



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93400** (13) **C2**
(51) **МПК**
G01N 27/26 (2011.01)
B01D 57/02 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОЗЧИНІВ І ПРИСТРІЙ ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ

1

(21) a200811512
(22) 05.02.2007
(24) 10.02.2011
(86) PCT/RU2007/000065, 05.02.2007
(31) 2006106665
(32) 26.02.2006
(33) RU
(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.
(72) ЗІНЧЕНКО МІХАІЛ ІВАНОВІЧ, RU, КАМЕНЦЕВ ЯРОСЛАВ СЕРГЄЄВИЧ, RU, КАМЕНЦЕВ МІХАІЛ ЯРОСЛАВОВІЧ, RU, СЛЯДНЄВ МАКСІМ НІКОЛАЄВИЧ, RU, СТРОГАНОВ АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЄВИЧ, RU
(73) ЗІНЧЕНКО МІХАІЛ ІВАНОВІЧ, RU, КАМЕНЦЕВ ЯРОСЛАВ СЕРГЄЄВИЧ, RU, КАМЕНЦЕВ МІХАІЛ ЯРОСЛАВОВІЧ, RU, СЛЯДНЄВ МАКСІМ НІКОЛАЄВИЧ, RU, СТРОГАНОВ АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЄВИЧ, RU
(56) SU 1827636, 15.07.1993, A1
SU 500502, 25.01.1976, A
CA 2484804, 11.12.2003, A1
(57) 1. Спосіб електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів, що включає виконання калібрувальних і аналітичних вимірювань, що складаються з промивання капіляра розчином електроліту, введення в заповнений електролітом капіляр розчину калібрувальної суміші при калібрувальних вимірюваннях і введення розчину проби при аналітичних вимірюваннях, електрофоретичного розділення компонентів введених розчинів в капілярі під впливом прикладеної між кінцями капіляра напруги, детектування і вимірювання значень часу виходу компонентів введених розчинів; ідентифікацію компонентів проби за часом виходу, який **відрізняється** тим, що при промиванні капіляра розчином електроліту визначають величину потенціалу течії шляхом вимірювання різниці потенціалів між кінцями капіляра при певній різниці тисків між вказаними кінцями капіляра, причому одержане значення величини потенціалу течії використовують при ідентифікації компонентів проби шляхом порівняння величин потенціалу течії, виміряних при промиванні перед калібрувальними і аналітичними вимірюваннями.

2

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що промивання капіляра розчином електроліту здійснюють до тих пір, поки значення потенціалу течії не досягне заданої величини.
3. Спосіб за п.2, який **відрізняється** тим, що вказану задану величину потенціалу течії вибирають рівною або меншою від величини потенціалу течії, виміряної при промиванні капіляра розчином електроліту перед електрофоретичним розділенням калібрувальної суміші.
4. Спосіб за п.1 або 2, який **відрізняється** тим, що для ідентифікації компонентів проби використовують значення часу виходу відомих компонентів, виміряні при електрофоретичному розділенні калібрувальної суміші, з використанням поправок, визначуваних із співвідношення між величиною потенціалу течії, виміряною перед електрофоретичним розділенням проби, і величиною потенціалу течії, виміряною перед електрофоретичним розділенням калібрувальної суміші.
5. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що для визначення величини потенціалу течії кінці капіляра поміщають в посудини з електролітом і вводять в електричний контакт із засобами вимірювання потенціалу течії так, щоб засоби вимірювання потенціалу течії і електроліт, що знаходиться в посудинах і капілярі, утворювали замкнуте вимірювальне електричне коло, а при електрофоретичному розділенні розмикають вказане вимірювальне електричне коло, причому посудини з електролітом, в які поміщають кінці капіляра, вводять в електричний контакт з джерелом високої напруги так, щоб джерело високої напруги і електроліт, що знаходиться в посудинах і капілярі, утворювали замкнуте високовольтне електричне коло.
6. Пристрій для електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів, що включає капіляр, посудини для електроліту і проб, засоби встановлення капіляра і посудин, виконані зі здатністю поміщення кінців капіляра у вказані посудини, засоби утворення потоку електроліту через капіляр, засоби створення напруги між кінцями капіляра, пов'язаний з капіляром детектор і систему керування і обробки сигналів, який **відрізняється** тим, що він містить засоби вимірювання потенціалу течії, виконані зі здатністю вимірюван-

