофоретические подвижности одинаковы, поэтому без специальных мер они выходят одним общим пиком. Для разделения аммония и калия в состав ведущего электролита вводят специальную добавку 18-краун-6, являющегося макроциклом с гидрофильной внутренней полостью, размер которой очень близок размеру ионного радиуса иона калия. В результате образуются комплексы включения по типу «гость»–«хозяин», где «гостем» являются катионы калия, а «хозяином» — молекулы краун-эфира, в основе такого комплексообразования лежат ион-дипольные взаимодействия катиона калия с атомами кислорода (рис. 8). Благодаря образованию комплекса включения подвижность ионов калия снижается, а подвижность других ионов остается без изменений.

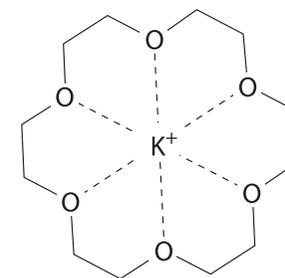


Рис. 8. Графическая формула комплекса катиона калия с 18-краун-6.

Примечание. Строго говоря, первыми появляются пики цезия и рубидия, а уже затем катионы аммония и калия. При совместном присутствии пики цезия и рубидия накладываются друг на друга. Если концентрация одного из этих ионов сильно преобладает, присутствие минорного компонента трудно заметить, но при близких концентрациях двойной пик наблюдается хорошо, хотя он не пригоден для количественной оценки содержания каждого из компонентов. Чтобы полностью разделить цезий и рубидий, следует ввести в состав буфера еще один краун-эфир (15-краун-5).

После калия один за другим с хорошим разрешением мигрируют пики натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция (рис. 9).

Примечание. Первые методики определения катионов, разработанные в фирме «Люмэкс», имели несколько иной порядок выхода пиков: литий мигрировал после магния. При высоких концентрациях магния, что нередко для водных объектов, литий мог попадать на «хвост» пика магния, это существенно затрудняло разметку и приводило к ошибкам в количественных расчетах. В настоящее время в составе буферного раствора увеличена концентрация винной кислоты, которая уже при низких концентрациях образует с двухвалентными катионами в слабокислой среде однозарядные комплексные катионы. Их подвижности существенно отличаются от подвижностей свободных двухзарядных катионов, благодаря чему щелочно-земель-

ные катионы выходят после лития. Наиболее резко изменяется поведение кальция, который в отсутствие винной кислоты выходит между натрием и литием первым из двухвалентных катионов, а в ее присутствии выходит последним после пика бария.

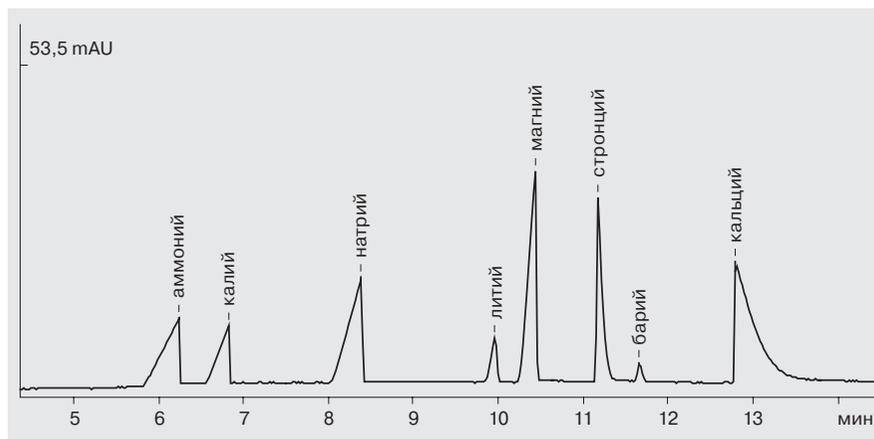


Рис. 9. Электрофореграмма модельного раствора катионов.

«Капель-105», капилляр: внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см.

Ведущий электролит: 10 мМ БИА, 5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6.

Ввод пробы: гидродинамический 30 мбар×10 с.

Анализ: +13 кВ. Температура: 20 °С. Детектирование: 267 нм.

При анализе природных вод на электрофореграмме могут наблюдаться дополнительные пики, принадлежащие другим катионам, в частности, катионам двухвалентных марганца и железа. Пик марганца выходит вслед за пиком стронция, а пик железа — после пика кальция.

Следует обратить внимание на частую необходимость разбавлять пробы перед анализом. Для разбавления используют ту воду — дистиллированную, бидистиллированную, деионизованную, на которой были приготовлены градуировочные растворы, рабочие буферы и промывочные растворы. Важно при этом знать катионный состав такой воды, так как от этого будет зависеть возможность и достоверность определения низких концентраций анализируемых катионов. Особенно это относится к иону аммония.

Не ставя перед собой задачи привести полный текст МВИ, мы сделаем акцент на наиболее важных практических моментах при выполнении анализа катионов.

- ▶ Для приготовления буфера лучше всего использовать свежеприготовленный раствор винной кислоты.
- ▶ При пониженной температуре бензимидазол (БИА) может выпадать в осадок. Перед приготовлением буфера для анализа раствор БИА рекомендуется подогреть, поместив в теплую водяную баню (~50 °С).
- ▶ Для модификаций «Капель-105, -105М» необходимо установить длину волны детектирования 267 нм.

- ▶ Все растворы, контактирующие с капилляром (промывочные, буферные и растворы пробы), перед помещением их в прибор обязательно центрифугируют (скорость вращения 5000 об/мин., время 3–5 мин.).
- ▶ Для промывки капилляра между анализами настоятельно рекомендуется использовать отдельную пробирку с буфером, при этом составы промывочного и рабочего буферов должны быть одинаковыми!
- ▶ Буферные растворы, участвующие в анализе, заменяются через каждые 4–5 анализов или по мере их загрязнения (в зависимости от состава анализируемых образцов). Признаки загрязнения буферов — появление на электрофореграмме ступеней, дрейфа базовой линии, а также изменение величины тока по сравнению с первыми анализами (не путать с небольшим (допустимым) дрейфом тока в ходе одного анализа).
- ▶ Верхний предел диапазона измеряемых концентраций по каждому катиону в тексте методики указан с учетом разведения пробы в сто раз.
- ▶ При анализе реальных проб на электрофореграмме могут наблюдаться дополнительные пики, принадлежащие, в частности, ионам рубидия, цезия, марганца и двухвалентного железа. На стадии освоения методики рекомендуется использовать метод добавок для правильной идентификации определяемых катионов.
- ▶ При анализе проб, в которых концентрация макрокомпонента (натрий, магний или кальций) превышает 200 мг/л, наблюдается искажение формы пиков аммония и калия, не мешающее, однако, количественной обработке. При разбавлении пробы от 2 до 5 раз влияние макрокомпонентов снижается, и пики приобретают «привычную» форму.
- ▶ Хранение дистиллированной воды:
 - для сбора и хранения воды следует использовать пластиковую посуду;
 - необходимо максимально снизить контакт воды с воздухом рабочих помещений;
 - тщательно укупоривая емкости с водой и избегая длительного хранения воды;
 - в помещениях, в которых установлен дистиллятор и ведется анализ катионов на «Капели», следует устранить источники аммиака.

8.1.2. Определение неорганических анионов (хлорида, сульфата, нитрита, нитрата, фторида, фосфата)

Для определения анионов в приборе «Капель» необходимо установить источник высокого напряжения отрицательной полярности. Тогда электрод на входном конце капилляра будет катодом, а электрод выходного конца — анодом, и анионы будут мигрировать в сторону выходного конца, т. е. к детектору.

На рис. 10а показано направление движения ЭОП в противоположную от анионов сторону. Скорость движения анионов заметно превосходит скорость течения жидкости в капилляре, тем не менее, разнонаправленные потоки могут в ряде случаев существенно увеличивать времена анализа анионов. Для использования транспортной функции ЭОП, который только переносит зоны разделенных компонентов, не принимая участия в самом процессе разделения, принято обращать направление движения электроосмотического потока (рис. 10б), вводя в состав ведущего электролита специальные соединения.

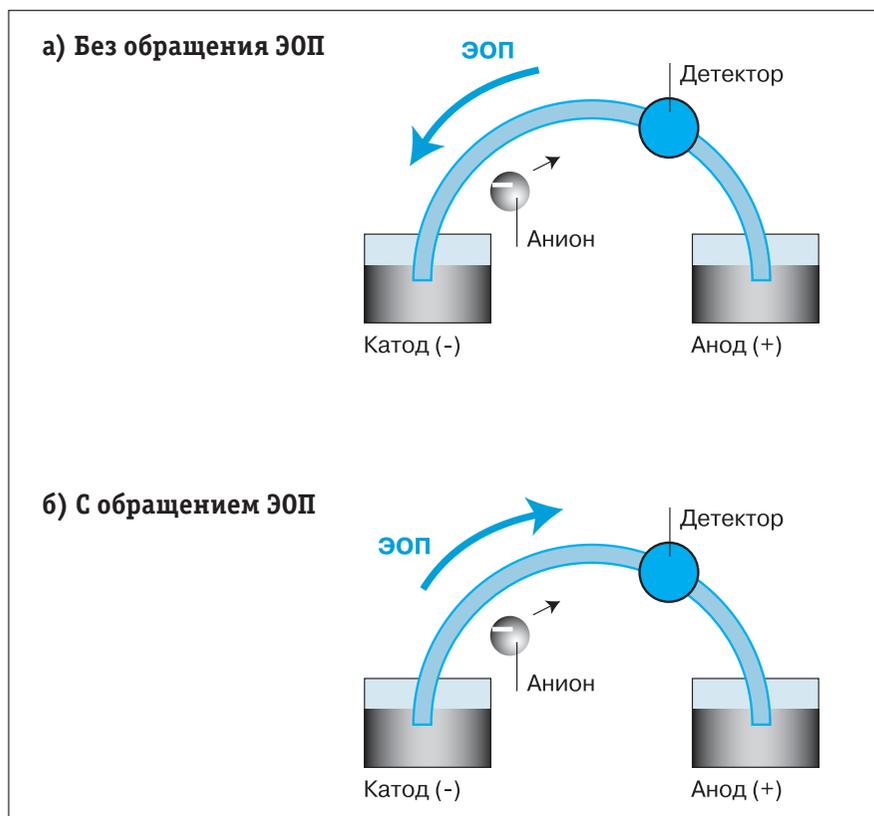


Рис. 10. Схемы анализа неорганических анионов (с отрицательным высоковольтным блоком).

Ведущий электролит в случае анализа анионов должен удовлетворять нескольким обязательным условиям.

Во-первых, он должен быть щелочным, так как большинство определяемых анионов существуют только в щелочных средах.

Во-вторых, основой электролита должен быть анион, имеющий сильную полосу поглощения в области 254 нм, так как большинство анионов не обладают собственными полосами поглощения в указанной области, и их определение может быть выполнено только косвенным методом.

В-третьих, ведущий электролит должен содержать вещество, с помощью которого можно обратить направление электроосмотического потока, так как в противном случае ЭОП, направленный к катоду, резко замедлит, а во многих случаях сделает невозможной, электромиграцию анионов к детектору.

Наконец, в-четвертых, катионный компонент ведущего буферного раствора должен быть катионом достаточно сильного основания, и в то же время обладать малой подвижностью, чтобы обеспечить малую электропроводность раствора.

На практике рабочий буферный раствор состоит из смеси диэтанолamina (основание) и хромовой кислоты с добавкой катионного поверхностно-активного вещества бромид (или гидроксида) цетилтриметиламмония (ЦТАБ или ЦТАОН). Избыток диэтанолamina (ДЭА) создает слабо щелочную среду (pH ~9), анион CrO_4^{2-} обеспечивает необходимое светопоглощение, а катион ЦТА⁺, сорбируясь на поверхности кварцевого капилляра, перезаряжает поверхность на положительную, чем достигается изменение направления ЭОП.

Бромид цетилтриметиламмония $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{N}]^+\text{Br}^-$ легко растворим в воде. Как всякое поверхностно-активное вещество, ЦТАБ при малых концентрациях образует истинные растворы, а при более высоких — коллоидные. Частицы коллоидного раствора — мицеллы — представляют собой сферические образования, состоящие из 60–100 катионов, обращенных азотным концом наружу, которые несут соответствующий положительный заряд, нейтрализуемый эквивалентным количеством анионов. Во время приготовления запасных растворов процесс образования коллоидных частиц из кристаллического вещества происходит достаточно медленно, однако при разбавлении запасного раствора до концентрации ниже критической концентрации мицеллообразования, процесс деградации мицелл, и образование истинного раствора происходит быстро и количественно. ККМ для ЦТАБ равна 0,007 моль/л.

Порядок миграции анионов: хлорид, нитрит, сульфат, нитрат, фторид, гидрофосфат. Все пики разрешаются полностью. После выхода гидрофосфата через некоторое время выходит пик гидрокарбоната, который всегда присутствует как в буферном растворе, так и в растворе пробы. Выход пика гидрокарбоната может служить признаком и сигналом для окончания анализа.

На электрофореграммах как стандартных растворов, так и растворов проб часто наблюдаются отрицательные пики. Их появление связано с тем, что в растворах проб (стандартов) отсутствуют анионы, которые находятся в растворе ведущего электролита. Первый такой пик может наблюдаться между пиками хлорида и нитрита и связан с присутствием в составе ведущего электролита ионов брома (при использовании ЦТАБ в качестве модификатора ЭОП, рис. 11а). Величина этого, так называемого, бромидного провала тем больше, чем больше общая концентрация анионов в пробе, и при большой их концентрации могут наблюдаться трудности с автоматической разметкой пика нитрита. В этом случае разметку рекомендуется исправить вручную.

Второй отрицательный пик часто наблюдается после выхода пика гидрофосфата. Его появление объясняется тем, что при хранении буферные растворы постепенно поглощают все большие и большие количества углекислого газа. В каких-то случаях концентрация карбоната в пробе может оказаться меньше, чем в ведущем электролите, и тогда на электрофореграмме на месте пика гидрокарбоната появляется отрицательный пик. В некоторых случаях он может быть настолько большим, что будет мешать автоматической разметке пика гидрофосфата. Это является сигналом к тому, чтобы заново приготовить свежий раствор ДЭА (быстрее всех поглощает CO_2) или полностью заменить компоненты ведущего электролита на свежеприготовленные. Количественное определение гидрокарбоната невозможно из-за его неконтролируемого содержания в используемых растворах.

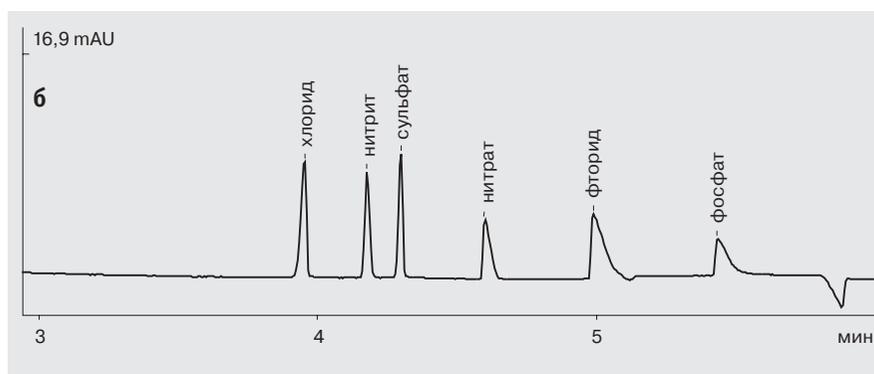
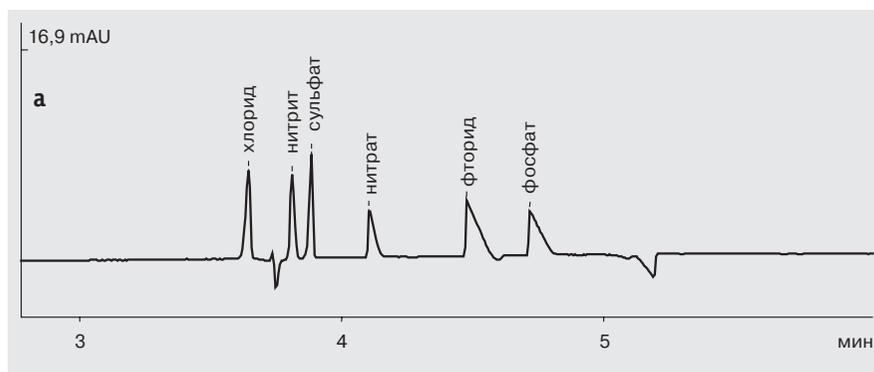


Рис. 11. Электрофоретическое разделение неорганических анионов в присутствии (а) и в отсутствие (б) бромид-ионов в составе ведущего электролита.

Составы буферов см. **табл. 5.** (с. 164)

На электрофореграммах проб кроме пиков определяемых анионов могут присутствовать пики других анионов, которые в том числе затрудняют расшифровку электрофореграммы (например, пики формиат-иона, мигрирующего сразу же после фторида). Для идентификации определяемых анионов в этом случае применяют метод добавок.

В 2003 году методика определения анионов была нами переработана. Сравнение двух методик приведено в **табл. 5.**

Мы уже упоминали, что при использовании в составе ведущего электролита ЦТАБ на электрофореграмме между пиками хлорид-иона и нитрит-иона наблюдается отрицательный пик бромид-иона, который при большой минерализации пробы мешает разметке нитрит-иона. Для электролита с ЦТАОН бромидного провала не существует (**рис. 11б**), что позволило получить целый ряд преимуществ:

- ▶ упростилась автоматическая разметка в целом;
- ▶ снизились погрешности определения нитрит-иона;
- ▶ появилась потенциальная возможность определения бромид-иона в диапазоне концентраций ~0,2–50 мг/л.

