
300 лет Санкт-Петербургу
Материалы XXXII конференции СПбГИТМО(ТУ)

УДК 543.545: 543.3

© Р. А. Козулин, В. М. Золотарев, В. Е. Курочкин

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЖИДКОСТЕЙ

Рассмотрены методы анализа многокомпонентных жидкостей. В обзоре показано, что для контроля состава таких жидкостей необходимо их разделение по составу с последующим детектированием отдельных компонент. В качестве системы разделения компонент рассмотрен метод капиллярного электрофореза. В качестве детекторов электрофоретических пиков рассмотрена совокупность разных методов.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современной аналитической химии характеризуется усилением роли физических и физико-химических методов исследования объектов хозяйственной деятельности человека и окружающей его природы для выяснения их качественного и количественного состава. Важное место среди этих методов занимает электрофорез, получивший широкое распространение в последние десятилетия как эффективный метод исследования многокомпонентных смесей. При этом к неоспоримым достоинствам электрофореза можно отнести высокую разрешающую способность, возможность использовать в качестве детектирующей системы практически любой известный физический или химический метод. В качестве положительных особенностей электрофореза можно рассматривать возможность использования для анализа небольшого количества образца и высокую экспрессность метода.

Электрофорез в общем случае можно разделить на две большие части по принципу проведения процесса — это классический электрофорез (на плоскости) и электрофорез в капилляре. Однако детектирование в классическом электрофорезе имеет характерную особенность: количественный анализ возможен только в отраженном свете, а в случае белков — только по степени их окрашивания и поэтому часто бывает ошибочным. Капиллярный электрофорез (КЭ), объединяющий свойства капиллярной жидкостной хроматографии и классического электрофореза, но превосходящий их в эффективности разделения, в настоящее время успешно конкурирует с другими аналитическими методами.

Быстрое развитие метода было обусловлено двумя решающими усовершенствованиями: во-первых, был существенно уменьшен внутренний диаметр разделительного капилляра; во-вторых, детектирование по электропроводности было за-

менено на прямое оптическое детектирование в потоке жидкости. Предпосылкой для дальнейшего развития метода была возможность использования кварцевого капилляра с высокой прозрачностью в ближней УФ-области и с внутренним диаметром от 50 до 100 мкм. При этом улучшились как разделение, так и возможности детектирования. Благодаря сравнительно большому отношению поверхности капилляра к его объему влияние тепловой конвекции сильно ослаблено, что также улучшает разделение.

Современная тенденция инструментальной аналитической химии выдвигает проблемы высокочувствительного детектирования в малых (1 мкл) и сверхмалых (20–50 нл) объемах. Аппаратурное решение этой задачи требует разработки сверхчувствительных оптических детекторов. Малая длина оптического пути в капилляре является специфической особенностью КЭ, когда при уменьшении объема оптической ячейки возникает ряд проблем, связанных с низким отношением сигнал/шум, которые приводят к снижению чувствительности и воспроизводимости анализов. При осуществлении оптического детектирования в сверхмалых объемах важное значение имеет минимизация потерь света, т. к. при малой энергии падающего излучения может иметь место существенное снижение чувствительности.

Метод основан на разделении сложных смесей на компоненты. Разделение происходит в электролите, заполняющем кварцевый капилляр, при приложении к нему разности потенциалов. После разделения компоненты детектируются, проходя в капилляре через зону детектирования (рис. 1). При этом в капилляре происходят два процесса: электрофорез и электроосмос.

Электрофорез — движение заряженных частиц в электрическом поле.

Электроосмос — движение жидкости в капилляре, обусловленное силой вязкости при движении диффузной части двойного электрического слоя

в размывание пробы. К сожалению, ни один отдельный детектор не обеспечивает все эти свойства. Поэтому соответствующий детектор должен выбираться исходя из специфики применения прибора.

В КЭ существует два основных типа детектирования.

1) Измерение разницы некоторых физических свойств пробы относительно только буфера. К этому типу относятся рефрактометрия, кондуктометрия и непрямые методы детектирования. Эти методы относительно универсальны. Однако они не имеют высокой чувствительности и большого динамического диапазона, потому что сигнал детектора зависит не от свойств растворов, а от различий в свойствах раствора и буфера.

2) Измерение конкретных свойств пробы. Этот тип включает детектирование по поглощению, флуориметрию, электрохимическое детектирование, радиометрию и рамановскую спектрометрию. Эти методы ограничиваются детектированием только тех проб, которые обладают определенными свойствами. Такие детекторы обычно более чувствительны, чем детекторы первого типа, обладают более широким линейным диапазоном и более распространены в КЭ.

Детектирование компонентов пробы в КЭ может проводиться во время их миграции через капилляр (фотометрирование, флуориметрия, кондуктометрия, рефрактометрия и т.д.) или когда они вышли из капилляра (электрохимическое детектирование, масс-спектрометрия). При измерениях в капилляре измерительной кюветой является сам капилляр, поэтому зональное расширение из-за стыков и соединений устранено. При детектировании на выходе из капилляра ячейка детектора обычно вносит вклад в размывание полосы пика, что должно учитываться исследователями.

Фотометрическое детектирование

Детектирование по поглощению (абсорбции) света в образце — наиболее распространенный метод в микросепарационной технике, особенно в КЭ, т. к. позволяет регистрировать огромное количество органических соединений, многие из которых поглощают в диапазоне 195–210 нм. Проводить измерения в коротком УФ (160–180 нм), где поглощают практически все органические молекулы, проблематично из-за поглощения оптическими средами и воздухом. А для соединений, чьи структуры не включают π -связи (т. е. ионы, углеводы), фотометрирование на длинах волн > 190 нм дает относительно слабое отношение "сигнал/шум". Поэтому, хотя методы поглощения в УФ и видимом диапазонах применимы к массе разнообразных растворов, они не всегда универсальны. К тому же в капиллярах с маленьким внутренним диаметром (< 100 мкм), в которых обычно выполня-

ется детектирование, зависимость поглощения от длины оптического пути не позволяет обнаруживать растворы со слабой поглощательной способностью, и концентрационная чувствительность в 30–100 раз ниже, чем в жидкостной хроматографии (ЖХ). Чувствительность можно повысить путем увеличения объема подаваемой пробы, но это может неблагоприятно сказаться на эффективности разделения. Для фотометрического детектирования существует компромисс между использованием капилляров с маленьким диаметром для высокой эффективности разделения и использованием более широких капилляров для большей чувствительности. Из-за очень малой толщины слоя к детекторам предъявляются высокие требования, касающиеся чувствительности, шумов, юстировки и влияния светорассеяния. Ширина щели перед капилляром должна быть достаточно малой, чтобы засветить только пробу в капилляре, снижая таким образом паразитные засветки, приводящие к чрезмерному шуму фона.

Чтобы обеспечить большую гибкость в выборе спектрального диапазона измерений, необходим детектор с переменной длиной волны, даже если будет иметься некоторая потеря в чувствительности. Для этих целей используют монохроматоры с дифракционными решетками. Основной недостатком конструкций, использующих монохроматор, — это обычно меньшая их чувствительность по сравнению с системами, использующими фильтры, которые обеспечивают большее пропускание света.

