

Капиллярные электросепарационные методы — новая эра в анализе многокомпонентных проб / Б.Г.Беленький // Научное приборостроение — 1992. — Т. 2. — N 1. — С. 3-36.

Капиллярные электросепарационные методы (КЭСМ) — новое направление в аналитической химии, обеспечивающее скоростной высокоэффективный анализ многокомпонентных проб неорганических и органических веществ, в том числе биополимеров. КЭСМ включают свободный электрофорез (зонный электро- и изотахофорез, изоэлектрофокусирование), гель-электрофорез, электрокинетическую и электроосмотическую хроматографию. По аппаратурному оформлению КЭСМ значительно проще ВЭЖХ, превосходя ее на один — два порядка по скорости анализа, массовой чувствительности и селективности. КЭСМ высокоэкономичны в эксплуатации. Библ.— 30 назв. Ил — 17. Табл. — 10.

Б.Г.Беленький

(Институт аналитического приборостроения РАН, С.-Петербург)

КАПИЛЛЯРНЫЕ ЭЛЕКТРОСЕПАРАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ – НОВАЯ ЭРА В АНАЛИЗЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРОБ

Введение

В современном арсенале аналитической химии ведущую роль играют методы скоростного высокочувствительного анализа многокомпонентных смесей. Эти задачи решаются главным образом с помощью хроматографии (приблизительно 80 % аналитических определений, из них на долю современной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) приходится половина – 40 % определений).

ВЭЖХ — это выдающийся метод анализа. Он универсален, так как охватывает практически все классы органических и неорганических веществ и использует все виды хроматографических разделительных процессов, применяет многие, если не все, типы детекторов: от простейшего электрохимического до сложных —УФ-спектрофотометрического с диодной линейкой, масс-спектрометрического, инфракрасного с Фурье-преобразованием и атомно-абсорбционного. ВЭЖХ обладает высокой чувствительностью: при использовании системы обогащения до 1 ppt (одна часть на триллион). Одновременно ВЭЖХ представляет собой высокоавтоматизированный метод анализа, начиная с приготовления пробы, ее дериватизации — получения производных, облегчающих разделение анализируемых компонентов и их детектирование, управления разделительным процессом, и заканчивая обработкой результатов анализа и их информационной поддержкой.

Вместе с тем приборы для ВЭЖХ — высокоэффективные жидкостные хроматографы — сложны в изготовлении, поскольку являются компьютеризированными приборами точной механики, электроники и оптики: самыми сложными из массовых аналитических приборов, самыми массовыми из сложных научных приборов. Это особое положение высокоэффективных жидкостных хроматографов породило специальную технологию их массового изготовления, которая оказалась по плечу лишь нескольким многонациональным компаниям, заводы которых расположены в Западно-Европейских странах, США, Японии [1].

Другой особенностью высокоэффективных жидкостных хроматографов является относительно высокая стоимость их эксплуатационных расходов за счет использования дорогостоящих хроматографических колонок (500 —

1000 долларов США за 1 штуку) и значительных количеств дорогостоящих (токсичных и пожароопасных) элюентов – растворителей высокой чистоты, не допускающих при применении градиентного элюирования их регенерации. Сложность производства современных высокоэффективных жидкостных хроматографов не позволила до сих пор организовать их выпуск в нашей стране, а высокие издержки эксплуатации делают непосильным для рядовых лабораторий эффективное использование зарубежных приборов. Таким образом, сложилась ситуация, когда наша страна оказалась лишенной важнейшей группы аналитических приборов, охватывающих более 40 % аналитических определений, и обречена на использование суррогатов подобных приборов, например, "Милихром" и т. п., не обеспечивающих необходимых метрологических параметров и надежности в эксплуатации (важнейшая характеристика аналитического прибора, хорошо учитываемая рынком на Западе, но серьезно не регламентируемая ГОСТом, и поэтому игнорируемая отечественными приборостроителями).

Имеется еще одна особенность современных высокоэффективных жидкостных хроматографов, связанная с тем, что в них не реализованы и, по-видимому, не могут быть реализованы, теоретические (максимальные) параметры разделительных процессов по эффективности (пиковой емкости), производительности (пиковой емкости за единицу времени) и массовой чувствительности. А это ограничивает использование ВЭЖХ в анализе быстротекущих процессов (исследовании быстрой кинетики химических и биологических объектов), изучении сложных систем (генетическом картировании), исследовании микрообъектов (биохимии и метаболизма отдельных клеток, прижизненном изучении биохимии мелких животных).

Итак, существует социальный заказ, особенно актуальный для нашей страны, на разработку и организацию массового выпуска аналитических систем, обеспечивающих исследование объектов, ныне анализируемых ВЭЖХ, не уступающих, или мало уступающих, по универсальности и метрологическим характеристикам ВЭЖХ, значительно превосходящих ВЭЖХ по эффективности, производительности и массовой чувствительности, и, кроме того, более простых по конструкции и технологичности, чем высокоэффективные жидкостные хроматографы. Например, за счет существенного ограничения числа позиций точной механики в приборах и использования новых технологических принципов (планарной гибридной технологии, оптоэлектроники и т.п.). И, наконец, более дешевых и надежных в эксплуатации. Подобный социальный заказ, где формируется требование достижения лучших результатов более простыми и дешевыми средствами, отвечает духу научно-технической революции, однако его выполнение стоит на грани возможного.

К счастью, подобное решение имеется. Это использование капиллярных сепарационных методов (КСМ), в частности, капиллярных электросепарационных методов (КЭСМ), эффективное применение которых началось с создания Иоргенсоном прибора капиллярного электрофореза [2] и Терабе метода капиллярной электрокинетической хроматографии [3]. Счастливые особенности КСМ, как это отмечается в ряде обзорных статей [4-7], связаны с комплексным использованием новых и известных ранее процессов:

гибких кварцевых капилляров с гладкими внутренними стенками, обеспечивающих приготовление относительно дешевых хроматографических колонок внутренним диаметром $d_c = 10 + 200$ мкм, длиной до 1 м с приведенной ВЭТТ $h \approx 2$;

возможностей капиллярного электрофореза, позволяющих при использовании кварцевых капилляров $d_c < 100$ мкм (обеспечивающих диссипацию тепла) реализовать разделительные процессы с градиентом потенциала до 500 – 1000 В/см, эффективностью до $9 \cdot 10^5$ т. т/м и производительностью до 1500 т. т/с;

применения наряду со свободным электрофорезом (разделением компонентов, различающихся по электрофоретической подвижности — отношению поверхностного потенциала к коэффициенту трения), электрофореза в геле, электроосмотической хроматографии — хроматографии с движением элюента за счет электроосмоса и электрокинетической хроматографии, основанной на распределении разделяемых компонентов между раствором и движущимися в электрическом поле мицеллами, комплексами, молекулами поли-электролитов, коллоидными частицами. Все это создает огромное разнообразие разделительных процессов (превышающее возможности ВЭЖХ);

умения уменьшения размытия при электрофорезе, а также при движении элюента за счет электроосмоса, образующего плоский профиль скорости жидкости в капилляре (в отличие от параболического при движении жидкости под давлением);

легкости получения 2Д- (двухмерных) разделительных систем путем сочетания КСМ двух типов (например, хроматографии и электрофореза) и 3Д- и 4Д-разделительных систем за счет подключения детекторов со спектральной идентификацией детектируемых компонентов (масс-спектрометра, tandem-масс-спектрометра, УФ-спектрофотометра с диодной линейкой, ИК-спектрометра с Фурье-преобразованием, пульсирующего амперометрического детектора);

возможности использования высокочувствительных детекторов с малым объемом детектирования: лазер-индуцированных прямой и непрямой флуориметрии, электрохимического детектора;

достижения 0.2 % воспроизводимости времен удерживания за счет жидкостного термостатирования разделительных капилляров, стабилизации напряжения (0.01 %), стандартизации ввода пробы;

значительно более простой и более технологичной в изготовлении (за счет отсутствия насосов) конструкции приборов для КЭСМ (прибора высоковольтного капиллярного электрофореза — ПКЭФ) по сравнению с высокоэффективными жидкостными хроматографами. Преимущества и недостатки КЭСМ по сравнению с ВЭЖХ показаны в табл. 1.

КЭСМ включают свободный капиллярный электрофорез (СКЭФ); капиллярный гель-электрофорез (КГЭФ); капиллярные электрокинетическую (КЭКХ) и электроосмотическую (КЭОХ) хроматографии.

Физико-химические особенности КЭСМ

На рис. 1 изображен механизм функционирования этих КЭСМ, указаны зависимости, характеризующие скорость движения аналита v_x и высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ) H , характеризующую размытие границ зон [8]. Скорость движения аналита v_x является (за исключением КГЭФ) суммой электрофоретической скорости v_{ep} и электроосмотической скорости электролита в капилляре v_{eo} :

Таблица 1

Возможности ВЭЖХ и КЭСМ

Параметр	ВЭЖХ	КЭСМ	Преимущество КЭСМ
Эффективность, т. т/м	$5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^5$	++
Скорость, т. т/с	200	1500	++
Чувствительность: масс конц.	фмоль 10^{-8} М	амоль 10^{-7} М	++ —
ΔR , %	0.1	0.2	—
ΔA , %	0.5	1	—
Детектор (тип)	СФ, ФЛ, ЭХ, рефр., ИК, поляр.	СФ, ФЛ, ЭХ	—
Препаративная	Да	Нет	— —
Разделительные системы	Меньше	Больше	+
Изготовление	Значительно сложнее (точная механика, оп- тика, электроника)	Значительно проще (оптика, электроника, планарная техно- логия)	++
Возможность стыков- ки с масс-спектромет- ром	Хорошая	Хорошая	+
2Д-, 3Д-разделения	Среднее	Хорошее	++
Стоимость эксплуата- ции	Средняя	Низкая	++

Примечание: СФ — спектрофотометрический, ФЛ — флюориметрический, ЭХ — электрохимический, рефр. — рефрактометрический, ИК — инфракрасный, поляр. — поляриметрический.

$$v_x = v_{ep} + v_{eo}.$$

При этом знак скорости определяется направлением движения: к катоду — положительный, к аноду — отрицательный. В основе КЭСМ лежат электрофорез и электроосмос.

Электрофорез. В электрическом поле заряженные частицы (ионы) движутся вместе с противоионами; частично нейтрализующими заряд частицы. Вблизи ее поверхности образуется двойной электрический слой (рис. 2). При этом часть противоионов представляет плотный Штерновский слой адсорбированных противоионов, а другая часть свободно диффундирует в объемный раствор и образует так называемый диффузный слой противоионов. Толщина двойного электрического слоя δ зависит от концентрации электролита и его диэлектрической проницаемости $\epsilon_0\epsilon$, где ϵ_0 — диэлектрическая проницаемость в вакууме; ϵ — отношение диэлектрической проницаемости электролита к ϵ_0 :

КЗЭФ	$v_{ep} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta}$ $v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta}$ $v_x = v_{ep} + v_{eo}$ $H_{KZE} = \frac{2D_m}{v} \frac{2D_m \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E};$ $v_{ep} < v_{eo};$ $H \approx 1 \text{ мкм}$
КГЭФ	$v_{ep} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta} \chi$ $H = \frac{2D_m \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E \chi}; H = \text{const};$ $H \approx 1.1 \text{ мкм}$
КЭКХ	$v_x = v_{eo} + \left[\frac{K}{1+K} \right] v_{mic}$ $H_{KEX} \approx H_{KZE};$ $H \approx 1 \text{ мкм}$
КЭОХ	$v_x = \frac{1}{1+k'''} v_{eo}$ $H_{KEO} = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{v_{eo}} + \frac{1}{30} \frac{k''}{(1+k'')^2} \frac{d_p^2 v_{eo}}{D_s};$ $H_{KEO} = A + \frac{B}{v_{eo}} + 2.5 \text{ мкм (5 мкм)}$ $+ C v_{eo} \approx 1.3 \text{ мкм (0.5 мкм)}$
КЖХ (ΔP)	$v_x = \frac{1}{1+k'''} v(\Delta P)$ $H_{KZH} = A + \frac{B}{v} + C v;$ $A_{KZH} > A_{KEO};$ $H_{KZH} \geq 2d_p$

Рис. 1. Механизм и ВЭТТ КЭСМ, КЖХ (с движением элюента за счет перепада давления в колонке ΔP) [8]

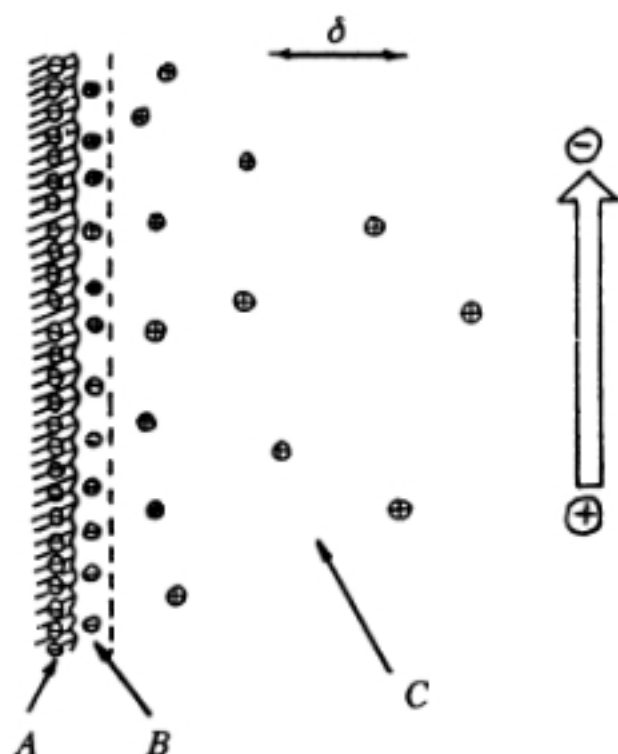


Рис. 2. Двойной электрический слой: А — поверхность с фиксированными зарядами; В — Штерновский слой адсорбированных ионов; С — направление электрического поля, δ — толщина диффузного слоя подвижных ионов

$$\delta = \left\{ \frac{\epsilon_0 \epsilon R T}{2 C \mathcal{F}} \right\}^{1/2}$$

Здесь $\mathcal{F}$ — число Фарадея; R — универсальная газовая постоянная; T — температура. Электрический потенциал поверхности заряженной частицы, частично нейтрализованной Штерновским адсорбционным слоем противоионов, представляет так называемый дзета-потенциал (ζ -потенциал). Его величина лежит в пределах 0—50 мВ и определяет электрофоретическую скорость v_{ep} частицы. Для заряженной сферической частицы в электрическом поле напряженностью E v_{ep} составляет

$$v_{ep} = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta E}{\eta}, \quad (1)$$

где η — коэффициент вязкости, определяемый размером и формой частицы, вязкостью растворителя η_0 . Для сферической частицы по формуле Эйнштейна $\eta = \eta_0 (2.5 v_p N + 1)$, где v_p — объем сферической частицы, $v_p = (3/4) \pi a^3$; a — Стоксов радиус; N — число Авогадро.

