202010037-2026

2.1.2.37. КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦ ♦».

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Капиллярный электрофорез представляет собой физический метод анализа, основанный на миграции заряженных частиц определяемого вещества в растворе электролита внутри капилляра под воздействием постоянного электрического поля.

Скорость миграции частиц определяемого вещества под влиянием электрического поля с напряженностью E определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотической подвижностью буферного раствора внутри капилляра. Электрофоретическая подвижность частицы растворенного вещества (μ_{ep}) зависит от ее свойств (электрический заряд, размер и форма) и от свойств буферного раствора, в котором происходит процесс миграции (тип и ионная сила электролита, значение pH, вязкость и наличие добавок). Электрофоретическая скорость (v_{ep}) частицы растворенного вещества, принимаемых как сферические, описывается уравнением:

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

где: q – эффективный заряд частицы растворенного вещества;
r – радиус Стокса частицы растворенного вещества;
η – вязкость раствора электролита;
V – приложенное напряжение;
L – общая длина капилляра.

При помещении капилляра, заполненного буферным раствором, в электрическое поле внутри капилляра начинается миграция раствора, называемая электроосмотическим потоком. Скорость электроосмотического потока зависит от электроосмотической подвижности (μ_{eo}), которая, в свою очередь, зависит от плотности заряда на внутренней стенке капилляра и свойств буферного раствора. Электроосмотическая скорость (v_{eo}) описывается уравнением:

$$v_{\mathrm{eo}} = \mu_{\mathrm{eo}} \times E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \times \frac{V}{L}$$

где: ε – диэлектрическая проницаемость буферного раствора;
ζ – дзета-потенциал поверхности капилляра.

Скорость частицы растворенного вещества (ν) определяется уравнением:

$$v = v_{\mathrm{ep}} + v_{\mathrm{eo}}$$

В зависимости от заряда частиц определяемого вещества, его электрофоретическая подвижность и электроосмотическая подвижность могут иметь одинаковое или противоположное направление. В условиях нормального капиллярного электрофореза анионы мигрируют в направлении, противоположном направлению электроосмотического потока, а их скорости меньше электроосмотической скорости. Катионы мигрируют в направлении, совпадающем с направлением электроосмотического потока, а их скорости превышают электроосмотическую скорость. В условиях, когда электроосмотическая

скорость превышает электрофоретическую, катионы и анионы могут быть разделены в течение одного пробега.

Время (t), необходимое частице растворенного вещества для миграции на расстояние (I) от конца капилляра, в который осуществляется введение, до точки детекции (эффективная длина капилляра), определяется уравнением:

$$t = \frac{I}{\nu_{\text{ep}} + \nu_{\text{eo}}} = \frac{I \times L}{\left(\mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}}\right) \times V}$$

Как правило, при значении pH более 3 капилляры с немодифицированной поверхностью, изготовленные из плавленого кварца, имеют отрицательный заряд, обусловленный ионизацией силанольных групп, расположенных на внутренней стенке капилляра. Соответственно, электроосмотический поток направлен от анода к катоду. Для достижения надлежащей воспроизводимости скорости миграции частиц растворенного вещества электроосмотический поток должен оставаться постоянным при каждом пробеге. В некоторых случаях требуется уменьшить или устранить электроосмотический поток путем модификации внутренней стенки капилляра или изменения концентрации, состава и (или) pH буферного раствора.

После введения образца в капилляр каждый ион определяемого вещества, входящего в состав образца, мигрирует в среде фонового электролита согласно своей электрофоретической подвижности как независимая зона. Дисперсия зон, представляющая собой размывание зоны каждого вещества, является следствием различных явлений. В идеальных условиях вклад в уширение зоны вещества вносит только молекулярная диффузия вещества вдоль капилляра (продольная диффузия). В этом случае эффективность разделения, выражаемая числом теоретических тарелок (N), определяется уравнением:

$$N = \frac{\left(\mu_{ep} + \mu_{eo}\right) \times V \times I}{2 \times D \times L}$$

где: D – коэффициент молекулярной диффузии частицы растворенного вещества в буферном растворе.