Общая концентрация ведущего электролита практически не изменилась, при этом чуть возросла концентрация хромат-иона и появился новый компонент буфера. Изначально предполагалось, что глюконат кальция сможет связать гидрокарбонат-ион, который образуется при хранении буфера в результате поглощения буфером углекислого газа из воздуха. Существенного выигрыша в сроке хранения нового буферного раствора получить не удалось, но нами отмечено, что введение глюконата кальция в состав электролита увеличило разрешение близко стоящих пиков нитрита и сульфата и чуть «сблизило» пики фосфата и гидрокарбоната, **рис. 12б.**

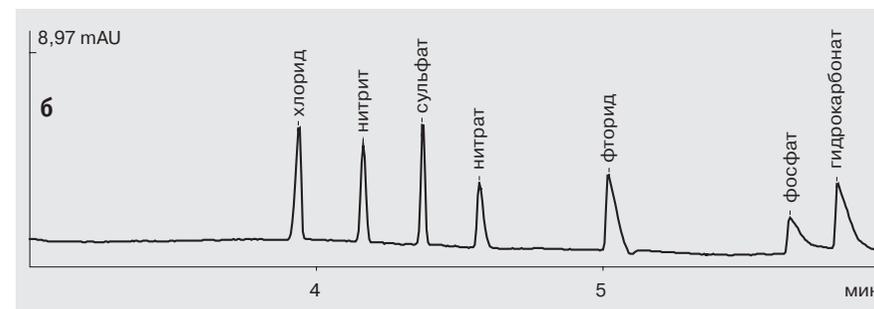
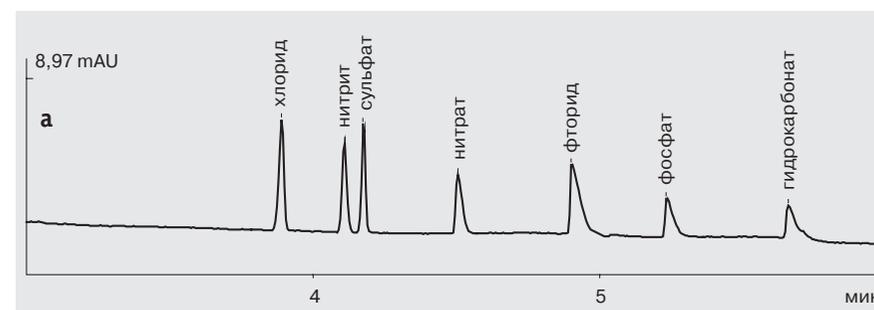


Рис. 12. Электрофоретическое разделение неорганических анионов в отсутствие (а) и в присутствии (б) ~1,2 мМ глюконата кальция в составе ведущего электролита.

В новой методике удалось повысить чувствительность определения для нитрита, нитрата, фторида и фосфата, с одной стороны, за счет исключения стадии разбавления растворов перед анализом вдвое, а, с другой стороны, за счет увеличения концентрации основного поглощающего компонента буфера — хромат-иона. Для хлорида и сульфата верхние границы определяемых концентраций увеличены до 200 мг/л, что часто позволяет анализировать эти ионы в пробах без дополнительного разбавления.

Таблица 5. Сравнение двух методик определения анионов, разработанных фирмой «Люмэкс».

Что изменилось	Предыдущая МВИ (срок действия до 25.11.2003)	Ныне действующая МВИ (срок действия до 01.03.2009)
состав ведущего электролита	5 мМ CrO ₃ 20 мМ ДЭА 1,65 мМ ЦТА-Br	7 мМ CrO ₃ 20 мМ ДЭА 2 мМ ЦТА-ОН 0,25 мМ глюконат кальция
нижние пределы определяемых концентраций	0,25 мг/л фторид 0,5 мг/л остальные	0,5 мг/л хлорид 0,2 мг/л нитрит 0,5 мг/л сульфат 0,2 мг/л нитрат 0,1 мг/л фторид 0,2 мг/л фосфат
верхние пределы определяемых концентраций	25 мг/л фторид 50 мг/л остальные	200 мг/л хлорид 50 мг/л нитрит 200 мг/л сульфат 50 мг/л нитрат 25 мг/л фторид 50 мг/л фосфат
набор градуировочных смесей	50–20–10–5–2–0,5 мг/л	50–40–30–20–10–5 мг/л
способ построения градуировочной зависимости	только по всем градуировочным смесям	по всем градуировочным смесям или по смеси одного состава
длина волны детектирования	254 нм	254 нм и 374 нм (для «Капели-105»)
разбавление проб буфером №2	перед анализом все пробы разбавлялись буфером №2	перед анализом буфером №2 разбавляют только пробы с общей минерализацией менее 3 мг/л
представление результатов согласно	МИ 2336-95	ГОСТ Р ИСО 5725-2002

В табл. 6 мы поместили информацию о практических ситуациях, вызывающих затруднения у исполнителей, возможных причинах их возникновения и вариантах решения.

Таблица 6. Практические аспекты освоения методики определения неорганических анионов.

Ситуация	Причина	Рекомендации
осадок в ведущем электролите	из-за поглощения рабочим буферным раствором CO ₂ из воздуха снижается pH буфера, и при pH <8,7 образуется осадок гидрохромата цетилтриметиламмония	<ul style="list-style-type: none"> ▶ убедиться в правильности приготовления и хранения раствора ДЭА (следует отбирать твердую/замороженную навеску, хранить раствор в герметичной пластиковой посуде, pH должно быть не менее 9,0) ▶ использовать для хранения буфера виалы с плотно закручивающимися крышками ▶ можно увеличить содержание ДЭА в буфере до 25 мМ (профиль разделения практически не меняется) ▶ обязательно центрифугировать все используемые в анализе растворы
длинные «хвосты» у всех пиков (рис. 13) это не затрудняет идентификацию компонентов, но мешает количественному определению	неровный срез входного конца капилляра	проверить входной конец капилляра и при необходимости отрезать ровно и строго под углом 90°
	капилляр не доведен до кондиционного состояния	часто наблюдается на новых капиллярах в первый и даже второй дни работы, в процессе «обкатки» нового капилляра профиль разделения придет в норму
	буфер приготовлен не точно по прописи методики, а именно, мало ДЭА	убедиться в правильности приготовления и хранения раствора ДЭА
	неоднородность внутреннего диаметра капилляра по его длине	крайне редко, но бывает; в идеале требуется замена капилляра тем не менее, можно работать и в случае «хвостатых» пиков, но важно при обработке данных размечать пики так, чтобы конец пика был симметричен началу относительно вершины пика
недостаточное разделение пиков фосфата и гидрокарбоната	большое содержание гидрокарбоната в пробе	<ul style="list-style-type: none"> ▶ при большом содержании фосфата следует разбавить пробу, снизив влияние гидрокарбоната; ▶ можно использовать буфер, не содержащий глюконата кальция, рис. 12а
низкая воспроизводимость времен миграции компонентов	капилляр недостаточно подготовлен к анализу или загрязняется примесями веществами пробы (при работе со сложными матрицами времена миграции увеличиваются)	важно строго соблюдать процедуру промывки капилляра изо дня в день, т. к. использование в составе буфера модификатора ЭОП требует более тщательной подготовки капилляра к работе и в ходе анализов

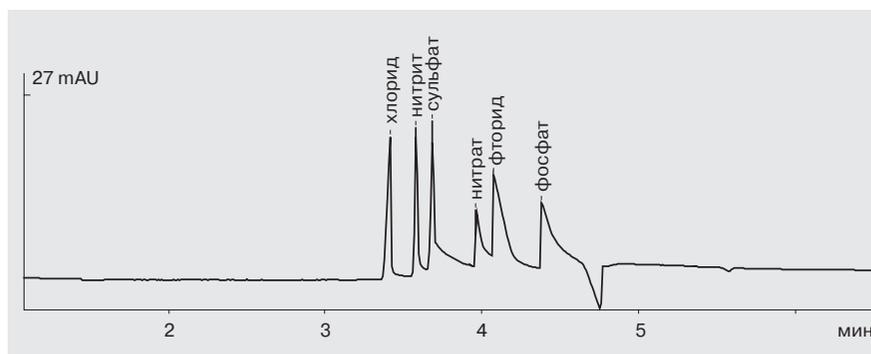


Рис. 13. Типичный вид электрофореграммы при использовании буфера с недостаточной концентрацией ДЭА.

8.1.3. Одновременное определение катионов калия, натрия, магния, кальция и анионов хлорида и сульфата в водных средах с использованием электроинжекционного анализатора «Капель-103РЕ»

В 2002 году фирма «Люмэкс» организовала выпуск опытной партии проточных электроинжекционных анализаторов, которые получили название «Капель-103РЕ». По своим техническим и метрологическим параметрам эти анализаторы не отличаются от базовой модели «Капель-103Р», но имеют дополнительные приспособления и технические решения, которые существенно расширяют аналитические возможности прибора.

Идея электроинжекционного анализа принадлежит профессору В. П. Андрееву. Коротко и в популярном изложении она сводится к тому, что если капилляр, заполненный ведущим электролитом, поместить с левой и правой сторон в растворы, имеющие, в общем случае, разный состав, и на короткое время включить высокое напряжение, то при положительной полярности высокого напряжения слева в капилляр возникшим электроосмотическим потоком (ЭОП) будет введена некоторая доза анализируемого раствора, точно так же, как это имеет место при электрокинетическом способе ввода пробы в обычном электрофорезе. С правой же стороны под действием высокого напряжения в капилляр будут втягиваться анионные компоненты раствора, расположенного справа, преимущественно те, которые имеют скорости электромиграции, превышающие по абсолютной величине скорость ЭОП. Таким образом, в капилляр с противоположных сторон может быть осуществлен ввод разных по своей природе веществ. Если теперь, как это происходит при обычной процедуре электрофоретического определения, поместить концы капилляра в растворы ведущего электролита и включить высокое напряжение в режиме анализа, то катионные компоненты левого раствора, обгоняя ЭОП, будут двигаться вправо, в то время как анионные компоненты правого раствора будут двигаться им навстречу справа налево. Если составы растворов подобраны так, что они могут взаимодействовать друг с другом, то в момент встречи произойдет образование нового соединения, которое будет отличаться по заряду и по подвижности от исходных компонентов и начнет мигрировать в капилляре в соответствии с вновь возникшими свойствами.

Чтобы иметь возможность зарегистрировать происходящие явления, окно детектора должно располагаться не на выходе из капилляра, а в его средней части, с этой целью для «Капель-103РЕ» сконструирована специальная кассета для капилляра. Расположение окна детектора в центре кассеты открывает широкие возможности для варьирования длин участков капилляра, находящихся слева и справа от окна детектора. Тем самым достигается возможность оптимизировать время анализа или селективность разделения, а также управлять временем выхода ЭОП и анионных компонентов, введенных с правой стороны капилляра. Особенно важно это в случае *одновременного определения катионов и анионов* потому, что подвижность анионов, в общем случае, больше подвижности катионов, и при равных отрезках капилляра слева и справа пики катионов и анионов выходят тесной совместной группой, разметка которой и расшифровка пиков представляет некоторые сложности.

Примечание. В тех же случаях, когда «Капель-103РЕ» используется для определения по стандартным аттестованным методикам, эффективная длина капилляра слева может быть установлена штатной (50 см), в то время как справа от детектора она устанавливается минимально возможной (16 см). Некоторое увеличение общей длины капилляра с 60 до 66 см, и связанное с этим уменьшение градиента напряжения, может быть легко нивелировано увеличением задаваемого напряжения или некоторым увеличением времени анализа.

Одной из самых интересных особенностей «Капель-103РЕ» является принципиальная возможность определения анионного и катионного составов пробы в рамках одного анализа. Несомненным преимуществом такого определения является сокращение более, чем вдвое времени, необходимого для получения достаточно полной информации о ионном составе пробы. Отпадает необходимость в модифицировании поверхности капилляра и обращении направления ЭОП, а, следовательно, можно пользоваться одной и той же кассетой для реализации разных методов анализа.

Так как наибольший практический интерес представляет определение катионов щелочных и щелочно-земельных металлов и широко распространенных анионов, рассмотрим такое определение более подробно. Как известно, указанные катионы и анионы не имеют собственных полос поглощения в области рабочей длины волны ртутной лампы, и их определение возможно лишь косвенным методом. В аттестованных методиках для этого применяют анионы хромата для определения анионов и катионы бензимидазолия при определении катионов. Анионы определяют в щелочном ведущем буфере, так как часть определяемых ионов является анионами слабых кислот, и в анионной форме они существуют в щелочной среде, а катионы определяют в слабокислой среде, так как, с одной стороны, катионы бензимидазолия преобладают в кислых растворах, а, с другой стороны, определяемые катионы в этих условиях свободны от побочных явлений гидролиза и взаимодействия с анионами слабых кислот. Таким образом, для одновременного определения катионов и анионов ведущий буфер должен содержать как поглощающий катион, так и поглощающий анион, а величина pH должна определяться предпочтительными интересами. Если желательно определять кроме щелочных ещё и щелочно-земельные катионы, то pH должен быть слабокислым. В этом случае среди анионов можно будет определять только анионы сильных кислот. Если же предпочтение должно быть отдано определению анионов, в том числе и анионов слабых кислот, то буферный раствор должен быть щелочным, и в таком случае катионы щелочно-земельных металлов либо вообще не могут быть определены, либо их определение будет сопровождаться большими ошибками.

В качестве окрашенных компонентов ведущего электролита мы предлагаем использовать, например, хромовую кислоту и бензимидазол, как основание. При этом для получения слабокислого электролита молярное отношение бензимидазола к хромовой кислоте должно быть несколько больше, чем 1:1, а для щелочного электролита это отношение должно быть существенно больше, чем 2:1. На **рис. 14** показаны электрофореграммы стандартного раствора (**а**) и пробы минеральной воды «Охтинская» (**б**).

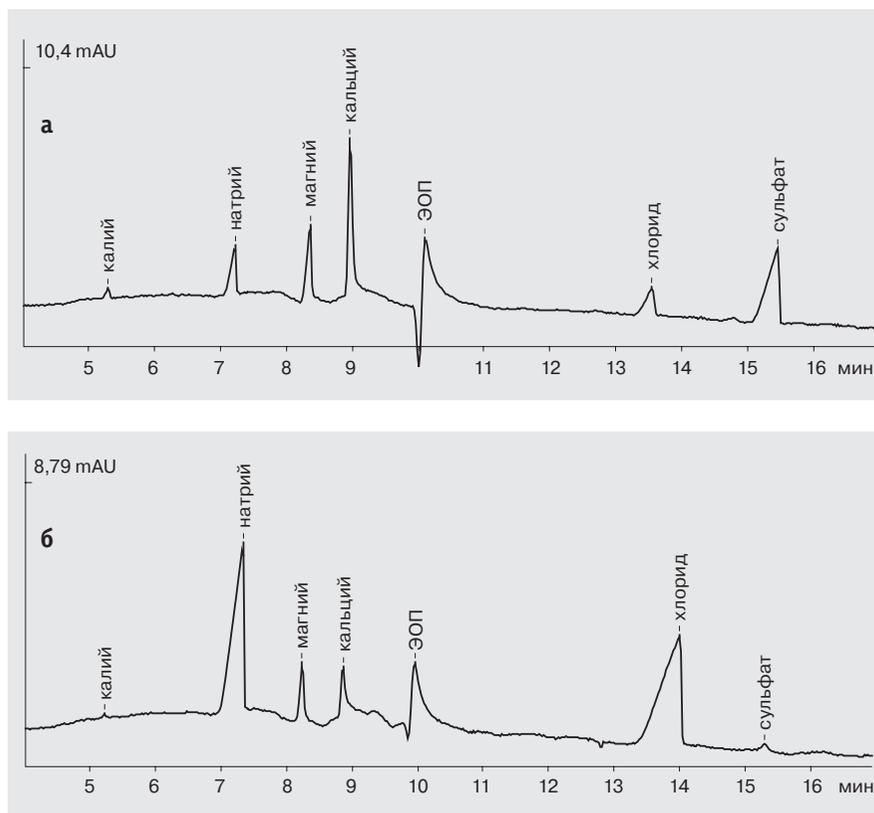


Рис. 14. Примеры одновременного анализа катионов и анионов в модельном растворе (а) и реальной пробе (б).

а) модельный раствор анионов и катионов;

б) проба — минеральная вода «Охтинская», разбавление 1:9.

Капель-103PE, капилляр: внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф}$ слева 30 см, $L_{эфф}$ справа 60 см. Ведущий электролит: CrO_3 5 мМ, винная кислота 2,5 мМ, бензимидазол 6 мМ, ацетат диэтаноламины (ДЭА) 1,5 мМ (винная кислота введена в состав электролита для увеличения времени миграции двухвалентных катионов, а ацетат ДЭА — для снижения скорости ЭОП). Ввод пробы: электрокинетический с противоположных сторон капилляра, 1кВ×15 с. Анализ: +10 кВ. Детектирование: 254 нм.

На электрофореграмме катионы регистрируются в том же порядке, что и в аттестованной методике, а анионы выходят после ЭОП. При вводе стандартной смеси анионов в этих условиях на электрофореграмме не наблюдаются пики фторида и фосфата.

Чувствительность определения анионов сильных кислот в этом случае несколько меньше, чем в аттестованной методике, т. к. молярный коэффициент поглощения гидрохромата при длине волны 254 нм меньше, чем хромата, но вариант одновременного определения катионов и анионов может оказаться полезным в тех случаях, когда не требуется знать содержание минорных компонентов пробы. Например, в случае анализа технологических вод, особенно тогда, когда существенное значение имеет знание не столько общей жесткости воды, сколько точных концентраций магния и кальция. Ещё один интересный аспект — анализ минеральных вод, вин, соков и т. п. продукции на предмет подтверждения их подлинности по характеристическим соотношениям различных ионов. Во всех этих случаях одновременное определение катионов и анионов может резко снизить себестоимость анализа и значительно повысить производительность.

8.2. Анализ безалкогольных, слабоалкогольных и алкогольных напитков (соков, сокосодержащих напитков, водок, вин и виноматериалов, пива, бренди (коньяков) и др.)

Современный уровень развития пищевых технологий все больше и дальше уводит нас от натуральных продуктов и сырья в сторону частично или полностью искусственных. Особенно это касается алкогольных и безалкогольных напитков.