С подробным изложением теории двойного электрического слоя можно ознакомиться, например, в работе [9]. Согласно формуле (1) $v_{ep} = 1$ мм/с при $E = 500$ В/см, $\eta = 0.001$ кг/м · с, $\zeta = 50$ мВ и $\epsilon = 80$.

Электроосмос. Поскольку внутренняя поверхность капилляра заряжена, около нее также образуется двойной электрический слой, диффузная часть которого движется параллельно стенке капилляра, если вдоль нее ориентировано электрическое поле. Скорость электроосмоса определяется уравнением, подобным (1):

$$v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta E}{\eta}. \quad (2)$$

Фактор 2/3, характерный для сферической частицы, заменяется здесь на 1 для цилиндрического капилляра, v_{eo} обычно больше v_{ep} и составляет приблизительно 2 мм/с. Уравнения (1) и (2) используют, когда толщина двойного слоя δ менее 1/10 внутреннего диаметра капилляра d_c [8]. δ , как и ζ , зависят от концентрации и диэлектрической проницаемости электролита. При $C = 10^{-3}$ М в воде $\delta \sim 10$ нм в чистой воде $\delta \approx 1$ мм. В случае капилляра требование $\delta < 0.1 d_c$ всегда выполняется. Однако, если капилляр заполнить частицами сорбента (КЭОХ), указанное требование ограничивает диаметр

частиц d_p снизу. Так, при использовании электролита $C = 0.001$ М ($\delta = 10$ нм) $d_{min} = 0.4$ мкм.

Вернемся к электрофорезу. Его скорость v_{ep} определяется отношением силы, действующей на частицу F , к коэффициенту поступательного трения f :

$$v_{ep} = F/f.$$

Поскольку $F = z \mathcal{F} E$, где z — эффективный поверхностный заряд частицы, а f — для сферической частицы согласно закону Стокса равно $6\pi\eta a N$, где a — Стоксов радиус, то

$$v_{ep} = \frac{z \mathcal{F} E}{6\pi\eta a N} = \mu_{ep} E.$$

Здесь μ_{ep} — электрофоретическая подвижность ($\mu_{ep} = v_{ep}$ при $E = 1$ В/см), определяемая поверхностным зарядом, формой и размером частицы.

Электромиграционная подвижность μ представляет сумму электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{ep} + \mu_{eo}.$$

Специфическое влияние природы частиц в свободном электрофорезе на их электрофоретическую подвижность определяется отношением поверхностного заряда частицы, определяемого ζ -потенциалом и площадью поверхности, к коэффициенту поступательного трения, также определяемого площадью частицы и ее формой. В результате частицы одинаковой формы и с равной плотностью поверхностного заряда имеют одинаковые электрофоретические подвижности и, следовательно, имеют равную скорость, независимо от размера. Иное дело КГЭФ. Здесь вследствие модификации внутренней поверхности капилляра электроосмотическое движение электролита практически отсутствует, а электрофоретическая скорость разделяемых веществ ограничивается стерическим взаимодействием с матрицей геля, характеризуемым фактором взаимодействия χ

$$v_x = v_{ep} \chi.$$

Фактор значительно сильнее дискриминирует скорости макромолекул в зависимости от их размеров, чем также зависящий от размеров и формы молекулы коэффициент трения при свободном электрофорезе, определяющий коэффициент вязкости η в формуле (1). В результате КГЭФ представляет сильнейший инструмент фракционирования биополимеров по заряду и размеру макромолекул.

Можно увеличить разрешающую силу электрофореза не только этим путем, но и при взаимодействии молекул солюта с адсорбирующими частицами: несущими заряд и, следовательно, подвижными в электрическом поле (КЭКХ) или неподвижными фиксированными в капилляре (КЭОХ).

При КЭОХ скорость солюта определяется формулой

$$v_x'' = \frac{1}{1 + k'} v_{eo}, \quad (3)$$

а если молекулы солюта электрофоретически подвижны, то формулой

$$v_x''' = \frac{1}{1+k'} v_{eo} + \frac{k'}{1+k'} v_{ep}.$$

Здесь k' — фактор емкости $k' = (W/V_0)K_a$, где W — объем адсорбционного слоя; V_0 — объем электролита; K_a — коэффициент адсорбции.

Остановимся более подробно на КЭКХ. При наличии в электролите заряженных мицелл, движущихся со скоростью u_{mc} (КЭМХ), скорость зоны зависит от коэффициента распределения вещества между мицеллой и электролитом Kd_{mc} и соотношения объемов мицелл и электролита V_{mc}/V_0 :

$$k'_{mc} = (V_{mc}/V_0) Kd_{mc};$$

$$v_x^{jV} = v_{eo} + \frac{k'_{mc}}{1+k'_{mc}} v_{mc}.$$

При $k'_{mc} = 0$ (вещество не солюбилизировано) $v_x^{jV} = v_{eo}$. При $k'_{mc} = \infty$ $v_x^{jV} = v_{eo} + v_{mc}$. Определим k'_{mc} из времен выхода из колонки (длиной l) вещества: $t_x = l/v_x$, мицелл: $t_{mc} = l/v_{mc}$ несолубилизованного вещества: $t_0 = l/v_{eo}$:

$$k'_{mc} = \frac{t_x - t_0}{t_0 (1 - t_x/t_{mc})}.$$

При $t_{mc} = \infty$ (хроматография, где сорбент неподвижен) k_{mc} превращается в k' :

$$k' = \frac{t_x - t_0}{t_0}.$$

Если же вещество вне мицелл заряжено и обладает электрофоретической скоростью v_{ep} , то скорость зоны зависит и от нее:

$$v_x'' = v_{eo} + \frac{1}{1+k'_{mc}} v_{ep} + \frac{k'_{mc}}{1+k'_{mc}} v_{mc}.$$

Здесь коэффициенты при v_{ep} и v_{mc} , как и в уравнении (3), определяют долю вещества, находящегося в электролите и мицеллах.

Теперь рассмотрим ситуацию, когда вещество адсорбируется на стенке капилляра с коэффициентом K_a , образуя адсорбционный слой объемом W , пропорциональным внутренней поверхности капилляра A , но много меньшим его объема V_0 . Тогда при КЗЭФ указанный фактор будет уменьшать скорость электрофоретической зоны v_x на коэффициент $1/(1 + WK_a/V_0) = 1/(1 + k')$:

$$v_x = \frac{1}{1+k'_a} (v_{eo} + v_{ep}).$$

При КЭКХ, когда мицеллы не сорбируются,

$$v'_x = \frac{1}{1 + k'_a} v_{eo} + \frac{k'_{mc}}{1 + k'_{mc}} v_{mc},$$

и при КЭКХ, когда мицеллы не сорбируются, но вещество заряжено и движется в электрическом поле, сорбируясь на поверхности капилляра,

$$v''_x = \frac{1}{1 + k'_a} \left(v_{eo} + \frac{1}{1 + k'_{mc}} v_{ep} \right) + \frac{k'_{mc}}{1 + k'_{mc}} v_{mc}. \quad (4)$$

Электроосмотическая скорость всегда положительна, а электрофоретическая скорость и скорость мицелл могут быть как положительными, так и отрицательными. При $pH > pI$ и отрицательно заряженных мицеллах, их скорости отрицательны. Перепишем в соответствии с этим уравнение (4):

$$v''_x = \frac{1}{1 + k'_a} \left(v_{eo} - \frac{1}{1 + k'_{mc}} v_{ep} \right) - \frac{k'_{mc}}{1 + k'_{mc}} v_{mc}. \quad (5)$$

Скорости v_{eo} (при $pH > 5$) и v_{mc} обычно мало зависят от pH раствора, в то время как k'_{mc} и v_{ep} находятся в сильной зависимости от него. В результате первый и второй члены уравнения (5) сильно зависят от колебаний pH , а первый член от концентрации (за счет влияния на k'_a) солюта. В результате может наблюдаться плохая воспроизводимость v_x . Ее можно улучшить, подавляя адсорбцию анализируемого вещества и работая вблизи изоточки (с целью уменьшения v_{ep}).

На уже упомянутом рис. 1 изображены зависимости для ВЭТТ — H различных вариантов КЭСМ [8]. Благодаря плоскому фронту движения электролита в капилляре при электроосмосе у КЗЭФ, КГЭФ, КЭКХ отсутствует размывание за счет профиля скорости, а у КЭКХ из-за малости размера мицелл и коллоидов (< 0.1 мкм) за счет массопереноса. В результате все размывание происходит только за счет молекулярной диффузии пропорционально $t^{1/2}$, и у этих вариантов КЭСМ ВЭТТ (H) составляет ≈ 1.1 мкм и, следовательно, эффективность капиллярной колонки длиной 1 м $N \approx 9 \cdot 10^5$ т.т.

Что касается КЭОХ, то здесь начинает играть роль межфазный массоперенос, который не влияет на ВЭТТ в случае КЭКХ. В результате у КЭОХ $H \approx 2.5$ мкм при диаметре зерна сорбента $d_p = 5$ мкм и $H \approx 1.3$ мкм при $d_p = 0.5$ мкм.

Закономерности размывания границ зон у КЭОХ близки к закономерностям КЖХ, однако, благодаря параболическому профилю скорости: герм A (профиля скорости) в уравнении Нокса,

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

при КЖХ больше, чем при КЭОХ (плоский профиль скорости). При КЭОХ $H_{кэох} \leq 2d_p$, и эффективность колонки длиной 1 м с сорбентом $d_p = 5$ мкм $N \approx 10^5$ т.т (в девять раз меньше, чем при КЗЭФ, КГЭФ, КЭКХ).

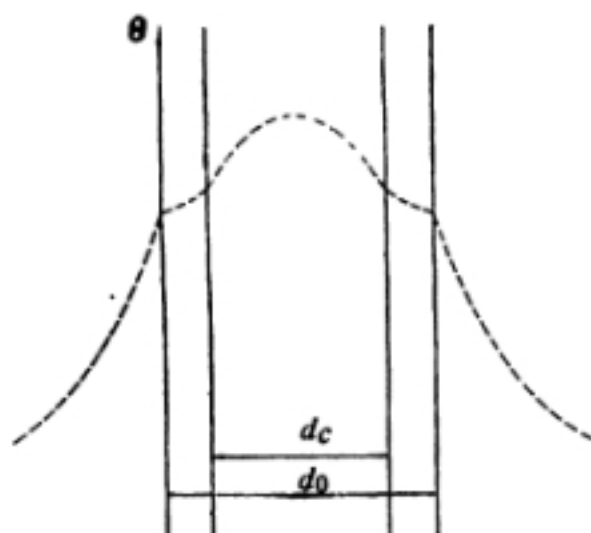


Рис. 3. Температурный избыток Q в капилляре, заполненном электролитом за счет Джоулева тепла: d_c и d_0 — внутренний и наружный диаметр капилляра, соответственно

Тепловые эффекты в КЭСМ. Все сказанное выше связано с аксиальной диффузией. Однако значительную роль в КЭСМ играет тепловой профиль скорости в капилляре за счет значительного выделения Джоулева тепла Q при прохождении электрического тока через капилляр [8].

На рис. 3 показан температурный профиль в капилляре, на его стенках и в окружающем пространстве при выделении Джоулева тепла Q при прохождении электрического тока через заполняющий капилляр электролит:

$$Q = E^2 \lambda C \epsilon,$$

где λ — молярная электропроводность электролита; ϵ — общая пористость среды ($\epsilon = 1$ в открытом капилляре, $\epsilon = 0.4 \div 0.8$ в капилляре, заполненном сорбентом). При $E = 50000$ В/м, $\lambda = 0.015$ м²/моль Ω , $C = 10^{-2}$ М, $\epsilon = 0.80$, $Q = 300 \cdot 10^6$ Вт/м³ = 300 Вт/см³.

Можно рассчитать падение температуры на внутренней стенке капилляра θ_{core} :

$$\theta_{\text{core}} = Q d_c^2 / 16k = (E^2 \lambda C \epsilon) (d_c^2 / 16k),$$

где k — молярная теплопроводность.

Для $d_c = 100$ мкм и $k = 0.4$ Вт/мК, $\theta_{\text{core}} = 0.47$ и перепад температуры на стенке капилляра

$$\theta_{\text{wall}} = \frac{Q d_c^2}{8k_w} \ln \left(\frac{d_0}{d_c} \right).$$

Для типичного значения $d_0 / d_c = 2$, $d_c = 100$ мкм, $k_w = 1$ Вт/мК, $\theta_{\text{wall}} = 0.11$. Таким образом, θ_{core} и θ_{wall} малы, и главный избыток тепла рассеивается в среде, окружающей капилляр. Поэтому так велика роль термостатирования капилляра в капиллярном электрофорезе. Если рассмотреть величину падения температуры θ при охлаждении капилляра неподвижным воздухом, а также движущимся со скоростью 0.1, 1 и 10 м/с, то θ для капилляра $d_c = 100$ мкм соответственно будут 45, 30, 20 и 10 К. Поскольку θ_{core} , θ_{wall} и θ пропорциональны d_c^2 , ограничивают $d_c < 100$ мкм.

При разогреве электролита за счет выделения Джоулева тепла имеют место два эффекта: повышение T и увеличение θ_{core} , что, в свою очередь, увеличивает поперечный профиль вязкости, k' и кинетической скорости в капилляре. А это приводит к дополнительному размыванию зон.