В качестве источника излучения в системах КЭ повсеместно используется дейтериевая лампа, которая дает непрерывный источник УФ-излучения с максимумом интенсивности примерно на 220 нм. В работе [1] авторы исследовали использование других газоразрядных ламп, наполненных цинком (214 нм), кадмием (229 нм) и мышьяком (200 нм), и сделали вывод, что цинковая лампа — лучший источник излучения для работы с фиксированной длиной волны, т. к. дает лучшее отношение сигнал/шум и стабильность, чем остальные лампы. Однако преимущество дейтериевой лампы состоит в том, что она может использоваться в непрерывном диапазоне от 180 до 400 нм, в то время как лампы с цинком, кадмием и мышьяком имеют отдельные полосы, что ограничивает их полноценное применение.

Прямое фотометрирование

В силу того что основная масса коммерческих приборов КЭ оснащена фотометрическими детекторами УФ и видимого диапазона, было разработано множество методик с помощью детектирования по поглощению самых различных веществ, начиная с анионов и катионов и заканчивая ДНК. Чтобы преодолеть ограничение вследствие слабо-

го поглощения в капилляре, было предпринято несколько попыток с целью увеличить чувствительность без ухудшения эффективности разделения. Увеличение оптического пути поглощения в работах [2–4] достигалось путем изменения формы или диаметра капилляра в области детектирования. Несмотря на то что улучшение чувствительности было достигнуто, теоретически предполагаемое увеличение из-за более длинного оптического слоя не достигалось, т. к. проблема, связанная с неэффективным прохождением света через капилляр, в этом случае остается и даже еще больше обостряется. Например, из-за ослабления света в капилляре, имеющего Z-образную ячейку детектирования, наблюдалось только шестикратное увеличение отношения сигнал/шум (С/Ш), несмотря на увеличение оптического пути в 60 раз [5]. Z-образная форма получается при двукратном изгибании участка капилляра на 90° . Все же, используя Z-образный капилляр и химическую модификацию аналитов, было достигнуто 20-кратное увеличение в концентрационной чувствительности при следовом анализе соединений карбонила в дождевой воде [6]. Путем химической модификации соединения карбонила были преобразованы в соединения с повышенным молярным коэффициентом экстинкции. В результате предел детектирования достигнут в районе 170–300 нмоль/л. При этом сообщается, что увеличение оптического пути ячейки привело к снижению электрофлуоресцентного разрешения на 47 %. Несколько раньше фирма Hewlett-Packard представила проточную Z-образную ячейку [7], которая имеет оптический путь 1.2 мм и объем детектирования 12 нл. Эта ячейка состоит из плавленого кварца и плоских окон для минимизации паразитного света и представляет отдельную интегрированную систему с капилляром. Минимизируя паразитный свет и увеличивая оптический путь, удалось чувствительность увеличить десятикратно без ухудшения эффективности разделения.

Кроме этого, Hewlett-Packard разработала капилляр, имеющий область с расширенным внутренним диаметром. Расширение капилляра производится вытравливанием. Когда зона пробы входит в расширенную область, ее скорость замедляется, а концентрация остается неизменной. При этом проба по ширине поджимается и увеличивается в диаметре, создавая увеличенный оптический путь (рис. 2). Имеются коммерчески доступные капилляры с трехкратно расширенной внутренней областью. Такие капилляры более требовательны к фокусирующей оптике. Как можно предположить из рисунка, ширина зоны пробы уменьшается пропорционально квадрату диаметра. Апертура для ограничения света в капилляре должна быть поэтому сужена. Юстировка становится критичной, т. к. лучи света должны быть

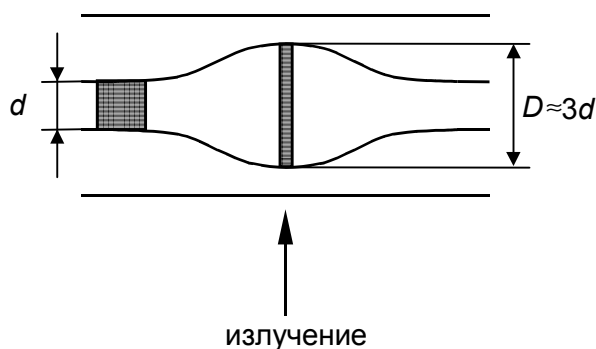


Рис. 2. Капилляр фирмы Hewlett-Packard с расширенным внутренним диаметром для увеличения оптического пути

строго перпендикулярны оси капилляра. Используя лазерный луч для фотометрирования, в таком капилляре можно достичь 8-кратного повышения чувствительности [8].

До настоящего времени наиболее многообещающая попытка в улучшении пределов детектирования, увеличивая оптический путь поглощения в КЭ, ожидалась с развитием многоходовой нанолитровой отражательной кюветы [9]. Многоходовая кювета делается непосредственно на капилляре путем нанесения на коротком участке серебряного покрытия в точке детектирования. Два окна, расположенные на противоположных сторонах капилляра выше и ниже зоны детектирования, разнесены на расстояние 1.5 мм и служат для входа и выхода лазерного излучения. При использовании лазерного излучения и многоходовой кюветы было получено 40-кратное повышение пределов детектирования по сравнению со стандартным детектированием излучения, напрямую освещающего кварцевый капилляр. Тем не менее такая геометрия ячейки детектирования облучает большой объем пробы (6.6 нл или несколько миллиметров капилляра), что снижает эффективность разделения. Кроме того, чтобы многоходовая ячейка стала практичной для КЭ, лазер должен быть заменен на широкополосный источник света, способный детектировать многие аналиты. Это осложняет отражения внутри ячейки [9] из-за сложности фокусировки некогерентного источника излучения и влияния длины волны на преломление и отражение света.

В итоге даже в капиллярах с увеличенным оптическим ходом детектирование по поглощению в конечном счете ограничено в соответствии с законом Бера и возможностями, связанными с измерением маленьких изменений сигнала на уровне большого фона. В результате фотометрирование в капилляре имеет относительно невысокие пределы детектирования по концентрации, находящиеся в диапазоне 10^{-6} М. Кроме того, прямое фо-

тометрирование сложно или невозможно для веществ, которые обладают слабым коэффициентом экстинкции, таких как ионы или неорганические соли.

