

ОТ РЕДАКЦИИ  
(избранное: монографии ученых ИАП РАН)



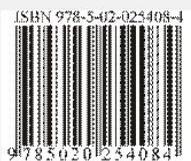
Борис Григорьевич Беленький (1926–2008 гг.) — доктор химических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, лауреат Государственной премии России, выдающийся ученый в области хроматографии и аналитической химии.

Б.Г. Беленький внес огромный вклад в разработку фундаментальных и прикладных проблем физической химии; им создана научная школа современного хроматографического анализа; разработаны новые направления аналитической химии; приборно-методическая база отечественной хроматографии и электрофореза; организовано производство новых хроматографических приборов и сорбентов.

Особую ценность представляют пионерские работы Б.Г. Беленького и его школы, связанные с оптимизацией хроматографических методов, которые принесли широкую известность их авторам в нашей стране и за рубежом: высокоэффективная тонкослойная хроматография, созданная на 10 лет раньше зарубежных работ; использование капиллярной жидкостной хроматографии в прецизионном анализе полимеров и производных аминокислот; хроматографическое фракционирование гетерополимеров в «критических» условиях; оптимизация градиентной хроматографии белков по длине колонки — высокоэффективная мембранная хроматография.

Редкий талант ученого, научная эрудиция, бесконечное обаяние позволили Б.Г. Беленькому создать научные коллективы единомышленников.

Б.Г. Беленький автор более 250 научных работ, 30 изобретений, им опубликованы четыре монографии, две из них в Нидерландах и США.



Б. Г. Беленький

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ  
КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**



Санкт-Петербург  
2009 г.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт аналитического приборостроения

Б. Г. Беленький

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ  
КАПИЛЛЯРНЫЙ  
ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**



Санкт-Петербург  
"Наука"  
2009

УДК 543

ББК 24.4

Б44

Рецензенты: *Л.Н. Галль, В.В. Малеев*Б44 **Беленький Б. Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез.** — СПб.: Наука, 2009. — 320 с.

ISBN 978-5-02-025408-4

Книга представляет собой практическое руководство по капиллярному электрофорезу — новому методу анализа, обладающему высокой разрешающей способностью и сочетающему преимущества электрофоретических методов разделения с возможностью автоматизации анализа и простотой количественного расчета, характерного для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Быстрота анализа и эффективность разделения в сочетании с широкой областью применения делают капиллярный электрофорез одним из наиболее совершенных аналитических методов.

Материал книги включает основы капиллярного электрофореза как метода анализа сложных биологических смесей и некоторые конкретные методики анализа.

Книга рассчитана на специалистов, работающих в области медицинского и биохимического анализа.

B. G. Belenkii

**HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

This book is a practical guide to capillary electrophoresis, a novel analytical technique with a high resolving power. Capillary electrophoresis combines the advantages of electrophoretic separation methods with the ability to automate the analysis and the simplicity of quantitation which are typical of high performance liquid chromatography.

Capillary electrophoresis combines fast analysis and efficient separation with wide applicability, making it one of the most advanced analytical techniques.

This book covers the principles of capillary electrophoresis as a preferred method to analyze complex biological mixtures as well as some examples of specific analytical methods.

This book is aimed at experts working in the field of medical and biochemical analysis.

ISBN 978-5-02-025408-4

© Б. Г. Беленький, 2009

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Список сокращений .....	7
Глава 1. <b>МЕТОД ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА (ВЭКЭ)</b> .....	9
I. Место ВЭКЭ в ряду аналитических методов .....	9
II. Физические основы метода ВЭКЭ .....	17
II.1. Электрофорез .....	17
II.2. Электроосмос .....	19
II.3. Особенности электрофоретических процессов в вариациях ВЭКЭ .....	22
II.4. Тепловые эффекты в ВЭКЭ .....	24
II.5. Экстраколоночное размывание зон .....	25
II.6. Параметры разделения .....	26
III. Особенности сепарационных механизмов в вариациях метода ВЭКЭ .....	27
IV. Некоторые методические вопросы ВЭКЭ .....	31