Таблица 2

Граничные условия, при которых
 $H_T < (1/10)H_{axial}$

C , моль · л ⁻¹	E , кВ · м ⁻¹	d_c , мкм	Q , Вт · см ⁻³	θ , К
0.001	10	1500	1	2
	20	750	5	3
	50	300	3	4
	100	150	120	6
0.01	10	700	12	6
	20	350	50	8
	50	140	300	15
	100	70	1200	19
0.1	10	320	120	20
	20	160	500	26
	50	80	3000	40
	100	30	12000	50

Чтобы оценить границы влияния теплового фактора на эффективность КЭСМ, воспользуемся инвариантом Нокса [8], указывающим предельные значения концентрации электролита C , моль · л⁻¹ (примерно равной концентрации пробы C_0), напряженности поля E , кВ · м⁻¹, диаметра капилляра d_c , мкм, при которых еще отсутствует асимметрия пика, обусловленная тепловыми эффектами

$$d_c^3 E^3 C < 3.3 \cdot 10^9. \quad (6)$$

Уравнение (6) позволяет рассчитать C , E или d_c при знании двух других параметров. В табл. 2 приведены результаты подобных расчетов. Видно, что при переходе от $C = 0.001$ М и $E = 10$ кВ · м⁻¹ к $C = 0.1$ М и $E = 100$ кВ · м⁻¹, θ изменяется от 1 до 50 К. При этом d_c необходимо уменьшить с 1500 до 30 мкм. При выборе диаметра капилляра следует учитывать и еще один фактор: чувствительность трансколлоночного абсорбционного детектирования, которая пропорциональна d_c . Поэтому d_c не опускают ниже 70 мкм, а это при $E = 50$ кВ · м⁻¹ (дальнейшее увеличение E связано с преодолением технических трудностей электроизоляции), согласно табл. 3, определяет предельную концентрацию $C \approx 0.1$ моль · л⁻¹, что выполнимо для низкомолекулярных веществ (3 — 5 %), но непреодолимо для макромолекул. Здесь нужно снижать C , что обеспечивает эффективность КЗЭ, но уменьшает чувствительность детектирования.

Рассмотрим более подробно размывание зон в КЭКХ при соблюдении условия (6) (диаметр капилляра $d_c < 70$ мкм). Размывание зон σ_{tot}^2 при таком ограничении мало зависит от теплового фактора и связано с размыванием:

а) в колонке (капилляре): σ_{col}^2 ;

б) в экстраколлоночной системе: $\sigma_{ex}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2$, где σ_{inj}^2 и σ_{det}^2 описывают размывание в дозаторе и детекторе:

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2.$$

Размывание в колонке (капилляре) при КЭКХ. Рассмотрим вначале размывание в колонке. Оно включает размывание, связанное с продольной диффузией H_l (ранее рассматриваемое нами как единственный нетемпературный фактор размывания в КЭСМ), кинетикой сорбции-десорбции H_{ms} интермицеллярной диффузией в водной фазе H_{aq} (интермицеллярный массоперенос), радиальным температурным эффектом, связанным с выделением Джоулева тепла H_T (главный фактор размывания зон при $d_c > 100$ мкм и высоком напряжении), электрофоретической дисперсией H_{ep} (связанной с неоднородностью мицелл по размеру, форме и заряду):

Таблица 3

Рассчитанные максимальные длины
и объемы инъекции и детектирования в капилляре $d_c = 50$ мкм

Параметр	Число теоретических тарелок N								
	100000			500000			1000000		
L , мм	150	250	500	150	250	500	150	250	500
H , мкм	1.50	2.50	5.00	0.30	0.50	1.00	0.15	0.25	0.50
5 %-ное увеличение									
l_{inj} (l_{det}), мм	0.37	0.62	1.24	0.17	0.28	0.56	0.12	0.20	0.39
V_{inj} , нл	0.73	1.22	2.43	0.33	0.55	1.09	0.23	0.38	0.77
10 %-ное увеличение									
l_{inj} (l_{det}), мм	0.53	0.89	1.77	0.24	0.40	0.79	0.17	0.28	0.56
V_{inj} , нл	1.04	1.75	3.48	0.47	0.78	1.55	0.33	0.55	1.10

$$H_{col} = H_l + H_{mc} + H_{aq} + H_{\tau} + H_{ep}.$$

Получены выражения для ВЭТТ — H_{col} [10] этих видов размывания в электрофоретической колонке — капилляре, которые связаны:

1) с продольной диффузией

$$H_l = \frac{2(D_{aq} + D_{mc}k'_{mc})}{1 + (t_0/t_{mc})k'_{mc}} \frac{1}{v_{eo}};$$

2) с кинетикой сорбции — десорбции

$$H_{mc} = \frac{2(1 - t_0/t_{mc})^2 k'}{\{1 + (t_0/t_{mc})k'_{mc}\} (1 + k')^2} - \frac{v_{eo}}{k_d};$$

3) с интермицеллярной диффузией в водной фазе

$$H_{aq} = \left(\frac{k'_{mc}}{1 + k'_{mc}} \right)^2 \frac{2(1 - t_0/t_{mc})^2}{1 + (t_0/t_{mc})k'_{mc}} \frac{dv_{eo}}{4D_{aq}};$$

4) с температурным эффектом (радиальным градиентом T)

$$H_1 = \frac{(1 - t_0 / t_{mc})k'_{mc}}{24(D_{aq} + D_{mc}k'_{mc})} \cdot \frac{B^2 I^4}{64k_0^2 \pi^4 r_c^2 \lambda T_0^4} v_{eo};$$

5) с электрофоретической дисперсией

$$H_{ep} = \frac{0.026 (1 - t_0 / t_{mc})^2 k'_{mc}}{1 + (t_0 / t_{mc})k'_{mc}} \cdot \frac{v_{eo}}{k_d}.$$

Здесь D_{aq} и D_{mc} — коэффициенты диффузии в водной фазе и мицеллах ($D_{aq} \approx 10D_{mc}$); t_0 и t_{mc} — времена миграции нерастворимого в мицелле ($k' = 0$, метанола) и сильно взаимодействующего с мицеллой ($k' = \infty$, судана III) веществ; k'_{mc} — фактор емкости солюта (отношения числа молекул в мицеллах в водной фазе); v_{eo} — электроосмотическая скорость; k_d — константа кинетики десорбции с поверхности мицеллы; d — расстояние между мицеллами в растворе; B — константа температурной зависимости вязкости: $\eta = A \exp(B/T)$, где A — константа; k_0 и λ — коэффициенты электро- и теплопроводности растворов; I — ток; T_0 — исходная T ; r_c — радиус капилляра.

Особенности этих выражений заключаются в том, что лишь первое из них для H_1 зависит от обратной скорости электроосмотического потока $1/v_{eo}$, остальные связаны с ней линейно, в результате зависимость $H_{col}(v_{eo})$ проходит через минимум. Другая особенность заключается в том, что только выражение для размывания, связанного с радиальным тепловым эффектом, зависит от радиуса капилляра r_c . На рис. 4 показаны рассчитанные и экспериментальные зависимости H_{col} от v_{eo} для различных величин k'_{mc} для капилляра $d_c = 50$ мкм [10]. Как видно, при $k'_{mc} = 0$ (нерастворимый в мицеллах солют при КЭКХ и КЗЭ) и $k'_{mc} = 1$ (а) H_{col} определяется только H_1 , при $k'_{mc} = 5$ (б) H_{col} зависит не только от H_1 , но и от H_{mc} и H_{ep} , в особенности при $v_{eo} > 3$ мм/с. Если $k'_{mc} = \infty$ (в), то H_{col} при $v_{eo} > 3$ мм/с определяется только H_{ep} . Как видно из рис. 4, экспериментальные значения H_{col} во всех случаях превышают рассчитанные величины примерно на одинаковую величину ΔH_{col} . Причина этого пока не выявлена, тем не менее можно определить следующие оптимальные параметры разделительных систем для КЭСМ (при $d_c = 50$ мкм):

$$v_{eo} > 1 \text{ мм/с}; k'_{mc} < 5.$$

Экстраколоночное размывание. Рассмотрим экстраколоночное размывание при капиллярном электрофорезе, полагая, что занимаемая пробой длина капилляра l_{inj} соответствует доступной для детектирования ("окно детектирования") длине капилляра l_{det} : $l_{inj} = l_{det}$. Доля капилляра, занятая пробой, влияет на эффективность колонки (капилляра).

Согласно работе [11]

$$N = 12 (l_{inj} / l)^2.$$

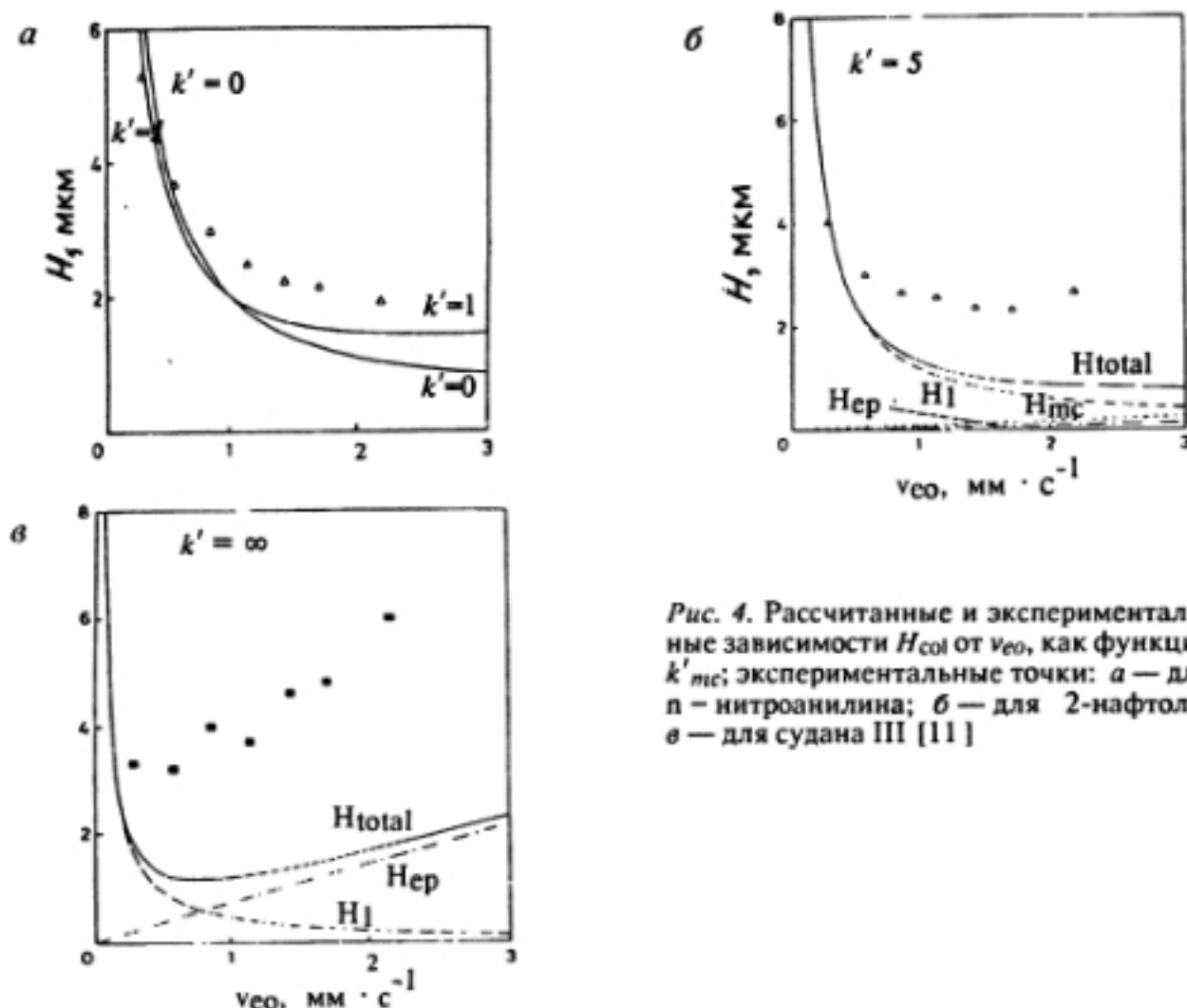


Рис. 4. Рассчитанные и экспериментальные зависимости H_{col} от v_{eo} , как функция k'_{mc} ; экспериментальные точки: а — для п-нитроанилина; б — для 2-нафтола; в — для судана III [11]

Для веществ, различающихся по молекулярным массам (коэффициенту диффузии D), l_{inj} можно рассчитать по следующей формуле [12]:

$$l_{inj} = (24DEt)^{1/2}, \quad (7)$$

где E — допустимое увеличение ВЭТТ за счет размывания пробы при вводе в капилляр; t — время экспонирования пробы. При $E = 0.1$ и $t = 10$ мин для высокомолекулярных веществ ($D = 10^{-6}$ см²/с) $l_{inj} = 380$ мкм, для низкомолекулярных веществ ($D = 10^{-5}$ см²/с) $l_{inj} = 1.2$ мм.

В работе [13] рассчитаны $l_{inj} = l_{det}$ и постоянная времени детектора τ , как функции соответственно lH и $t/N^{1/2}$ при 5- и 10%-ном увеличении H для разных l , H и N (см. табл. 3, 4).

Особенности сепарационных механизмов КЭСМ. В табл. 5 показаны схемы различных видов КЭСМ, их основной механизм фракционирования, факторы, контролирующие качество разделения (управляющие размыванием зон) [8].

СКЭФ основан на разделении ионов аналита или их ионизированных производных в электрическом поле при взаимодействии со специально сконструированной электролитной разделительной средой (однородной или с градиентом рН, ионной силы, диэлектрической проницаемости,

Таблица 4

Рассчитанные
максимальные величины
постоянной времени

Время удер- жива- ния, мин	Число теоретических тарелок N		
	100000	500000	1000000
5 %-ное увеличение ВЭТТ			
5	0.30	0.14	0.10
10	0.61	0.27	0.19
30	1.83	0.82	0.58
10 %-ное увеличение ВЭТТ			
5	0.43	0.19	0.14
10	0.87	0.39	0.27
30	2.61	1.17	0.82

Таблица 5

Капиллярные
электросепарационные методы
(КЭСМ)

Метод	Фаза		Тип солюта	Основа разделения	Фактор, контролирующий качество разделения
	элек- тролит	аль- терна- тивная			
СКЭФ	М	—	I	Е	T, D
КГЭФ	S	S	I	OE	T, D
КЭКХ	М	М	N, IP	P	T, D
КЭОХ	М	S	N, TP	P	T, D, MT

Примечания: 1. Метод СКЭФ — свободный капиллярный электрофорез; КГЭФ — капиллярный гель-электрофорез; КЭКХ — капиллярная электрокинетическая хроматография; КЭОХ — капиллярная электроэндоосмотическая хроматография. 2. Фаза: М — подвижная; S — неподвижная. 3. Тип солюта: I — ионизированный; N — нейтральный; IP — ионно-парный эффект. 4. Основа разделения: Е — электрофорез; OE — молекулярно-ситовый эффект; P — распределение. 5. Контролирующие факторы: T — термический эффект; D — аксиальная диффузия; MT — массоперенос.