Непрямое фотометрирование

Для молекул со слабыми поглощательными способностями существует альтернативный способ детектирования — это не прямое измерение поглощения. Непрямое фотометрирование проводится на той же аппаратуре, что и прямое, с единственной разницей в том, что поглощающее вещество содержится в электрофоретическом буфере, а компоненты пробы не поглощают. Когда проба, имеющая более низкое поглощение, чем буфер, проходит через зону детектирования, мощность света, доходящая до фотоприемника, увеличивается. Предел детектирования для таких измерений сопоставим с обычным поглощением в УФ и видимом диапазонах, составляя 10^{-6} – 10^{-5} М [10]. Непрямое фотометрирование в КЭ использовалось прежде всего для детектирования ионов [11, 12], углеводов [13]. Удалось разделить все лантаноиды [14], что невозможно было сделать даже при оптимизации ионно-хроматографических систем. Лучшая чувствительность для такого детектирования была достигнута в двухлучевой лазерной схеме [15], где предел обнаружения по концентрации составил 10^{-7} М без предварительной концентрации в капилляре. Непрямое детектирование лучше подходит для специфических прикладных методик, в которых все параметры оптимизированы и остаются неизменными от анализа к анализу. Для непрямого детектирования также хорошо подходят капилляры Z-образной формы или с расширенным внутренним диаметром.

Необходимо отметить, что чувствительность фототермического детектирования ограничивается стабильностью мощности источника света. Для современных дейтериевых ламп шум составляет около 10^{-5} единиц оптической плотности.

Фототермическое детектирование

Для регистрации поглощающих свет, но не люминесцирующих веществ хорошо подходит фототермическое детектирование (ФТД). В этом методе измеряются быстрые локальные изменения температуры, возникающие внутри пробы при поглощении ею оптического (или любого другого) излучения. Благодаря тому что такие детекторы прямо измеряют поглощенную энергию, перешедшую в тепло, их чувствительность существенно выше по сравнению с фотометрическими. ФТД нечувствительно к оптическому пути, позволяет проводить измерения непосредственно в капилляре и поэтому является особенно привлекательным методом детектирования для КЭ. В этом методе

необходимо использовать два лазера: лазер накачки и лазер для анализа пробы. На рис. 3 показано ФТД по методу тепловой линзы [16], где лазер накачки и лазер анализа пробы направлены так, что они пересекаются в капилляре, создавая область детектирования. Когда молекула проходит через область детектирования, она поглощает свет от лазера накачки. После этого поглощенная энергия безызлучательно переходит в тепловую энергию окружающего буфера, что приводит к изменению в показателе преломления буфера. В результате луч пробного лазера преломляется и производит изменение сигнала на фотоприемнике. Чувствительность фототермического поглощения пропорциональна мощности лазера накачки, а не оптическому пути, и поэтому для обнаружения слабопоглощающих или низкоконцентрированных аналитов выгодно использовать лазеры большой мощности.

Фототермическое детектирование было применено для анализа различных соединений. В работах [17, 18] описаны фототермические системы для нескольких различных комбинаций лазеров и поглотителей. Например, 4-милливаттный He—Cd лазер (442 нм) был выбран как источник накачки для анализа аминокислот. Для этого эксперимента предел детектирования по массе составил 200 аттомоль. Дериватизированные аминокислоты были детектированы, используя эксимерный лазер, и пределы детектирования составили 9×10^{-7} М для глицина. В работе [19] было проведено разделение и детектирование 19 аминокислот при секвенировании белка. Для ФТД в КЭ были использованы также другие системы. Например, в работе [20] сообщается о применении фототермического детектирования в КЭ, используя двухчастотный ион-аргоновый лазер в качестве накачки. Аминокислоты были проанализированы в 25 мкм капилляре, и показана нечувствительность фототермического метода к оптическому пути. К преимуществу методов ФТД относится возможность работы с микрообъемами пробы и высокая чувствительность, которая дос-

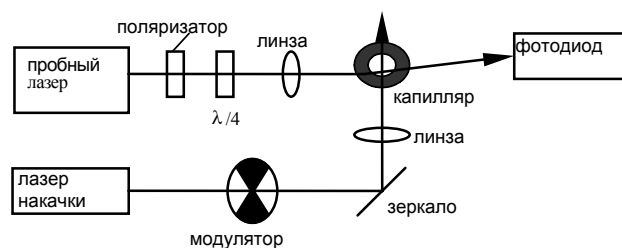


Рис. 3. Схема фототермического детектирования аналита по методу тепловой линзы

тигается еще и тем, что возбуждение происходит в видимом спектральном диапазоне, где интенсивность фона растворителя заметно меньше по сравнению с УФ-диапазоном. Однако для таких методов требуется сложное юстирование, раствор должен иметь полосы поглощения, которые соответствуют длине волны луча лазера накачки, для подвижной фазы должна быть заметной величина dn/dT , и эти методы относительно дороги в приборном исполнении. Поэтому, несмотря на большое количество публикаций, посвященных применению таких детекторов в капиллярном электрофорезе, коммерчески доступных приборов не существует, и детекторы остаются реализованными исключительно в виде лабораторных установок.

ЛАЗЕРНОЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Флуоресценция представляет собой процесс переизлучения поглощенного света на другой длине волны. В отличие от абсорбционного детектирования, где измеряются малые изменения прошедшего света на уровне относительно большого фона, при флуориметрии измерения проводятся на слабом фоне, что позволяет регистрировать даже отдельные вспышки фотонов. Высокая чувствительность такого детектирования, реализуемая наиболее полно при нулевом уровне фона, связана еще с тем, что нестабильность мощности источника света приводит не к потере чувствительности, а к ошибке измерений. При увеличении интенсивности возбуждения возрастает сигнал флуоресценции. Короткий оптический путь в КЭ, таким образом, представляет меньше проблем по сравнению с фотометрированием даже с учетом того, что интенсивность флуоресценции в капилляре линейно зависит от оптического пути. Первые флуоресцентные установки, использующие для возбуждения аналита в капилляре ксеноновые импульсные лампы, не превосходили по чувствительности абсорбционные детекторы, т. к. источник возбуждения не имел достаточной мощности. Наибольший прогресс в чувствительности для флуориметрии достигнут благодаря применению лазеров с их уникальными свойствами: высокой мощностью и пространственной когерентностью, что позволяет сосредоточивать максимальную мощность излучения в минимальном объеме. Индуцированная лазером флуоресценция (ИЛФ) — наиболее чувствительный метод для детектирования микрообъемов, используемый в настоящее время. Предел детектирования лучших систем КЭ с ИЛФ значительно ниже 10^{-13} М, что позволяет обнаруживать менее 10 молекул в пробе. Фактически, используя ИЛФ, в капилляре возможно детектирование от-

дельной молекулы. Были использованы различные подходы в построении детекторов ИЛФ, преимущества и недостатки которых будут рассмотрены ниже.

Флуоресцентные детекторы в настоящее время являются вторым наиболее широко распространенным типом детекторов, используемых в КЭ. Благодаря их высочайшей чувствительности они незаменимы в биохимических исследованиях при анализе аминокислот, пептидов, белков и особенно важны в секвенировании ДНК.