(19) **UA** (11) **93400** (13) **C2**

ня різниці потенціалів між кінцями капіляра і з можливістю утворення електричного зв'язку з кінцями капіляра при промиванні таким чином, що вказаними засобами вимірювання потенціалу течії і електролітом, що знаходиться в посудинах і в капілярі, утворене вимірювальне електричне коло, а засоби утворення потоку електроліту через капіляр виконані з можливістю створення і підтримки певної різниці тисків між кінцями капіляра, причому засоби виміру потенціалу течії забезпечені засобами розмикання вказаного вимірювального ланцюга під час проведення електрофоретичного аналізу.

7. Пристрій за п.6, який **відрізняється** тим, що засоби встановлення капіляра і посудин виконані з

можливістю забезпечення пневматичного зв'язку внутрішньої порожнини посудини з розчином, в яку поміщений один з кінців капіляра, із засобами утворення потоку електроліту через капіляр, а засоби утворення потоку виконані з можливістю підтримки заданого тиску в цій порожнині.

8. Пристрій за п.6, який **відрізняється** тим, що вказані засоби розмикання містять першу і другу посудини для електроліту, встановлені з можливістю поміщення кінця капіляра в першу посудину при вимірюванні потенціалу течії і в другу посудину при електрофоретичному розділенні, а у вказану першу посудину встановлений вимірювальний електрод.

Винахід відноситься до аналітичної хімії, зокрема, до методу капілярного електрофорезу, і може бути використаний для виконання аналізів багатоконпонентних розчинів.

Відомі варіанти реалізації способу електрофоретичного визначення складу багатоконпонентних розчинів (1, 2, 3), які базуються на розділенні компонентів складних сумішей у кварцовому капілярі під дією прикладеного електричного поля високої напруги. У згаданих варіантах способу пробу аналізованого розчину вводять в капіляр, заздалегідь промитий і заповнений розчином електроліту, називаним також буферним розчином або буфером. Після прикладення до кінців капіляра високої напруги компоненти суміші починають рухатися в капілярі з різною швидкістю. При досягненні рухомих компонентом проби зони детектування, віддаленої від вхідного отвору капіляра на задану відстань, здійснюють детектування цього компоненту, тобто вимірюють амплітуду сигналу детектора, залежну від кількості компоненту в пробі, а також вимірюють час виходу цього компоненту проби, рівний інтервалу часу між початком електрофоретичного розділення і моментом детектування цього компоненту. При використанні фотометричного, флуориметричного або іншого оптичного детектора зона детектування, як правило, знаходиться в капілярі. При використанні маспектрофотометричного детектора зона детектування знаходиться на виході з капіляра. Розгортку в часі сигналу детектора при проходженні одиночного компоненту називають електрофоретичним піком. Зареєстрована розгортка в часі сигналу детектора називається електрофореграмою, і служить для якісної ідентифікації піків і кількісного визначення речовин, відповідних різним пікам. Для ідентифікації різних компонентів проби використовують зіставлення їх значень часу виходу з часом виходу компонентів калібрувальних (градувальних) розчину, а порівняння амплітуд сигналів детектора, отриманих при електрофоретичних розді-

леннях калібрувальних (градувальних) розчинів і проб, використовують для визначення кількості ідентифікованих компонентів в пробі. Відомий патент US (5), в якому описані спосіб і пристрій для вимірювання і контролю електроосмотичного потоку в реальному часі.