электрического поля и т. п.) на основе электрофоретической подвижности анализа при наложении электроосмоса.

Можно выделить следующие варианты СКЭФ:

1) капиллярный зонный электрофорез (КЗЭФ) с разделением пробы (аналита) на отдельные гауссовой формы зоны, движущиеся в однородном электрическом поле в соответствии с электрофоретической подвижностью компонентов;

2) капиллярный изотахофорез (КИТФ) с разделением ионов на отделенные резкими границами зоны, содержащие единственный компонент (и общий противоион), которые движутся с одинаковой скоростью между лидирующим и терминальным электролитами. При этом напряженность электрического поля в зонах саморегулируется так, что она становится обратно пропорциональной электрофоретической подвижности содержащихся в них ионов. Последнее достигается изменением их концентрации, при этом масса ионов в зоне определяет их длину;

3) капиллярное изoeлектрофокусирование (КИЭФ), осуществляемое в капилляре, где тем или иным способом устанавливается градиент pH. В этих условиях амфотерные соединения в зависимости от заряда движутся к катоду или аноду, останавливаясь в точках (при отсутствии электроосмоса — непереносное условие КИЭФ), где pI анализа соответствует pH градиента.

Выделение и регистрация этих зон осуществляется путем вытеснения содержимого капилляра через детектор.

КГЭФ — основан на разделении движущихся в электрическом поле ионизированных макромолекул за счет их взаимодействия с сеткой замурованного в капилляре геля. При этом гель может быть инертным, и в основе разделения лежит молекулярно-ситовой эффект, или может взаимодействовать с аналитом за счет кулоновских или молекулярных сил.

КЭКХ — основана на разделении нейтральных аналитов путем их распределения между движущимися в электрическом поле заряженными частицами и электролитом, заполняющим капилляр. Это взаимодействие может быть основано на молекулярных силах, ионно-парном эффекте, комплексообразовании (лигандном обмене), биоспецифических взаимодействиях и т. п. (В табл. 6 показаны разновидности КЭКХ: мицеллярная — КМЭКХ, ионообменная — КИОЭКХ, лигандообменная — КЛОЭКХ, коллоидная — ККЭКХ).

КЭОХ — основана на взаимодействии аналита с сорбентом при движении электролита — элюента за счет электроосмоса. Механизм селективности такой же, как при КЖХ, однако, благодаря электролитной природе элюента, КЭОХ более пригодна для разделения полярных аналитов (подобно обращенно-фазной хроматографии). Из-за плоского электроосмотического профиля скорости размывание в КЭОХ меньше, чем в КЖХ.

Таким образом, для КЭСМ характерно огромное разнообразие вариантов (механизмов) разделения, безусловно превышающее возможности ВЭЖХ (КЖХ). В связи с этим рассмотрим, например, возможность хирального разделения с использованием КЭСМ, которое может быть осуществлено КЗЭФ при использовании модифицирующего ионизированного хирального агента, КГЭФ при применении хирально-активного геля или аналогичного модифицирующего агента, КЭКХ при хирально-активных заряженных частицах (макромолекулах) или хирально-активных ионизированных модификаторах электролита — КЭОХ с использованием принципов хиральной ВЭЖХ (КЖХ) (рис. 5).

Наиболее селективным вариантом КЭСМ является КЭКХ. Если рассматривать только КМЭКХ, то здесь селективность регулируется природой образующих мицеллы ПАВ, концентрацией ПАВ, критической концентрацией мицеллообразования ККМ (увеличение концентрации ПАВ после ККМ изменяет размеры и форму мицелл), ионной силой электролита, химической

Таблица 6

Капиллярная электрокинетическая хроматография (КЭКХ)

Подвижные заряженные частицы	Распределяемые компоненты	Разновидность
Мицеллы	N, IP	Мицеллярная
Оптически активные мицеллы	(d, l) N, IP	Хиральная
Полиэлектролиты	I, IP	Ионообменная
Комплексы	N	Лигандообменная
Коллоиды	I	Коллоидная

КЗЭФ	• В электролите, изменяет размер, заряд O $U_{epD} + U_{epL}$	• В матрице геля $U_{\Sigma}^0 > U_{epD} \frac{1}{1+K_D} \neq U_{epD} \frac{1}{1+K_L}$
КГЭФ	• В электролите, большие размеры или заряды $\chi_L U_{epD} \neq \chi_L U_{epL}$	• На сорбенте $U_{epD} \frac{1}{1+K_D} \neq U_{epD} \frac{1}{1+K_L} < U_{\Sigma}^0$
КЭОХ	• В электролите, адсорбирует O ΣO или заряды $U_{epD} \frac{1}{1+K_L} \neq U_{epD} \frac{1}{1+K_D} \approx U_{\Sigma}^0$	• В матрице геля $U_{mic} \frac{K_L}{1+K_L} \neq U_{mic} \frac{K_D}{1+K_D} \approx U_{\Sigma}^0 - U_{epD}$
КЭКХ	• В электролите, изменяет K' или заряд O $U_{epD} + U_{epL}$	• В матрице геля $U_{mic} \frac{K_L}{1+K_L} \neq U_{mic} \frac{K_D}{1+K_D} \approx U_{\Sigma}^0 - U_{epD}$

Рис. 3. Возможные варианты разделения энантиомеров с помощью КЭСМ.

Обозначения: ● — хиральный агент; ○ — аналит; ⊕ — мицелла; ● — сорбент; ➡ — со; ➡ — ер

природой катионов и анионов, добавками неэлектролитов и, наконец, изменением рН. Остановимся более подробно на последнем факторе. Как известно, скорость мицелл v_{mc} при КЭКХ определяется суммой электроосмотической скорости v_{eo} и скорости мицелл v_{ep} . При движении к катоду v_{mc} положительна, при движении к аноду — отрицательна:

$$v_{mc} = v_{eo} + v_{ep} . \quad (8)$$

При этом время удерживания t_R в КЭКХ определяется как

$$t_R = \frac{1 + k'_{mc}}{1 + (t_0 / t_{mc})k'_{mc}} t_0 , \quad (9)$$

где t_0 и t_{mc} — время удерживания нерастворимого в мицелле солюта и мицелл; k'_{mc} — емкость сорбции солюта в мицелле. При $k'_{mc} = -t_{mc} / t_0$ выражение (9) изменяет свой знак, как это видно на рис. 6. Последнее определяется изменением знака v_{mc} , который зависит от v_{eo} , определяемой зарядом внутренней поверхности кварцевого капилляра, поскольку при $pH < 5$ подавляется диссоциация силанольных гидроксильных групп. При $k'_{mc} = -t_{mc} / t_0$, когда $t_{mc} < 0$ t_R становится бесконечным. При $k'_{mc} > -t_{mc} / t_0$ $t_R < 0$, т. е. солют движется к аноду вместе с мицеллами.

Разрешение зон также связано с изменением рН вследствие изменения при этом t_0 / t_{mc} :

$$R_s = \frac{N^{1/2}(\alpha - 1)k'_{mc}[1 - (t_0 / t_{mc})]}{4\alpha(1 + k'_{mc})[1 + (t_0 / t_{mc})k'_{mc}]} . \quad (10)$$

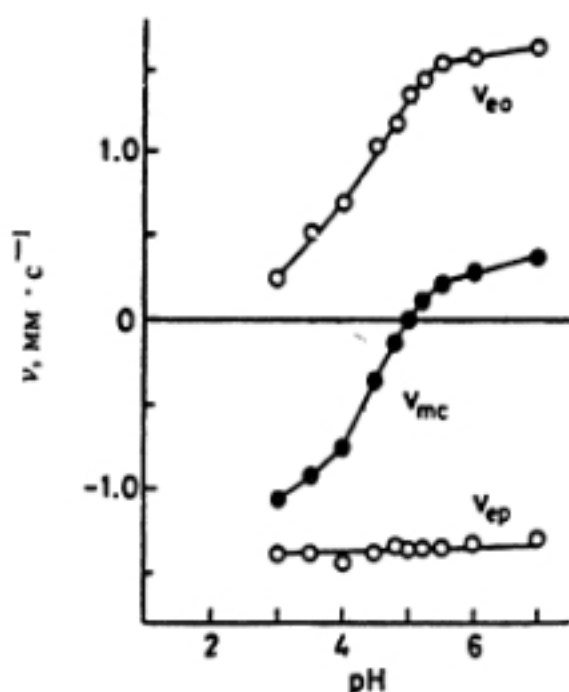


Рис. 6. Зависимость электрокинетической скорости v при КЭКХ от рН (капилляр $l = 500$ мм, $d_c = 50$ мкм, $V = 14.7$ кВ, 50 мкА; разделение фенолов в 0.1 М растворе DCNa (рН 6.0) [12])

Наличие последнего сомножителя в формуле (10) отличает выражение для R_s КЭКХ от соответствующего выражения для хроматографии. На рис. 7, а показана зависимость $f(k'_{mc})$ произведения двух последних сомножителей (10) от k'_{mc} [13]. Видно, что при определенных значениях $k'_{mc} = -(t_{mc} / t_0) f(k'_{mc})$ и, следовательно, R_s стремится к бесконечности. При этом, однако, резко увеличивается время удерживания (9) — (рис. 7, б). Вблизи этих значений k'_{mc} можно найти оптимум разделения при допустимом времени анализа. Варьируя рН, можно изменять знак v_{eo} от одинакового с v_{ep} на разный с соответствующим изменением v_{mc} . При этом важно, чтобы мицеллы двигались к электроду, расположенному

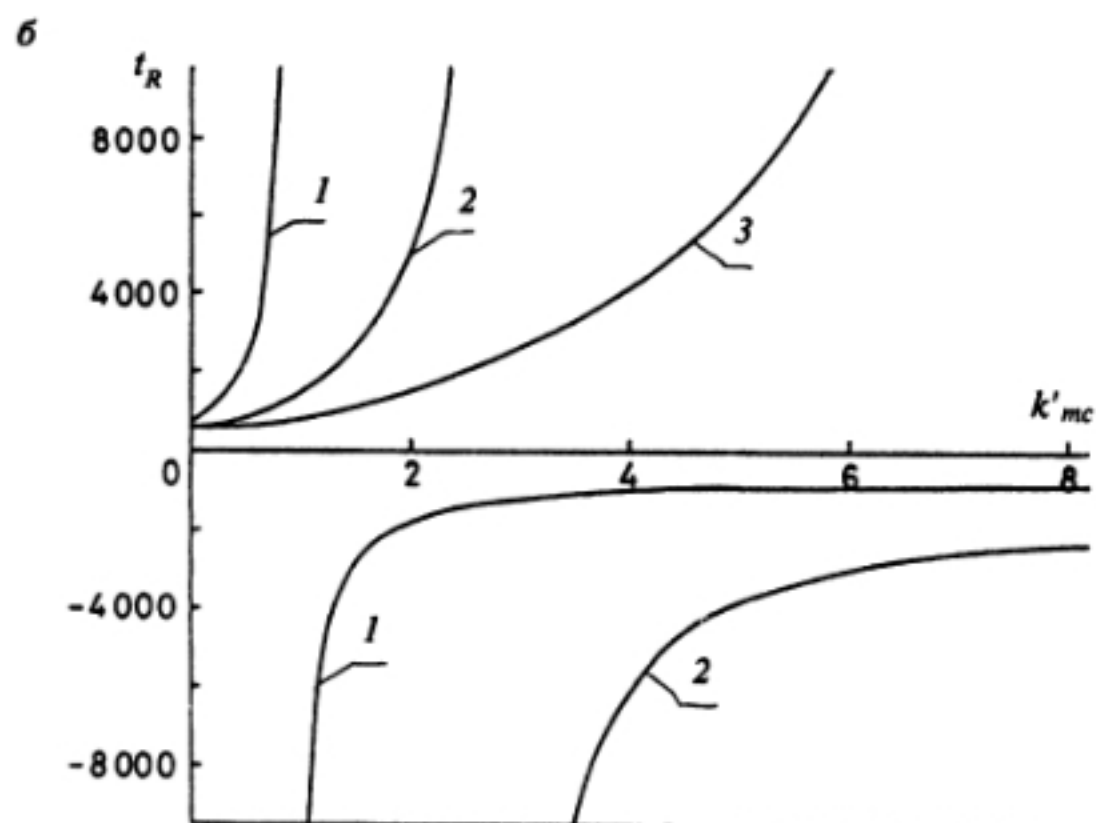
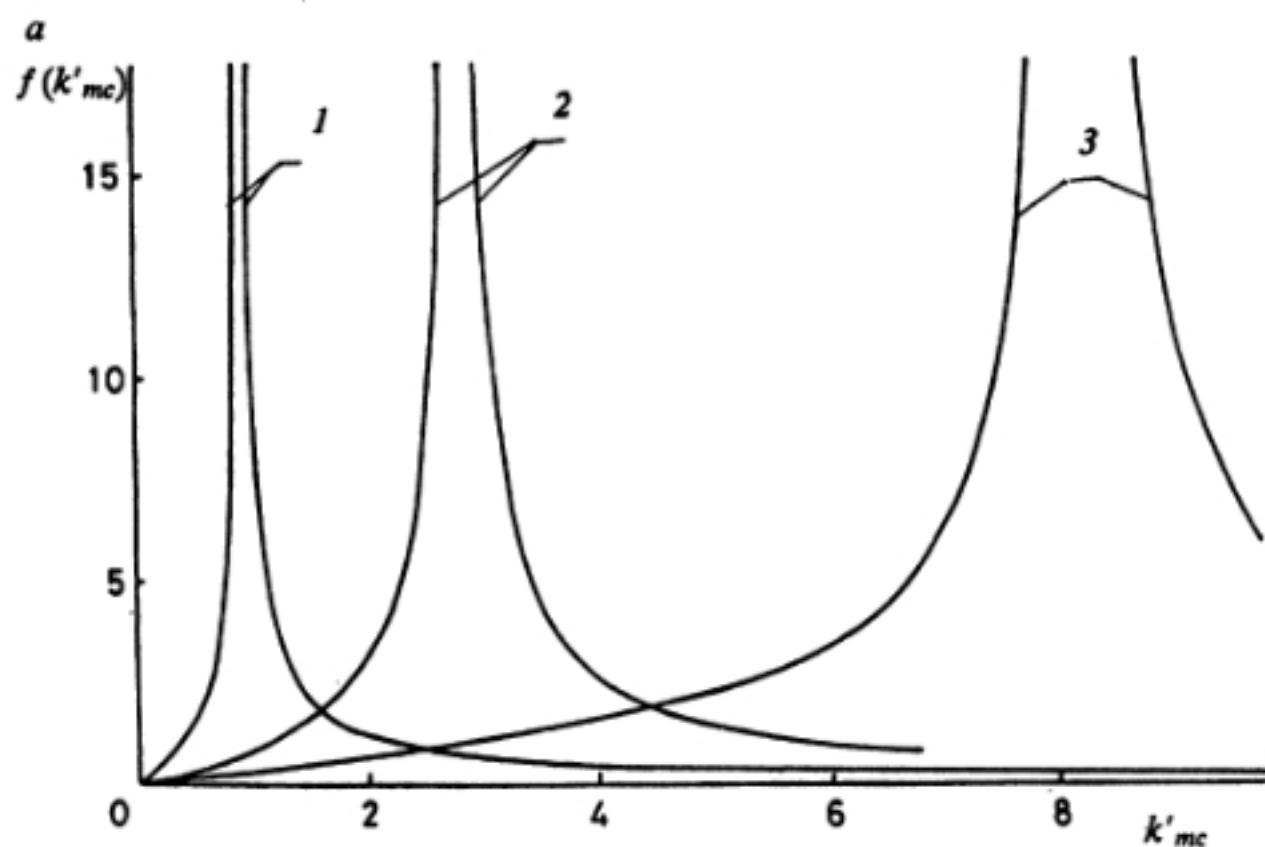