IV.1.	Устройство для капиллярного электрофореза .....	31
IV.2.	Чувствительность детектирования .....	33
IV.3.	Подготовка пробы для капиллярного электрофореза .....	34
IV.4.	Ввод пробы .....	34
IV.5.	Детекторы .....	36
	Литература .....	40
<b>Глава 2. МЕТОДИКИ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА .....</b>		
	<b>I. Матричные эффекты и разделение .....</b>	<b>42</b>
	<b>II. Капиллярный зонный электрофорез .....</b>	<b>43</b>
	II.1. Ионная сила пробы .....	45
	II.2. Белки .....	45
	II.3. Водородный показатель pH .....	46
	II.4. Вязкость и объем пробы .....	47
	II.5. Стэкинг и полевая инжекция .....	49
	<b>III. Мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография (МЭКХ) .....</b>	<b>56</b>
	III.1. Объем пробы и ПАВ в электрофоретическом буферном растворе .....	57
	III.2. Поверхностно-активные вещества и органические растворители в пробе .....	59
	III.3. Практические аспекты и примеры .....	60
	<b>IV. Капиллярный ионный электрофорез .....</b>	<b>61</b>
	IV.1. Фактор параллельного осмотического потока .....	62
	IV.2. Принцип детектирования на основе замещения коионов электролита .....	65
	IV.3. Методы ввода пробы .....	69
	IV.4. Примеры .....	74
	IV.5. Модификаторы электроосмотического потока для анионного анализа .....	83
	IV.6. Применение КИЭФ .....	84
	<b>V. Очистка пробы .....</b>	<b>87</b>
	V.1. Разбавление и прямой ввод пробы .....	87
	V.2. Экстракция, фильтрация и диализ .....	89
	V.3. Депротенизация с помощью органических растворителей .....	91
	<b>VI. Матрица пробы и точность .....</b>	<b>92</b>
	VI.1. Факторы, влияющие на воспроизводимость высоты пиков и на воспроизводимость времени миграции .....	92
	VI.2. Практические аспекты .....	93
	<b>VII. Практические рекомендации .....</b>	<b>94</b>
	VII.1. Средства, необходимые для работы .....	94
	VII.2. Уход за капиллярами и их использование .....	95
	VII.3. Электролиты .....	96
	Литература .....	97
<b>Глава 3. МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В КАПИЛЛЯРНОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗЕ .....</b>		
	<b>Введение .....</b>	<b>102</b>
	<b>I. Методы оптического детектирования для капиллярного электрофореза .....</b>	<b>104</b>
	I.1. Общие требования к характеристикам и конструкции .....	104
	I.2. Прямое и не прямое детектирование .....	107
	I.3. Детектирование по поглощению .....	108
	I.4. Детектирование по флуоресценции .....	119
	I.5. Другие способы оптического детектирования .....	133

II.	Методы электрохимического детектирования в ВЭКЭ .....	139
II.1.	Потенциометрическое детектирование .....	139
II.2.	Детектирование по электропроводности .....	148
II.3.	Амперометрическое детектирование .....	156
	Литература .....	161
<b>Глава 4.</b>	<b>ПРИМЕНЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПРОИЗВОДСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ .....</b>	<b>172</b>
	Введение .....	172
I.	Аттестация КЭ и вопросы чувствительности .....	174
I.1.	Аналитические проверки .....	174
I.2.	Повышение чувствительности .....	175
II.	Анализ фармацевтических препаратов и определение примесей в них .....	179
II.1.	Анализ основных компонентов и определение примесей .....	179
II.2.	Определение противоионов (ионный анализ) .....	184
II.3.	Определение физико-химических свойств .....	186
III.	Анализ природных лекарственных средств .....	186
IV.	Разделение гидрофобных и/или электрически нейтральных лекарственных препаратов .....	188
IV.1.	Электрокинетическая хроматография (ЭКХ) .....	188
IV.2.	Капиллярная электрохроматография примесей .....	190
IV.3.	Безводный капиллярный электрофорез .....	190
V.	Анализ ДНК и белков .....	191
V.1.	Антисенс ДНК .....	191
V.2.	Анализ пептидов и белков .....	193
VI.	Энантиомерные разделения .....	194
VI.1.	Селекторы на основе ЦД и краун-эфиров .....	194
VI.2.	Селекторы на основе полисахаридов, антибиотиков и белков .....	196
VI.3.	Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) и капиллярная электрохроматография (КЭКХ) .....	197
	Литература .....	198
<b>Глава 5.</b>	<b>КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДЛЯ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ .....</b>	<b>211</b>
	Введение .....	211
I.	Мониторинг лекарственных препаратов при лечении больного (МЛП) .....	213
I.1.	Противоэпилептические средства .....	214
I.2.	Противоастматические средства .....	216
I.3.	Анальгетики .....	217
I.4.	Иммуноподавляющие средства .....	217
I.5.	Антидепрессанты .....	218
I.6.	Бензодиазепины .....	219
I.7.	Антибиотики и противомикробные средства .....	219
I.8.	Противоаритмические и противогипертонические средства .....	220
I.9.	Средства, усиливающие функцию почек .....	221
I.10.	Противоопухолевые средства .....	222
II.	Метаболические исследования .....	223
III.	Применение в судебной медицине .....	229
III.1.	Экстренная токсикология .....	229
III.2.	Определение присутствия препаратов. Криминалистический анализ .....	231
	Литература .....	240