Применяемые в производстве напитков комбинации различных искусственно вырабатываемых пищевых добавок и наполнителей (красителей, консервантов, подсластителей, ароматизаторов, эмульгаторов, стабилизаторов цвета и вкуса и т. п.) призваны улучшить потребительские свойства продукта (вкус, аромат, внешний вид, срок хранения и др.), но зачастую не удовлетворяют санитарным нормам. Исходя из экономических соображений, предприятия все чаще используют более дешевое сырье, менее качественные пищевые добавки и упрощенные технологии.

Количество фальсифицированной алкогольной и безалкогольной продукции в России на сегодняшний день превышает все мыслимые размеры, и здесь уже главным становится вопрос не только качества, но и безопасности напитка.

В **главе 7** мы приводили несколько примеров использования систем капиллярного электрофореза «Капель» для оценки качества и натуральности вин, пива, коньяков, водок и других напитков. В этой главе мы подробно рассмотрим схемы разделений консервантов, подсластителей, красителей и органических кислот.

8.2.1. Определение кофеина, аскорбиновой кислоты, консервантов (сорбиновой и бензойной кислот) и подсластителей (сахарина, аспартама и ацесульфама К)

В безалкогольных и слабоалкогольных напитках в качестве консервирующих добавок используют бензоат натрия и сорбиновую кислоту. В этих же продуктах можно определять также аскорбиновую кислоту (антиоксидант и витаминизирующую добавку) и кофеин.

Бензойная, сорбиновая и аскорбиновая кислоты в щелочных растворах могут находиться в форме анионов, что позволяет использовать для их разделения и определения капиллярный зонный электрофорез. Анализ органических анионов, в отличие от неорганических, предпочтительно вести на приборе с положительной полярностью высоковольтного блока, в этом случае сильный ЭОП (рН ~9) переносит мало-подвижные органические анионы в сторону детектора к катоду, против их электрической природы (на электрофореграмме (рис. 15) анионы выходят после системного пика ЭОП — зоны нейтральных компонентов).

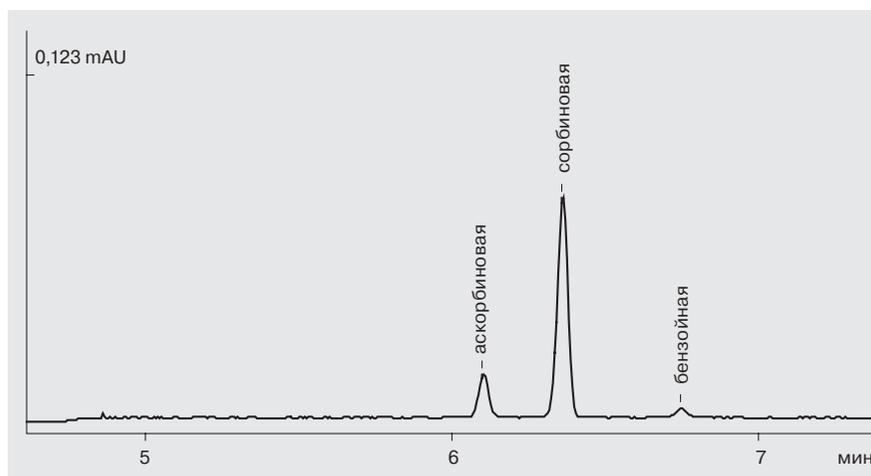


Рис. 15. Разделение аскорбиновой, сорбиновой и бензойной кислот методом капиллярного зонного электрофореза.

Капилляр: внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф/общ} = 50/60$ см. Ведущий электролит: тетраборат натрия, 10 мМ, рН 9,2. Ввод пробы: гидродинамический 30 мбар×15 с. Анализ: +20 кВ. Детектирование: 254 нм. Температура: 24 °С.

При этом используется прямое одноволновое детектирование, так как все компоненты имеют в области 254 нм полосы поглощения той или иной степени интенсивности (для повышения чувствительности определения бензойной кислоты и кофеина рекомендуется использовать длину волны 200 нм («Капель-105»)).

Кофеин в боратном буфере находится в недиссоциированной форме и для его определения следует обратиться к мицеллярному варианту — МЭКХ. В состав ведущего электролита вводят додецилсульфат натрия в концентрации 40 мМ, при которой большая его часть находится в форме отрицательно заряженных мицелл. Аскорбиновая, сорбиновая и бензойная кислоты по-прежнему находятся в растворе в анионной форме, что не мешает их разделению с кофеином. При наложении высокого напряжения навстречу ЭОП движется мицеллярная фаза, благодаря которой разделяются незаряженные компоненты пробы, в то время как на поведение анионов кислот присутствие ДДСН никакого влияния не оказывает (анионы кислот разделяются вследствие различий в их электрофоретических подвижностях). Поэтому на электрофореграмме после выхода системного пика — зона нейтральных компонентов, не удерживаемых мицеллами, наблюдается сначала пик кофеина, а затем пики анионов аскорбиновой, сорбиновой и бензойной кислот, рис.16.

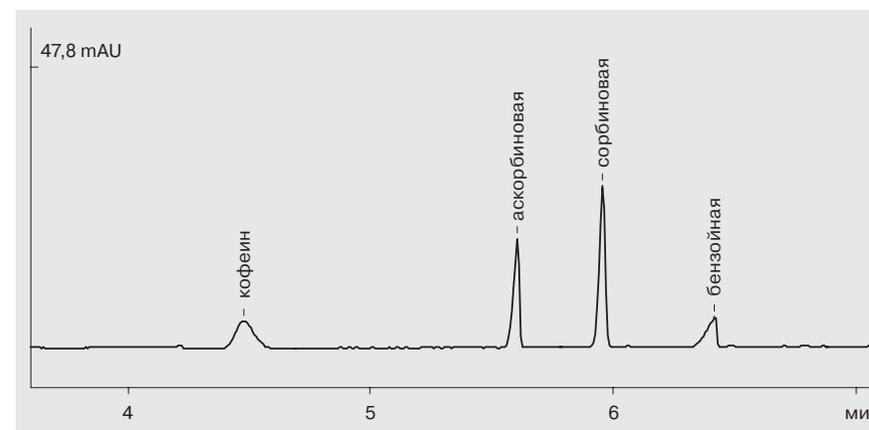


Рис. 16. Разделение кофеина, аскорбиновой, сорбиновой и бензойной кислот методом мицеллярной электрокинетической хроматографии.

Капилляр: внутр. диаметр 75 мкм, $L_{эфф/общ} = 50/60$ см. Ведущий электролит: тетраборат натрия, 10 мМ, ДДСН 40 мМ, рН 9,2. Ввод пробы: гидродинамический 30 мбар×15 с. Анализ: +20 кВ. Детектирование: 254 нм. Температура: 27 °С.

Поскольку в настоящее время безалкогольные и слабоалкогольные напитки наряду с консервантами и кофеином содержат также подсластители, такие как сахарин, аспартам и ацесульфам К, было бы целесообразно проводить их совместное определение в пробах. Условия, приведенные на рис. 16, идеально подходят для такого разделения (рис. 17).

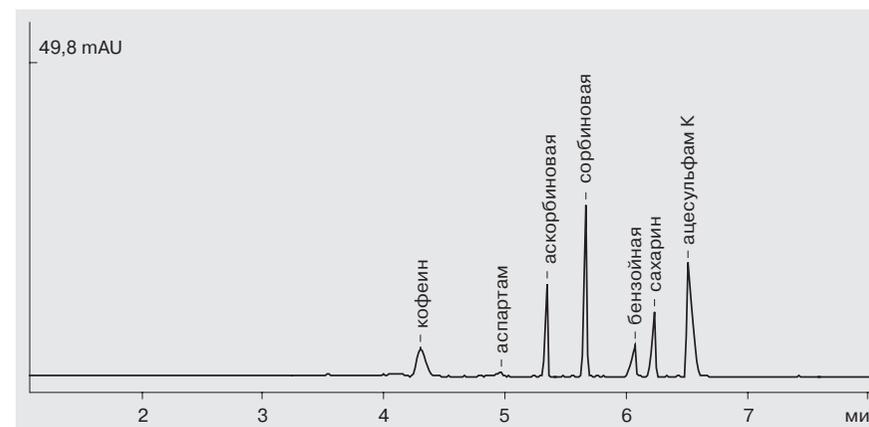


Рис. 17. Одновременное разделение кофеина, аскорбиновой кислоты, консервантов и подсластителей методом МЭКХ. Условия аналогичны рис. 16.

Используемый в мицеллярном электрофорезе додецилсульфат натрия при хранении его растворов, особенно в щелочной среде, подвергается гидролизу, продуктом которого является додециловый спирт $C_{12}H_{25}OH$. Додециловый спирт — неионогенное поверхностно-активное вещество. Пока поверхность кварцевого капилляра несет отрицательные заряды, додециловый спирт остается в растворе, участвуя в равновесиях мицеллообразования, но как только среда раствора становится слабокислой, он активно сорбируется на кварцевой поверхности. Пленка додецилового спирта делает поверхность гидрофобной, на поверхности не образуется двойной электрический слой, и капилляр становится непригодным для электрофоретических разделений. Поэтому, если после работы с растворами, содержащими додецилсульфат, предполагается промывка кислотой, то предварительно капилляр должен быть тщательно отмыт сначала щелочным буферным раствором, не содержащим додецилсульфата, а затем водой. Удалить пленку додецилового спирта с поверхности кварцевого капилляра можно промывкой его концентрированной серной кислотой, соблюдая необходимые предосторожности.

8.2.2. Определение органических кислот

Анализ органических кислот актуален на всех этапах производства вина, пива, соков, нектаров, сокодержавших напитков. Наличие или отсутствие органических кислот в пробе, а также их количественное содержание и соотношение позволяют определять подлинность и качество напитков, контролировать ферментативные процессы и проводить корреляцию со вкусом конечного продукта.

Для разделения органических кислот (щавелевой, муравьиной, винной, яблочной, янтарной, лимонной, уксусной, молочной, пропионовой, масляной) предложено использовать вариант капиллярного зонного электрофореза с отрицательной полярностью напряжения, как при анализе неорганических анионов. В состав ведущего электролита при этом обязательно вводят ЦТАБ с целью обращения ЭОП в сторону детектора и диэтанолмин (ДЭА) для формирования pH 5,1, необходимого для диссоциации кислот. Дополнительным компонентом ведущего электролита является ЭДТА, что позволило нам скорректировать формы пиков лимонной и щавелевой кислот. Детектирование ведут косвенным способом в УФ-области спектра при 254 нм, поэтому основой буфера для анализа органических кислот является анион, имеющий заметное поглощение при этой длине волны (нами выбрана бензойная кислота). Разделение кислот основано на миграции их анионных форм под действием электрического поля вследствие различных электрофоретических подвижностей. Первыми будут мигрировать небольшие и быстрые неорганические анионы (хлорид, сульфат, нитрат), затем, начиная со щавелевой, все определяемые анионы органических кислот, **рис. 18**. Между молочной и уксусной кислотами определяется фосфат-ион в форме дигидрофосфата. Поскольку этот ион практически всегда встречается в исследуемых напитках, в методике предусмотрено его количественное определение.

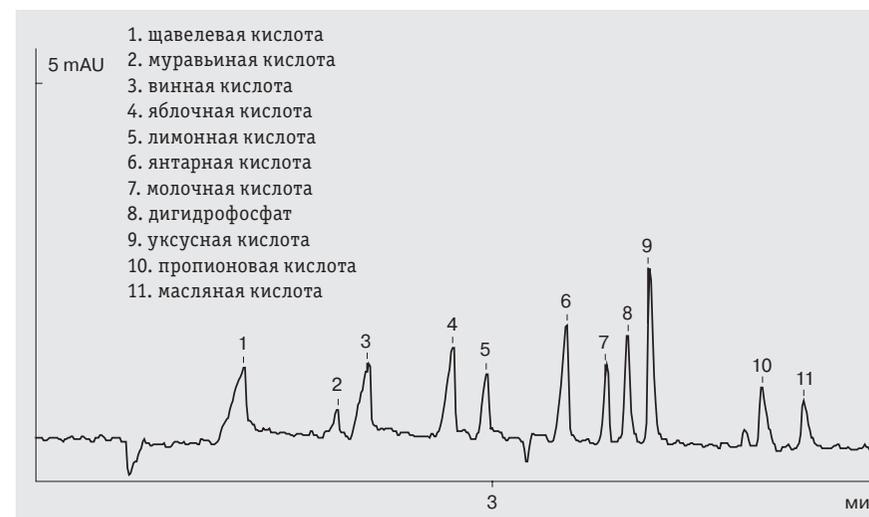


Рис. 18. Электрофоретическое разделение органических кислот и фосфат-иона методом КЗЭ.

Система капиллярного электрофореза «Капель» любой модификации с отрицательной полярностью источника высокого напряжения. Буфер: бензойная кислота 10 мМ, ДЭА 9 мМ, ЦТАБ 0,5 мМ, ЭДТА 0,1 мМ. Капилляр: $L_{эф}/L_{общ} = 50/60$ см, ID = 75 мкм. Ввод пробы: 150 мбар \times . Напряжение: -20 кВ. Детектирование: 254 нм, косвенное. Стандартная смесь органических кислот (по 10 мг/л каждой).

Отрицательный пик между лимонной и янтарной кислотами является системным и принадлежит ЭДТА. Отрицательный пик перед щавелевой кислотой принадлежит бромиду и подобен бромидному провалу в методике анализа неорганических анионов. В приведенных условиях отсутствует мешающее влияние аскорбиновой, сорбиновой и бензойной кислот, а также карбонат-иона.

Диапазоны измеряемых концентраций в среднем составляют 0,5–200 мг/л.

Органические кислоты в реальных объектах сильно различаются по своему качественному и количественному составу. В связи с этим на этапе предварительной подготовки необходимо разбавлять пробы, исходя из поставленной задачи. Так, вина и соки разбавляют в 50 и 100 раз, соответственно. При анализе в пиве щавелевой и муравьиной кислот разбавление не должно превышать 3–х раз, при анализе всех остальных компонентов допускается разбавление в 20 и более раз (перед отбором аликвоты пива для разбавления исходную пробу пива необходимо тщательно дегазировать). На **рис. 19** приведен пример анализа органических кислот в вине.

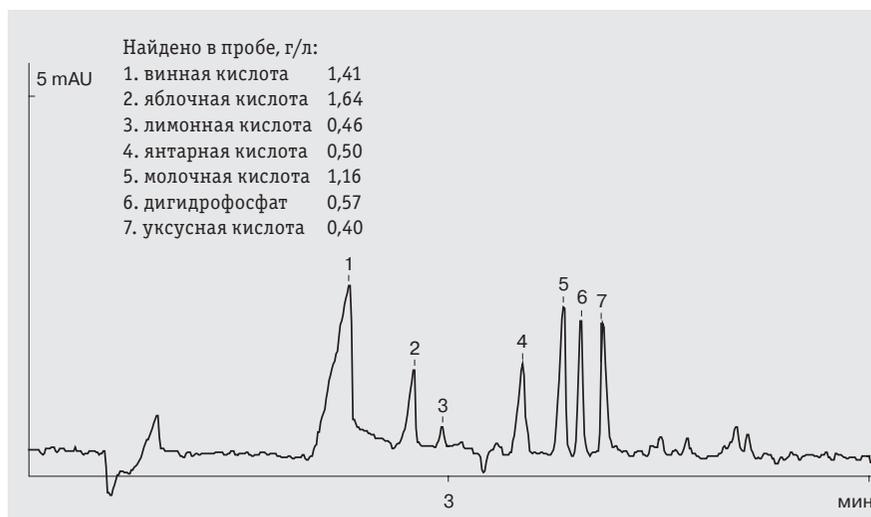


Рис. 19. Определение органических кислот в белом сухом вине.
Проба: вино белое, сухое (разбавлено в 50 раз водой). Условия анализа как на рис. 18.

Следует отметить, что при необходимости определения в винах fumarовой кислоты, требуется дополнительная оптимизация условий разделения, т. к. в предложенных выше условиях fumarовая кислота мигрирует совместно с винной кислотой. Такие факторы, как введение в состав буфера добавки органических спиртов, дают положительный результат, однако в целом отрицательно сказываются на стабильности ЭОП, влияя на модификацию внутренней стенки капилляра катионом цетилтриметиламмония.

8.2.3. Определение синтетических красителей

В производстве напитков широко применяют натуральные и синтетические красители. Имеют место случаи фальсификации продукции, выражающейся в несоответствии качественного состава содержимого упаковки и информации на этикетке (замена натуральных красителей синтетическими, использование запрещенных красителей и др.), превышение установленных норм содержания.

Разработанная нами методика определения синтетических красителей (табл. 7) распространяется на безалкогольные (соки, сокодержажие напитки, лимонады) и алкогольные напитки (вина, коктейли, водки) и предназначена для контроля качества и безопасности продукции при производстве и обращении на рынке.

Таблица 7. Название и номера красителей по различным классификациям.

Название	Е номер	Номер по СИ
тартразин	Е 102	19140
желтый «солнечный закат»	Е 110	15985
кармуазин	Е 122	14720
амарант	Е 123	16185
понсо 4R	Е 124	16255
эритрозин	Е 127	45430
красный 2G	Е 128	18050
красный очаровательный AC	Е 129	16035
патентованный синий V	Е 131	42051
индигокармин	Е 132	73015
бриллиантовый синий FCF	Е 133	42090
зеленый S	Е 142	44090
блестящий черный PN	Е 151	28440

Определение синтетических красителей требует предварительной подготовки пробы к анализу, основными этапами которой являются сорбция красителей из анализируемого напитка на оксиде алюминия, десорбция водным раствором аммиака, удаление последнего выпариванием. Для разделения красителей предложен вариант капиллярного зонного электрофореза с положительной полярностью напряжения и прямым детектированием при 254 нм (рис. 20). Для повышения чувствительности методики рекомендуется использовать длину волны 215 нм. Под действием электрического поля в кварцевом капилляре, заполненном карбонатным буфером, анионные формы определяемых соединений мигрируют к катоду благодаря сильному ЭОП. Порядок миграции: триарилметановые, ксантеновые, индигоидные и азокрасители.