Рис. 7. Рассчитанные зависимости $f(k'_{mc})$ (а) и t_R (б) от k'_{mc} при pH: 1 — 4.0; 2 — 4.5; 3 — 4.8

вблизи детектора. Между тем, знаки v_{eo} и v_{ep} влияют на размывание зоны [14]. При противоположных знаках оно увеличивается, поскольку вблизи границы диффузионной части двойного электрического слоя будет наблюдаться возмущающий эффект, связанный с наличием движущихся в противоположных направлениях потоков.

Для того, чтобы выявить главные особенности КЭСМ, следует сопоставить теоретические аспекты хроматографии и электрофореза, имея его в виду как основополагающий вариант КЭСМ.

Длительное время эти два метода развивались самостоятельно разными специалистами на основе разных теоретических концепций. В настоящее время теоретическая и методическая базы хроматографии и электрофореза начинают объединяться, и успехи капиллярного высоковольтного электрофореза, положившего начало целому кусту новых капиллярных электросепарационных методов, — результат развития этого общего подхода.

Электрофорез проще, и сложнее хроматографии. В хроматографии хроматографическая подвижность контролируется сорбционным взаимодействием с неподвижной фазой — сорбентом, что позволяет легко реализовать огромное многообразие типов межмолекулярных взаимодействий, определяющих селективность разделения. Определенную, но подчиненную роль играет и взаимодействие аналита с подвижной фазой. Селективность разделения в хроматографии — легко регулируемый процесс, хорошо изученный в смежных с хроматографией дисциплинах: адсорбции, физико-химии растворов, химии комплексов, ионном обмене и т. п.

В классическом электрофорезе возможности изменения электрофоретической подвижности — отношения заряда молекулы аналита к его коэффициенту поступательного трения, ограничены. Это создание градиентов электрического поля, коррекция рН и ионной силы электролита, изменяющих скорость движения ионов за счет регулирования эффективного заряда аналита, электропроводности раствора, гидродинамического сопротивления движению аналита в электрическом поле. Эта ограниченность, по сравнению с хроматографией, возможности регулирования подвижности аналита заставляет обращаться к экстремальным нелинейным ситуациям — изoeлектрофокусированию, изотахофорезу, которые имеют аналоги в хроматографии, но они редко используются, поскольку в хроматографии легко реализуются значительно более простые линейные элютивные процессы (аналогичные КЗЭФ), полностью обеспечивающие необходимую селективность разделения.

Итак, в классическом электрофорезе невозможно обойтись без нелинейных процессов, требующих развития сложной теории [15, 16], при этом отсутствует теоретическая поддержка со стороны смежных дисциплин, что определяет необходимость самостоятельного развития этой теории специалистами по электрофорезу. Отсюда относительно малое число теоретических работ, и вообще, фундаментальных исследований по электрофорезу как в нашей стране, так и за рубежом. Но без них невозможны эффективные занятия классическим электрофорезом как методом анализа и препаративного фракционирования. Эта ситуация в корне отличается от хроматографии, где с развитием ВЭЖХ господствуют линейные процессы, позволяющие использовать этот метод на сугубо эмпирической основе. Отметим, что развитие препаративной ВЭЖХ возродило интерес к нелинейной хроматографии, фронтальным и вытеснительным вариантам хроматографического процесса. Отметим также, что современные капиллярные электросепарационные мето-

ды — это линейный процесс, теоретический аппарат которого, правда, сложнее теоретического аппарата линейной хроматографии за счет необходимости учета разогрева жидкости выделяющимся при электрофорезе джоулевым теплом. Однако практическая реализация этого процесса с использованием тонких капилляров позволяет снять или значительно уменьшить влияние этого фактора на эффективность разделения.

Некоторые методические вопросы капиллярного электрофореза

Прибор капиллярного электрофореза. На рис. 8 изображена схема прибора капиллярного электрофореза (ПКЭФ). В его состав входят источник высокого напряжения (до 30 кВ с переключаемой полярностью и стабилизацией по напряжению и току 0.01 %); гибкий кварцевый капилляр внутренним диаметром 30—100 мкм и длиной 10—100 см, помещенный в термостатируемый (10—50 °С) контейнер; детектор; амперметр; электродные сосуды с платиновыми электродами, один из которых (вблизи детектора) заземлен, а второй — высоковольтный — находится под напряжением.

Забор пробы жидкости для промывания капилляра, а также буферного раствора производится из сосудов, установленных в автоматическом коллекторе, управляемом компьютером, который регулирует и рабочий режим электрофореза. С помощью компьютера осуществляется обработка информации и ее хранение. Современные ПКЭФ обеспечивают 0.2—0.5 % воспроизводимость времен удерживания, 1—3 % воспроизводимость сигнала детектора. Время получения электрофореграммы составляет от десятков секунд до десятков минут. Чувствительность детектирования определяется выбором детектора. Интересное усовершенствование ПКЭФ связано с заменой гибких кварцевых капилляров кремниевой пластинкой с капиллярами, полученными методом планарной технологии (фотогравировкой [17]). Указыва-

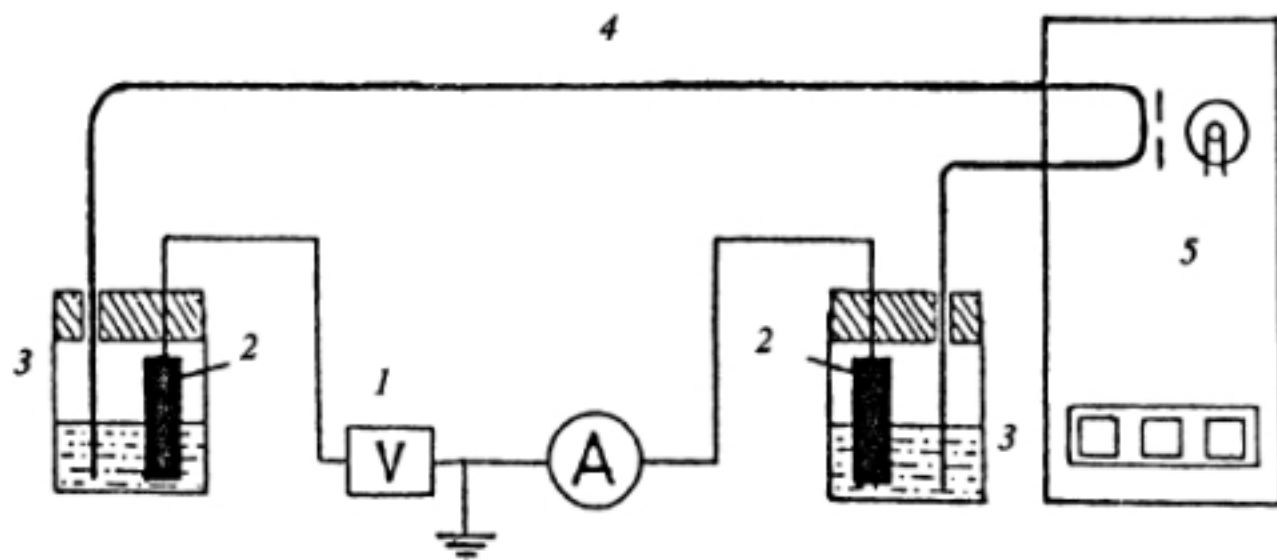


Рис. 8. Схема прибора капиллярного электрофореза: 1 — источник высокого напряжения; 2 — платиновый электрод; 3 — электродный сосуд; 4 — гибкий кварцевый капилляр; 5 — детектор

ется, что капилляры прямоугольной формы значительно эффективнее (при соотношении ширины к высоте до 15:1) капилляров круглой формы, кроме того, благодаря отличной теплопроводности кремния (приблизительно в 100 раз большей, чем у кварца) изготовленные с помощью планарной технологии капилляры значительно лучше термостатируются. Вообще говоря, хорошее термостатирование (жидкостное) не только повышает воспроизводимость времен удерживания, но уменьшает шум нулевой линии [18] (рис. 9). В связи с проблемой термостатирования капилляров следует более детально остановиться на зависимости от температуры результатов капиллярного электрофреза. Увеличение температуры капилляра уменьшает время миграции, ухудшает разрешение [19].

В то же время повышение температуры увеличивает важнейший параметр капиллярного электрофореза — его производительность N/t . Поясним причину этого феномена. Следуя Гиддингсу [20], запишем:

$$\frac{N}{t} = \frac{(zFE)^2}{12\pi RT\eta(T)aN} \quad (11)$$

Здесь F — сила, действующая на частицу со Стоксовым радиусом a и эффективным зарядом z в электрическом поле напряженностью E ($F = \pi FE$); F — число Фарадея; η — коэффициент вязкости; N — число Авогадро.

Зависимость N/t от температуры проявляется через зависимость от T произведения $T\eta(T)$ в знаменателе (11). Как видно из рис. 10, представляющего зависимость отношения $T\eta(T)/(T\eta(T))_{373\text{ К}}$ от T , величина $T\eta(T)$ уменьшается и, следовательно, N/t увеличивается с ростом T [20].

Верхняя температура термостатирования определяется закипанием органического модификатора электролита (например, для метанола $T_{\text{max}} = 340\text{ К}$). Нижняя температура связана с кристаллизацией солей из буферного раствора. Так, при работе с достаточно концентрированными растворами додецилсульфата натрия по этой причине нельзя опускаться ниже $T = 283\text{ К}$. При увеличении температуры падает растворимость в жидкости газов, которые начинают выделяться в виде пузырьков, увеличивающих электрическое сопротивление электролита в капилляре и образующих ложные пики на электрофореграмме. Отсюда необходимость удаления перед экс-

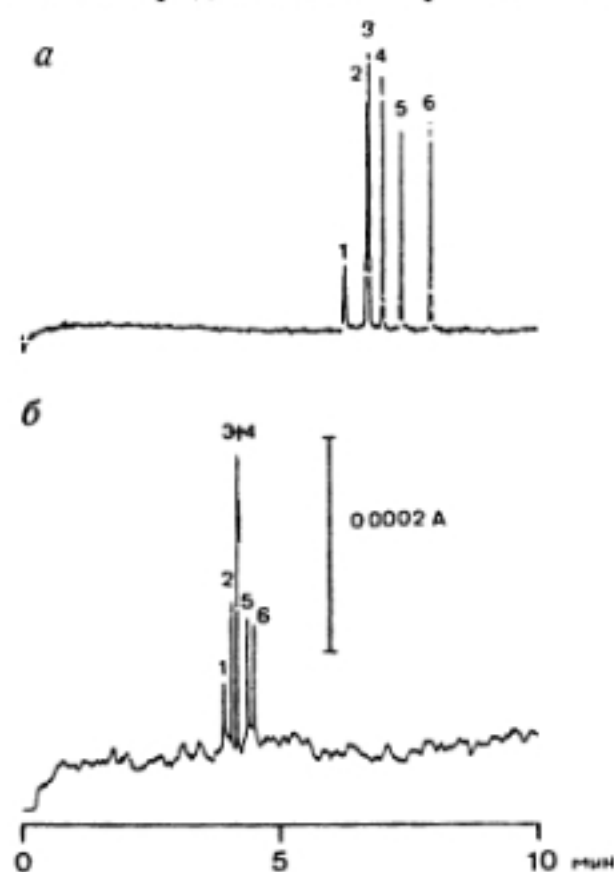


Рис. 9. Влияние охлаждения разделительного капилляра на нулевую линию при МЭКХ и разделение незаряженных веществ: 1 — H_2O ; 2 — β -DOPA; 3 — сульфаниламид; 4 — теобромин; 5 — теофиллин, 6 — кофеин. а — жидкостное охлаждение капилляра 298 К; б — без охлаждения [17]

периментом растворенных газов из буферного раствора и пробы.

Важным моментом в воспроизводимости КЭСМ является предотвращение адсорбции аналита на внутренней поверхности капилляра. При адсорбционном взаимодействии со стенкой капилляра сразу падает эффективность капиллярного электрофореза за счет сопротивления массопереносу. Динамическая модификация стенки капилляра адсорбирующимися компонентами пробы приводит, как это показано на рис. 11, к изменению времени удерживания и ухудшению разрешения [7]. Выход из этого положения — обязательное промывание капилляра

после каждого цикла разделения или модификация его внутренней поверхности гидрофильными покрытиями для предотвращения адсорбции [18].

Ввод пробы. Ввод пробы в ПКЭФ осуществляется несколькими методами.