<b>Глава 6.    НОВЕЙШИЕ МЕТОДЫ КАПИЛЛЯРНОГО               ЭЛЕКТРОФОРЕЗА</b> .....	246
Введение .....	246
I.   Микрофлюидные аналитические системы .....	253
I.1. Безнасосная микрофлюидика .....	253
I.2. Лаборатории в формате чипа .....	256
I.3. Аналитические особенности МФАС .....	259
I.4. Конструкция и изготовление микрофлюидных чипов .....	263
I.5. Недостатки МФАС .....	271
I.6. МФАС в анализе гетерогенных проб .....	272
I.7. Последние достижения в МФАС .....	275
II. Мультикапиллярный электрофорез (МКЭФ) .....	281
II.1. МКЭФ и секвенирование ДНК .....	281
II.2. Системы детектирования в МКЭФ .....	288
II.3. Методы оптимизации МКЭФ .....	297
II.4. Перспективы МКЭФ .....	308
Литература .....	309

## TABLE OF CONTENTS

List of abbreviations .....	7
<b>Chapter 1.   METHOD OF HIGHLY EFFICIENT CAPILLARY               ELECTROPHORESIS (HECE)</b> .....	9
I.   The place of HECE among analytical methods .....	9
II. Physical basis of the method of HECE .....	17
II.1. Electrophoresis .....	17
II.2. Electrosmos.....	19
II.3. Peculiarities of electrophoretic processes in variations of HECE.....	22
II.4. Thermal effects in HECE .....	24
II.5. Extra column band broadening .....	25
II.6. Separation parameters .....	26
III. Features of separation mechanisms in variations of the HECE method	27
IV. Some methodological issues of HECE .....	31
IV.1. Device for capillary electrophoresis .....	31
IV.2. Detection sensitivity .....	33
IV.3. Sample preparation for capillary electrophoresis.....	34
IV.4. Sample input .....	34
IV.5. Detectors .....	36
Литература .....	40
<b>Chapter 2.   METHODS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS</b> .....	42
I.   Matrix effects and separation .....	42
II. Capillary zone electrophoresis .....	43
II.1. The ionic strength of the sample .....	45
II.2. Proteins .....	45
II.3. Hydrogen pH parameter .....	46
II.4. Sample viscosity and volume .....	47
II.5. Stacking and field injection .....	49
III. Micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) .....	56
III.1. Sample volume and surfactant in electrophoretic buffer solution .....	57
III.2. Surfactants and organic solvents in the sample .....	59

III.3.	Practical aspects and examples .....	60
IV.	Capillary ion electrophoresis .....	61
IV.1.	Parallel osmotic flow factor .....	62
IV.2.	The principle of detection based on the replacement of electrolyte coion .....	65
IV.3.	Methods of sample introduction .....	69
IV.4.	Examples .....	74
IV.5.	Modifiers of electroosmotic flow for anion analysis .....	83
IV.6.	CIE application .....	84
V.	Sample purification .....	87
V.1.	Dilution and direct injection of the sample .....	87
V.2.	Extraction, filtration and dialysis .....	89
V.3.	Deproteinization by organic solvents .....	91
VI.	Sample matrix and accuracy .....	92
VI.1.	Factors affecting the reproducibility of peak heights and the reproducibility of migration time .....	92
VI.2.	Practical aspects .....	93
VII.	Practical recommendations .....	94
VII.1.	Facilities required for the work .....	94
VII.2.	Capillary care and use .....	95
VII.3.	Electrolytes .....	96
Literature	.....	97
<b>Chapter 3.</b>	<b>METHODS OF DETECTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS</b> .....	<b>102</b>
Introduction	.....	102
I.	Methods of optical detection for capillary electrophoresis .....	104
I.1.	General requirements for performance and design .....	104
I.2.	Direct and indirect detection .....	107
I.3.	Absorption detection .....	108
I.4.	Fluorescence detection .....	119
I.5.	Other methods of optical detection .....	133
II.	Electrochemical detection methods in HECE .....	139
II.1.	Potentiometric detection .....	139
II.2.	Conductivity detection .....	148
II.3.	Amperometric detection .....	156
Literature	.....	161
<b>Chapter 4.</b>	<b>APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE PRODUCTION OF PHARMACEUTICAL DRUGS</b> .....	<b>172</b>
Introduction	.....	172
I.	CE certification and sensitivity issues .....	174
I.1.	Analytical checks .....	174
I.2.	Sensitization .....	175
II.	Analysis of pharmaceutical products and the determination of impurities in them .....	179
II.1.	Analysis of the main components and determination of impurities .....	179
II.2.	Determination of counterions (ion analysis) .....	184
II.3.	Determination of physical and chemical properties .....	186
III.	Analysis of natural medicines .....	186
IV.	Separation of hydrophobic and / or electrically neutral drugs .....	188
IV.1.	Electrokinetic chromatography .....	188
IV.2.	Capillary electrochromatography of impurities .....	190
IV.3.	Anhydrous capillary electrophoresis .....	190
V.	Analysis of DNA and proteins .....	191
V.1.	DNA antisense .....	191
V.2.	Analysis of peptides and proteins .....	193