Диапазоны измеряемых концентраций составляют в среднем 0,5–60 мг/л.

В реальных объектах синтетические красители присутствуют в ограниченном количестве, обычно не более 2 красителей в пробе. Все многообразие цветов и оттенков напитков создается за счет использования красителей в различных концентрациях, т. е. в пробе присутствует один основной краситель и один краситель для придания оттенка. На рис. 21 приведен пример анализа синтетических красителей в слабоалкогольном коктейле.

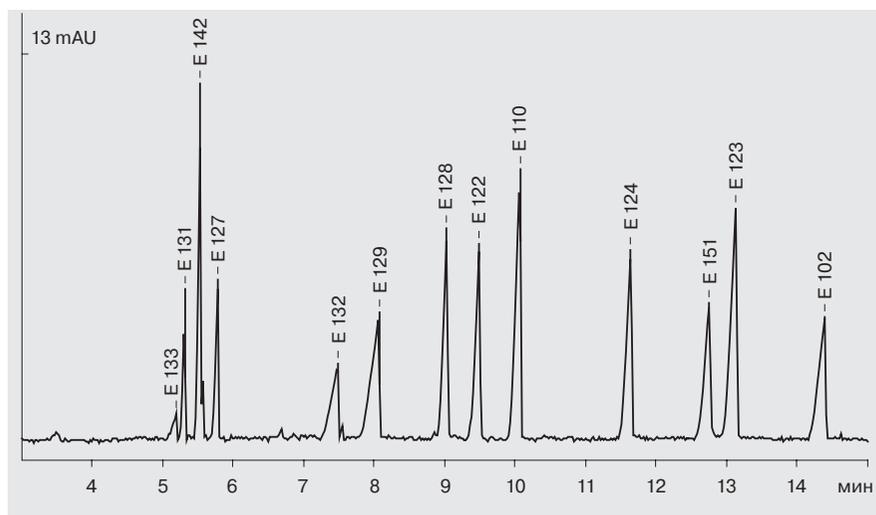


Рис. 20. Разделение тринадцати синтетических красителей методом КЗЭ.

Капилляр: $L_{\text{эф}}/L_{\text{общ}} = 50/60\text{см}$, ID = 75 мкм. Ввод пробы: 300 мбар \times с. Буфер: карбонатный.

Напряжение: +25 кВ. Температура: 20 °С.

Детектирование: 254 нм. Стандартная смесь красителей (по 10 мг/л).

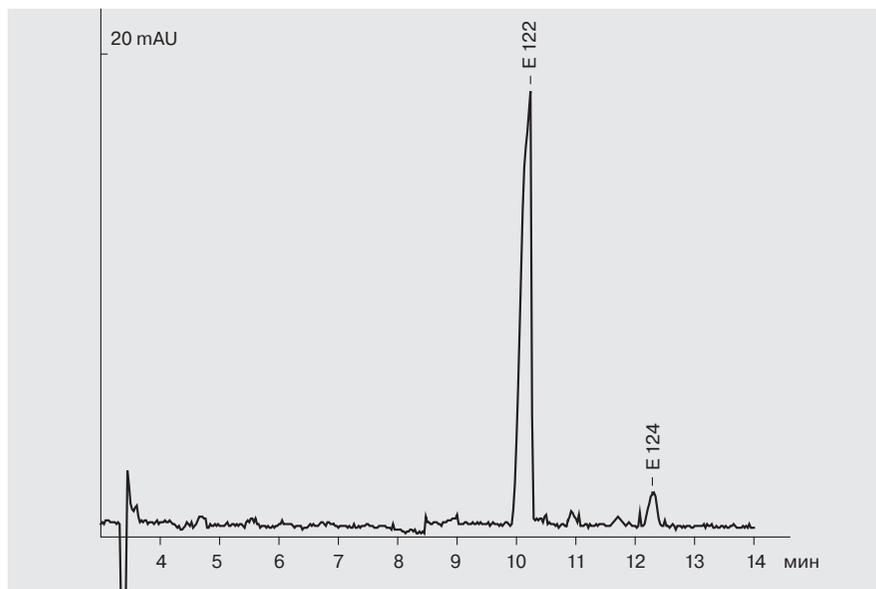


Рис. 21. Анализ синтетических красителей в слабоалкогольном коктейле.

Условия анализа как на рис. 20. Детектирование: 215 нм.

Проба: слабоалкогольный коктейль, найдено: E 122 — 33,8 мг/л; E 124 — 1,8 мг/л.

Для анализа слабоокрашенных напитков необходимо на стадии пробоподготовки проводить концентрирование пробы в 2 или 5 раз.

Присутствие в анализируемой пробе натуральных красителей (соки, сокоосодержащие напитки и др.) не мешает определению синтетических красителей.

Разработанная методика определения синтетических красителей имеет ряд особенностей:

- ▶ Рабочая длина волны 254 нм позволяет использовать для работы приборы «Капель» любой модификации, имеющей жидкостную систему охлаждения капилляра («Капель-103РТ, -104Т, -105 и все модификации «М»). Использование длины волны 215 нм («Капель-105, -105М») дает возможность повысить чувствительность методики (в среднем в 2 раза), иначе — снизить предел детектирования красителей в анализируемых пробах, что может быть полезно при обнаружении запрещенных красителей.
- ▶ В методике используется очень простой (однокомпонентный) карбонатный буфер.
- ▶ Для анализа требуется малое количество простых и доступных реагентов (на всю методику не более 5).
- ▶ Использование для определения синтетических красителей капиллярного электрофореза позволяет существенно сократить время анализа пробы по сравнению с имеющимися ТСХ- и спектрофотометрическими методиками.

Важные практические моменты, которые необходимо соблюдать при выполнении анализа синтетических красителей:

- ▶ Рабочий буферный раствор необходимо готовить ежедневно.
- ▶ Следует строго соблюдать сроки годности стандартных растворов красителей. Срок хранения раствора индигокармина (E132) — 1 неделя (в посуде из темного стекла), эритрозина (E127) — 1 месяц, всех остальных красителей — 3 месяца.
- ▶ Все растворы, контактирующие с капилляром (промывочные, буферные, растворы пробы) перед помещением в прибор обязательно надо центрифугировать (3–5 минут при скорости вращения 5000 об/мин.).
- ▶ Непосредственно перед пробоподготовкой пробы необходимо дегазировать. Пробы с осадком перед дегазированием следует профильтровать через сухой бумажный фильтр «синяя лента», отбрасывая первую порцию фильтрата.
- ▶ Буферные растворы, участвующие в анализе, а также промывочный буфер необходимо заменять после каждых 2-х анализов.
- ▶ После каждых 4-х анализов и в конце рабочего дня обязательно проводить промывку капилляра с использованием растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. Хранение капилляра определяется частотой работы: на ночь можно оставлять в буфере, на большее время — в воде или в высушенном состоянии.
- ▶ Для проверки правильности идентификации пиков на полученных электрофореграммах рекомендуется использовать метод добавок.

8.3. Анализ гербицидов классов феноксикарбоновых кислот и симметричных триазинов

Среди пестицидов, проявляющих гербицидную активность, наибольшее распространение получили феноксикарбоновые кислоты (ФКК) и симметричные триазины. Максимум гербицидной активности ФКК наблюдается при наличии в бензольном кольце двух атомов хлора, т. е. для 2,4-Д и ее гомологов (табл. 8). Наиболее избирательными гербицидами среди триазинов являются 2-хлор-4-алкиламино-6-алкиламино-симм-триазины (хлор-симм-триазины) и 2-метилтио-4-алкиламино-6-алкиламино-симм-триазины (метилтио-симм-триазины), табл. 9.

Таблица 8. Гербициды класса феноксикарбоновых кислот, их кислотные свойства и ПДК в водных объектах.

Название компонента	pK _a	Заместители				ПДК в водных объектах, мг/л
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
кислота феноксиуксусная (ФУК)	2,20	CH ₂	H	H	H	1,0 (питьевая)
кислота 2,4-дихлорфеноксиуксусная (2,4-Д)	2,64	CH ₂	Cl	Cl	H	0,03 (питьевая) 1,0 (природная)
кислота 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т)	2,85	CH ₂	Cl	Cl	Cl	запрещена к применению
кислота 2,4-дихлорфенокси-α-пропионовая (2,4-ДП)	3,0	(CH ₂) ₂	Cl	Cl	H	0,50 (питьевая) 0,62 (природная)
кислота 2,4-дихлорфенокси-α-масляная (2,4-ДМ)	4,8	(CH ₂) ₃	Cl	Cl	H	0,01 (питьевая)

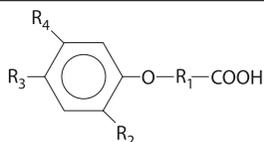
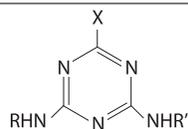


Таблица 9. Структура симметричных триазинов, их pK_a и ПДК в воде.

Гербицид	Заместители			pK _a	ПДК в водной среде (мг/л)
	X	R	R'		
симазин	Cl	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	1,65	0,024 (рыб-хоз. водоемы)
атразин	Cl	C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	1,68	0,005 (рыб-хоз. водоемы)
пропазин	Cl	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	1,85	1,0 (питьевая)
прометрин	SCH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	4,1	3,0 (питьевая) 0,05 (рыб-хоз. водоемы)



Отмеченные группы пестицидов характеризуются средней токсичностью (ПДК в табл. 8 и 9), при этом персистентность (способность сохраняться какое-либо время в окружающей среде, не теряя своей биологической активности) для триазинов в 3 раза выше. Следует отметить, что наряду с остаточными количествами гербицидов важно контролировать содержание продуктов их разложения, многие из которых также оказывают токсическое воздействие на окружающую среду. Для ФКК таким сопутствующим компонентом в водной среде является 2,4-дихлорфенол.

Относительно новым, экспрессным, простым и надежным методом определения пестицидов, характеризующимся высокой эффективностью разделения и низкой себестоимостью анализа, является капиллярный электрофорез. В зависимости от условий анализа ФКК могут находиться в растворе в форме органических анионов или нейтральных молекул, а симм-триазины — в катионной или нейтральной формах, что позволяет применять для их анализа как вариант капиллярного зонного электрофореза, так и мицеллярную электрокинетическую хроматографию.

Анализ гербицидов класса феноксикарбоновых кислот в природных, питьевых и сточных водах методом капиллярного зонного электрофореза.

Для модельной смеси, содержащей 2,4-ДМ, 2,4-ДП, 2,4,5-Т, 2,4-Д и феноксиуксусную (ФУК) кислоты (табл. 8), подобраны оптимальные условия разделения компонентов в режиме капиллярного зонного электрофореза (рис. 22), при этом анализируемые компоненты находятся в форме органических анионов. Линейный диапазон определяемых концентраций составил 0,2–20 мг/л при объеме пробы 1 мл. При необходимости определения концентраций гербицидов менее 0,2 мг/л (см. ПДК, табл. 8) предложено концентрирование пробы с использованием твердофазной экстракции, в этом случае нижняя граница определяемых концентраций составила 0,002 мг/л при объеме пробы 100 мл.

Проведена оценка мешающего влияния 2,4-дихлорфенола. Показано, что 2,4-дихлорфенол, как продукт конечного разложения ФКК в водной среде, в выбранных условиях полностью разделяется с анализируемыми компонентами, не мешая их количественному определению.

Для природных вод изучено возможное мешающее влияние гуминовых кислот (ГК) при разделении и количественном определении феноксикарбоновых кислот. Установлено, что гуминовые кислоты при концентрации менее 50 мг/л не влияют на параметры разделения смеси ФКК. При увеличении концентрации ГК от 50 до 250 мг/л наблюдается заметное (вдвое) снижение эффективности разделения каждого из анализируемых компонентов не мешающее, однако, количественному определению.

С 1 июля 2008 года в Российской Федерации действует ГОСТ Р 52730-2007 «Вода питьевая. Методы определения содержания 2,4-Д», в который включен метод капиллярного электрофореза.

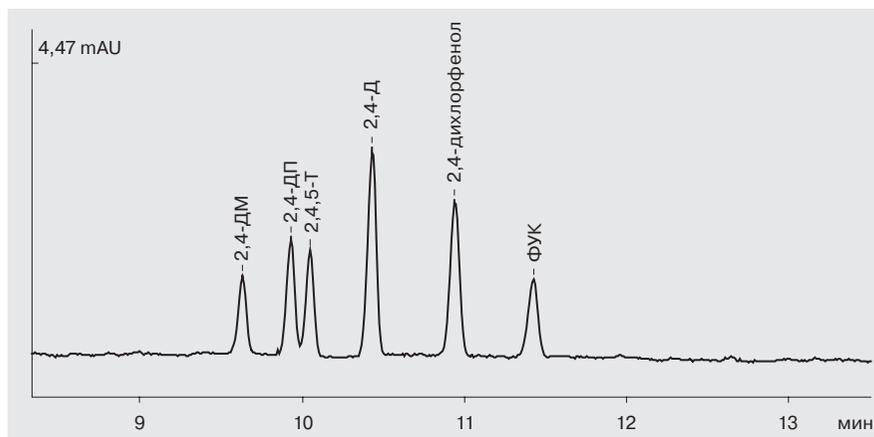


Рис. 22. Разделение феноксикарбоновых кислот и 2,4-дихлорфенола методом капиллярного зонного электрофореза.

Система капиллярного электрофореза «Капель-105»; капилляр: кварцевый, эффективная длина 60 см, внутренний диаметр 75 мкм; ведущий электролит: боратный буфер, 10 мМ, рН 9,2; ввод пробы: 30 мбар×15 с; рабочее напряжение: +20 кВ; детектирование: УФ, 205 нм; температура +20 °С. Концентрации определяемых компонентов: 2,4-ДМ, 2,4-ДП, 2,4,5-Т — по 2 мг/л, 2,4-Д, 2,4-ДХФ, ФУК — по 1 мг/л.

Определение гербицидов ряда *симм*-триазинов в природных и питьевых водах методом мицеллярной электрокинетической хроматографии.

Согласно значениям pK_a (табл. 9) при рН <3 возможно существование *симм*-триазинов в форме катионов, что позволяет использовать для их разделения вариант капиллярного зонного электрофореза. При этом следует учитывать, что скорость электроосмотического потока в кислой среде невелика, что может существенно увеличить время анализа. На рис. 23 приведена электрофореграмма смеси, содержащей симазин, атразин, пропазин и прометрин (а также метку электроосмотического потока (ЭОП) — бензиловый спирт) в режиме КЗЭ (рН ведущего электролита 2,5).

Первым мигрирует прометрин, а далее — симазин, атразин и пропазин, выходящие одним пиком без разделения. Очевидно, что в режиме зонного электрофореза возможно лишь групповое разделение метилтио- и хлор-*симм*-триазинов. В связи с ограниченными возможностями капиллярного зонного электрофореза при разделении симазина, атразина, пропазина и прометрина в форме катионов мы перешли к варианту мицеллярной электрокинетической хроматографии в щелочной среде (рН 9,2), где мицеллообразователем выступил додецилсульфат натрия. При оптимизации разделения нами исследованы факторы, определяющие эффективность и разрешающую способность системы разделения: концентрация мицеллообразователя (от 10 до 50 мМ), влияние органического модификатора (добавки метанола, 10 и 20 % об.), введенного в состав ведущего электролита, изменение величины рабочего напряжения (от +15 до +25 кВ). В условиях эксперимента анализируемые компоненты представляли собой нейтральные соединения и распределялись между водной и псевдостационарной мицеллярной фазами согласно своей гидрофобности: симазин < атразин < пропазин < прометрин (рис. 24).

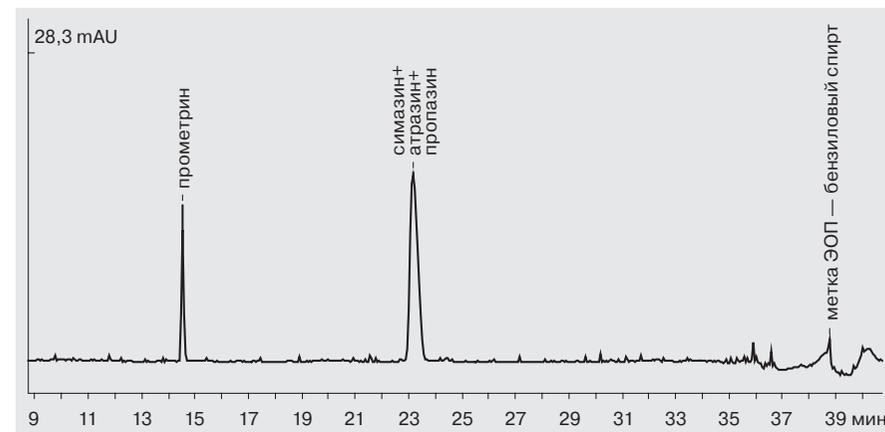


Рис. 23. Разделение симазина, атразина, пропазина и прометрина в режиме капиллярного зонного электрофореза.

Система капиллярного электрофореза «Капель-105». Буфер: 20 мМ фосфорная кислота, рН 2,5. Капилляр: кварц, эффективная длина 60 см, внутренний диаметр 75 мкм. Напряжение: 20 кВ (ток 112 мкА). Ввод пробы: 450 мбар×с. Детектирование: 229 нм. Концентрация каждого вещества 8 мкг/мл.