1. Электрокинетическим — путем погружения конца капилляра в сосуд с анализируемым раствором (проба) и строго ограниченным по времени наложением стабилизированного напряжения на капилляр, в который за счет электроосмоса втягивается проба. При этом ионы разного заряда движутся со скоростью, большей или меньшей, чем электроосмотическая, а нейтральные молекулы со скоростью электроосмоса. Таким образом происходит фракционирование пробы. Если электроосмос отсутствует (при модификации

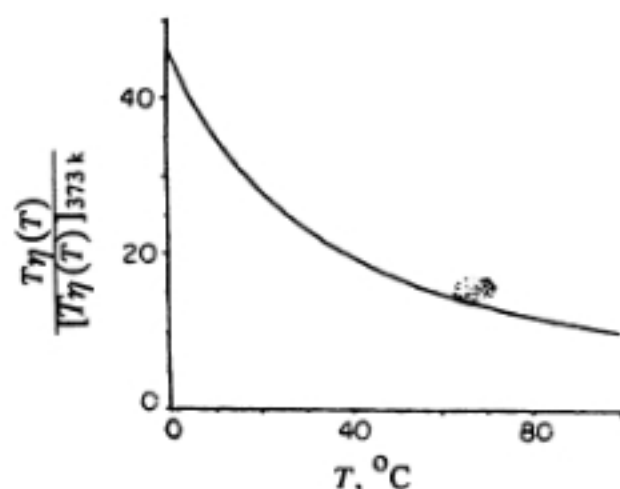


Рис. 10. Зависимость произведения абсолютной температуры на вязкость $T\eta(T)$ (относительно значения при температуре кипения в нормальных условиях) от температуры

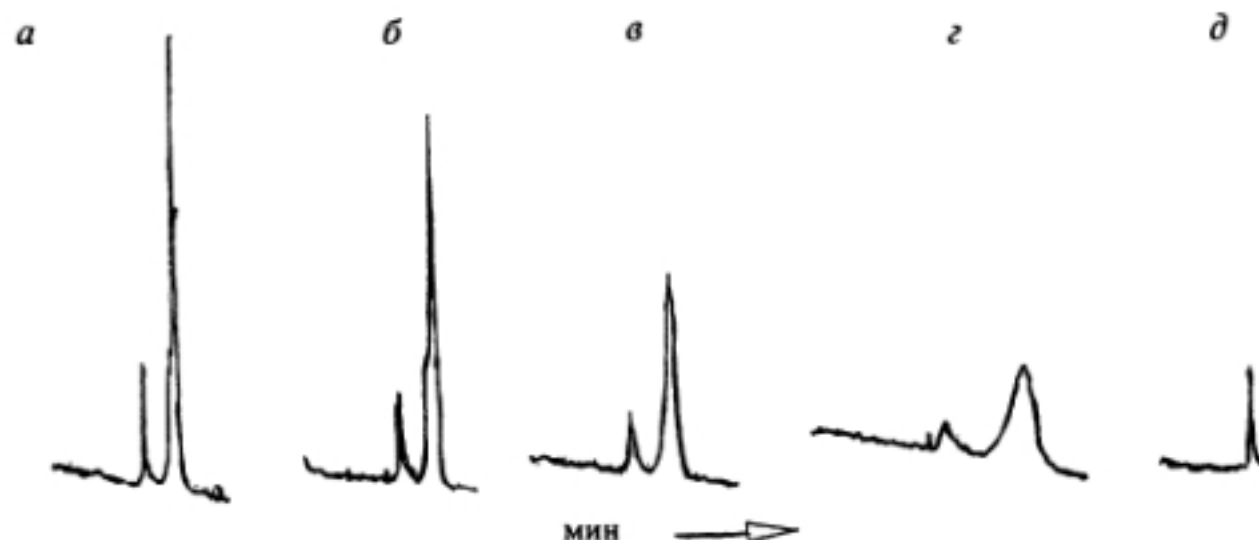


Рис. 11. Эффект адсорбции белков кональбумина и овальбумина на внутренней стенке кварцевой капиллярной колонки. а—г — без промывания капилляра (увеличение времени миграции и размывания пиков), д — после промывания капилляра 0.1 М NaOH. Капилляр $L = 100$ см, $d_c = 100$ мкм, 0.01 боратный буфер, pH9, $V = 17.5$ кВ, флуоресцентное детектирование [8]

капилляра) или он в значительной степени подавлен (при большой ионной силе электролита), то при наложении напряжения в капилляр попадут только ионы противоположного к заряду электрода в околодетекторном электродном сосуде знака (ионы другого знака и нейтральные молекулы в капилляр не попадут).

2. Гидродинамическим — путем засасывания пробы в капилляр, заполненный электролитом, при повышении давления в высоковольтном сосуде или вакуумировании пространства околодетекторного заземленного сосуда, или сифонировании при повышении уровня высоковольтного сосуда с пробой над уровнем околодетекторного сосуда.

Первый и второй методы требуют термостатирования капилляра (стабилизации вязкости электролита), стабилизации pH и ионной силы m . Как показано в работе [12], касание капилляром пробы приводит к ее продвижению в капилляре на длину до 700 мкм, больше предельной длины l_{inj} , рассчитанной по формуле (7).

Напомним, что для белка ($D = 10^{-6}$ см²/с) при $E = 0.1$, $t = 10$ мин, $l_{inj} = 380$ мм, т. е. существенно меньше наблюдаемой в эксперименте.

В работе [12] указываются причины этого феномена. Их три: заталкивание (засасывание) жидкости при погружении и удалении капилляра из объема пробы; конвективная диффузия за счет различий в вязкости, плотности, поверхностном натяжении пробы и электролита; диффузия солута в капилляр. По-видимому, главной причиной описываемого явления является конвективный ток жидкости в конце капилляра за счет разной плотности пробы и электролита.

3. Ввод пробы с предконцентрированием. Главный вариант этого метода — сочетание изотахофореза с КЭФ (рис. 12) [7]. Проба засасывается в предкапилляр вместе с лидирующим и терминальным электролитами. После наложения электрического поля и достижения стационарной стадии изотахофореза лидирующий электролит отводится в сторону, а нужная для анализа

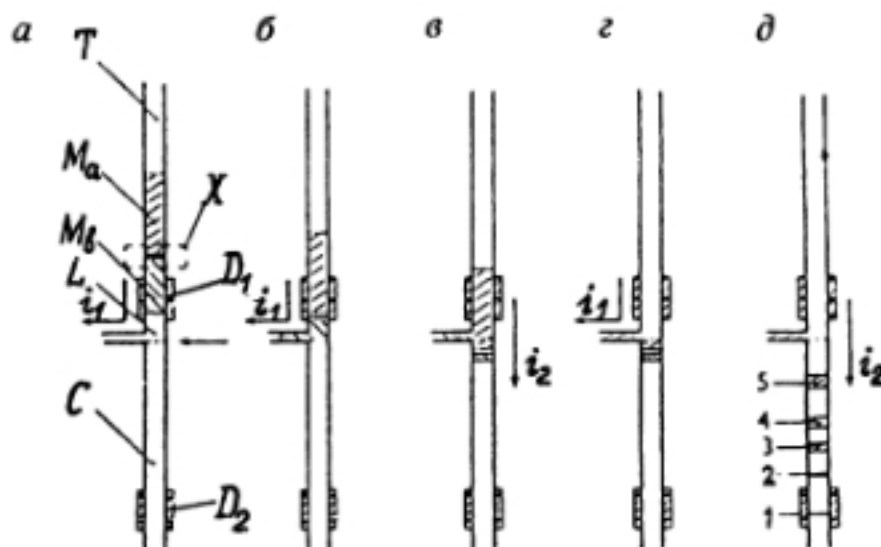


Рис. 12. Ввод пробы с предконцентрированием методом изотахофореза: а — стадия КИТФ: изотахофоретическое разделение в первом капилляре; б — удаление примеси M_a из сепарационной ячейки; в — перенос фракции пробы, содержащей аналит (х) во второй капилляр; г — удаление примеси M_a из сепарационной ячейки; д — стадия КЭФ во втором капилляре. L — лидирующий электролит, T — терминальный электролит, D_1 и D_2 — детекторы, i_1 и i_2 — направления электрического тока, 1—5 — разделенные компоненты пробы на стадии КЭФ [8]

часть разделившейся пробы путем электромиграции переводится в рабочую колонку для КЭФ. При этом, если концентрация аналита в стационарной стадии ИТФ больше его концентрации в пробе, то аналит концентрируется. При этом возможно концентрирование в сотни раз.

Другие варианты концентрирования пробы в КЭФ — это ее ввод в растворителе с меньшей электропроводностью (за счет снижения концентрации ионов или добавки неэлектролита), чем у рабочего электролита, и помещение пробы в предкапилляр с меньшим, чем у рабочего капилляра диаметром. Весьма вероятно, что в первом и третьем вариантах возможен ввод пробы без описанного выше специфического размывания.

Ввод пробы в ПКЭФ — это важнейший элемент эффективной работы КЭФ. Рекомендуется, например, в работе [19], для избежания размывания при вводе пробы использовать следующую последовательность операций (табл. 7). Правильный ввод пробы и стабилизация условий КЭФ (pH , m , T , состава электролита, концентрации и объема пробы) обеспечивают 0.2 % воспроизводимость времен удерживания, а промывание поверхности капилляра уменьшает хвостатость пика.

Детекторы

Ключевым моментом в создании оборудования для КЭСМ является разработка детекторов, совместимых по объемам измерительной ячейки с капиллярными колонками $d_c = 1 + 100$ мкм. Длина капилляра, занимаемая пробой l_{inj} , и "окно детектирования" l_{det} практически (за исключением КЭОХ) не зависят от диаметра капилляра. Их допустимые величины указаны в табл. 3, однако объемы детектирования V_d зависят от d_c^2 .

Таблица 7

Пятистадийный ввод пробы

Стадия	Операция	Высоковольтный сосуд
1	Заполнение пробой: электрокинетическое (контроль T , V) и гидродинамическое (контроль T , P и H); контроль Δt	I (проба)
2	Удаление пробы с поверхности капилляра путем погружения в сосуд с буфером	II (буфер)
3	Электрофорез: контроль T , V , m , pH в КГЭФ — контроль I (вместо V)	III (рабочий буфер)
4	Промывание капилляра: засасывание вакуумом в заземленном сосуде (давлением в высоковольтном сосуде)	IV (буфер) V, IV (растворитель, буфер)
5	Заполнение капилляра буфером: засасывание вакуумом в заземленном сосуде (давлением в высоковольтном сосуде)	III (рабочий буфер)

Примечание: T — температура, V — напряжение, I — сила тока, m — ионная сила, Δt — экспозиция при вводе пробы, H — перепад уровня заземленного сосуда над уровнем сосуда под напряжением.

Устанавливаемый в табл. 3 субнанолиитровый объем проб для КЭСМ при относительно невысокой концентрационной чувствительности детекторов требует раствора пробы достаточно высокой концентрации. Что касается разбавленных проб, то их ввод в больших, чем указаны в табл. 3, объемах может осуществляться при использовании предконцентрирования с помощью изотактофора по аналогии с диск-электрофорезом или при вводе пробы в разбавленном буферном растворе, на границе которого с более концентрированным заполняющим капилляр рабочим раствором образуется скачок потенциала, и проба концентрируется в виде узкой зоны.

Для капиллярного электрофореза, как видно из табл. 3, требуются детектирующие устройства с нанолиитровыми и субнанолиитровыми измерительными ячейками. Ограничения по размерам окна детектирования l_{det} и постоянной времени детектора τ при капиллярном электрофорезе приведены в табл. 3, 4. Известно большое разнообразие детекторов для капиллярного электрофореза (табл. 8) [6].

Как видно из табл. 8, наиболее чувствительное детектирование обеспечивают прямая флуориметрия с предколоночной дериватизацией, непрямая флуориметрия с ионным вытеснением (для КЗЭ и ионной хроматографии) и амперометрия [6] (наиболее универсальная и чувствительная в пульсирующем варианте [21]). Именно эти виды детектирования наиболее часто используются в КЭСМ (КЗЭФ, КЭКХ). Необходимо отметить, что камнем преткновения в развитии КЭСМ-методов явился поиск универсального детектора, каким в ВЭЖХ является спектрофотометрический детектор. Спектрофотометрический детектор в классическом варианте при направлении светового луча поперек капилляра малочувствителен, поскольку оптический путь здесь равен диаметру капилляра (менее 100 мкм). Большое внимание уделено так называемому термолинзовому методу детектирования, основан-

Таблица 8

Методы детектирования в КЭФ

Принцип детектирования	Предел детектирования, моль
Спектрофотометрический:	
абсорбция	$10^{-13} - 10^{-15}$
романовская спектрометрия	$2 \cdot 10^{-15}$
"термолинза"	$4 \cdot 10^{-17}$
Флуоресцентный:	
прямая флуориметрия	
предколоночная дериватизация	$10^{-17} - 10^{-20}$
"on column" дериватизация	$8 \cdot 10^{-10}$
постколоночная дериватизация	$2 \cdot 10^{-17}$
непряная флуориметрия	
объемное вытеснение	$5 \cdot 10^{-14}$
ионное вытеснение	$5 \cdot 10^{-18}$
Масс-спектрометрический	$1 \cdot 10^{-17}$
Электрохимический:	
кондуктометрия	$1 \cdot 10^{-16}$
потенциометрия	$1 \cdot 10^{-15}$
амперометрия	$1 \cdot 10^{-18}$
Радиометрический	$1 \cdot 10^{-13}$

ному на измерении теплового эффекта при поглощении детектируемым веществом излучения лазера накачки. Этот эффект измеряется путем определения интенсивности зондирующего лазерного луча (вследствие его расфокусировки в термолинзе) и другими методами. Сложность применения термолинзы связана с необходимостью использования УФ-лазера — в настоящее время громоздкого и малодоступного прибора и неустойчивостью работы термолинзового детектора. Поиск универсального детектора для КЭСМ завершился применением для этих целей не прямой флуориметрии [22]. Этот метод основан на вытеснении аналитом растворенного в электролите флюорофора и падении вследствие этого фоновой флуоресценции.

Предельно детектируемая концентрация аналита при не прямом детектировании определяется уравнением

$$C_{\text{lim}} = \frac{C_m}{DR \cdot TR},$$

где C_m — концентрация чувствительного компонента подвижной фазы в хроматографии (электролита в КЭСМ); DR — динамический диапазон детектора; TR — коэффициент вытеснения аналитом чувствительного компонента ($TR \approx 1 + 20$).