При електрофоретичному розділенні розчинів швидкість переміщення зарядженої частинки в капілярі складається алгебраїчно із швидкості електроміграції частинки, яка залежить тільки від властивостей самої частинки (її заряду, маси і конфірмації), і швидкості переміщення електроосмотичного потоку (ЕОП), яка залежить від властивостей капіляра. Швидкість ЕОП при заданому складі і концентрації буферного електроліту визначається рівнянням:

$$A_{\text{eof}} = \zeta \frac{\varepsilon E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

де A_{eof} - швидкість ЕОП, ζ - електрокінетичний потенціал поверхні, ε - діелектрична постійна розчину, E - напруженість електричного поля, η - в'язкість розчину буферного електроліту. Рівняння показує, що швидкість ЕОП, за інших рівних умов, пропорційна величині електрокінетичного потенціалу (ζ -потенціалу) поверхні залежного від складу і структури подвійного електричного шару, що утворюється між внутрішньою поверхнею капіляра і електролітом. Рівноважне значення ζ -потенціалу для чистої поверхні капіляра за даних умов є величиною максимальною, при цьому швидкість ЕОП найбільша, а час виходу компоненту найменший. Якщо не застосовувати процедуру відмивання капіляра після аналізу, то при послідовних введеннях проби час виходу компоненту збільшується. Це свідчить про зменшення величини ζ -потенціалу внаслідок забруднення внутрішньої поверхні капіляра адсорбованими домішками, що змінили склад подвійного електричного шару. При значній зміні значень часу виходу компонентів внаслідок забруднення капіляра виникають помил-

ки ідентифікації компонентів багатокомпонентної суміші.

Найбільш близьким до пропонованого винаходу є спосіб (4), який включає виконання калібрувальних і аналітичних вимірювань що складаються з промивання капіляра розчином електроліту, введення в заповнений електролітом капіляр розчину калібрувальної суміші при калібрувальних вимірюваннях і введення розчину проби при аналітичних вимірюваннях, електрофоретичного розділення компонентів введених розчинів в капілярі під дією прикладеної між кінцями капіляра напруги, детектування і вимірювання значень часу виходу компонентів введених розчинів а також ідентифікацію компонентів проби за значеннями часу виходу.

Промивання капіляра після виконання аналізу забезпечує видалення з капіляра компонентів проби які мігрували назустріч електроосмотичному потоку, а також забезпечує очищення стінки капіляра від адсорбованих домішок. Для найбільш ефективного очищення капіляра, залежно від особливостей його експлуатації, підбирають різні промивні розчини. Зокрема, новий або тривалий час неживаний капіляр промивають послідовно розчином кислоти водою, розчином лугу знову водою і кондиціонують промиванням розчином електроліту. Необхідний ступінь очищення стики капіляра від адсорбованих домішок досягається емпіричним підбором¹ складу промивних розчинів і часу промивання кожним з них. Ефективність промивання з'ясовується після проведення чергового аналізу з відтворюваного значень часу виходу визначуваних компонентів.

Для реалізації вищезгаданого способу описаний пристрій (4), що включає капіляр, посудини для електроліту і проб, засоби встановлення капіляра і посудин, виконані з можливістю поміщення кінців капіляра у вказані посудини, засоби створення потоку електроліту через капіляр, засоби створення напруги між кінцями капіляра, зв'язаний з капіляром детектор, а також систему керування і обробки сигналів.

Істотними недоліками згаданого способу і пристроїв на його основі є те, що ефективність промивання з'ясовується тільки після проведення чергового аналізу а також той факт, що правильність емпіричного підбору умов промивання капіляра залежить від кваліфікації оператора, тобто не об'єктивізована. Результатом при недостатньому або невизначеному ступені очищення стінок капіляра є недостатня відтворюваність значень часу виходу визначуваних компонентів, яка з'ясовується лише теля виконання аналізу.

Причиною невідтворюваності є неконтрольований розкид від одного аналізу до іншого швидкості електроосмотичного потоку (ЕОП) A_{eof} , яка може змінюватися внаслідок сорбції з розчину проби на поверхню капіляра домішок, що порушують структуру подвійного електричного шару. Це утруднює ідентифікацію компонентів проби і збільшує похибку при кількісній оцінці концентрації компонентів, а в деяких випадках вимагає повторного аналізу проби.