На практике значительный вклад в дисперсию зон также вносят и другие явления, такие как процессы тепловыделения, адсорбции образца на стенках капилляра, а также различие в проводимости образца и буферного раствора, длина столба введенной пробы, размер ячейки детектора и расположение емкостей с буферными растворами на разных уровнях.

Разделение двух зон (выражаемое с помощью разрешения, R_S) может быть достигнуто при изменении электрофоретической подвижности частиц определяемых веществ и электроосмотической подвижности, а также при увеличении эффективности разделения зон каждого определяемого вещества, согласно уравнению:

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

где: μ_{epa} и μ_{epb} – электрофоретические подвижности двух определяемых веществ при разделении;

$\bar{\mu}_{ep}$ – средняя электрофоретическая подвижность двух определяемых веществ $\mu_{ep} = \frac{1}{2}\left(\mu_{epb} + \mu_{epa}\right)$.

ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование для капиллярного электрофореза включает в себя:

– регулируемый высоковольтный источник постоянного тока;

– две емкости с буферными растворами, расположенные на одном и том же уровне и содержащие указанные анодный и катодный растворы;

– два электрода (катода и анода), погруженные в емкости с буферными растворами и подключенные к источнику питания;

– капилляр (обычно изготовленный из плавленого кварца) для разделения, который, при использовании некоторых типов детекторов, имеет оптическое окно, расположенное на уровне детектора; концы капилляра помещены в емкости с буферными растворами; капилляр заполняют раствором, указанным в частной фармакопейной статье;

– подходящая система ввода пробы;

– детектор, способный определять в режиме реального времени количество интересующих веществ, проходящих через сегмент капилляра для разделения; детектирование обычно основано на абсорбционной спектрофотометрии (в ультрафиолетовой и видимой областях) или флуориметрии, в ряде случаев может быть целесообразно также кондуктометрическое, амперометрическое или масс-спектрометрическое детектирование; альтернативным способом детектирования соединений, которые не поглощают УФ-излучение и не флуоресцируют, является непрямое детектирование;

– для получения воспроизводимых результатов разделения рекомендуется использовать термостат, способный поддерживать постоянную температуру внутри капилляра;

– записывающее устройство и походящий интегратор или компьютер.

Для прецизионного количественного анализа критическими факторами являются установление способа ввода пробы и его автоматизация. Ввод пробы может быть основан на использовании силы тяжести, давления или вакуума и электрокинетических сил. Количество каждого компонента образца, введенного электрокинетическим способом, зависит от его электрофоретической подвижности, что приводит к возможным неравным условиям для разных веществ при использовании данного режима ввода пробы.

Используют капилляр, буферные растворы, предварительную подготовку, раствор образца и условия миграции, указанные в соответствующей частной фармакопейной статье. Применяемый раствор электролита фильтруют для удаления твердых частиц и дегазируют для предотвращения образования пузырьков, мешающих работе детектора и созданию электрического контакта в капилляре во время процесса электрофоретического разделения. Для обеспечения воспроизводимых значений времени миграции растворенных веществ для каждой аналитической методики должна быть разработана методика тщательной промывки.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном зонном электрофорезе определяемые вещества разделяются в капилляре, содержащем только буферный раствор без использования какой-либо антиконвекционной среды. В данном методе разделение обусловлено миграцией различных компонентов образца с различной скоростью в виде отдельных зон. Скорость миграции каждой зоны зависит от электрофоретической подвижности частиц растворенного вещества и электроосмотического потока в капилляре (см. раздел *Общие принципы* данной общей фармакопейной статьи). Для улучшения разделения веществ, адсорбирующихся на кварцевой поверхности, могут быть использованы капилляры с модифицированной поверхностью.