Прямое детектирование в капилляре

В первых детекторах для возбуждения и сбора флуоресценции использовали световоды. В системе, которая подошла для коммерческого применения, излучение ион-аргонового лазера (3 мВт, $\lambda = 488$ нм) вводится в световод, после которого фокусируется в капилляр шариковой линзой. Флуоресценция пробы собирается другим волоконным и передается на ФЭУ. Так как шариковые линзы имеют большие аберрации, то лазерный луч засвечивает область большего размера, чем внутренний диаметр капилляра, поэтому положение волокна, линзы и капилляра в этой схеме не очень критично. Несмотря на то что не все лучи проходят через диаметр капилляра, линейность детектора по концентрации сохраняется. Некоторые особенности этой схемы ограничивают возможности детектора. Во-первых, использование оптического волокна ограничивает доступные длины волн лазеров, т. к. УФ линии будут иметь ослабление из-за поглощения в волокне. Во-вторых, шариковая линза приводит к неэффективному использованию мощности лазера. В третьих, присутствует значительный уровень паразитных засветок из-за отражений от стенок капилляра и других элементов. Для достижения высокой чувствительности необходимо флуоресценцию пробы изолировать от рассеянного лазерного излучения. Поэтому были разработаны следующие системы детектирования.

Ортогональная система детектирования. Ортогональное построение детектора является самой распространенной, простой и в то же время эффективной конструкцией для достижения высокой чувствительности, где угол между лучом лазера и направлением сбора флуоресценции составляет 90 градусов (рис. 4). Флуоресценция пробы собирается микрообъективом, затем проходит через интерференционный светофильтр (ИФ), подавляющий фоновую засветку, и фокусируется линзой на ФЭУ. При построении такой системы после лазера необходимо устанавливать ИФ, т. к. в излучении могут присутствовать вторичные гармоники, совпадающие с длиной волны флуоресценции. Лазерный луч следует фокусировать в пятно

меньшего размера, чем внутренний диаметр капилляра для создания максимальной интенсивности возбуждения и минимизации паразитного света. Для 50 мкм капилляров вполне подходит простая двояковыпуклая линза, а для капилляров меньшего диаметра лучше использовать специальные линзы, создающие дифракционно ограниченное пятно. Капилляр устанавливается под углом Брюстера к возбуждающему излучению для уменьшения отраженного и преломленного света от его стенок. Такое построение детектора обеспечивает линейный динамический диапазон по крайней мере четыре порядка, а предел детектирования по флуоресценции 3×10^{-12} М для капилляров с внутренним диаметром 50 и 75 мкм [21]. Несмотря на низкую цену детектора, чувствительность сопоставима с другими более сложными установками. Тем не менее при использовании капилляров с внутренним диаметром менее 50 мкм предел детектирования снижается примерно в 10 раз благодаря увеличению рассеяния и уменьшению облучаемого объема.

Конфокальная система детектирования. В конфокальной системе детектирования возбуждение и сбор флуоресценции происходит на одной оси, где один микрообъектив фокусирует излучение в капилляр и собирает флуоресценцию. Пройдя через светоделитель, отражательные и полосовые светофильтры, флуоресценция регистрируется ФЭУ. Паразитный свет от стенок капилляра в этой схеме большей частью отражается в других направлениях, что уменьшает его проникновение на фотоприемник и снижает интенсивность фоновой засветки. В конфокальной системе может использоваться высокоапертурный микрообъектив, который позволяет сильно сконцентрировать свет в капилляр и собрать флуоресценцию в большом телесном угле. Глубина поля такой оптической системы достаточно мала, поэтому облучается

только внутренняя область капилляра, что также снижает рассеянный свет. В результате чувствительность детектирования оказалась высокой и для меченных флуоресцеином аминокислот составила 10^{-13} М по концентрации [22]. Некоторые трудности в работе конфокальным детектором могут возникнуть при юстировке светоделителя, чтобы сделать соосными возбуждающий луч и флуоресценцию, особенно при работе с невидимым УФ-диапазоном.

Конфокальная система детектирования также открывает возможность детектирования флуоресценции во многих капиллярах одновременно, что значительно увеличивает производительности КЭ. В этом случае можно сканировать микрообъективом поперек оси капилляров, которые уложены параллельно друг другу. Таким образом, было выполнено секвенирование ДНК в 96 капиллярах с применением четырехцветного детектирования флуоресценции [23]. Для возбуждения использовался ион-аргоновый лазер (488 нм) мощностью 3–4 мВт. При сканировании микрообъектив перемещается со скоростью 1 см/с. Флуоресценция от четырех красителей разделяется на четыре канала детектирования с помощью дихроичных светоделителей и, пройдя узкополосные светофильтры, фокусируется на 4 фотоумножителя. Такая система обладает высокой чувствительностью и производительностью.

Детектирование при возбуждении флуоресценции вдоль оси капилляра. Так как количество фотонов флуоресценции пропорционально оптическому пути, то увеличения чувствительности можно достичь при возбуждении флуоресценции вдоль оси капилляра. Это можно выполнить, заведя луч лазера в световод, который направляет его в торец капилляра [24]. Флуоресценцию можно собирать перпендикулярно оси капилляра, используя световод диаметром 1 мм. В этом случае оптический путь, с которого собирается флуоресценция, возрастает в 20 раз при диаметре капилляра 50 мкм.

Возбуждение может быть осуществлено с использованием полного внутреннего отражения света внутри капилляра. В этом случае движение зоны анализа можно проверить на каком-нибудь участке капилляра. Это может дать дополнительные сведения о процессе разделения. Однако надо учесть, что постоянное облучение пробы приведет к фотохимическому обесцвечиванию и возможной потере сигнала. В этом случае к буферу может быть добавлен поглощающий краситель для предотвращения распространения луча возбуждения слишком далеко в капилляр. Тогда область, самая близкая к торцу капилляра, будет эффективно возбуждена. В результате концентрационная чувствительность для меченных флуоресцеином аминокислот

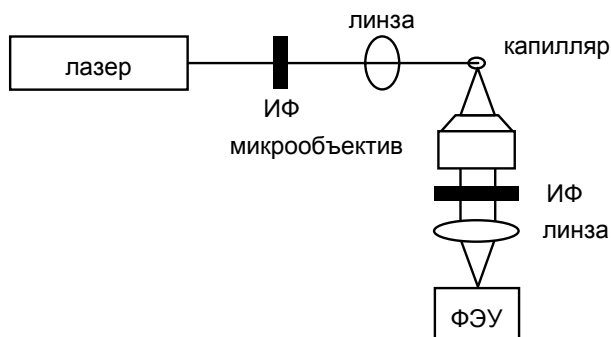


Рис. 4. Схема возбуждения и регистрации флуоресценции аналита в капилляре

кислот составила порядка 10^{-12} М [25].

Интересной особенностью возбуждения вдоль оси капилляра с полным внутренним отражением является то, что луч лазера не выходит за внутренний диаметр. Это ограничивает паразитный свет, который может достигать ФЭУ. В принципе даже можно не удалять полиимидное покрытие на капилляре в зоне детектирования, т. к. флуоресцирующее покрытие не контактирует с лазерным лучом.