Предельно детектируемая масса вещества равна

$$q_{\text{lim}} = C_{\text{lim}} V_d.$$

В табл. 9 приведены параметры различных методов не прямого детектирования [22]. Как видно из таблицы, наиболее чувствительным методом не прямого детектирования является лазерный флуоресцентный метод с ионным вытеснением флюорофора.

Варианты КЭСМ и их использование для анализа различных классов веществ. В табл. 10 показаны оптимальное использование различных видов КЭСМ для разделения ионов, амфотерных соединений и неэлектролитов. Выбор методов ввода пробы в этих случаях будет определяться наличием электроосмоса (ионная сила, модификация внутренней поверхности капилляра) и концентрацией рабочего электролита. Применение КЭСМ описано в обзорных статьях по аналитической биотехнологии [4, 24, 25], химической технологии [25, 26], анализу фармацевтических препаратов [27]. Рис. 13-17 демонстрируют примеры некоторых высокоэффективных разделений, полученных с помощью капиллярного электрофореза. Что касается КГЭФ олигонуклеотидов (рис. 17), то в настоящее время в лаборатории Б. Л. Кэргера (США) достигнуто разделение до 700 нуклеотидов. Этот рекордный результат наилучшим образом свидетельствует о выдающихся возможностях капиллярного электрофореза.

Заключение

Подведем некоторые итоги. Определим для капиллярного электрофореза время анализа t , его эффективность N , разрешение R_s и производительность N/t , как функцию напряжения V , приложенного к концам капилляра длиной L :

Таблица 9

Методы непрямого детектирования

Принцип детектирования	DR	Вытеснение	C_m , моль	Требуемые параметры			q_{lim} , моль
				C_m/DR , моль	l , мм	V_d , мкл	
Рефрактометрический	$10^7 - 10^8$	О	20	$10^{-6} - 10^{-7}$	0.1	0.1	$10^{-13} - 10^{-14}$
Поляризметрический	10^8	О	20	10^{-7}	10	70	10^{-11}
Абсорбционный	$10^4 - 10^5$	О	20	$10^{-3} - 10^{-4}$	10	10	$10^{-8} - 10^{-9}$
		И	10^{-4}	$10^{-8} - 10^{-9}$			
Флюорисцентный	10^4	О	20	10^{-3}	1	0.1	10^{-10}
		И	10^{-4}	10^{-8}			10^{-15}
Флюорисцентный лазерный	$10^3 - 10^4$	О	20	$10^{-2} - 10^{-3}$	0.01	10^{-6}	$10^{-11} - 10^{-15}$
		И	10^{-5}	$10^{-8} - 10^{-9}$		10^{-3}	$10^{-17} - 10^{-21}$
Кондуктометрический	10^4	И	10^{-4}	10^{-8}	0.1	0.1	10^{-15}
Амперометрический	10^4	И	10^{-5}	10^{-9}		10^{-3}	10^{-18}

*О — объемное, И — ионное.

$$t = \frac{l}{v} = \frac{l}{\mu E} = \frac{lL}{\mu V}. \quad (12)$$

Здесь l — расстояние между началом капилляра и точкой детектирования; v и μ — электромиграционные скорости и подвижность ($v = v_{eo} + v_{ep}$, $\mu = \mu_{eo} + \mu_{ep}$), $v = \mu E$; E — напряженность электрического поля ($E = V/L$);

$$N = \frac{l}{H} = \frac{\mu l E}{2D} = \frac{\mu V}{2D} \left(\frac{l}{L} \right). \quad (13)$$

Третье выражение в цепочке равенств (13) получено путем замены $H = 2d/v$:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\Delta\mu}{\mu} \right) N^{1/2} = 0.18 \Delta\mu \left(\frac{lE}{D\mu} \right)^{1/2} = 0.18 \Delta\mu \left(\frac{lV}{LD\mu} \right)^{1/2}. \quad (14)$$

Развитие выражений в цепочке равенств (14) связано с заменами $N = l/H$, $H = 2D/v$, $v = \mu E$. Здесь $\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2$; $\mu = (\mu_1 + \mu_2)/2$.

Таблица 10

Разделение с помощью капиллярного электрофореза

Образец, область pH	Риск поверхностной адсорбции	Механизм разделения	Необходимость покрытия капилляра
Ионы в кислой среде	Да	КЗЭФ +	Да
	Нет	КЗЭФ +	Нет
Ионы в щелочной среде	Нет	КЗЭФ –	Нет
Ионы в широкой области pH	Нет	КЗЭФ (ЭО)	Нет
Ионы, подвижность только катионов или только анионов	Да/Нет	КИТФ	Да
Амфотерный	Да/Нет	КИЭФ	Да
Ионы и неэлектролиты	Нет	КЗЭФ (ЭО)	Нет
Неэлектролиты	Нет	МЭКХ	Нет
Сильногидрофобные вещества	Нет	ЦД-МЭКХ	Нет

Примечание: КЗЭФ — капиллярный зонный электрофорез, полярность + или –; КЗЭФ (ЭО) — КЗЭФ комбинированный с ЭО; КИЭФ — капиллярное изоэлектрофокусирование; КИТФ — капиллярный изотахофорез; МЭКХ — мицеллярная электрокинетическая хроматография; ЦД-МЭКХ — МЭКХ, модифицированная циклодекстрином [23]; полярность +: детектирование на катоде; полярность –: детектирование на аноде.

$$\frac{N}{t} = \frac{(z F V)^2}{12 \pi R T \eta(T) N L^2} \quad (15)$$

Уравнение (15) получено из (11) заменой E на V/L .

Как видно из (12) — (15), рост V уменьшает время анализа (приблизительно $1/V$ увеличивает эффективность (приблизительно V), разрешение (приблизительно $V^{1/2}$) и производительность (приблизительно V^2). Следовательно, рост напряжения — главный путь увеличения эффективности (качества) капиллярного электрофореза. Пределом на этом пути является ограничение пробойного напряжения и выделение Джоулева тепла, увеличивающего размывание в капилляре, а также вызывающего закипание электролита.

По-видимому, переход от кварцевых капилляров к изготовленным с помощью планарной технологии в кремниевой пластине сможет решить задачу увеличения V и, следовательно, повышения N , R_s , N/t и уменьшения t при КЭФ. Вместе с тем великолепные аналитические возможности КЭСМ в известной степени гасятся недостатками, пока еще присущими КЭСМ. К ним относятся сложность ввода пробы в виде узкой зоны (в пределе δ -функции), что, во-первых, существенно снижает эффективность КЭСМ и, во-вторых, пони-

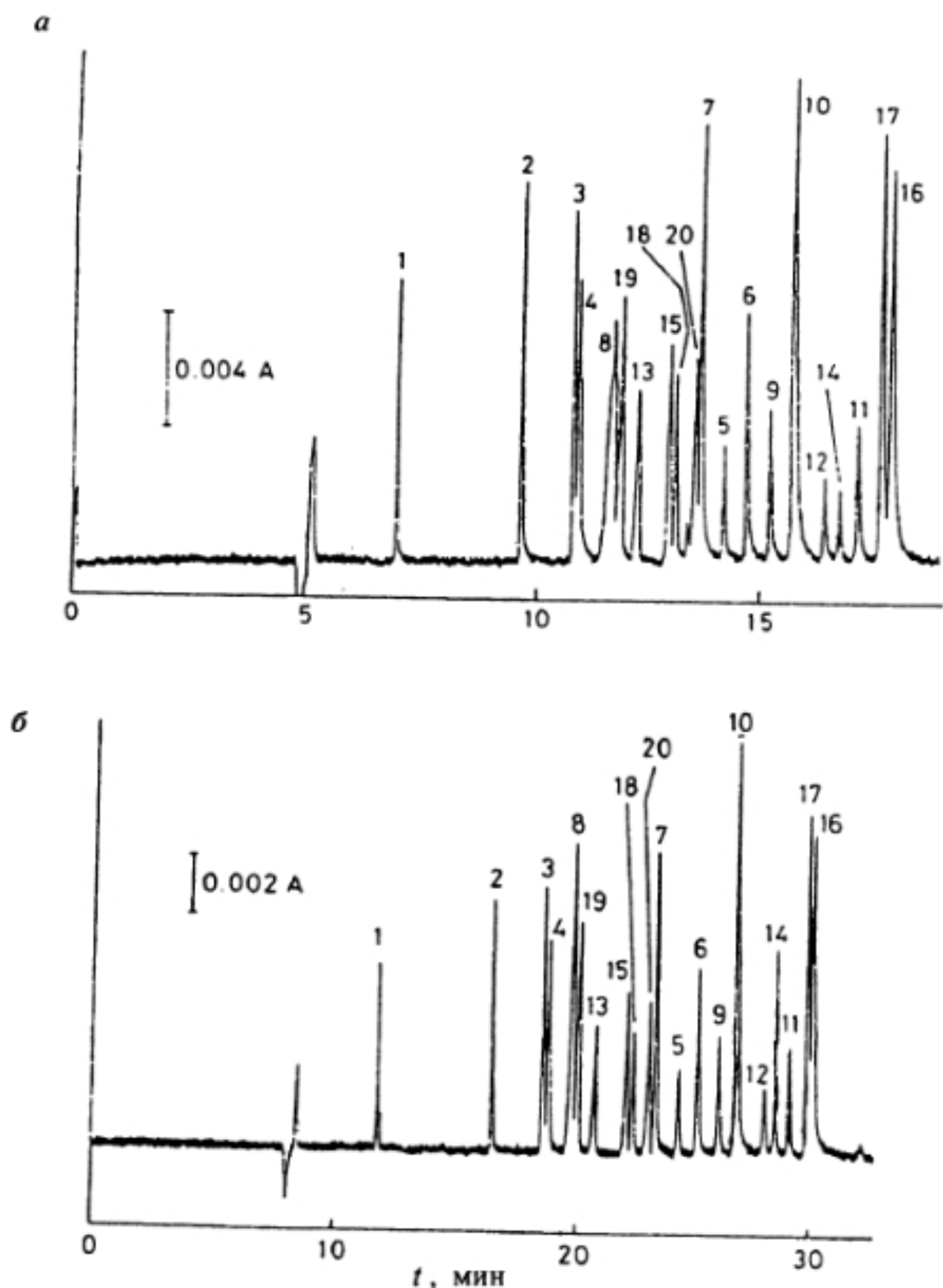


Рис. 13. Разделение смеси хлорированных фенолов с помощью МЭКХ: 1 = фенол (Ф), 2 = 2-хлор-Ф, 3 = 3-хлор-Ф, 4 = 4-хлор-Ф, 5 = 2, 3-дихлор-Ф, 6 = 2, 4-дихлор-Ф, 7 = 2, 5-дихлор-Ф, 8 = 2, 6-дихлор-Ф, 9 = 3, 4-дихлор-Ф, 10 = 3, 5-дихлор-Ф, 11 = 2, 3, 4-трихлор-Ф, 12 = 2, 3, 5-трихлор-Ф, 13 = 2, 3, 6-трихлор-Ф, 14 = 2, 4, 5-трихлор-Ф, 15 = 2, 4, 6-трихлор-Ф, 16 = 3, 4, 5-трихлор-Ф, 17 = 2, 3, 4, 5-тетрахлор-Ф, 18 = 2, 3, 4, 6-тетрахлор-Ф, 19 = 2, 3, 5, 6-тетрахлор-Ф, 20 = пентахлор-1. 0.07 М ДСNa (pH7), $V =$ (а) 15 кВ, (б) 10 кВ, $I =$ (а) 28 мкА, (б) 17 мкА. Капилляр $L = 650$ мм, $l = 500$ мм, $d_c = 50$ мкм. Детектирование $\lambda = 220$ нм, $T = 35^\circ\text{C}$ [28]

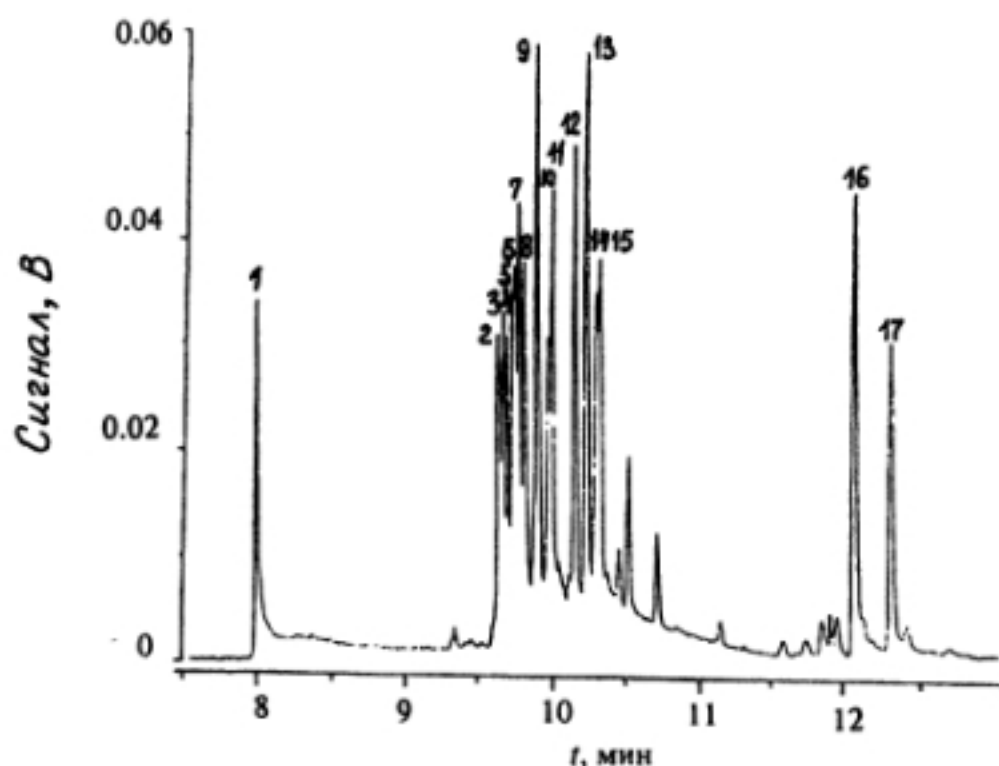


Рис. 14. Анализ флуоресценции тиогидантоиновых (FTH) производных аминокислот. 1 - Arg, 2 - His, 3 - Leu, 4 - Ile, 5 - Tyr, 6 - Met, Thr, 7 - Val, 8 - Hyp, 9 - Pro, 10 - Thr (Ser), 11 - Ala, 12 - Gly, 13 - Cys, 14 - FITC, 15 - Gln, 16 - Glu, 17 - Asp [29]