При использовании данного вида капиллярного электрофореза возможно проведение анализа как малых (M_r < 2000), так и больших молекул (2000 < M_r < 100 000). Благодаря высокой эффективности, достигаемой в капиллярном зонном электрофорезе, может быть

проведено разделение молекул, имеющих очень незначительные различия в величинах отношений заряда к массе. При добавлении к разделяющему буферному раствору хиральных селекторов можно также разделять хиральные соединения.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Оптимизация разделения является комплексным процессом, в котором важную роль могут играть несколько параметров разделения. Основными факторами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения, являются инструментальные параметры, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. Для оптимизации приложенного напряжения и температуры капилляра информативным является график Джоулева нагрева. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, повышение температуры и, как результат, образование градиентов вязкости в буферном растворе, находящемся в капилляре. Данный эффект приводит к уширению зоны и уменьшает разрешение.

Полярность. Полярность электродов может быть нормальной (анод на входе и катод на выходе), электроосмотический поток при этом мигрирует по направлению к катоду. В случае обращенной полярности электродов электроосмотический поток направлен от выхода из капилляра, и только заряженные определяемые вещества с электрофоретическими подвижностями, превышающими величину электроосмотического потока, попадают к выходу.

Температура. Температура главным образом влияет на вязкость и электрическую проводимость буферного раствора и, как следствие, на скорость миграции. В некоторых случаях увеличение температуры капилляра может вызвать конформационные изменения молекул белков, что изменяет их времена миграции и эффективность разделения.

Капилляр. Размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на время анализа, эффективность разделения и допустимую нагрузку. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), что приводит к увеличению времени миграции. Для определенного буферного раствора и электрического поля тепловыделение и, следовательно, уширение зон веществ зависит от величины внутреннего диаметра капилляра. Кроме этого, величина внутреннего диаметра капилляра влияет на предел обнаружения, зависящий от объема введенной пробы и используемого детектора.

Поскольку адсорбция компонентов образца на стенке капилляра ограничивает эффективность, при разработке методики разделения следует предусмотреть способы предотвращения таких взаимодействий. Так для предотвращения адсорбции белков было разработано несколько способов. Некоторые из таких способов (использование экстремальных значений pH и адсорбция положительно заряженных добавок в буферный раствор) для предотвращения адсорбции белков требуют лишь изменения состава буферного раствора. В других способах внутренняя стенка капилляра покрывается полимером, ковалентно связанным с поверхностью, что предотвращает взаимодействие между белками и отрицательно заряженной поверхностью кварца. Для этих целей выпускаются готовые к использованию капилляры с покрытиями, состоящими из нейтральных гидрофильных катионных или анионных полимеров.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация буферного раствора. Буферные растворы, подходящие для капиллярного электрофореза, имеют соответствующую буферную емкость в выбранном диапазоне pH и низкую подвижность для минимизации образования тока.

Подбор во всех возможных случаях буферного раствора с подвижностью ионов, соответствующей подвижности частицы растворенного вещества, важен для минимизации искажения зоны. Также важен тип растворителя, использованного для растворения образца,

для фокусирования образца в колонке, что увеличивает эффективность разделения и улучшает детектирование.

Увеличение концентрации буферного раствора (при одном и том же значении pH) уменьшает электроосмотический поток и скорость миграции растворенного вещества.

Значение pH буферного раствора. Значение pH буферного раствора может влиять на разделение вследствие модификации заряда определяемого вещества или добавок, а также изменения электроосмотического потока. При разделении белков и пептидов изменение pH буферного раствора со значения, превышающего изоэлектрическую точку (pI), до значения, которое меньше ее, изменяет суммарный заряд растворенного вещества с отрицательного на положительный. Увеличение pH буферного раствора обычно увеличивает электроосмотический поток.