Использование оптических волокон позволяет распределить лазерный луч одновременно в большое количество капилляров. Например, лазер мощностью 1 Вт может освещать связку световодов, чтобы завести по 1 мВт излучения в 500 отдельных капилляров [26]. Флуоресценцию от всех капилляров можно одновременно регистрировать с помощью ПЗС камеры. Это позволяет проводить мультикапиллярное детектирование без движущихся частей и также увеличивает скорость секвенирования ДНК.

Непрямое детектирование флуоресценции

Непрямое измерение флуоресценции по своей сути совпадает с непрямым измерением поглощения, только буфер в капилляре вместо поглощения флуоресцирует, а компоненты пробы его вытесняют и также не взаимодействуют со светом. В результате при прохождении пробы через возбуждающий луч на фоне флуоресценции буфера образуются провалы в интенсивности. Непрямое детектирование ИЛФ менее чувствительно, чем прямое, однако оно более чувствительно, чем фотометрирование. Преимущество непрямого детектирования состоит в его универсальности. Пределы детектирования ограничены динамическим диапазоном сигнала (отношение сигнала фона к его шуму) и составляют обычно 10^{-6} – 10^{-5} М. При разделении 10 аминокислот предел детектирования составил 10^{-7} М [27]. В этой системе для

возбуждения флуоресценции буфера использовался 8 мВт He—Cd лазер с линией 325 нм и капилляр, установленный под углом Брюстера для снижения паразитного света, идущего на ФЭУ. Перед ФЭУ устанавливался пространственный фильтр и интерференционный фильтр на 405 нм. По сравнению с прямой ИЛФ невысокий предел детектирования для непрямого измерения флуоресценции получается в результате шума фона флуоресценции, вызванного нестабильностью лазерного излучения и фотообесцвечиванием красителей. Поэтому не прямое детектирование флуоресценции не часто используется в КЭ.

Детектирование после капилляра

Было разработано несколько подходов для постколлоночного детектирования ИЛФ, но только один метод получил широкое применение. Во всех случаях целью ставилось пространственно или спектрально отделить сигнал флуоресценции от высокого фонового сигнала, и лучшая система получилась при использовании проточной кюветы. Такая кювета изготавливается из кварцевых прямоугольных пластин и в нее вставляется капилляр (рис. 5). При электрофорезе через кювету прокачивается буферный раствор, который увлекает за собой выходящие из капилляра соединения. Возбуждающий луч фокусируется в кювету с помощью линзы ниже торца капилляра. Оптика для сбора флуоресценции устанавливается перпендикулярно относительно луча лазера.

Высокая чувствительность при детектировании в проточной кювете достигается благодаря существенному снижению фона, причиной которого являлись преломление, отражение и рассеяние света капилляром. Так как кювета имеет плоские и параллельные грани, свет, отраженный от границы раздела кювета/буфер, из-за небольшой разницы в показателях преломления практически не попадает в собирающий микрообъектив. К тому же проточная кювета имеет свойство гидродинамической фокусировки, которое предотвращает размывание выходящих из капилляра компонентов и сохраняет высокую эффективность разделения. Эти преимущества проточной кюветы позволили достичь предельной чувствительности и привели к детектированию отдельной молекулы в КЭ. В более ранних работах [28] отдельные молекулы детектировались при прокачке шприцем через капилляр раствора красителя, и только в проточной кювете удалось детектировать отдельные молекулы в условиях КЭ [29].

Для одномолекулярного детектирования использовалась кювета со стороной 1 мм и толщиной стенок 150 мкм. В качестве флуорофора использовался Б-фикоэритрин, который возбуждался He—Ne лазером (543 нм) мощностью 2 мВт. Из-

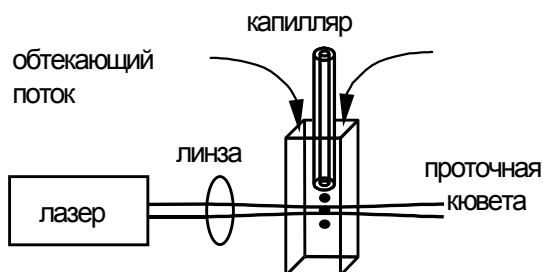


Рис. 5. Схема проточной кюветы с прокачкой буферного раствора, который увлекает за собой выходящую из капилляра пробу (аналит)

лучение фокусировалось в кювете в пятно 30 мкм примерно на 20 мкм ниже торца капилляра. Флуоресценция собиралась двумя микрообъективами по обеим сторонам кюветы, проходила через узкополосные светофильтры и попадала на диафрагму, снижавшую рассеянное излучение. В качестве фотоприемников использовались два ФЭУ, связанные суммирующей цепью, а для выделения всплесков флуоресценции на фоне шумов ФЭУ применялся цифровой гауссовый фильтр. Было показано, что в связи со стохастическими флуктуациями в количестве вводимых в капилляр молекул вероятность детектирования отдельной молекулы составляет 50 %.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Электрохимическое детектирование не является оптическим методом и может быть разделено на три главные категории: потенциометрия, детектирование по электропроводности (кондуктометрия) и амперометрия. Вообще кондуктометрические и потенциометрические детекторы обеспечивают хорошую чувствительность. Амперометрическое детектирование, с другой стороны, является селективным, и его можно настроить на интересующий аналит. Главное преимущество электрохимического детектирования состоит в его высокой селективности и способности регистрировать многие электроактивные вещества без предварительной модификации пробы. В то время как были достигнуты некоторые успехи, использование электрохимического детектирования в КЭ может оказаться чрезвычайно сложным и утомительным, т. к. подготовка электросенсора включает сложное изготовление самого сенсора и требует точного пространственного юстирования электрода относительно капилляра.

Потенциометрическое детектирование

Потенциометрические детекторы, впервые использованные для КЭ в 1990 г. [30], базируются на классических ион-селективных микроэлектродах и имеют способность обнаруживать чрезвычайно малые количества неорганических и органических ионов в микрообъемах ($\sim 0.5 \times 10^{-15}$ л для кальция). Сигнал генерируется при переходе иона из текущего потока образца в мембрану детектора. Присутствие аналита производит изменение в разнице потенциалов между внутренним раствором датчика и потоком образца. Разность потенциалов является мерой активности иона, данная уравнением Нернста и непосредственно связанная с концентрацией ионов. Отклик потенциометра при прохождении пробы происходит вообще достаточно

быстро, что предотвращает искажение формы пика и позволяет получить количественную информацию относительно концентрации аналита. Все же неудобства потенциометрических микродатчиков включают сложную подготовку датчика, процедуры обработки (т. е. подготовку ион-селективной мембранной фазы микроэлектрода) и сложные микронные манипуляции, необходимые для юстировки [30]. Другой недостаток потенциометрического детектирования — ограниченный срок службы сенсора, который при нормальных условиях КЭ составляет приблизительно 2–3 дня.