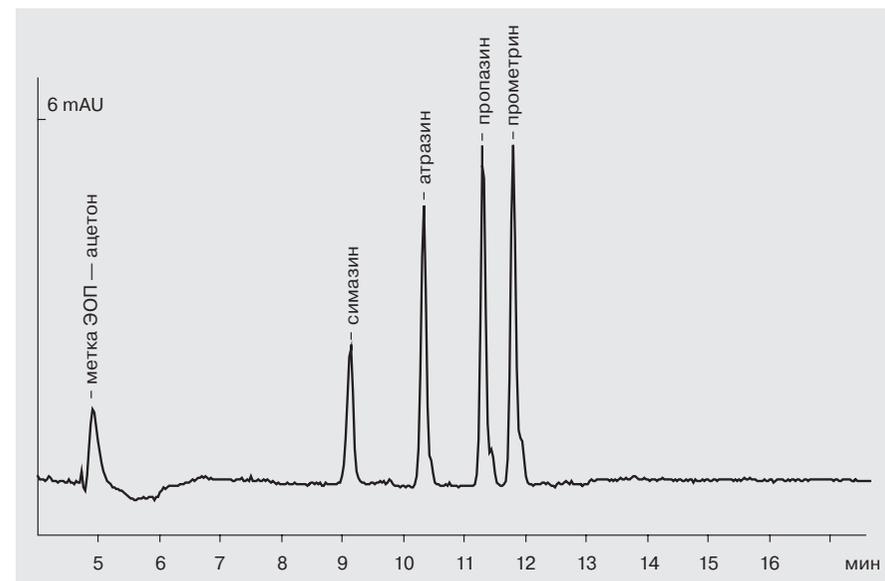


Рис. 24. Электрофореграмма модельной смеси *симм*-триазинов.

Система капиллярного электрофореза «Капель-105». Буфер: 10 мМ тетраборат натрия, 30 мМ ДДСН. Капилляр: кварц, эффективная длина 60 см, внутренний диаметр 75 мкм. Напряжение: 25 кВ (ток 62 мкА). Ввод пробы: 450 мбар×с. Детектирование: 229 нм. Концентрация каждого вещества 5 мкг/мл.

Минимально определяемая концентрация для симазина составляет 0,1 мг/л, для атразина, пропазина и прометрина — 0,05 мг/л (соотношение сигнал/шум = 2), объем пробы для анализа не превышает 5 мл. Следует отметить, что указанные пределы позволяют контролировать пропазин и прометрин в водных средах методом КЭ без предварительного концентрирования пробы, тогда как для симазина и атразина прямой анализ оказывается недостаточно чувствительным (ПДК, табл. 9). При необходимости определения более низких концентраций следует использовать стадию предварительного концентрирования пробы, например, с использованием твердофазной экстракции.

Таким образом, для анализа гербицидов феноксикарбоновых кислот и *симм*-триазинов в водных средах возможно использование метода капиллярного электрофореза. При этом феноксикарбоновые кислоты предпочтительно анализировать в зонном варианте, тогда как для гербицидов класса симметричных триазинов рекомендован режим мицеллярной электрокинетической хроматографии с додецилсульфатом натрия в качестве мицеллообразователя.

8.4. Анализ кормов, комбикормов, сырья для их производства, премиксов

Контроль качественного и количественного состава кормов и сырья для их производства является важным этапом при разработке сбалансированного рациона питания животных и птицы. Для современных высокопродуктивных пород животных и кроссов птицы требуются корма, хорошо сбалансированные по энергетическому, белковому, аминокислотному, минеральному, витаминному, макро- и микроэлементному составу.

Важнейшим показателем питательной ценности кормов является содержание аминокислот, среди которых есть незаменимые, поступающие в организм только с пищей. Как недостаток аминокислот в рационах, приводящий к задержке в росте и развитии, снижению продуктивности и воспроизводительных функций, так и их избыток, сопровождаемый неполным усвоением и даже образованием вредных продуктов распада, снижают экономическую эффективность кормов.

8.4.1. Анализ аминокислот

Для определения аминокислотного состава кормов в России до последнего времени рекомендовали использовать аминокислотные анализаторы (АКА) на основе ионообменной хроматографии, что для подавляющего большинства аналитических лабораторий было невыполнимо ввиду очень старого парка АКА чешского производства и дороговизны современных анализаторов только зарубежного производства. Известны схемы анализа аминокислот в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ с градиентным элюированием, которые даже несмотря на большой парк отечественных жидкостных хроматографов не нашли в России широкого использования в аминокислотном анализе кормов ввиду отсутствия аттестованных методик. В сложившейся ситуации лабораториям предлагали временный выход — применение расчетного способа, главным недостатком которого является отсутствие информации о фактическом содержании аминокислот в пробе. Таким образом, в последние годы

ощущалась реальная потребность в новом методе и методике, реализованной на недорогом, предпочтительно отечественном, оборудовании.

Мы уже неоднократно сравнивали капиллярный электрофорез с ВЭЖХ и говорили о преимуществах первого: высокая эффективность разделения, недоступная ВЭЖХ; отсутствие хроматографической колонки; минимальный расход реактивов, отсутствие или минимальный расход дорогостоящих высококачественных органических растворителей; экспрессность анализа.

С использованием КЭ нами были разработаны две основные схемы определения аминокислотного состава кормов и сырья для их производства:

- ▶ анализ пяти технологически важных аминокислот,
- ▶ анализ всех двадцати протеиногенных аминокислот.

Аминокислоты в кормах присутствуют как в свободной, так и в связанной форме (последние анализируют после гидролиза белков). Стадия гидролиза определяется только типом аминокислоты (при анализе триптофана используют щелочной гидролиз, при анализе остальных девятнадцати аминокислот — кислотный) и не зависит от конечного варианта определения.

Примечание. Расшифровка символов аминокислот приведена в списке принятых сокращений в начале данного руководства.

Анализ технологически важных аминокислот (Lys, Met, Thr, Cys-Cys, Trp).

Достаточно высокие содержания аминокислот в кормах позволили нам проводить прямое определение аналитов в гидролизатах пробы по собственному поглощению аминокислоты (190 нм). При этом, несмотря на существенные различия в физико-химических свойствах протеиногенных аминокислот (основные, кислотные, полярные, гидрофобные, гидрофильные), оказалось возможным использование варианта капиллярного зонного электрофореза, позволяющего разделять ионные компоненты пробы. Сложность матрицы реальных объектов анализа (комбикорма, рыбная и мясокостная мука, дрожжи, шроты и жмыхи) требовала достоверной идентификации технологически важных аминокислот на фоне сопутствующих протеиногенных аминокислот, что могла обеспечить только высочайшая селективность разделения. В связи с полным разрушением триптофана при кислотном гидролизе белков для него была разработана собственная схема разделения (приведена ниже), таким образом, основная задача заключалась в полном разделении лизина, метионина, треонина и цистина с остальными пятнадцатью аминокислотами. Поиск оптимальных условий разделения в основном был связан с выбором pH и состава ведущего электролита. Аминокислоты относятся к цвиттер-ионам, т. е. являются нейтральными молекулами, содержащими одновременно положительные и отрицательные центры (аминогруппу и карбоксильную группу соответственно). С учетом цвиттер-ионной структуры аминокислот проведены разделения 19 протеиногенных аминокислот в форме катионов (pH 2,7) и анионов (pH 9,2), в том числе с использованием в составе ведущих электролитов макроциклических добавок: 18-краун-6, способного проявлять катионную селективность в кислой среде, и α - и β -циклодекстринов в щелочной.

Практически полное разделение интересующих нас четырех аминокислот на фоне сопутствующих пятнадцати было достигнуто при использовании *щелочного буфера* с добавлением β -ЦД (**Рис. 25а**). Первые 2 аминокислоты (лизин и аргинин) в условиях анализа находятся в форме органических катионов, согласно их изоэлектрическим точкам (и. э. т.), и мигрируют до ЭОП (зоны нейтральных компонентов). Все другие

имеют форму органических анионов. Тот факт, что некоторые сопутствующие аминокислоты мигрировали в одной зоне без разделения, было не принципиально, важно, что они отделялись от интересующих нас четырех аминокислот.

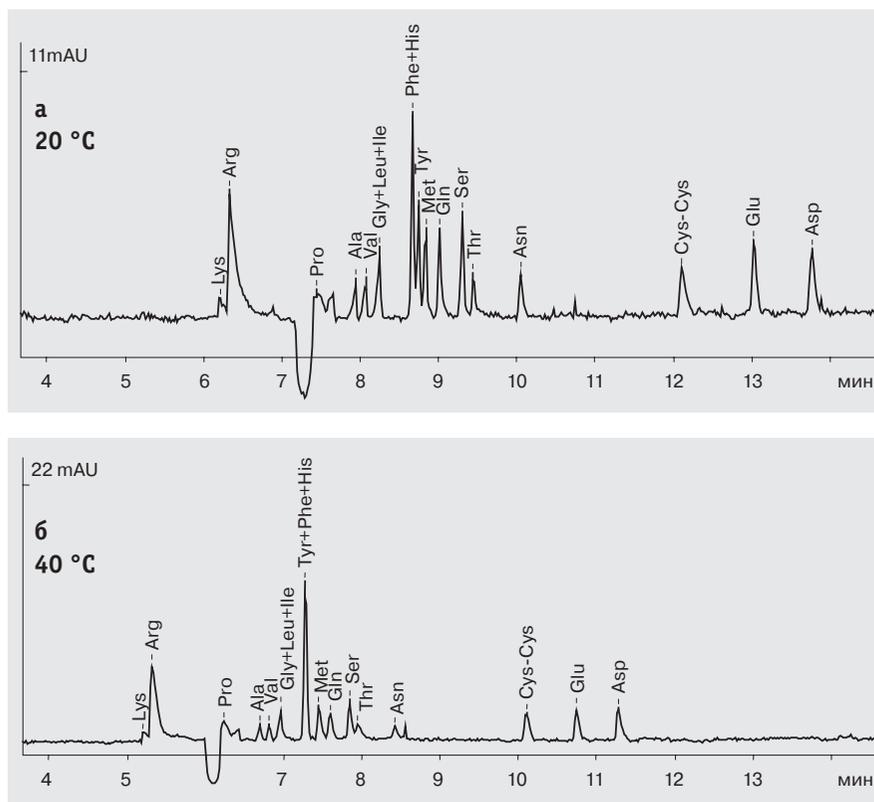


Рис. 25. Разделение и прямое определение 19-ти аминокислот в режиме КЭЭ. Кварцевый капилляр 75 см (65 см до детектора) × 50 мкм внутренний диаметр. Буфер: 10 мМ боратный, 10 мМ β-ЦД (рН 9,2). Ввод пробы: 450 мбар·с. Анализ: +20 кВ. Детектирование: УФ, 190 нм. Температура: 20 °С (а) и 40 °С (б).

Повышение селективности разделения метионина и группы ароматических аминокислот (Тур и Phe) было достигнуто при увеличении температуры до 40 °С (рис. 25б), что можно объяснить повышением стабильности комплексов включения типа «гость–хозяин» между молекулами циклодекстрина и ароматическими кислотами. С одной стороны известно, что размер полости β-ЦД максимально соответствует размеру бензольного кольца, с другой, что при комнатной температуре растворимость макроцикла невелика, поэтому повышение температуры способствует более активному комплексообразованию.

Методика анализа четырех аминокислот вошла в ГОСТ Р 52347-2005 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана методом капиллярного электрофореза».

Прямое определение Тгр.

Вследствие разрушения триптофана при кислотном гидролизе, для определения этой технологически важной аминокислоты была разработана собственная схема. Несмотря на то, что Тгр можно было детектировать при 190 нм, нами выбрана рабочая длина волны, соответствующая максимуму поглощения (219 нм), что позволило, с одной стороны, существенно повысить чувствительность определения (на порядок), а, с другой, заметно снизить мешающее влияние сопутствующих протеиногенных аминокислот. Используемый на стадии подготовки пробы щелочной гидролиз в большей или меньшей степени разрушает все аминокислоты, кроме Тгр (рис. 26). Проведение разделения при повышенной температуре (40 °С) заметно сокращает время единичного анализа.

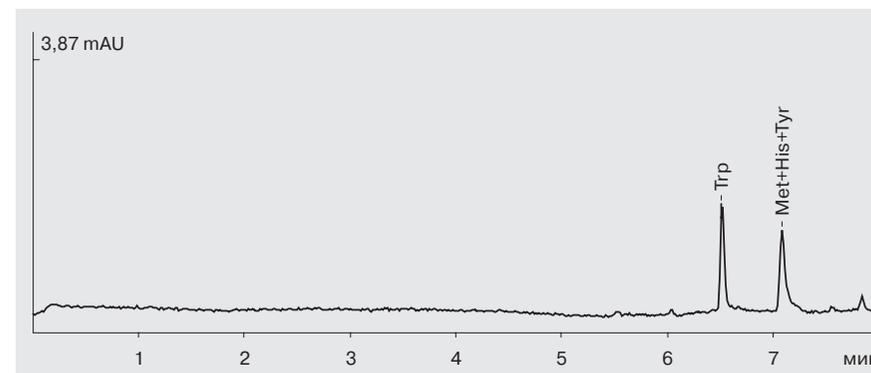


Рис. 26. Определение Тгр в рыбной муке.

Кварцевый капилляр 75 см (65 см до детектора) × 50 мкм внутренний диаметр. Буфер: 20 мМ боратный (рН 9,2). Ввод пробы: 150 мбар·с. Анализ: +20 кВ. Детектирование: УФ, 219 нм. Температура 40 °С. Подготовка пробы: навеска 100 мг, щелочной гидролиз (Ва(ОН)₂, T = 110 °С, 18 часов), удаление избытка щелочи. Результат анализа: Тгр (0,52 %).

Методика анализа триптофана вошла в ГОСТ Р 52347-2005 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Определение содержания лизина, метионина, треонина, цистина и триптофана методом капиллярного электрофореза».

При желании анализировать свободные формы аминокислот (в отсутствие гидролиза) триптофан в условиях, приведенных на рис. 25, при 190 нм, будет мигрировать между Val и Gly. Его разделение возможно при повышении концентрации β-ЦД в буферном растворе или в отдельном анализе при 219 нм. Разделение всех двадцати аминокислот до базовой линии в приведенных или близких условиях недостижимо.

Полный анализ протеиногенных аминокислот.

Полное разделение всех протеиногенных аминокислот возможно только в форме производных. Широкому распространению фенилизотионаата (ФИТЦ) для модификации аминокислот в КЭ (а также в ВЭЖХ) по сравнению с другими реагентами способствуют простота использования, хорошее разделение полученных производных, достаточная воспроизводимость условий реакции, высокая растворимость в водной среде. При взаимодействии ФИТЦ с аминокислотами в щелочной среде про-

исходит образование фенилтиокарбамильных (ФТК) производных, которые в кислой среде переходят в соответствующие фенилтиогидантоиновые (ФТГ) производные. Наши предварительные эксперименты по синтезу ФТГ-производных аминокислот показали, что наряду с основным продуктом реакции образуются несколько побочных, трудно идентифицируемых соединений. При получении же ФТК-производных такого рода проблем не возникало.

В подобранных оптимальных условиях (рис. 27) показано разделение девятнадцати аминокислот (без триптофана), которые можно анализировать после проведения кислотного гидролиза кормов.

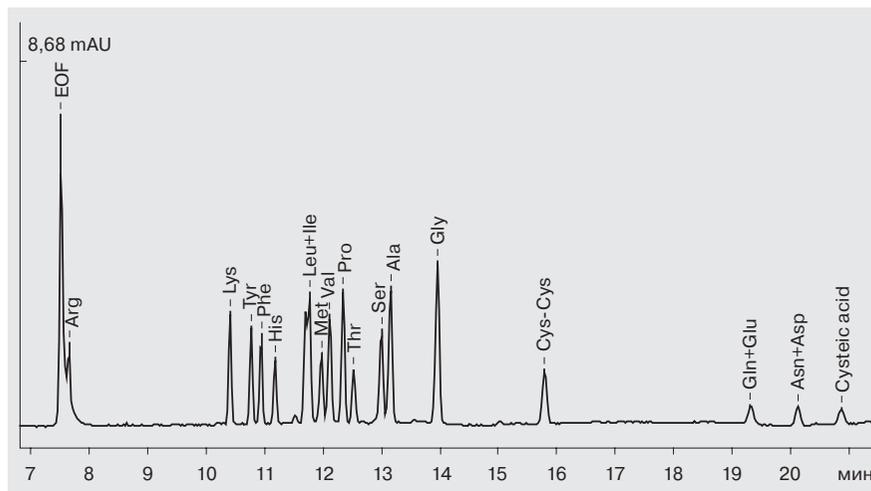


Рис. 27. Разделение смеси ФТК-производных аминокислот после кислотного гидролиза.

Кварцевый капилляр 75 см (65 см до детектора) × 50 мкм внутренний диаметр. Буфер: 30 мМ фосфатный (рН 7,4), 4 мМ β-ЦД. Ввод пробы: 150 мбар×с. Анализ: +25 кВ, давление 50 мбар после 17 мин. Детектирование: УФ, 254 нм. Температура 30 °С. Исходные концентрации каждой аминокислоты 10 мг/л.

В результате гидролиза Gln и Asn переходят в форму соответствующих им кислот (Glu и Asp) и определяются по их пикам (именно поэтому иногда говорят, что анализируют 18, а не 20 α-аминокислот). Кроме того, нами специально изучалось поведение цистина, поскольку литературные данные говорили о его нестабильности при кислотном гидролизе. В связи с этим цистин определяли по стандартной схеме кислотного гидролиза (на рис. 27 для ориентира показан пик цистина на 16 мин.), а также с предварительным окислением надмуравьиной кислотой до цистеиновой кислоты (последний пик на рис. 27), устойчивой к кислотному гидролизу. Показано, что во втором случае получаются более стабильные результаты.

С методической точки зрения в зависимости от того, какие именно аминокислоты представляют для исследователя наибольший интерес, было разумно разделить анализ ФТК-производных аминокислот на 3 схемы (табл. 10):

- ▶ сначала из кислотного гидролизата определяют основную группу из 14 пиков (до глицина включительно) в условиях, приведенных на рис. 27 (лейцин и изолейцин определяются по сумме; при необходимости анализа индивидуальных аминокислот разделение проводят в тех же условиях только при температуре 50 °С);
- ▶ в связи с тем, что цистин перед кислотным гидролизом переводят в цистеиновую кислоту, медленно мигрирующую в группе с глутаминовой и аспарагиновой кислотами, нами предложен ускоренный вариант их разделения в отдельном анализе под давлением (при этом определение первых 14-ти пиков ФТК-производных аминокислот становится невозможным);
- ▶ в последней схеме после щелочного гидролиза определяют триптофан, при этом анализ ведут при повышенной температуре, под давлением и с использованием другого буферного раствора (подготовка капилляра при переходе с фосфатного буфера на боратный (табл. 10) занимает не более 4–5 минут и проводится одновременно с установкой на приборе рабочей температуры для анализа триптофана).