Органические растворители. К водным буферным растворам для увеличения растворимости веществ в растворе или других добавок, и (или) воздействия на степень ионизации компонентов образца могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, ацетонитрил и др.). Добавление этих органических модификаторов к буферному раствору обычно вызывает уменьшение электроосмотического потока.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения энантиомеров к разделяющему буферному раствору добавляют хиральный селектор. Наиболее часто используемыми хиральными селекторами являются циклодекстрины, но также могут быть использованы краун-эфиры, полисахариды и белки. Поскольку хиральное распознавание определяется различными взаимодействиями между хиральным селектором и каждым из энантиомеров, разрешение, достигаемое для хиральных соединений, зависит, главным образом, от типа использованного хирального селектора. В связи с этим при разработке данных методик разделения целесообразно проверить возможность использования циклодекстринов с различным размером полостей (α-, β- или γ-циклодекстрин) или модифицированных циклодекстринов с нейтральными (метил-, этил-, гидроксиалкил- и другими) или ионизируемыми (аминометил-, карбоксиметил-, сульфобутилэфирными и другими) группами. При использовании модифицированных циклодекстринов необходимо принимать во внимание различия между разными партиями в степени замещения циклодекстринов, поскольку это может оказывать влияние на селективность. Другими факторами, влияющими на разрешение при хиральных разделениях, являются концентрация хирального селектора, состав и значение pH буферного раствора, а также температура. Использование органических добавок, таких как метанол или мочевина, также может влиять на достигаемое разрешение.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном гель-электрофорезе разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, действующим как молекулярное сито. Поскольку молекулы меньшего размера легче проникают в структуру геля и мигрируют быстрее, чем большие, разделение молекул с близкими величинами отношения заряда к массе происходит в соответствии с их размерами. Таким образом, методом капиллярного гель-электрофореза по величинам молекулярных масс могут быть разделены различные биологические макромолекулы (например, белки и фрагменты ДНК), часто имеющие близкие величины отношения заряда к массе.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕЛЕЙ

В капиллярном гель-электрофорезе используют гели двух типов: химически модифицированные и динамически модифицированные. Химически модифицированные гели, например, поперечно-сшитый полиакриламид, получают полимеризацией мономеров внутри капилляра. Они обычно химически связаны с поверхностью плавленого кварца и не могут быть удалены без разрушения капилляра. Если гели используются для анализа белков

в восстанавливающих условиях, разделяющий буферный раствор обычно содержит натрия додецилсульфат, а пробы перед вводом денатурируют нагреванием в смеси натрия додецилсульфата и 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола. При использовании невосстанавливающих условий (например, анализ интактного антитела) 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол не применяют. Разделение в поперечно-сшитых гелях может быть оптимизированно изменением разделяющего буферного раствора (в соответствии с указаниями в разделе, посвященном капиллярному зонному электрофорезу) и контролем пористости геля во время его получения. Размер пор поперечно-сшитых полиакриламидных гелей может быть модифицирован с помощью изменения концентрации акриламида и (или) пропорции сшивающего реактива. Как правило, уменьшение размера пор геля приводит к уменьшению подвижности разделяемых веществ. Вследствие жесткости подобных гелей может быть использован только электрокинетический ввод пробы.

Динамически модифицированные гели представляют собой гидрофильные полимеры, такие как линейный полиакриламид, производные целлюлозы, декстран и другие, способные растворяться в водных разделяющих буферных растворах и образующие разделяющую среду, которая также действует как молекулярное сито. Такие разделяющие среды получить легче, чем поперечно-сшитые полимеры. Они могут быть приготовлены в сосуде и помещены под давлением в капилляр с модифицированной поверхностью (без электроосмотического потока). Замена геля перед каждым вводом пробы как правило улучшает воспроизводимость разделения. Размер пор гелей может быть увеличен путем использования полимеров с большей молекулярной массой (при фиксированной концентрации полимера) или путем уменьшения концентрации полимера (при фиксированной молекулярной массе полимера). Уменьшение размера пор геля приводит к уменьшению подвижности частиц растворенного вещества в одном и том же буферном растворе. Поскольку при растворении таких полимеров в буферном растворе образуются растворы с низкой вязкостью, может быть использован как гидродинамический, так и электрокинетический ввод пробы.

КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ПРИНЦИП

При изоэлектрическом фокусировании молекулы мигрируют под действием электрического поля до тех пор, пока они остаются заряженными в градиенте pH, создаваемом амфолитами, имеющими широкий диапазон значений pI (полиаминокарбоновые кислоты), растворенными в буферном растворе.

Тремя основными стадиями изоэлектрического фокусирования являются загрузка, фокусирование и мобилизация.

Стадия загрузки. Могут быть использованы два способа:

– одноступенчатая загрузка: образец смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или с помощью вакуума;

– последовательная загрузка: в капилляр вводят начальный буферный раствор, затем амфолиты, затем образец, смешанный с амфолитами, после чего снова амфолиты и в конце замыкающий буферный раствор. Объем образца должен быть небольшим, чтобы не повлиять на величину градиента pH.

Стадия фокусирования. При подаче напряжения амфолиты, в зависимости от своего суммарного заряда, мигрируют по направлению к катоду или аноду, тем самым создавая градиент от анода (более низкие значения pH) к катоду (более высокие значения pH). На данной стадии разделяемые компоненты мигрируют до тех пор, пока не достигнут значения pH, соответствующего их изоэлектрической точке (pI) и ток не упадет до очень низких значений.

Стадия мобилизации. Если для детектирования необходима мобилизация, используют один из следующих способов:

– в первом способе мобилизацию проводят в течение стадии фокусирования

вследствие действия электроосмотического потока; электроосмотический поток должен быть достаточно малым, чтобы позволить провести фокусирование компонентов;

– во втором способе мобилизацию проводят после стадии фокусирования путем использования положительного давления;

– в третьем способе мобилизацию проводят после стадии фокусирования путем добавления солей в катодную или анодную емкость (в зависимости от направления, выбранного для мобилизации) для изменения pH в капилляре при приложении напряжения. Поскольку pH изменяется, белки и электролиты мигрируют по направлению к емкости, которая содержит добавленные соли, и проходят через детектор.

Достигаемое разделение, выражаемое как ΔpI, зависит от градиента pH (dpH/dx), количества амфолитов, имеющих различные величины pI, коэффициента молекулярной диффузии (D), напряженности электрического поля (E) и изменения электрофоретической подвижности определяемого вещества при изменении pH ($-\mathrm{d}\mu/\mathrm{dpH}$):

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

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке методик разделения, являются следующие.

Напряжение. В капиллярном изоэлектрическом фокусировании на стадии фокусирования используется электрическое поле с очень высокой напряженностью – от 300 В/см до 1000 В/см.

Капилляр. В зависимости от способа мобилизации (см. выше) электроосмотический поток должен быть уменьшен или подавлен. Капилляры с модифицированной поверхностью, как правило, уменьшают электроосмотический поток.

Растворы. Анодную емкость заполняют раствором, значение pH которого меньше значения pI наиболее кислого амфолита, а катодную емкость – раствором, значение pH которого больше значения pI наиболее основного амфолита. Для анодных буферных растворов часто используют фосфорную кислоту, а для катодных – натрия гидроксид.

Добавление полимера, такого как метилцеллюлоза, в раствор амфолита приводит к подавлению конвективных сил (если такие имеются) и электроосмотического потока, что обуславливается увеличением вязкости. Коммерчески доступные амфолиты охватывают широкие диапазоны pH, и при необходимости расширения диапазона pH могут быть смешаны. Широкие диапазоны pH используют для оценки значения изоэлектрической точки, в то время как более узкие применяют для повышения точности анализа. Соотнесение времени миграции и значения изоэлектрической точки для серии белковых маркеров может быть использована для калибровки.