VI. Enantiomeric separations .....	194
VI.1. Selectors based on CDs and crown ethers .....	194
VI.2. Selectors based on polysaccharides, antibiotics and proteins .....	196
VI.3. Micellar electrokinetic chromatography (MEC) and capillary electrochromatography (CEC) .....	197
Literature .....	198
<b>Chapter 5. CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF DRUG SUBSTANCE IN BIOLOGICAL LIQUIDS .....</b>	<b>211</b>
Introduction .....	211
I. Monitoring of drug substances in the treatment of the patient (MDS)..	213
I.1. Antiepileptic drugs .....	214
I.2. Anti-asthma drugs .....	216
I.3. Analgesics .....	217
I.4. Immunosuppressive drugs .....	217
I.5. Antidepressants .....	218
I.6. Benzodiazepines .....	219
I.7. Antibiotics and antimicrobials .....	219
I.8. Antiarrhythmic and antihypertensive drugs .....	220
I.9. Drugs that enhance kidney function .....	221
I.10. Antineoplastic agents .....	222
II. Metabolic studies .....	223
III. Application in forensic medicine .....	229
III.1. Emergency toxicology .....	229
III.2. Determination of the availability of drugs .....	231
Literature .....	240
<b>Chapter 6. THE NEWEST METHODS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS .....</b>	<b>246</b>
Introduction .....	246
I. Microfluidic analytical systems (MFAS).....	253
I.1. Pumpless microfluidic devices .....	253
I.2. Labs in chip format .....	256
I.3. Analytical features of MFAS .....	259
I.4. Design and manufacture of microfluidic chips .....	263
I.5. Disadvantages of MFAS .....	271
I.6. MFAS in the analysis of heterogeneous samples .....	272
I.7. Recent achievements in MFAS .....	275
II. Multicapillary electrophoresis (MCEF) .....	281
II.1. MCEF and DNA sequencing .....	281
II.2. Detection systems in MCEF .....	288
II.3. Methods for MCEF optimization .....	297
II.4. Perspectives of the MCEF .....	308
Literature .....	309

The book is freely available on the Network, placed in 3 files (in Russian):

[https://yadi.sk/i/k8V1cpeTT\\_8yig](https://yadi.sk/i/k8V1cpeTT_8yig)  
<https://yadi.sk/i/4udf4HtRdcGMu>  
<https://yadi.sk/i/iwaOSswrdcGQ2>

*Научное издание*

**Беленький Борис Григорьевич**  
**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ**  
**ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

*Утверждено к печати*

Институтом аналитического приборостроения РАН

Редактор издательства *Иванова О.В.*  
Компьютерный набор *Кузина Н.Н.*  
Компьютерная верстка *Беленков В.Д.*  
Дизайн обложки *Куспанова Б.С.*

Лицензия ИД № 02980 от 06 октября 2000 г.

Подписано к печати 3.03.2009.

Формат 60x90/16. Усл. печ. л.20.0. Уч.-изд. л. 15.5.

Тираж 300 экз. Тип. зак. №.....

Санкт-Петербургская издательская фирма "Наука" РАН  
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 1  
E-mail: main@nauka.nw.ru  
Internet: www.naukaspb.spb.ru

ISBN 978-5-02-025408-4



Отпечатано с готовых диапозитивов в типографии  
Издательства СПбГУ.  
199061, С.-Петербург, Средний пр. ВО, 41.

Книга в свободном доступе в Сети, размещена в 3 файлах:

[https://yadi.sk/i/k8V1cpeTT\\_8yig](https://yadi.sk/i/k8V1cpeTT_8yig)

<https://yadi.sk/i/4udf4HtRdcGMu>

<https://yadi.sk/i/iwaOSswrdcGQ2>