Детектирование по электропроводности

Детектирование по электропроводности было одним из первых методов детектирования, примененных в КЭ, и хорошо подходит для анализа ионов, потому что ионы не имеют, по существу, никакого поглощения в УФ и способности флуоресцировать. Это универсальный и относительно простой способ детектирования, где обычно используются два электрода, находящихся в контакте с раствором электролита, между которыми приложен постоянный электрический потенциал. Когда проба, отличающаяся своей электропроводностью, проходит между электродами, между ними изменяется напряжение, которое прямо пропорционально концентрации ионов пробы. Это позволяет точно определять абсолютные концентрации в смеси при помощи внутреннего стандарта, без отдельной калибровки по каждому компоненту. Предел детектирования по электропроводности находится между 10^{-6} и 10^{-7} М для электрокинетического введения пробы. В работе [31] показан детектор, который построен из готовых доступных компонентов. Электроды из платиновой проволоки были вставлены в отверстия в стенках капилляра друг напротив друга. Отверстия были сформированы излучением CO_2 -лазера и после установки электродов заливались эпоксидной смолой. Улучшение чувствительности до 10^{-7} – 10^{-8} М достигается при использовании детектирования с подавлением электропроводности при анализе анионов [32]. Для подавления электропроводности буферный противоион замещается при электродиализе, производя слабодиссоциированную кислоту (анализ анионов) или щелочь (анализ катионов). В результате общее количество проводящего электролита (буфера) снижается и различие в электропроводности между ионом пробы и "фоном" увеличивается. Однако техника детектирования с подавлением электропроводности является постколлоидной, что вызывает дополнительное размывание фронта пика и ограничивает эффективность разделения, вызывая диффузию на стыке мембрана/детектор.

Амперометрическое детектирование

Электрохимическое детектирование в амперометрической форме позволяет осуществлять чувствительное детектирование многих биологически важных молекул. Амперометрическое детектирование основано на переходе электрона от анализируемой пробы на поверхность (или наоборот) электрода, которая находится под воздействием постоянного тока. В результате перехода электрона на электроде происходит окислительно-восстановительная реакция, которая генерирует ток, напрямую зависящий от концентрации аналита. В самой простой форме детектора рабочий электрод поддерживается на одном потенциале относительно опорного электрода, и ток регистрируется как функция времени при выходе аналитов из капилляра. Основная трудность при объединении электрохимического детектирования с КЭ заключается в электрической изоляции рабочего электрода от приложенного к капилляру высоковольтного напряжения.

Недостатком амперометрических детекторов является сильное поглощение поверхностью электрода (электроды из углерода) промежуточных продуктов реакции аналита, что сокращает активность (переход электронов) электрода и осложняет детектирование. Эта проблема может быть уменьшена использованием пульсирующего амперометрического детектирования (ПАД), при котором работа детектора разбита на три шага (шаг 1 — детектирование; шаг 2 — анодная чистка поверхности электрода; шаг 3 — реактивация) [33]. Такая техника детектирования в КЭ была показана для анализа углеводов. При использовании золотых электродов при ПАД пределы детектирования по массе составили 0.28 фмоль (10^{-6} М) для инозита и 1.21 фмоль (2×10^{-6} М) для мальтозы [34]. В амперометрии работа на капиллярах с уменьшенным диаметром (5–15 мкм) вследствие увеличения кулоновской эффективности показывает повышенную чувствительность и массовые пределы детектирования.

РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Детектирование по показателю преломления в силу чувствительности к массовому количеству вещества является потенциальным кандидатом на использование в КЭ в качестве универсального детектирования. Было предпринято много попыток, чтобы миниатюризировать рефрактометрические детекторы (РД) для возможности работы с нанолитровыми объемами. Для этой цели прекрасно подходят лазеры. Было разработано много подходов в построении РД для КЭ, включая метод градиента концентрации, который исследует осе-

вые оптические возмущения, образующиеся при проходе зоны пробы [35], и использование оптического волокна [36], которое отслеживает своим перемещением отклонение прошедшего луча при изменении показателя преломления. В то же время эти подходы имеют ограничения в чувствительности.

Одно из решений, которое позволяет детектировать слабые изменения в показателе преломления внутри пиколитровых объемов, заключается в локализации интерференционной картины при дифракции лазерного луча. Если луч лазера под прямым углом сфокусировать линзой в капилляр, то в результате вокруг оси капилляра в перпендикулярной к нему плоскости получится интерференционная картина светлых и темных полос. Для данного капилляра положение этих полос зависит от показателя преломления среды, заполняющей капилляр и юстировки. Как следствие, появляется возможность с высокой чувствительностью измерять концентрацию аналита в капилляре, регистрируя смещения в положении полос интерференции [37]. В силу цилиндричности формы капилляра получаемая на воздухе интерференционная картина слишком сложна для интерпретации. Поэтому участок капилляра, в котором проходит детектирование, помещают в кювету с иммерсионной жидкостью, чтобы упростить картину интерференции и выбрать для работы более отчетливый участок интерференционных полос. При этом осуществляется термический контроль кюветы. Для аналитов, протекающих в капилляре под давлением, предел детектирования составил 3×10^{-8} единиц показателя преломления и линейность составила 4 порядка [37]. Однако предел детектирования ухудшается примерно в 10 раз во время электрофореза вследствие температурных флуктуаций и смещения капилляра при приложении высоковольтного напряжения. Чувствительность для этой схемы при разделении 5 натуральных сахаридов составила 10^{-5} М для сахарозы.

Другая техника для регистрации изменений показателя преломления в капиллярах связана с использованием голографических решеток для получения двухлучевой интерференционной картины прошедшего через капилляр света. Такая схема позволила разделить и детектировать ионы металлов, используя голографическую решетку и фотодиодную линейку, которая определяет отклонение луча. В работе [38] показано применение такой схемы для КЭ на чипе. Главный недостаток голографической интерферометрии в КЭ — это все та же самая зависимость от оптического пути, которая в конечном счете ограничивает пределы детектирования для ультрамалых объемов.

В работе [39] показан другой подход к интерференционному детектированию с использованием отражения луча лазера в обратном направле-

нии. В этой схеме сфокусированный лазерный луч падает на поверхность капилляра, вызывая интерференцию двух обратно отраженных лучей от внешних поверхностей капилляра. Наблюдая за этой интерференционной картиной, можно регистрировать изменения показателя преломления. Основной недостаток такого детектирования состоит в более низкой чувствительности, чем в вышеописанных детекторах, и повышенной сложности оптического тракта.

В работе [40] представлен альтернативный подход измерения показателя преломления в капилляре, основанный на интерференции отраженного от наклонного капилляра лазерного луча. При использовании небольшого наклона заполненного жидкостью капилляра по направлению луча лазера получается высококонтрастная интерференционная картина, которая смещается в пространстве в ответ на изменение в оптическом пути, позволяя регистрировать изменения показателя преломления (рис. 6). Чувствительность такой схемы, по сути, никак не зависит от оптического пути для капилляров, внутренние диаметры которых составляют от 75 до 775 мкм, не требуется никакой особой оптической юстировки и специального полимерного покрытия для капилляра. Было проведено сравнение данной схемы рефрактометрирования с обычным фотометрическим детектором в КЭ. Предел детектирования оказался в 1.6–2.5 раз лучше, чем для фотометрического детектора с использованием 100 мкм капилляра. После уменьшения диаметра капилляра до 50 мкм и менее предел детектирования для интерференционных РД оказался по крайней мере в пять раз лучше, чем для фотометрического детектора. Кроме того, интерференционные РД способны к пикограммовым пределам детектирования по массе в нанолитровом объеме с минимальным пассивным тепловым контролем для анализа углеводов, органических красителей, кофеина и катионов.