Осаждение белков в изоэлектрической точке во время стадии фокусирования может быть предотвращено, при необходимости, использованием добавок к буферному раствору, таких как глицерин, поверхностно-активные вещества, мочевина, или использованием цвиттер-ионных буферных растворов. Следует иметь в виду, что мочевина в зависимости от концентрации денатурирует белки.

МИЦЕЛЛЯРНАЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ПРИНЦИП

В мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) разделение происходит в растворе электролита, который содержит поверхностно-активное вещество (ПАВ) в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования (*ккм*). Молекулы растворенного вещества распределяются между водным буферным раствором и псевдонеподвижной фазой, образованной мицеллами, в соответствии со своим

коэффициентом распределения. Таким образом, данный метод можно рассматривать как гибрид электрофореза и хроматографии. Он может быть использован для разделения как заряженных, так и нейтральных частиц растворенных веществ, при этом сохраняется эффективность, скорость и инструментальная пригодность капиллярного электрофореза. Одним из наиболее распространенных ПАВ является анионное поверхностно-активное вещество натрия додецилсульфат, хотя применяются также и другие ПАВ, например, катионные, такие как соли цетилтриметиламмония.

Механизм разделения заключается в следующем. В нейтральной или щелочной среде возникает сильный электроосмотический поток, который перемещает ионы разделяющего буферного раствора по направлению к катоду. Если в качестве ПАВ используется натрия додецилсульфат, электрофоретическая миграция анионных мицелл происходит в противоположном направлении, т.е. к аноду. В результате общая скорость миграции мицелл уменьшается по сравнению со скоростью потока раствора электролита. В случае нейтральных растворенных веществ скорость миграции определяемого вещества будет зависеть только от величины его коэффициента распределения между мицеллой и водным буферным раствором, поскольку определяемое вещество способно распределяться между мицеллой и водным буферным раствором и не обладает электрофоретической подвижностью. На электрофореграмме пики, соответствующие каждому веществу из незаряженных частиц, всегда находятся между пиком маркера электроосмотического потока и пиком мицеллы (время между этими двумя пиками называется окном разделения). Для заряженных растворенных веществ скорость миграции зависит как от коэффициента распределения вещества между мицеллой и водным буферным раствором, так и от электрофоретической подвижности вещества в отсутствие мицеллы.

Поскольку механизм разделения в МЭКХ нейтральных и слабоионизированных растворенных веществ главным образом хроматографический, миграция растворенного вещества и разрешение могут быть охарактеризованы с помощью коэффициента удерживания вещества (k'), также известного как коэффициент распределения масс (D_m), который представляет собой отношение количества моль растворенного вещества, находящегося в мицелле, к количеству моль данного вещества в подвижной фазе.

Для нейтральных соединений k' определяется уравнением:

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

где: t_R – время миграции растворенного вещества;
t_0 – время выхода неудерживаемого растворенного вещества (определяемое с помощью маркера электроосмотического потока, не проникающего в мицеллу, например, метанола);
t_{mc} – время миграции мицеллы (измеряется с помощью маркера мицеллы, такого как Судан III, который мигрирует, полностью находясь в мицеллах);
K – коэффициент распределения растворенного вещества;
V_S – объем мицеллярной фазы;
V_M – объем подвижной фазы.

Аналогично, разрешение между пиками двух близко мигрирующих частиц растворенных веществ (R_S) определяется уравнением:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_b}{k'_b + 1} \times \frac{1 - \frac{t_o}{t_{mc}}}{1 + k'_a \times \frac{t_o}{t_{mc}}}$$

где: N – число теоретических тарелок для одного из растворенных веществ
α – селективность;
k'_a и k'_b коэффициенты удерживания для обоих растворенных веществ соответственно ($k'_b > k'_a$).

Подобные, но не идентичные уравнения для значений k' и R_S используются и в случае разделения заряженных частиц растворенных веществ.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения в МЭКХ, являются инструментальные, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, что приводит к появлению градиентов температуры и вязкости в буферном растворе в поперечном сечении капилляра. Данный эффект может быть значительным в случае буферных растворов с высокой электрической проводимостью, например для буферных растворов, содержащих мицеллы. Недостаточный теплоотвод приводит к уширению зоны и уменьшает разрешение.