Для реализации методики требуется специальная геометрия капилляра (внутренний диаметр 50 мкм, общая/эффективная длина 75/65 см) и специальная версия ПЗУ в приборе «Капель», позволяющая прикладывать давление в ходе электрофоретического определения, работать при температурах до 70 °С, изменять в ходе анализа параметры давления, рабочего напряжения, температуры и времени анализа без остановки электрофореграммы.

Таблица 10. Предлагаемые условия анализа ФТК-производных аминокислот.

Номер градуировочного раствора	1	2	3
определяемые аминокислоты	Ala, Arg, Val, His, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Tyr, Thr, Ser, Phe	Asp, Glu, Cys-Cys (по пику цистеиновой кислоты)	Тгр
ввод пробы	30 мбар, 5 с		
Условия анализа			
длина волны, нм	254		
напряжение, кВ	+25		
давление, мбар	0	50	30
температура, °С	30		50
время, мин.	13–15	10–12	6–7
ведущий электролит	фосфатный буфер		боратный буфер

Следует отметить некоторые особенности анализа ФТК-производных. Для β-ЦД как компонента буфера отмечена хиральная активность по отношению к Тгр, Туг и Phe (при этом D-формы мигрируют после L-форм для каждой из указанной аминокислоты).

кислот). Известно, что молекулы белков построены из α -аминокислот, принадлежащих, за исключением глицина, к *L*-ряду. Тем не менее, в производстве кормов активно используются синтетические добавки аминокислот, в том числе рацематов. Таким образом, предложенная схема анализа может быть использована для контроля качества входящего сырья, контроля производства кормов, выявления фальсификатов.

Заметим, что разработанную нами схему разделения можно использовать и для анализа свободных форм аминокислот (без проведения гидролиза). Например, мы применяли ее в анализе аминокислотного состава растений, соков, вин, пива, биопроб (сыворотки крови), фармпрепаратов и др. В этом случае Gln мигрирует между Val и Pro, Asp после Thr, а Trp перед Phe. Совершенно очевидно, что без проведения гидролиза все 20 аминокислот можно разделить в ходе одного анализа, при этом после выхода пика цистина рекомендуем приложить давление от 50 до 99 мбар для ускорения выхода глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Примечание. Для всех трех аминокислотных методик проведены сличительные эксперименты, в которых были использованы три метода: КЭ, обращенно-фазовая ВЭЖХ, ионообменная хроматография (аминокислотный анализатор). Полученные результаты были положительными, что позволило нам рекомендовать капиллярный электрофорез в качестве современного метода анализа аминокислот в кормах и сырье с высоким и низким содержанием белков.

8.4.2. Анализ свободных форм водорастворимых витаминов

Витамины относятся к жизненно важным соединениям, необходимым для нормального протекания биохимических и физиологических процессов в живых организмах. Большинство водорастворимых витаминов представлено несколькими соединениями (витамерами), обладающими сходной биологической активностью, табл. 11. Наряду с витаминами существует группа витаминоподобных соединений, например, флавоноиды (рутин, кверцетин).

Таблица 11. Классификация и номенклатура анализируемых соединений.

Витамин (синоним)	Витамер
Водорастворимые витамины	
витамин С	аскорбиновая кислота
тиамин (витамин В ₁)	тиамин
рибофлавин (витамин В ₂)	рибофлавин
пантотеновая кислота (витамин В ₃)	пантотеновая кислота
витамин В ₆	пиридоксин, пиридоксаль
ниацин (витамин РР, витамин В ₃)	никотиновая кислота, никотинамид
фолиацин (витамин В ₉ , витамин В ₁₂)	фолиевая кислота
биотин (витамин Н)	биотин
Витаминоподобные соединения	
флавоноиды: рутин, кверцетин	

Организм человека и животных не синтезирует витамины или синтезирует в недостаточном количестве, поэтому должен получать их с пищей. Избыточное или недостаточное потребление витаминов ведет к нарушениям физиологических функций организма, поэтому при разработке сбалансированного рациона питания животных и птицы важно контролировать фактическое содержание витаминов в исходном сырье и готовых кормах.

Традиционными методами анализа водорастворимых витаминов являются ВЭЖХ, флуориметрия и фотометрия. Нами предложен метод капиллярного электрофореза (КЭ). В отличие от флуориметрии/фотометрии капиллярный электрофорез, как и ВЭЖХ, позволяет одновременно определять все контролируемые компоненты. В то же время преимущества КЭ над хроматографическими методами заключаются в его высокой эффективности, малом расходе реактивов, отсутствии хроматографических колонок.

В качестве анализируемых объектов были выбраны премиксы, витаминные смеси и концентраты, которые характеризуются очень высоким содержанием искусственно внесенных витаминов, что предопределило анализ только свободных форм водорастворимых витаминов в указанных образцах.

На примере данной методики мы предлагаем проследить стратегию выбора оптимальной схемы разделения и определения.

Хорошая растворимость в водных и водно-органических растворах, а также относительно высокие содержания в премиксах и кормовых добавках делают водорастворимые витамины наиболее подходящими объектами для разделения и анализа методом капиллярного электрофореза. На модельной 12-ти компонентной смеси (табл. 11) в варианте капиллярного зонного электрофореза оптимизировали природу и концентрацию ведущего электролита, величину рабочего напряжения, температуру, геометрию капилляра, что позволило в целом решить проблему разделения витаминов. В условиях эксперимента витамин В₁ существует в форме катиона и детектируется перед ЭОП, витамин В₂ никотинамид, являясь нейтральным, мигрирует в зоне нейтральных компонентов вместе с ЭОП. Все другие витамины находятся в форме органических анионов, их зоны следуют за ЭОП согласно электрофоретическим подвижностям. Тем не менее из-за близких электрофоретических подвижностей пары витаминов В₆ пиридоксин/Н и С/В₃ разделить не удалось (рис. 28а). Их разделение оказалось возможным лишь при снижении рН буфера (рис. 28б) или при использовании в составе буфера добавок макроцикла β -ЦД (рис. 28в). В обоих случаях наблюдали увеличение общего времени анализа, а в случае с макроциклом — также инверсию пиков, принадлежащих витаминам Н и В₃, связанную с образованием этими витаминами комплексов включения с β -ЦД по типу «гость»–«хозяин».

Переход от КЗЭ к более селективной и универсальной мицеллярной электрокинетической хроматографии обеспечил полное разрешение как ионных, так и нейтральных компонентов анализируемой смеси при 80 мМ додецилсульфата натрия в составе буфера (рис. 29а). Отметим некоторые возможности системы капиллярного электрофореза «Капель-105», которые позволили повысить эффективность и селективность разделения водорастворимых витаминов (рис. 29б, 29в, табл. 12):

- ▶ высокоточное поддержание температуры охлаждающей капилляр жидкости, широкий температурный диапазон (от +10 до +70 °С),
- ▶ подача контролируемого давления в ходе анализа (до 99 мбар),
- ▶ программное изменение длины волны детектирования в ходе анализа (от 190 до 380 нм, шаг 1 нм).

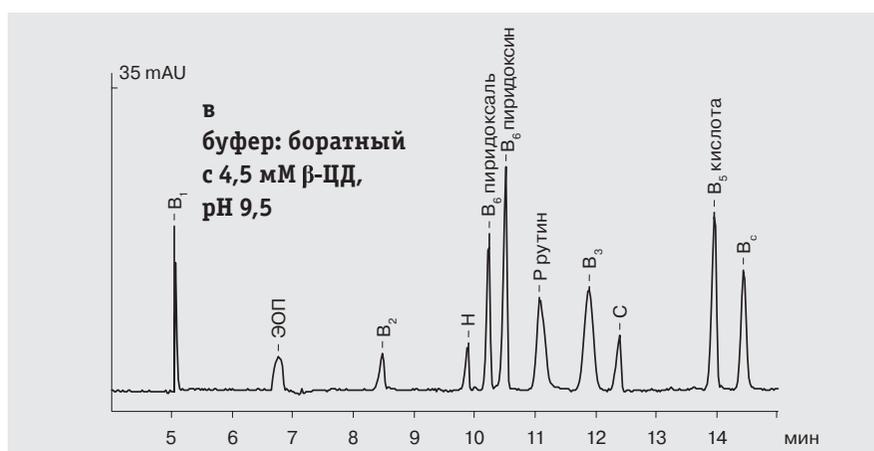
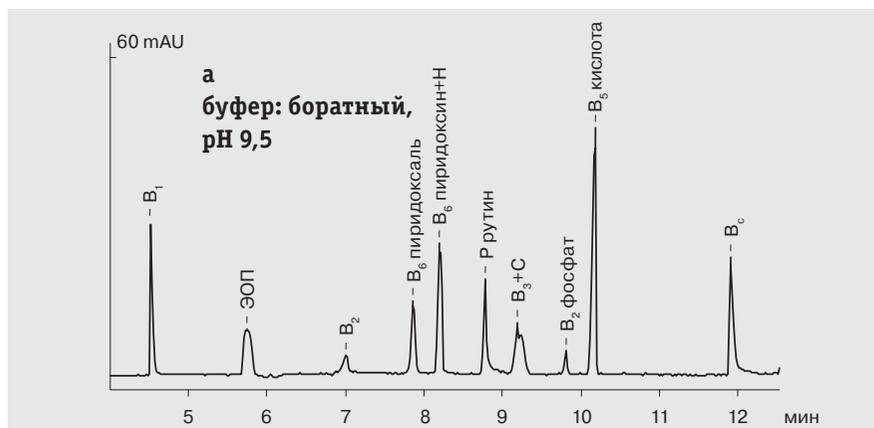


Рис. 28. Разделение водорастворимых витаминов методом КЗЭ.

Капилляр: кварц, 50 мкм, 65/75 см. Напряжение: 25 кВ. Температура: 30 °С. Детектирование: 200 нм.

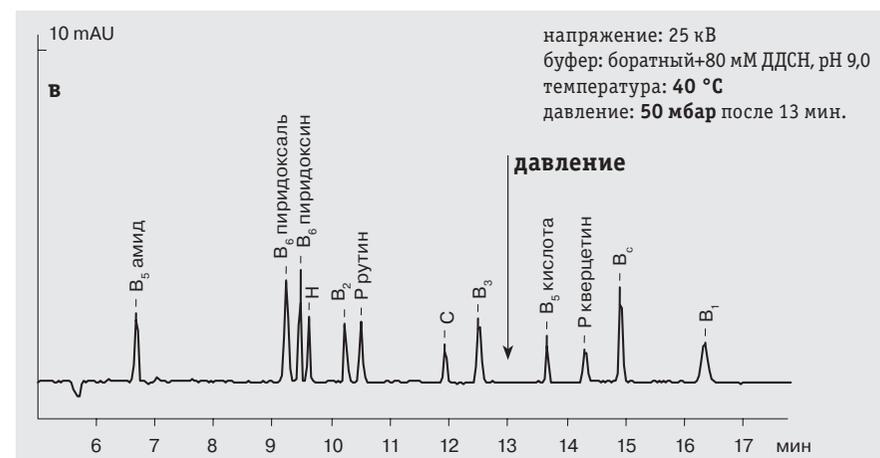
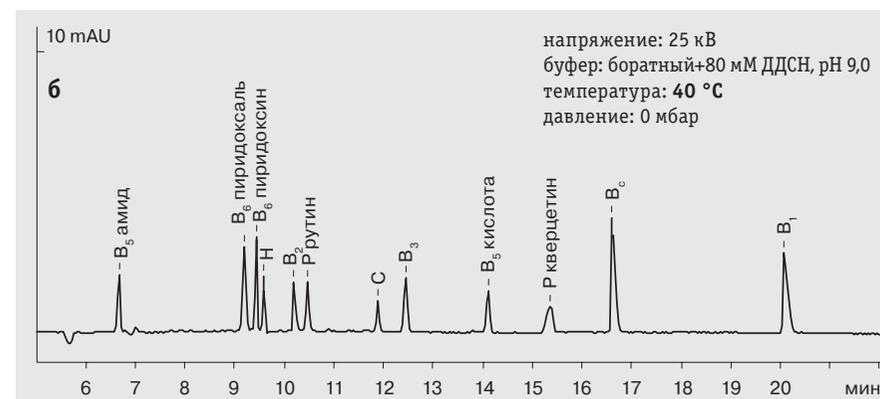
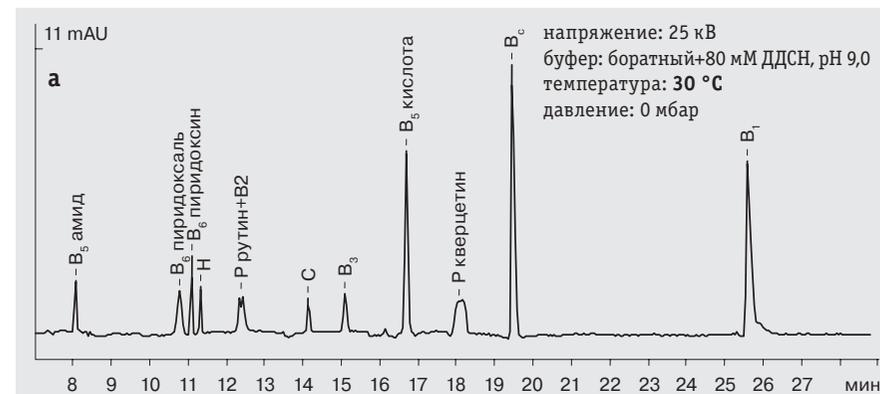


Рис. 29. Разделение водорастворимых витаминов методом МЭКХ.

Капилляр: кварц, 50 мкм, 65/75 см. Ввод пробы: 600 мбар·с. Детектирование: 200 нм.

Табл. 12. Параметры МЭХ-разделения ряда витаминов в присутствии и в отсутствие внешнего давления при анализе.

Витамин	0 мбар			50 мбар		
	Разрешение R (n, n+1)	Эффективность N (т. т.)	A _s (0,1)	Разрешение R (n, n+1)	Эффективность N (т. т.)	A _s (0,1)
B ₅ кислота	6,2	185000	0,88	6,0	506700	0,87
кверцетин	5,9	58700	0,59	4,9	181200	0,93
B _c	21,9	202200	3,2	9,2	305100	1,36
B ₁	—	190100	4,5	—	95200	1,17

Подготовка пробы.

На этапе подготовки пробы (образцы премиксов и витаминных добавок) использовали экстракцию витаминов водным раствором тетрабората натрия в присутствии сульфит-иона. Обнаруженное при 200 нм мешающее влияние матрицы пробы при анализе витамина B_c устранили изменением длины волны детектирования (240 нм) на «проблемном участке» (после 12 минуты и до конца анализа), которое не привело к потере чувствительности определения (рис. 30).

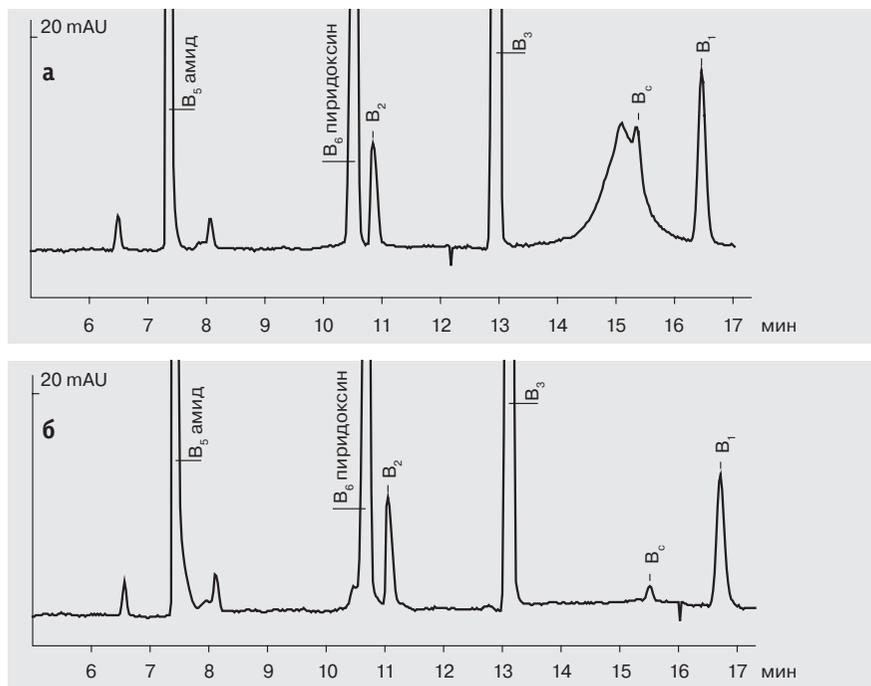


Рис. 30. МЭХ-анализ водорастворимых витаминов в премиксе.

а) Детектирование: 200 нм; б) Детектирование: 200 нм; 240 нм после 12 мин. (программное изменение длины волны в ходе анализа).

Навеска образца 1 г, найдено: B₅ никотинамид (6,5 г/кг), B₆ пиридоксин (7,7 г/кг), B₂ (6,5 г/кг), B₃ (18,3 г/кг), B_c (0,9 г/кг), B₁ (6,8 г/кг). Другие условия аналогичны рис. 29в.

Таким образом, полное разделение 12 различных форм водорастворимых витаминов возможно только при использовании МЭХ. При этом увеличение селективности разделения достигается повышением концентрации ДДСН в буфере (80 мМ), снижение времени анализа обеспечивается, с одной стороны, выбором рабочей температуры (40 °С), а, с другой стороны, использованием в ходе анализа давления 50 мбар. Для устранения мешающего эффекта матрицы при анализе реальных проб предложено программируемое переключение длин волн в ходе анализа.