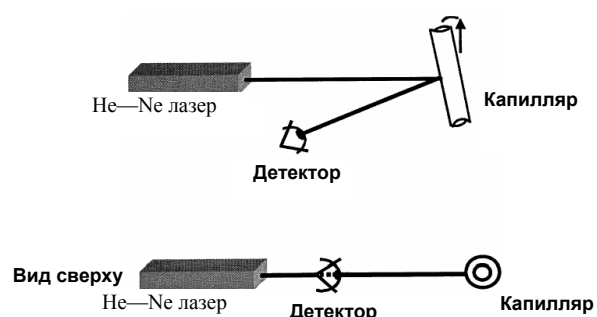


Рис. 6. Схема интерференционного измерения показателя преломления аналита в капилляре

Рефрактометрические детекторы являются, в общем, полезными системами, потому что они универсальны по своей природе, что расширяет их применимость. Кроме того, для работы с такими детекторами отпадает необходимость в химической модификации по сравнению с ИЛФ, что облегчает их использование.

ДЕТЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Использование в детектировании рамановской спектроскопии позволяет получить качественную информацию (т.е. структурные сведения) о форме разделяемых компонентов пробы. Однако химическое строение соединений, которые будут детектироваться, должно быть активным для рамановской спектроскопии, то есть внутренние колебания молекул пробы должны заметно изменять свою поляризуемость. При детектировании в этом методе регистрируют изменения интенсивности и длины волны рассеянного света, вызванные проходящими через зону детектирования веществами. В работе [41] показана рамановская система детектирования, где используется 40 мВт He—Cd лазер (442 нм), луч которого фокусируется объективом микроскопа в капилляр. Рассеянное излучение собирается жгутом из 200 мкм кварцевых волокон, которые направляют это излучение в монохроматор, после которого установлен ФЭУ. При использовании такой оптической системы в капилляре были установлены пределы детектирования 2.5×10^{-6} М для метила красного и метила оранжевого, которые имеют характерные рамановские спектры в кислых и щелочных растворах. Полученный концентрационный предел детектирования хорошо смотрится при сравнении с фотометрическим детектированием, но при этом имеется информация о структуре вещества. В другой системе детектирования [42] в качестве фотоприемника использовалась охлаждаемая ПЗС-камера, установленная на вертикальном микроскопе. Источником возбуждения служил 700 мВт YAG—Nd лазер (532 нм). Удалось разделить и детектировать рибонуклеотиды с пределом детектирования 5×10^{-6} М.

НЕТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В КЭ

Для КЭ также были предложены методы, использующие другие принципы регистрации пробы. Например, использовалось детектирование по ядерному магнитному резонансу (ЯМР) для анализа пептидов [43]. ЯМР-детектирование может использоваться в КЭ при остановке потока в капилляре и достигать нанограммовой чувствительно-

сти: для аргинина и триэтиламина 330 пмоль и 88 пмоль соответственно. Хотя другие методы более чувствительны (например, ИЛФ), используя ЯМР можно получить данные о структуре вещества. Другой пример детектирования в КЭ — радиоизотопное детектирование в реальном масштабе времени. Радиоизотопное детектирование — чрезвычайно чувствительная и высокоселективная техника, которая основана на измерении сцинтилляций раствора пробы. При распаде радионуклидов высвободившаяся энергия передается сцинтиллятору, который начинает испускать фотоны. В силу того что излучение фона по существу незначительно, достигается высокая чувствительность детектирования. В этом детектировании в качестве меток применяется изотоп фосфора ^{32}P . Вследствие большой энергии распада (1.7 МэВ) при детектировании соединений, меченных ^{32}P , детектирующее устройство можно установить снаружи капилляра, как это показано в работе. Глубина проникновения испускаемых бета-частиц составляет примерно 2000 мкм для воды и 950 мкм для плавленого кварца. Эти параметры хорошо подходят для измерения в КЭ, делая такое детектирование высокочувствительным для растворов, меченных ^{32}P . Пределы детектирования по концентрации для аденозинтрифосфата (АТФ) и гуанозинтрифосфата (ГТФ) составили примерно 10^{-10} М для 100 мкм капилляра. Несмотря на

высокую чувствительность, применение радиоизотопного детектирования ограничивается опасностью бета- и гамма-излучения.

Возбужденная лазером вибрация капилляра — другой метод детектирования, который может использоваться в КЭ. Такой способ детектирования можно рассматривать как нетрадиционное измерение показателя поглощения. В объеме детектирования 100 пл можно зарегистрировать 6 фг (13×10^{-8} М) красителя, который соответствует 1.5×10^{-5} единицам оптической плотности при использовании ион-аргонового лазера.

ВЫВОДЫ

Аппаратное обеспечение метода капиллярного электрофореза использует различные системы детектирования, в которых чаще всего применяются следующие методы регистрации: флуоресцентный, фотометрический, электрохимический и рефрактометрический.

Из-за широкого диапазона чувствительности детектирования (10^{-14} – 10^{-5} моль/л), позволяющего определять отдельные молекулы и разнообразия анализируемых соединений, специализированное применение прибора должно диктовать выбор схемы детектирования в КЭ (таблица).

Сравнение по предельной чувствительности различных методов детектирования в КЭ

Метод детектирования	Предел детектирования (М)
Прямое поглощение	10^{-5} – 10^{-6} (стандартный оптический путь), 10^{-6} (увеличенный оптический путь)
Непрямое поглощение	10^{-5} – 10^{-6}
Фототермическое преломление	10^{-7} – 10^{-8}
Прямая лазерная флуориметрия в капилляре	$< 10^{-13}$ (химическая модификация), 10^{-10} – 10^{-11} (собственная флуоресценция)
Лазерная флуориметрия после капилляра	10^{-16} (отдельные молекулы)
Непрямая лазерная флуориметрия	10^{-5} – 10^{-7}
Потенциометрия	10^{-7} – 10^{-8}
Кондуктометрия	10^{-7} – 10^{-8}
Амперометрия	10^{-7} – 10^{-8}
Рефрактометрия	10^{-5} – 10^{-6}
Рамановская спектроскопия	10^{-3} – 10^{-6} (необходима предконцентрация)
Радиочастоты (ЯМР)	10^{-3}
Радиоизотопы	10^{-10}
Индукцированная лазером вибрация капилляра	10^{-8} (химическая модификация), 10^{-5} (собственное возбуждение)

Среди многообразия методов детектирования КЭ наиболее распространенным является фотометрический. Однако использование этого метода не позволяет разрабатывать приборы, характеризующиеся высокой чувствительностью. Наиболее чувствительный метод детектирования в КЭ — индуцируемая лазером флуоресценция, дающая возможность обнаруживать отдельные молекулы, но в этом случае чаще всего необходима предварительная химическая модификация. Для универсального детектирования в КЭ подходят рефрактометрические системы или в некоторых случаях оптические системы, использующие короткий УФ (<190 нм), а также кондуктометрическое детектирование.