Температура. Изменения температуры капилляра влияют на коэффициент распределения растворенного вещества между буферным раствором и мицеллами, критическую концентрацию мицеллообразования и вязкость буферного раствора. Данные параметры вносят вклад в величину времени миграции растворенного вещества. Использование надлежащей охлаждающей системы улучшает воспроизводимость времени миграции растворенных веществ.

Капилляр. Как и в случае капиллярного зонного электрофореза, размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на продолжительность анализа и эффективность разделения. Увеличение эффективной и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), увеличить время миграции и улучшить эффективность разделения. Внутренний диаметр определяет тепловыделение (для определенного буферного раствора и электрического поля) и, соответственно, уширение зоны вещества.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация поверхностно-активного вещества. Тип ПАВ так же, как и неподвижная фаза в хроматографии, влияет на разрешение, поскольку изменяет селективность разделения. К тому же величина $\lg k'$ нейтрального соединения линейно увеличивается при увеличении концентрации ПАВ в подвижной фазе. Поскольку разрешение в МЭКХ достигает максимума при приближении величины k' к значению $\sqrt{t_{mc}/t_0}$, изменение концентрации ПАВ в подвижной фазе изменяет величину разрешения.

Значение pH буферного раствора. Несмотря на то, что значение pH не изменяет коэффициент распределения неионизированных растворенных веществ, оно может изменять электроосмотический поток в капиллярах с немодифицированной поверхностью. Уменьшение значения pH буферного раствора уменьшает электроосмотический поток и тем самым увеличивает разрешение нейтральных веществ в МЭКХ, что приводит к увеличению продолжительности анализа.

Органические растворители. Для улучшения разделения в МЭКХ гидрофобных соединений к раствору электролита могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, пропанол, ацетонитрил и др.). Добавление таких модификаторов обычно уменьшает время миграции и селективность разделения. Поскольку добавление органических модификаторов влияет на величину критической концентрации мицеллообразования, конкретная концентрация ПАВ может быть использована только в

пределах некоторого процентного содержания органического модификатора, которое не предотвращает мицеллообразование или не оказывает отрицательного влияния на этот процесс, приводя к исчезновению мицелл и отсутствию разделения. Диссоциация мицелл в присутствии большого количества органического растворителя не всегда означает невозможность дальнейшего разделения; в некоторых случаях гидрофобное взаимодействие между мономером ионного ПАВ и нейтральным разделяемым веществом приводит к образованию сольвофобных комплексов, которые могут быть разделены электрофоретически.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения энантиомеров с использованием МЭКХ в мицеллярную систему включают хиральный селектор, ковалентно связывая его с ПАВ или добавляя к раствору электролита, в котором происходит разделение мицелл. Мицеллы, способные к разделению хиральных соединений, обычно содержат соли *N*-додеканоил-L-аминокислот, соли желчных кислот и т.д. Хиральное разделение может быть также проведено с помощью хиральных селекторов, таких как циклодекстрины, добавленных к растворам электролитов, содержащих мицеллы ахиральных ПАВ.

Другие добавки. Существует ряд подходов, предполагающих добавление различных реактивов к буферному раствору для изменения селективности. Добавление некоторых типов циклодекстринов к буферному раствору также может быть использовано для уменьшения взаимодействия гидрофобных растворенных веществ с мицеллой, тем самым увеличивая селективность разделения для такого типа соединений.