С 1 июля 2008 года в Российской Федерации действует ГОСТ Р 52741-2007 «Премиксы. Определение содержания витаминов: B₁ (тиаминхлорида), B₂ (рибофлавина), B₃ (пантотеновой кислоты), B₅ (никотиновой кислоты или никотинамида), B₆ (пиридоксина), B_c (фолиевой кислоты), С (аскорбиновой кислоты) методом капиллярного электрофореза». В зависимости от состава анализируемой пробы и требований к точности измерений могут быть использованы КЗЭ и МЭХ. Методика может быть реализована только на системах капиллярного электрофореза «Капель-105, -105М» (рабочие длины волн 200 и 240 нм) со специальной геометрией капилляра, аналогичной аминокислотному (внутренний диаметр 50 мкм, общая/эффективная длина 75/65 см), и специальной версией ПЗУ в приборе «Капель-105», позволяющей прикладывать давление в ходе электрофоретического определения, работать при температурах до 70 °С, изменять в ходе анализа параметры давления, рабочего напряжения, температуры, времени анализа и длины волны без остановки электрофореграммы.

Глава 9. Общие рекомендации по работе с системами капиллярного электрофореза, возможные трудности и пути их преодоления

В этом разделе мы хотели бы изложить наши рекомендации, касающиеся одного из важнейших этапов работы с системами капиллярного электрофореза «Капель» — подготовки капилляра, а также отразить ситуации, возникающие в процессе эксплуатации приборов «Капель» и, в той или иной степени, приводящие к невозможности выполнения анализов, пояснить причины возникновения таких ситуаций и порекомендовать способы решения.

9.1. Подготовка капилляра к работе, проверка его кондиционного состояния, хранение, пути восстановления работоспособности, замена

Подготовка капилляра является важнейшим этапом анализа в капиллярном электрофорезе и должна выполняться с особой тщательностью. Экономия на качестве и количестве промывки может приводить к появлению артефактов и даже полностью загубить проведенный анализ. Необходимо отметить, что не существует жестких правил подготовки капилляра, а есть только общие подходы.

Новый капилляр, а также капилляр, загрязненный в процессе работы или не использованный в работе более 1 месяца, для восстановления кондиционного состояния внутренней поверхности промывают в следующем порядке:

1. раствором 0,5 М соляной кислоты не менее 10 мин. (максимально 30 минут),
2. дистиллированной водой 10 минут,
3. раствором 0,5 М гидроксида натрия не менее 10 минут (максимально 30 минут),
4. дистиллированной водой 10 минут,
5. рабочим буферным раствором 30 минут.

Примечание. Напоминаем, что капилляры, которые ранее в ходе анализа заполнялись буферными растворами, содержащими додецилсульфат натрия (ДДСН), должны быть обязательно отмыты щелочным раствором, не содержащим ДДСН, затем водой, только после этого можно применять рекомендованную выше схему промывки, начиная с кислоты.

Напомним, что первая операция имеет целью удалить с поверхности многозарядные катионы, органические соединения, способные к протонированию, например, амины, аминокислоты, белковые вещества, некоторые поверхностно-активные соединения. Последующая промывка водой удаляет остатки катионных соединений и избыток кислоты. Уменьшать время этих операций не рекомендуется. Затем следует стадия активирования поверхности капилляра раствором щелочи. На этой стадии протекают процессы гидролиза и диссоциации силанольных групп, удаляются анионные примеси. Последующая промывка водой удаляет избыточную концентрацию электролитов и формирует диффузный слой. Окончательная промывка рабочим буферным раствором кондиционирует поверхность капилляра применительно к тем условиям, в которых будет проводиться анализ.

Так как условия анализа отличаются от условий промывки тем, что при анализе на капилляр наложено высокое напряжение, желательно после промывки капилляра буферным раствором записать электрофореграмму этого раствора без ввода пробы и

в тех условиях напряжения и времени анализа, которые рекомендованы методикой выполнения измерений. Такой контроль базовой линии позволяет провести предварительную оценку работоспособности системы. Если сигнал базовой линии сохраняет относительное постоянство после начального участка (около 1 минуты), капилляр можно считать готовым к работе.

Между анализами капилляр промывают в обязательном порядке! Целей такой промывки две: во-первых, удалить из капилляра остатки предыдущей пробы, особенно те компоненты, которые мигрировали навстречу электроосмотическому потоку; во-вторых, восстановить стационарное (равновесное) состояние двойного электрического слоя на границе раздела капилляр–раствор.

Вторая цель достигается различными приемами в зависимости от состава анализируемых проб:

- ▶ если проба не содержит веществ, нарушающих структуру двойного слоя, то во время анализа после выхода всех определяемых компонентов в течение 2–3 минут записывают электрофореграмму базовой линии. После этого капилляр промывают в течение 2 минут рабочим буферным раствором (это время рекомендовано для стандартной геометрии капилляра в кассетах, поставляемых с приборами серии «Капель»: внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см. Для спецкассет, используемых, например, при анализе аминокислот и водорастворимых витаминов, параметры капилляра равны: внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 75 см; поэтому время промывки между анализами должно быть увеличено до 3–4 минут),
- ▶ если же проба содержит вещества, отравляющие поверхность кварца, то процедура промывки должна обеспечивать очистку поверхности. Веществами, которые нарушают структуру двойного слоя, могут быть многовалентные катионы, катионные и нейтральные поверхностно-активные вещества, различные осадки и пленки, образующиеся при взаимодействии компонентов пробы и рабочего буферного раствора, белковые вещества и т. п. В таких случаях состав промывных растворов и порядок их применения подбирают экспериментально, соотносясь с природой мешающих компонентов. Например, применяют следующий порядок промывок: по 2–5 минут водой, 0,5 М раствором гидроксида натрия, водой, рабочим буферным раствором. Если необходимо удалить вещества катионной природы, то после промывки водой капилляр промывают 1 М раствором соляной кислоты, а затем так же, как в предыдущем примере. Время промывки каждым раствором можно варьировать, подбирая оптимальную схему промывки экспериментально. Критерием правильности режима промывки служит воспроизводимость времен миграции/удерживания известных компонентов в контрольных или в стандартных растворах при последовательных вводах.

Порядок хранения капилляра в перерывах между сеансами работы зависит от интенсивности использования прибора.

При ежедневной работе рекомендуется после окончания последнего анализа промыть капилляр дистиллированной водой не менее 10 минут, удалить из прибора все пробирки с растворами, кроме водных, в которые следует погрузить концы капилляра и оставить в таком положении на ночь.

Допускается оставлять капилляр на ночь в растворе ведущего электролита, концы капилляра при этом обязательно опущены в растворы. При таком способе хране-

ния капилляра следует принимать во внимание состав рабочего буфера, поскольку для сложных по составу электролитов (например, с добавками циклодекстринов и органических растворителей) может нарушаться рабочее состояние капилляра: как правило, первая же утренняя промывка водой не сопровождается появлением капли на выходном конце капилляра, что требует либо проведения ряда специальных промывок (в зависимости от состава рабочего буфера, находящегося в капилляре), либо механической продувки капилляра (**приложение В**), либо его замены на новый.

При перерывах в работе на 2–3 дня (до недели) капилляр следует промыть водой и хранить в воде.

При перерывах на срок более одной недели капилляр необходимо после тщательной промывки водой (не менее 30 минут) высушить (продуть воздухом) и оставить в сухом состоянии, обязательно погрузив оба конца капилляра в чистые и сухие пробирки типа Эппендорф. При таком способе хранения для восстановления работоспособности капилляра его следует готовить к работе, как новый капилляр. Случается, что капилляр, длительное время хранившийся в сухом состоянии, не достигает рабочего состояния при выполнении описанных выше процедур. Следует повторить еще раз схему подготовки нового капилляра, увеличив время промывки капилляра щелочью и рабочим буфером. В крайнем случае можно использовать промывку капилляра небольшим количеством (1–2 капли на выходе) концентрированной серной кислоты, затем ополоснуть входной конец капилляра и электрод в пробирке с дистиллированной водой, заменить пробирку с водой на новую и промыть капилляр водой в течение 20–30 минут, после чего приступить к ежедневной схеме кондиционирования капилляра.

Так как в промежутках между сеансами работы (например, между рабочими днями) капилляр хранится чаще всего заполненным водой, то **ежедневно перед началом работы** его кондиционируют короткой (3–5 минут) промывкой 0,5 М раствором гидроксида натрия, водой (5 минут), затем рабочим буферным раствором под напряжением в течение времени, предусмотренного МВИ. После этого необходимо записать электрофореграмму соответствующего контрольного раствора и убедиться в кондиционном состоянии капилляра.

Необходимо напомнить, что при промывке под напряжением, как и при анализе, уменьшается буферная емкость ведущего электролита из-за электрохимических реакций на электродах системы. Это следует учитывать при расчете ресурса буферного раствора.

Иногда эффективной может оказаться и короткая схема ежедневной подготовки капилляра, заключающаяся в том, что капилляр перед первым анализом промывают только рабочим буфером (10–15 минут) и проводят анализ без ввода пробы в течение времени, необходимого для анализа пробы по данной МВИ.

Контроль качества подготовки капилляра к работе проводят с использованием самых разных растворов. Например, в качестве контрольного может выступать раствор компонента, определяемого по МВИ. Или это может быть независимый раствор, как описано в **приложении Б**. В любом случае главным критерием кондиционного состояния капилляра остается воспроизводимость времен миграции вещества и зоны ЭОП для двух-трех последовательных вводов контрольного раствора.

К нарушениям работоспособного состояния капилляра относят:

- ▶ невоспроизводимость времени миграции вещества (метки ЭОП) в связи с недостаточным кондиционированием капилляра и/или химическим загрязнением капилляра,
- ▶ появление у пиков «хвостов», невоспроизводимость ввода пробы,
- ▶ механическое загрязнение капилляра,
- ▶ поломка капилляра.

В этом разделе уже неоднократно обсуждались варианты подготовки капилляра к работе, полные и краткие схемы промывки перед анализом, между анализами. Напомним, что не существует жестких правил, регламентирующих процедуру промывки капилляра. Но, экспериментально подобрав оптимальную схему, важно соблюдать ее изо дня в день в рамках однотипных экспериментов (например, внутри одной методики), потому что именно это — залог высокой воспроизводимости времен миграции. Мы также упоминали, каким образом следует промывать капилляр в случае его химического отравления (загрязнения примесными компонентами пробы).

Если с химическим загрязнением капилляра справиться сравнительно просто, то с механическим — сложнее, а иногда и просто невозможно. В самом простом случае наблюдается закупорка выходного конца капилляра солями, образовавшимися при высыхании раствора электролита при неправильном хранении капилляра между анализами (надолго оставляли концы капилляра (чаще выходной конец после промывки) на воздухе) или в конце рабочего дня (не промыли капилляр водой и не погрузили концы капилляра в воду на ночь). Выход из сложившейся ситуации следующий: для начала следует погрузить концы капилляра в горячую дистиллированную воду на 10–15 минут, затем, заменив воду, промыть капилляр свежей порцией дистиллированной воды комнатной температуры, наблюдая за появлением капли на выходном конце капилляра.

Часто механическое загрязнение капилляра спровоцировано отсутствием стадии фильтрации используемых в работе растворов. В процессе промывки капилляра водой (прибор позволяет проводить промывку при давлении ~1 атм.), капля на выходе капилляра не наблюдается. В этом случае мы рекомендуем воспользоваться ручной промывкой, описанной в **Приложении В**. Там же будет описана схема резки концов капилляра, где мы обратим внимание на обязательное соблюдение угла среза равным 90° — гарантию того, что пики компонентов не приобретут форму с «хвостом» и не снизится воспроизводимость ввода.

Несмотря на то, что при аккуратной работе капилляр служит долго, все же принято считать его расходным материалом. Случается, что капилляры ломаются, особенно открытые их участки на входном и выходном узлах кассеты. Замена капилляра не является сложной задачей, даже в приборах с жидкостным охлаждением, где капилляр дополнительно одет в силиконовую рубашку, внутри которой течет теплоноситель. В связи с большим разнообразием модельного ряда приборов «Капель» изложить инструкции по замене капилляра в данном практическом руководстве не представляется возможным, подробные инструкции приведены в руководствах по эксплуатации конкретных систем капиллярного электрофореза. Хотим отметить, что системы капиллярного электрофореза модельного ряда «М» имеют более совершенную конструкцию кассеты, что позволило существенно упростить и ускорить процедуру замены капилляра.

9.2. Подготовка буферных и анализируемых растворов

В капиллярном электрофорезе фактором, ограничивающим нижнюю границу интервала определяемых концентраций, является чистота анализируемых растворов. Мелкие взвешенные частицы, а также микропузырьки, увеличивают амплитуду шума базовой линии, затрудняя распознавание пиков определяемых компонентов. Взвешенные частицы, оседая в капилляре, могут забивать капилляр. Мельчайшие пузырьки воздуха могут образовываться при перемешивании растворов, особенно в присутствии поверхностно-активных веществ. Кроме того, в процессе электрофореза протекающий через капилляр электрический ток нагревает раствор, что приводит к уменьшению растворимости газов в растворе. Выделяющиеся пузырьки могут прерывать электрическую цепь. По этим причинам основными требованиями при подготовке растворов являются тщательная фильтрация всех используемых в анализе и промывке капилляра растворов и обязательное их дегазирование.

Фильтрацию необходимо проводить так, чтобы в раствор не попадали частицы фильтрующего материала. По этой причине следует отказаться от применения бумажных фильтров. В комплект прибора «Капель» входят специальный держатель и набор полимерных фильтров типа «Владипор» с диаметром пор 0,2 мкм. Растворы следует фильтровать небольшими порциями, достаточными для работы в течение дня, отбрасывая первые капли в слив.

Дегазирование растворов лучше всего проводить вакуумированием, помещая отфильтрованные растворы в вакуум-экзикатор на 10 мин. Вакуумирование можно заменить центрифугированием приготовленных растворов в пробирках типа Эппендорф непосредственно перед анализом. Если не указано иначе центрифугирование проводят при скорости вращения 5–6 тысяч об/мин в течение 2–3 минут.

9.3. Возможные трудности при работе с системами капиллярного электрофореза «Капель» и программами сбора данных, причины и способы устранения

В таблице 13 описаны ситуации, мешающие нормальной работе системы капиллярного электрофореза «Капель», приведены причины их возникновения и предложены способы восстановления рабочего состояния.

Таблица 13. неполадки в работе, причины их вызывающие и способы устранения.

прибор не включается, индикатор «сеть» не светится	
Причина	Способ устранения
на прибор не поступает напряжение питания	проверьте, хорошо ли подсоединен шнур питания к прибору проверьте наличие напряжения в розетке замените шнур питания

капилляр не промывается (не появляется капля на выходе капилляра при промывке)	
Причина	Способ устранения
в капилляре и в пробирке на входе капилляра находится воздух	поставьте на вход капилляра пробирку с дистиллированной водой и заполните жидкостью капилляр
плохое уплотнение стаканчика на входе капилляра или кассеты с капилляром во входном узле; при этом показания давления либо всегда близки к нулю, либо быстро уменьшаются	опустите и поднимите снова стаканчик с пробиркой на входе капилляра; на ручке подъемного механизма должно чувствоваться небольшое усилие; проверьте, правильно ли отрезана крышка пробирки; подведите под вход капилляра другой стаканчик, попробуйте с ним промыть капилляр подтяните левый винт крепления кассеты
засорился капилляр	откройте крышку кассетного отделения, отверните два винта крепления кассеты, аккуратно выньте кассету с капилляром; один из концов капилляра при помощи полиэтиленового капилляра соедините с иглой шприца заполненного дистиллированной водой; попробуйте промыть капилляр если капилляр не промывается при помощи шприца, опустите оба конца капилляра в емкость с горячей водой не менее чем на 15 мин.; снова попробуйте промыть капилляр при помощи шприца если капилляр не промывается, его следует заменить
нет пиков на электрофореграмме	
Причина	Способ устранения
засорился капилляр (нет капли на выходном конце капилляра в режиме «Промывка»)	промойте капилляр, в крайнем случае, замените его
мал объем пробы, конец капилляра не достает до пробы в пробирке и она не вводится в капилляр	увеличьте объем пробы в пробирке Эппендорф
не соблюдены условия анализа по МВИ	проверьте условия анализа (качественный и количественный состав буфера, напряжение (ток), параметры ввода пробы, геометрию капилляра, температуру, длину волны)
вещество пробы не поглощает или слишком слабо поглощает ультрафиолетовое излучение на длине волны детектирования	измените методику измерений
большой дрейф и шум базовой линии	
Причина	Способ устранения
грязный буфер	замените буфер, профильтруйте его через мембранный фильтр и отцентрифугируйте
грязный капилляр	промойте капилляр 0,5 М раствором NaOH, дистиллированной водой, буфером

слишком большое напряжение, буфер в капилляре сильно нагревается с выделением мелких пузырьков растворенного в нем газа	уменьшите напряжение или измените концентрацию буфера
прибор не успел прогреться	подождите 30 мин.
не горит лампа (при этом сигналы по опорному и фото каналам порядка 0,000... В)	выключите и снова включите прибор. Если за 10 мин. лампа не зажглась, ее следует заменить
не включается высокое напряжение	
Причина	Способ устранения
неправильное положение входной или выходной пробирок	поднимите обе пробирки в рабочее положение
не до конца вставлен сменный блок высокого напряжения	вставьте сменный блок высокого напряжения до упора, плотнее завинтите фиксирующие винты
высокое напряжение подано и индицируется на дисплее прибора или на мониторе ПК, но ток равен нулю	
Причина	Способ устранения
пузырек воздуха в капилляре (недостаточно дегазирован буфер, в ходе анализа использованы слишком высокие значения напряжения и температуры при высокой концентрации буфера)	дегазируйте буфер; установите условия анализа согласно МВИ или снизьте концентрацию, температуру и напряжение в ходе анализа обязательно удалите из капилляра буфер с пузырьками воздуха, промыв капилляр новой порцией подготовленного буфера
колебания температуры системы охлаждения в пределах нескольких градусов	
Причина	Способ устранения
нет (или мало) воды в системе охлаждения	выключите прибор, долейте воду и снова запустите систему охлаждения
при внимании кассеты из кассетного отсека из нее вытекает жидкость	
Причина	Способ устранения
не снята лавсановая трубка с заглушки в верхней части кассеты	перед вниманием кассеты обязательно снимите трубку с заглушки и дайте стечь теплоносителю
при запуске анализа ПО не переходит в режим «Ожидание», а выдает окно «О программе „МультиХром для Windows“»	
Причина	Способ устранения
отсутствие или неисправность электронного ключа HASP	вставьте ключ в LPT- или USB-порт системного блока компьютера
в данный момент производилась печать на принтер, подключенный через электронный ключ HASP	не производите печать на принтер, подключенный через электронный ключ HASP, когда идет анализ