В последние годы активно развиваются мультикапиллярные системы, обладающие высокой чувствительностью и производительностью. Несмотря на то что КЭ становится рутинным и широко распространенным методом анализа, усовершенствование техники детектирования остается все еще актуальным вопросом.

Приложение. ПРОЦЕССЫ В КАПИЛЛЯРЕ

В то время как электрофорез обуславливает разделение частиц с различной подвижностью, электроосмос определяет течение буферного раствора в электрическом поле. В большинстве случаев при капиллярном электрофорезе на электрофоретическое перемещение ионов накладывается электроосмотический поток (ЭОП), от которого можно избавиться, покрывая внутренний диаметр капилляра полимерными соединениями. Этот поток зависит от распределения зарядов вблизи поверхности капилляра. Почти все поверхности несут на себе определенный заряд. В случае кварцевых капилляров — это отрицательные заряды (рис. 1), обусловленные диссоциацией силанольных групп. Этот поверхностный заряд локализуется в жидкости напротив соответствующих противоионов с противоположным зарядом. В таком двойном электрическом слое, схематически изображенном на рис. 1, преобладают положительные ионы, которые распределены между неподвижными и подвижными слоями. Если параллельно поверхности капилляра приложено электрическое поле, то оно притягивает противоионы из подвижного слоя вдоль оси и засасывает жидкость в капилляр. Поэтому в случае кварцевых капилляров электроосмотический поток направлен к катоду. Образуется очень плоский профиль потока. Это приводит к значительно меньшему уширению пиков, чем при гидродинамическом течении, при котором образуются сильно зависящие от радиуса капилляра и скорости течения параболические профили потока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mayer M.M., Miller J.A. // *Anal. Biochem.* 1970. N 36. P. 91–100.
2. Grant I.H., Steuer W.J. // *J. Microcol. Sep.* 1990. N 2. P. 74–80.
3. Tsudea T., Sweedler J.V., Zare R.N. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 2149–2152.
4. Taylor J.A., Yeung E.S. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 550. P. 831–837.
5. Chervet J.P., Van Soest R.E.J., Ursem M. LC Packings. Technical Communication, San Francisco, CA, 1990. 120 p.
6. Mainka A., Bachmann K. // *J. Chromatogr. A* 1997. V. 767. P. 241–247.
7. Hewlett-Packard Company, Peak. 2: 11. 1993. 25 p.
8. Xue Y., Yeung E.S. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66.
9. Wang T., Aiken J.H., Huie C.W., Hartwick R.A. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1372–1376.
10. Weinbenger R. *Practical Capillary Electrophoresis.* Academic Press, Boston, 1993.
11. Weston A., Brown P.R., Jandik P., Jones W.R., Heckenberg A.L. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 593. P. 289–295.
12. Jandik P., Jones W.R. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 546. P. 431–443.
13. Vorddran A., Oefner P., Scherz H., Bonn G. // *Chromatographia.* 1992. V. 33. P. 163–168.
14. Foret F., Fanali S., Naordi A., Bocek P. // *Electrophoresis.* 1990. N 11. P. 780.
15. Xue Y., Yeung E.S. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 2923.
16. Bornhop D.J., Dovichi N.J. // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 1632–1636.
17. Yu M., Dovichi N.J. // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. P. 37–40.
18. Yu M., Dovichi N.J. // *Anal. Chem.* 1989. V. 43. P. 196–201.
19. Chen M., Waldron K.C., Chao Y., Dovichi N.J. // *Electrophoresis.* 1994. V. 15. P. 1290–1294.
20. Bruno A.E., Paulus A., Bornhop D.J. // *Appl. Spectrosc.* 1991. V. 45. P. 462–467.
21. Yeung E.S., Wang P., Li W., Giese R.W. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 73. P. 608.
22. Hernandez L., Escalona J., Joshi N., Guzman N. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 183. P. 559.
23. Huang X.C., Quesada M.A., Mathies R.A. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 967.
24. Taylor J.A., Yeung E.S. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 1741.
25. Sweedler J.V., Shear J.B., Fishman H.A., Zare R.N., Scheller R.H. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 496.
26. Taylor J.A., Yeung E.S. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 956.
27. Kuhr W.G., Yeng E.S. // *Anal. Chem.* 1988. V. 60.

- P. 1832–1834.
28. Lee Y.-H., Maus R.G., Smith B.W., Winevordner J.D. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 4142–4149.
29. Chen D.Y., Dovichi N.J. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 690–696.
30. Haber C., Roosli S., Tsuda T., Scheidegger D. et al. // 12th Int. Symp. Capillary Chromatography. Kobe, Japan, 1990.
31. Haung X., Pang T.K., Gordaon M.J., Zare R.N. // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 2747–2749.
32. Dasgupta P.K., Bao L. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 1003–1011.
33. Ewing A.G., Mesaros J.M., Gavin P.F. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 527A–537A.
34. Lu W., Cassidy R.M. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 2878–2881.
35. Wu J., Pawliszyn J. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 224–227.
36. Buttry D.A., Vogelmann T.C., Chen G., Goodwin R. US Patent 5.600.433. 1997.
37. Bruno A.E., Krattiger B., Maystre F., Widmer H.M. // *Anal. Chem.* V. 63. P. 2689.
38. Bruggraf N., Krattiger B., De Melio A., De Rooij N., Manz A. // *Analyst.* 1998. V. 123. P. 1443–1447.
39. Deng Y., Li B. // *Appl. Opt.* 1998. V. 37. P. 998–1005.
40. Swinney K., Bornhop D.J. // *J. Microcol. Sep.* 1999. N 11. P. 596–604.
41. Chen C.Y., Morris M.D. // *Appl. Spectrosc.* 1998. V. 42. P. 515–518.
42. Kowalchuk W.K., Morris M.D. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 4255–4260.
43. Olson D.L., Peck T.L., Webb A.G., Sweedler J.V. // *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology.* Escom, Leiden, Netherlands, 1996. P. 730.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Козулин П.А., Курочкин В.Е.)

Санкт-Петербургский государственный институт точной механики и оптики (технический университет). (Золотарев В.М.)

Материал поступил в редакцию 31.03.2003.

METHODS OF ANALYSIS OF MULTICOMPONENT LIQUIDS

R. A. Kozulin, V. M. Zolotarev*, V. E. Kurochkin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

**Saint-Petersburg State Institute of Fine Mechanics and Optics (Technical University)*

Methods for analysis of multicomponent liquids are discussed. It is shown that to define the composition of such liquids, their separation with subsequent detecting separate components is necessary. The separation of components is achieved by capillary electrophoresis. Various detectors of electrophoretic peaks based on the combination of different methods are reviewed.