Добавление веществ, которые способны изменять взаимодействие между растворенным веществом и мицеллой вследствие адсорбции на последней, используется для улучшения селективности разделения в МЭКХ. Такие добавки могут представлять собой второе поверхностно-активное вещество (ионное или неионное), которое увеличивает количество смешанных мицелл, или катионы металлов, которые растворяются в мицелле и образуют координационные комплексы с растворенными веществами.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Площади пиков должны быть разделены на соответствующие времена миграции, чтобы в итоге получить скорректированную площадь, позволяющую компенсировать:

– смещение времени миграции в каждом из пробегов и тем самым уменьшить различия в величине аналитического сигнала;

– различные аналитические сигналы компонентов образца, имеющих различные времена миграции.

При использовании внутреннего стандарта необходимо подтвердить, что пик испытуемого вещества не перекрывается пиком внутреннего стандарта.

РАСЧЕТЫ

По полученным значениям рассчитывают содержание испытуемого компонента или компонентов. Если указано, рассчитывают процентное содержание одного или нескольких компонентов образца путем определения скорректированной площади пика или пиков как процентной части скорректированных площадей всех пиков, исключая пики растворителей или любых добавленных реактивов (метод нормализации). Рекомендуется использование автоматической системы интегрирования (интегратора или системы получения и обработки данных).

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

Для проверки надлежащей работы системы капиллярного электрофореза используются параметры пригодности системы. Выбор параметров зависит от используемого режима капиллярного электрофореза. К ним относятся: коэффициент удерживания (k') (только для мицеллярной электрокинетической хроматографии), число

теоретических тарелок (N), коэффициент симметрии (A_S) и разрешение (R_S). В предыдущих разделах было описано теоретическое представление для N и R_S, ниже приведены уравнения, позволяющие рассчитать эти параметры из электрофореграмм.

КАЖУЩЕЕСЯ ЧИСЛО ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ТАРЕЛОК

Кажущееся число теоретических тарелок (N) может быть рассчитано по уравнению:

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

где: t_R – время миграции или расстояние по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту;
w_h – ширина пика на половине высоты.

РАЗРЕШЕНИЕ

Разрешение (R_S) между близкими по высоте пиками двух компонентов может быть рассчитано по уравнению:

$$R_S = \frac{1{,}18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

где: t_{R1} и t_{R2} – времена миграции или расстояния по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков;
w_{R1} и w_{R2} – ширина соответствующего пика на половине высоты.

При необходимости разрешение может быть рассчитано путем измерения высоты впадины (H_v) между двумя частично разделенными пиками в препарате сравнения (таком как стандартный образец), высоты меньшего пика (H_p) и расчета отношения пик/впадина:

$$\frac{p}{V} = \frac{H_p}{H_V}$$

КОЭФФИЦИЕНТ СИММЕТРИИ

Коэффициент симметрии пика (A_S) может быть рассчитан по уравнению:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

где: $w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой его высоты;
d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передней границей пика на одной двадцатой его высоты.

Испытания на повторяемость площадей (стандартное отклонение площадей или отношений площадь/время миграции) и времен миграции (стандартное отклонение времени миграции) используются в качестве параметров пригодности. Повторяемость времени миграции представляет проверку пригодности процедуры промывки капилляра. Альтернативным способом предупреждения ухудшения повторяемости времени миграции является использование времени миграции относительно времени миграции внутреннего стандарта.

При определении родственных примесей нелишним может быть испытание на

подтверждение отношения сигнал/шум для препарата сравнения (такого как стандартный образец) или определение предела количественного определения.

ОТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ

Пределы обнаружения и количественного определения соответствуют отношению сигнал/шум 3 и 10 соответственно. Отношение сигнал/шум (S/N) рассчитывают по уравнению:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

где: H – высота пика, соответствующего рассматриваемому компоненту, на электрофореграмме раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии сигнала, наблюдаемого на протяжении двадцатикратной ширины пика на половине высоты;

h – уровень шума на электрофореграмме, полученной после ввода контрольного раствора, наблюдаемый в области, равной двадцатикратной ширине пика на половине высоты пика на электрофореграмме раствора сравнения и, по возможности, расположенной симметрично по обе стороны от места возможного обнаружения пика.