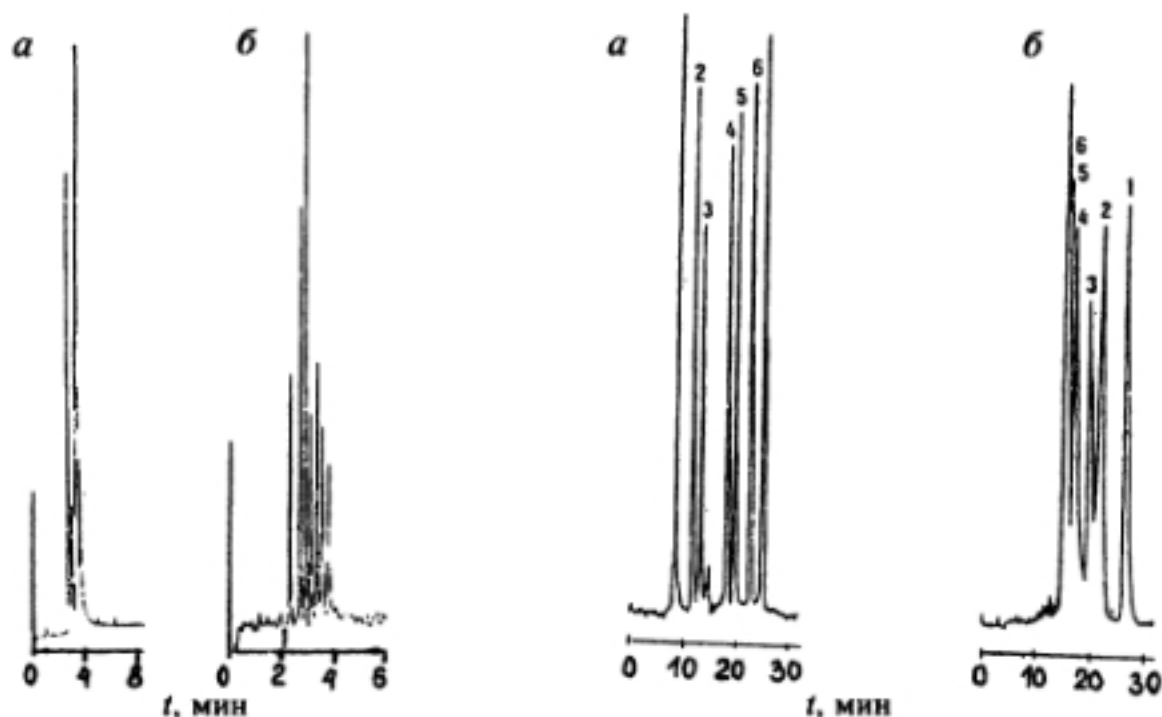


Рис. 15. Разделение аналогов ангиотензина с помощью МЭКХ при использовании катионного детергента (а) ниже и (б) выше критической концентрации мицеллообразования. Буферный раствор: 10 mM Трис / 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7.05) с бромистым додецилтриметиламмонием (а) 2.0×10^{-3} М, (б) 0.05 М [24]

Рис. 16. Разделение модельных белков с помощью КЗЭФ при pH 9.5 в модифицированном (а) и немодифицированном (б) кварцевом капиллярах: 1 - инсулин, цепь А (свиной); 2 - ВСА; 3 - овальбумин; 4 - инсулин; 5 - α -лактальбумин (коровий); 6 - β -казеин (коровий); 7 - инсулин, цепь В (свиной) [24]

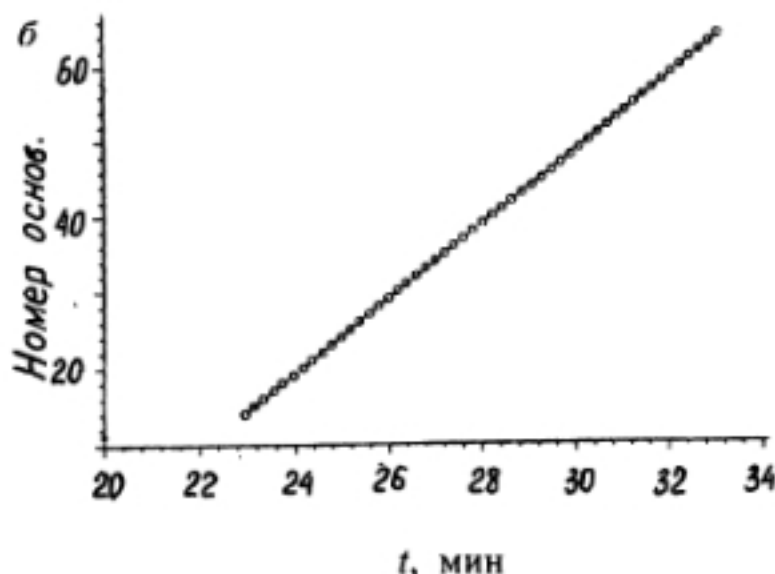
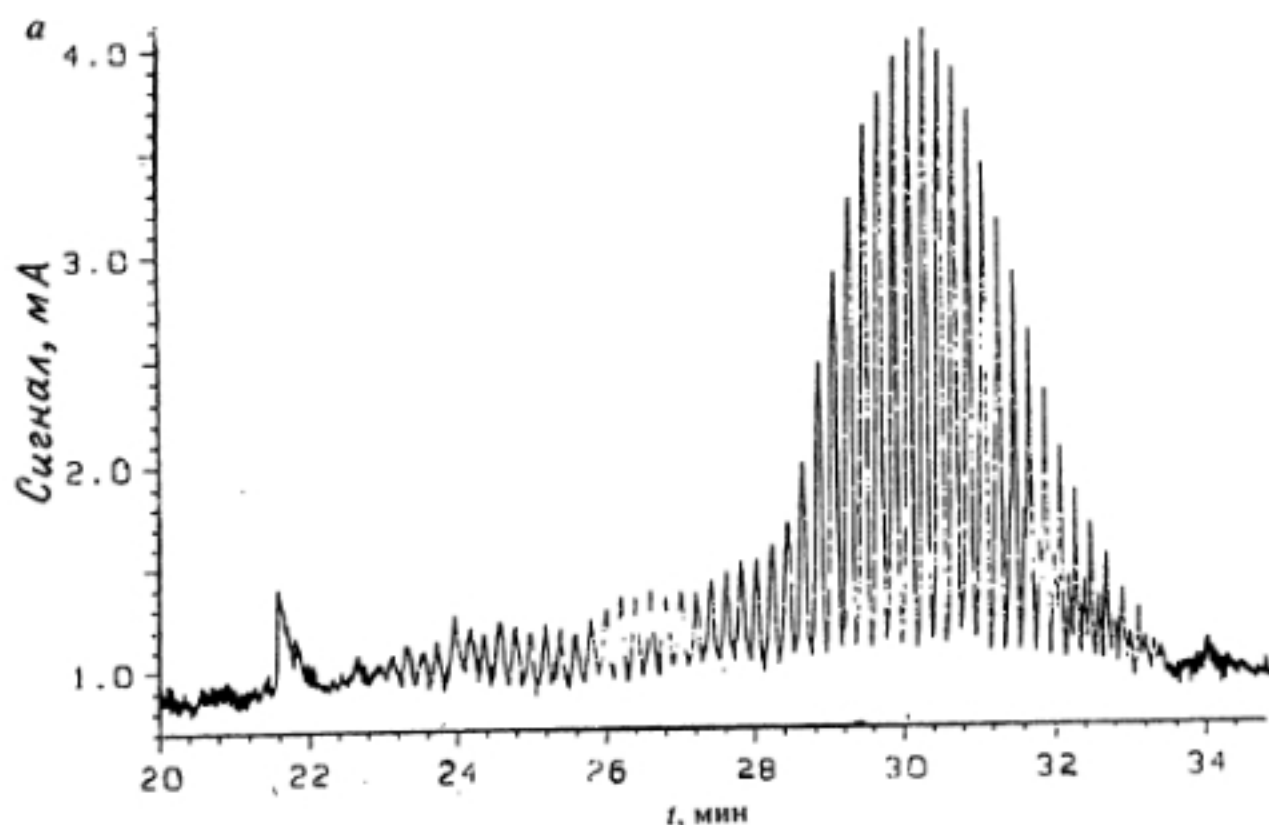


Рис. 17. Разделение полидезоксидениловой кислоты *pd* (А) 40-60. Концентрация пробы 0.02 мкг/мкл в воде. Капилляр: $L = 600$ мм, $l = 400$ мм, $d_c = 75$ мкм. Гель: 4 % Т, 3.3 % С полиакриламид. Буфер: 100 мМ Трис, 100 мМ борной кислоты, 7М мочевины, 2 мМ ЭДТА pH 8.6, $E = 250$ В/см, $I = -8$ мкА. Детектирование $\lambda = 260$ нм, инъекция 5 кВ, 3 с. (а). Зависимость времени миграции от числа оснований *pd* (А) / 30 (б)

жает чувствительность детектирования из-за сильного размывания пробы при вводе в капилляр; низкая концентрационная чувствительность из-за субнано-литрового объема измерительной ячейки.

Таким образом, представляются принципиально важными работы по усовершенствованию ПКЭФ в части уменьшения объема пробы и увеличения концентрационной чувствительности. Представляются первоочередными и работы по концентрированию пробы "on line" (следовой анализ) и модификации внутренней поверхности капилляров для предотвращения адсорбции биологически активных веществ, создания эффективного КГЭФ и КИЭФ.

Оценим перспективы развития КСМ. Капиллярная газовая хроматография представляет современное лицо газовой хроматографии. Однако ее развитие потребовало более 20 лет, причем значительные усилия и время были потрачены на организацию производства гибких кварцевых капилляров. Отметим, что более 25 % совместных публикаций по газовой хроматографии в действительности представляют публикации по капиллярной газовой хромато-масс-спектрометрии.

Что касается перспектив жидкостных КСМ, то здесь имеются три варианта мнений.

1. КСМ - это экзотические варианты ВЭЖХ, здесь некоторые перспективы имеют КЗЭФ, КЭКХ и капиллярная суперкритическая флюидная хроматография.

2. КСМ — это альтернативный ВЭЖХ-вариант современных сепарационных методов (перспективы см. в табл. 1, 5, 6, 10). Обращается внимание на низкую эффективность микроколоночной хроматографии, которая за рубежом находит применение только как микропрепаративный метод при изучении химической структуры биополимеров.

3. КСМ и, прежде всего, КЭСМ — высокоперспективный современный аналитический метод, который в будущем придет в аналитической химии на смену ВЭЖХ. Эта позиция, которой придерживается и автор статьи, особенно актуальна для нашей страны, где отсутствует производство ВЭЖХ, но имеются хорошие возможности производства ПКЭФ, для которого не нужны прецизионные микронасосы и микродозаторы — предельно сложные в массовом производстве изделия точной механики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belenkii B.G., Arkhipov D.V. //J.Chromatography. (To be published).
2. Jorgenson J.W., Lukacs K.D. // Science.- 1983.- V. 222.- P. 266.
3. Terabe Sh., Otsuka Koji, Ichikawa K. e. a.//Anal. Chem. - 1984.- V. 56. - P. 111.
4. Karger B., Cohen A., Guttman A.//J.Chromatography.- 1989.- V. 492. - P. 585.
5. Gordon M., Hung X., Pentanney S., Zare Jr. and R. //Science.- 1988. - V. 242. - P. 224-229.
6. Wallingford R.A., Eving A.G.//Adv. Chromatography. - 1989. - V. 25.- P. 1-76.
7. Schwer Ch., Kenndler E.//Chromatographia. - 1990. - V. 30. - P. 546.
8. Knox J.H.//Chromatografia.- 1988.- V. 26.- P. 329.
9. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. - М.: Наука, 1976. - 328 с.
10. Terabe Sh., Otsuka K., Ando T.//Anal. Chem.- 1989.- V. 61.- P. 251.
11. Otsuka K., Terabe Sh.//J. of Chromatography. - 1989. - V. 480. - P. 91.
12. Grushka E., McCormic R.//J. of Chromatogr. - 1989.- V. 471.- P. 421.
13. Otsuka K., Terabe Sh.//J.Microcolumn Separations.-1989.-V.1.- P.- 150.
14. Андреев В.П., Лусин Е.Е. О влиянии электроосмотического потока на эффективность капиллярного электрофореза: Препринт N 45. - ИАП АН СССР, 1991.
15. Hjerten S.//Electrophoresis.- 1990.- V. 11.- P. 665.
16. Dose E.V., Guiochon G.A.//Anal. Chem.- 1991.- V. 63. - P. 1063.

17. *Jansson M., Emmer A., Roerade J.* // High Resolution Chromatogr. - 1989. - V. 12. - P. 797.
18. *Schomburg G.* // Chromatographia. - 1990. - V. 30. - P. 500.
19. *Lux J., Yin H., Schomburg G.* // Chromatographia. - 1990. - V. 30. - P. 7.
20. *Giddings J.C.* // J. of Chromatogr. - 1989. - V. - 480. - P. 21.
21. *Townsend R.R., Olechno J.D.* e. a. // Nature. - 1988. - V. - 335. - 22 sept. P. 379.
22. *Yeung E.S.* // Accounts of Chemical Research. - 1989. - V. - 22. - P. 125.
23. *Terabe Sh., Miyashita Y., Shibata O.* e. a. // J. of Chromatogr. - 1990. - V. 516. - P. 23.
24. *Novotny M., Cobb K., Liu J.* // Electrophoresis. - 1990. - V. - 11. - P. 735.
25. *Duifffer T., Herb R., Herrmann H., Kobold U.* // Chromatographia. - 1990. - V. - 30. - P. 675.
26. *Stover F.S.* // Electrophoresis. - 1990. - V. 11. - P. 750.
27. *Nishi H., Terabe Sh., Seiyaku T.* // Electrophoresis. - 1990. - V. 30. - P. 691.
28. *Otsuka K., Terabe Sh., Ando T.* // J. of Chromatography. - 1985. - V. 348. - P. 39.
29. *Waldron K.C., Wu Sh., Earle C.W.* e. a. // Electrophoresis. - 1990. - V. 11. - P. 777.
30. *Paulus A., Gassmann E., Field M.* // Electrophoresis. - 1990. - V. 11. - P. 702.

Рукопись поступила 22.10.91