после запуска анализа на приборе ПО «МультиХром» остается в режиме «Ожидание» и не переходит в режим «Измерение»	
Причина	Способ устранения
нет связи прибор–компьютер	проверьте соединение между разъемом RS-232 прибора и COM-портом компьютера; проверьте исправность соединительного кабеля, разъема RS-232 и COM-порта
неправильно настроен протокол обмена прибора или интерфейс COM-порта, к которому подключено и настроено ПО «МультиХром» (при этом в строке состояния появляется «Ошибка синхронизации»)	проверьте протокол обмена прибора (должен стоять «1-МультиХром») и интерфейс COM-порта, на который настроено ПО «МультиХром» (должен стоять «Cape!»)
неправильно настроен сбор данных метода	для метода, в котором записываются электрофореграммы, выставьте правильный COM-порт
при построении градуировочной зависимости на электрофореграмме показаны концентрации, не соответствующие указанным в таблице концентраций	
Причина	Способ устранения
в «Отчете» указан метод расчета отличный от «Заказного» (одной из причин этого может быть удаление всех строк «Таблицы компонентов»)	в меню «Опции отчета» установите «Метод расчета — Заказной»

Приложение А

Хорошая лабораторная практика при использовании систем капиллярного электрофореза

- ▶ Берегите от пыли электроды и оптику.
- ▶ Храните электроды и капилляры в воде между рабочими днями и в выходные (в буферах — в зависимости от их состава).
- ▶ Используйте один капилляр на одну методику для повышения воспроизводимости результатов измерений.
- ▶ Подберите оптимальный режим кондиционирования и промывки капилляра до, между и по окончании анализа.
- ▶ Для ускорения процесса кондиционирования капилляра используйте промывку буфером под напряжением, однако **никогда** не делайте это с растворами сильных электролитов!
- ▶ Во избежание загрязнения после ввода пробы конец капилляра, соприкасающийся с пробой, следует окунуть в промежуточный раствор с буфером, а уже затем в буфер для анализа. Составы обоих буферов одинаковы!
- ▶ Фильтруйте и дегазируйте растворы буфера и пробы перед анализом.
- ▶ По окончании работы освободите прибор от всех пробирок, кроме водных, в которые погружены концы капилляра.
- ▶ Консервируйте систему КЭ при длительных перерывах в работе (>3 недель).
- ▶ Используйте пробирки и наконечники однократно. В крайнем случае, отделяйте и тщательно мойте то, что соприкасалось с концентрированными или загрязненными образцами.
- ▶ Время от времени контролируйте важные параметры анализа:
 - величину тока, особенно при смене партии буфера,
 - давление (герметичность системы ввода),
 - параметры детектора,
 - уровень жидкости в системе охлаждения капилляра (стабильность температуры).

Приложение Б

Тестирование систем капиллярного электрофореза «Капель»: проверка работоспособности прибора, контроль качества подготовки капилляра

Тестирование систем КЭ «Капель» проводится в целях оперативной проверки работоспособности систем, а также для контроля качества подготовки капилляра к работе.

В *состав тест-раствора* входят три определяемых компонента, порядок миграции которых соответствует порядку перечисления: метка ЭОП — бензиловый спирт, *N*-фенилантраниловая кислота (*N*-ФАК) в виде натриевой или литиевой соли, бензойная кислота также в виде соли. Электропроводность и pH раствора определяются наличием буры в концентрации 0,001 М.

Б1. Приготовление запасных и рабочих растворов

Запасный раствор бензинового спирта концентрации 0,4 % (об.).

В мерной колбе вместимостью 100 мл смешивают 400 мкл перегнанного бензинового спирта с 10 мл ацетонитрила. В отдельном сосуде смешивают 30 мл ацетонитрила и 60 мл воды. Полученным раствором заполняют мерную колбу до метки, и тщательно перемешивают.

Запасный раствор *N*-фенилантраниловой кислоты массовой концентрации 1 мг/мл.

В мерную колбу вместимостью 100 мл последовательно помещают 100 мг *N*-фенилантраниловой кислоты (ч. д. а.) и 50 мг безводного карбоната натрия. Растворяют кислоту, добавляя небольшими порциями горячую дистиллированную воду до полного растворения. Раствор охлаждают, разбавляют водой до метки и перемешивают.

Запасный раствор бензойной кислоты массовой концентрации 1 мг/мл.

В мерную колбу вместимостью 100 мл последовательно помещают 100 мг бензойной кислоты (ч. или ч. д. а.) и 50 мг безводного карбоната натрия. Растворяют кислоту, добавляя небольшими порциями горячую дистиллированную воду до полного растворения. Раствор охлаждают, разбавляют водой до метки и перемешивают.

Запасный раствор буры молярной концентрации 0,05 М.

Раствор готовят из стандарт-титра, предназначенного для кислотно-основных титрований, согласно инструкции. При отсутствии стандарт-титра раствор можно приготовить из х. ч. препарата десятиводного кристаллогидрата натрия тетраборнокислого, растворив в мерной колбе вместимостью 1 л навеску массой 19,071 г. в свежeproкипяченной и охлажденной без доступа воздуха дистиллированной воде.

Примечание. Запасные растворы хранят в полиэтиленовой таре, защищая от воздействия углекислого газа. Срок хранения раствора буры — 2 месяца, всех остальных растворов — не ограничен.

Рабочий раствор буры молярной концентрации 0,01 М

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мл запасного раствора буры, разбавляют до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. *Этот же раствор можно приготовить непосредственно из рН-стандарта буры (рН 9,18 при 25 °С).*

Тест-раствор

В мерную колбу вместимостью 100 мл последовательно помещают по 10 мл запасных растворов бензилового спирта и бензойной кислоты, 10 мл рабочего раствора буры и 5 мл запасного раствора *N*-фенилантраниловой кислоты. Смесь разбавляют до метки водой и перемешивают.

Б2. Условия тестирования

Для определения работоспособности системы капиллярного электрофореза «Капель» или правильности подготовки капилляра к работе проводят анализ тест-раствора в следующих условиях:

- ▶ система КЭ «Капель» с положительной полярностью высокого напряжения;
- ▶ капилляр: кварцевый, внутренний диаметр 75 (50) мкм, эффективная/общая длина 50/60 (65/75) см;
- ▶ ведущий электролит — 0,01 М раствор буры, рН 9,18;
- ▶ ввод пробы — гидродинамический, 30 мбар×5 сек;
- ▶ длина волны — 254 нм — для всех модификаций (для прибора «Капель 105 (М)» на выбор — 220 или 254 нм);
- ▶ температура — комнатная (для приборов, имеющих жидкостную систему охлаждения капилляра, +20 °С);
- ▶ анализ — напряжение +20 кВ, время анализа 10–15 минут.

На электрофореграмме (рис. Б1) должны регистрироваться три пика:

Пик 1 — сравнительно широкий, гауссовой формы пик метки ЭОП, время выхода ~4,5 мин.;

Пики 2 и 3 — пики фенилантранилат- и бензоат-анионов с временами выхода ~7 и ~8,5 минут соответственно.

Примечание. Приведенные времена миграции пиков относятся к стандартному капилляру, используемому в системах «Капель» (внутр. диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, полная длина 60 см). Для кассеты, предназначенной для аминокислотного анализа, в которой применяется капилляр внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 75 см, вид электрофореграммы и времена миграции показаны на рис. Б2.

Время миграции зоны ЭОП служит чувствительным индикатором кондиционного состояния капилляра. При загрязнении внутренней поверхности, особенно катионными и неионогенными поверхностно-активными веществами, время миграции зоны ЭОП увеличивается. Так как направление миграции анионов противоположно направлению ЭОП, то увеличение времени миграции зоны ЭОП приводит к непропорционально большому увеличению времени миграции анионов, что и является указанием на плохую подготовку капилляра.

При необходимости из электрофореграммы можно получить дополнительную информацию о качестве разделения и определения. Так, коэффициент разделения фенилантраниловой и бензойной кислот является мерой разделяющей способности капилляра. Анализ порций тест-раствора, разбавленных 0,001 М раствором буры в 10, 20 и 50 раз позволяет ориентировочно оценить уровень шумов и предел обнаружения бензойной кислоты, а также параметры сходимости измерений, т. е. оценить общее состояние прибора.

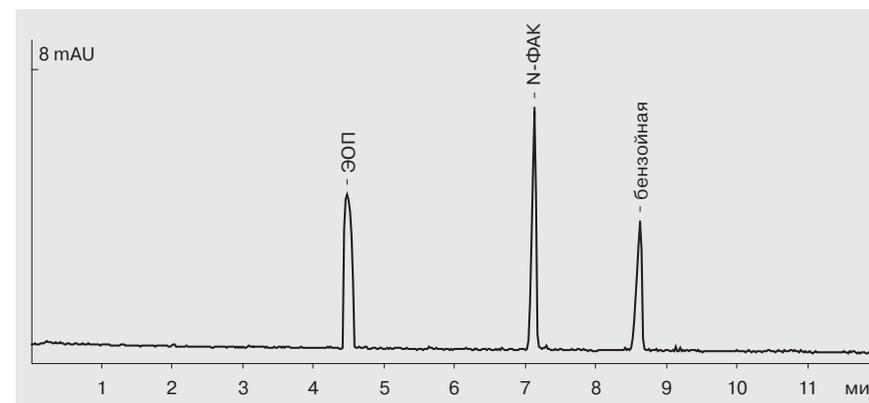


Рис. Б1. Электрофореграмма тест-раствора для стандартного капилляра.

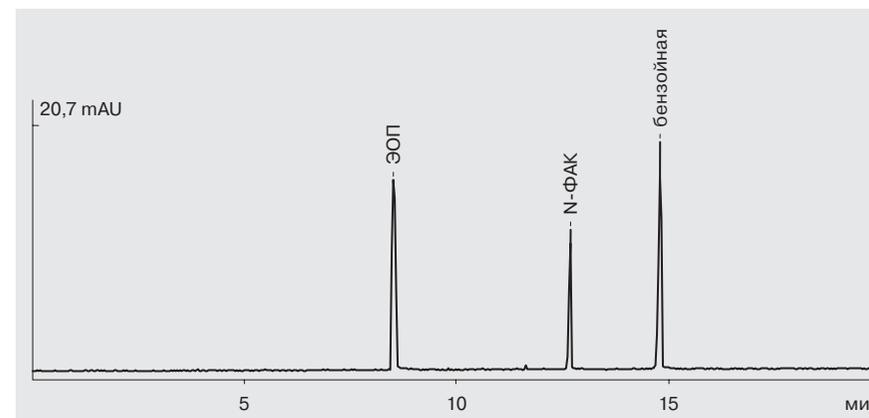


Рис. Б2. Электрофореграмма тест-раствора для капилляра со спецгеометрией.

Примечание. Иногда требуется достаточно быстро проверить работоспособность системы капиллярного электрофореза, например, проверить наличие отклика прибора на раствор определяемого компонента при данной длине волны. Для этих целей удобно воспользоваться режимом «Промывка». Сначала капилляр промывают рабо-

чим буфером или дистиллированной водой (здесь и далее — без напряжения). Затем на входном конце капилляра устанавливают пробирку с раствором анализируемого вещества и, включив регистрацию сигнала с помощью ПО «МультиХром» или аналогичного программного продукта, начинают промывать капилляр этим раствором не менее 60 сек.

Если при выбранной длине волны раствор анализируемого вещества имеют достаточную оптическую плотность, сигнал будет записан в виде ступени. В первые 15–17 сек. (для стандартной геометрии капилляра: внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см) фотометр регистрирует прохождение через окно детектора прозрачного растворителя — буфера или воды, которыми предварительно был заполнен капилляр. Затем в зону детектирования начинает поступать сильно поглощающий раствор. Оптическая плотность возрастает и к 22–25 секунде достигает предельного постоянного значения.

При невозможности сбора данных на компьютер сигналы регистрируют визуально с дисплея «Капли»: уровень нулевого сигнала (A_0) считывают до начала подъёма ступени, а предельное значение ($A_{пр}$) — после, записывая стабилизированное показание. Разность ($A_{пр} - A_0$) есть высота ступени, т. е. оптическая плотность тестового раствора, или фактическая мера чувствительности фотометра.

Наличие ступени однозначно говорит о том, что прибор «видит» анализируемое вещество, т. е. данный компонент можно зарегистрировать при выбранной длине волны, подобрав и при необходимости оптимизировав условия разделения и детектирования.

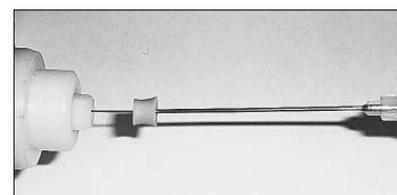
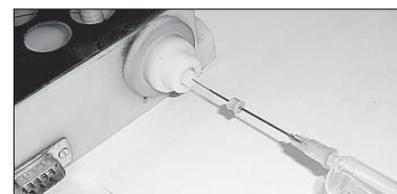
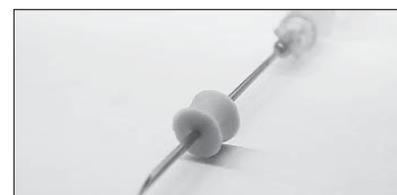
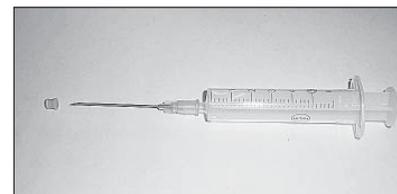
Приложение В

Ручная промывка капилляра с помощью медицинского шприца

Изложенная в этом приложении схема промывки капилляра может помочь в случае, когда капилляр засорился по вине плохо очищенного буфера или пробы. Кассету с капилляром предварительно необходимо вынуть из прибора. Обратите внимание, что в приборах с жидкостным охлаждением капилляре следует предварительно слить воду из системы охлаждения.

Нам понадобятся следующие материалы:

- ▶ одноразовый медицинский пластиковый инсулиновый шприц вместимостью 1 мл с иглой (можно использовать шприцы большего объема, например 2 и 5 мл),
- ▶ кусочек эластичной резины или силикона (обычно можно найти в комплекте ЗИП к прибору «Капель»),
- ▶ дистиллированная вода (лучше подогретая до 50–60 °С).



Сначала набираем в шприц дистиллированную воду и надеваем на иглу силиконовую прокладку.

После этого аккуратно вставляем выходной конец капилляра в иглу шприца на глубину 20–30 мм.

Далее сдвигаем силиконовую прокладку так, чтобы она герметизировала соединение капилляра и иглы шприца.

После этого следует достаточно сильно надавить на поршень пластикового шприца до появления капли на входном конце капилляра. При этом на соединительном участке возможно образование капли и даже брызг, поэтому работать с кассетой лучше на отдельном пустом столе, покрытом листом фильтровальной бумаги, вдали от прибора.

Наш опыт показывает, что чаще всего такого рода загрязнение возникает на входном участке капилляра, поэтому промывка проводится со стороны выхода. Тем не менее, допускается дополнительная промывка и в обратном направлении.

Если вышеописанная процедура не помогает, капилляр можно обрезать. Для этого необходимо при помощи скальпеля, керамического резачка для вскрытия ампул или хозяйственного ножа с острым лезвием нанести однократный надрез на полимерное покрытие капилляра со стороны входа (1–2 мм от конца капилляра), поместить в место надреза каплю дистиллированной воды, после чего при помощи пинцета осторожно отломить надрезанный кончик и проверить капилляр, промыв водой из шприца, наблюдая за появлением капли.

Важно!

- ▶ Следите за тем, чтобы надрезанный конец капилляра имел срез строго под углом 90°. В противном случае, пики компонентов могут приобрести форму с «хвостами», а также может снизиться воспроизводимость ввода.
- ▶ Помните, что Вы надрезаете участок капилляра, участвующий в разделении до зоны детектирования. В случае уменьшения эффективной длины капилляра на 2–3 мм, никаких заметных изменений в параметрах миграции, величине тока и т. д. наблюдаться не будет. Если же Вам придется значительно (более 1 см) укоротить капилляр с входного участка, то мы рекомендуем в случае качественной и количественной обработки результатов заложить обновленные данные (время миграции и площадь пика) в градуировочные таблицы.

Если после среза входного конца капилляра и промывки водой из шприца на выходном участке не появилась капля, то следует отрезать 1 мм выходной части капилляра, после чего во время промывки водой ожидать каплю на входе в капилляр.



Начинайте на
КАПЕЛИ®-103P/103PT



Совершенствуйтесь с
КАПЕЛЮ®-104T



Исследуйте новое на
КАПЕЛИ®-105/105M

Авторы: Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев

**Практическое руководство по использованию систем капиллярного
электрофореза «КАПЕЛЬ»**

В авторской редакции

Над книгой работали: В. М. Дружихина, Е. В. Родионенко, Е. К. Невоя

Сдано в набор 02.07.2008 г. Подписано в печать 07.07.2008 г.
Бумага мелованная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 15,5. Тираж 2000 экз. (доп. тираж); . Заказ № 8116.

ООО «Веда», Санкт-Петербург, ул. Итальянская, д. 29, оф. 5

Отпечатано в типографии ООО «Группа М»,
Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 4а



5- 903297- 01- 3