Для компенсації неконтрольованих змін швидкості електроосмотичного потоку в прототипі (4)

використовують мітки електроосмотичного потоку (далі - мітки ЕОП і, тобто спеціально введені в пробу компоненти з нульовою або низькою електрорухливістю (швидкістю електроміграції) в даному буфері, за часом виходу яких можна оцінити швидкість електроосмотичного потоку і скоригувати значення часу виходу аналізованих компонентів, тобто ввести розрахункові поправки. Застосування вказаних міток ЕОП значно збільшує витрати на проведення аналізів. Крім того такий метод не універсальний, оскільки для різних типів буферного розчину потрібно вибирати різні мітки ЕОП. Недоліком способу з використанням міток ЕОП є також те що він не застосовний при від'ємних швидкостях електроосмотичного потоку, оскільки мітки ЕОП в цьому випадку взагалі не досягають зони детектування.

Задачею даного винаходу є підвищення відтворюваності електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів, а також підвищення продуктивності аналізів при електрофоретичному розділенні великої кількості проб.

Для вирішення поставленої задачі пропонується спосіб електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів що включає виконання калібрувальних і аналітичних вимірювань що складаються з промивання капіляра розчином електроліту введення в заповнений електролітом капіляр розчину калібрувальної суміші при калібрувальних вимірюваннях і введення розчину проби при аналітичних вимірюваннях, електрофоретичного розділення компонентів введених розчинів в капілярі під дією прикладеної між кінцями капіляра напруги, детектування і вимірювання значень часу виходу компонентів введених розчинів, ідентифікацію компонентів проби за значеннями часу виходу, причому при промиванні капіляра розчином електроліту визначають величину потенціалу течії шляхом вимірювання різниці потенціалів між кінцями капіляра при певній різниці тисків між вказаними кінцями капіляра.

Для реалізації вказаного способу електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів пропонується пристрій, що включає капіляр, посудини для електроліту і проб, засоби встановлення капіляра і посудин виконані з можливістю поміщення кінців капіляра у вказані посудини, засоби створення потоку електроліту через капіляр, засоби створення напруги між кінцями капіляра, зв'язаний з капіляром детектор, а також систему керування і обробки сигналів, причому в пристрій введені засоби вимірювання потенціалу течії, виконані з можливістю вимірювання різниці потенціалів між кінцями капіляра при певній різниці тисків між вказаними кінцями капіляра, і з можливістю забезпечення електричного зв'язку з кінцями капіляра при промиванні таким чином, що вказані засоби вимірювання потенціалу течії і електроліт що перебуває в посудинах і в капілярі, утворюють замкнуте вимірювальне електричне коло.

Суть заявленого винаходу полягає у вимірюванні потенціалу течії при промиванні капіляра розчином електроліту під час підготовки капіляра до аналізу.

Пропоноване рішення базується на існуванні однозначної відповідності між величиною потенціалу течії і величиною швидкості електроосмотичного потоку A_{eof} .

Дійсно, потенціал течії U_s , вимірюваний при промиванні капіляра розчином електроліту шляхом вимірювання різниці потенціалів. Між кінцями капіляра при певній різниці тисків P між вказаними кінцями капіляра, так само як і швидкість електроосмотичного потоку A_{eof} пропорційний електрокінетичному потенціалу (ζ -потенціалу) поверхні:

$$U_s = \zeta \frac{\varepsilon P}{4\pi\eta} \quad (2)$$

Суть заявленого винаходу пояснюється кресленнями на яких зображено:

Фіг.1 Графік зміни в часі різниці потенціалів між кінцями капіляра при серії послідовних промивань дуже забрудненого капіляра;

Фіг.2 Графік залежності часу виходу мітки ЕОП від величини потенціалу течії U_s ;

Фіг.3 Блок-схема заявленого пристрою з використанням високовольтного реле для розмикання вимірювального кола;

Фіг.4 Блок-схема пристрою з використанням вимірювальних електродів і засобу переміщення посудин для розмикання вимірювального кола;

Фіг.5 Графік зміни в часі різниці потенціалів між кінцями капіляра в початковий період режиму промивання при відсутньому, наростаючому і стабілізованому тиску між кінцями капіляра;

Фіг.6 Графік зміни в часі різниці потенціалів між кінцями капіляра при серії послідовних промивань чистого капіляра.

Для підготовки до електрофоретичного розділення капіляр промивають промивальними розчинами, вибраними відповідно до типу речовин, що адсорбувалися раніше, а також з типом буферного електроліту, що використовувався при попередніх аналізах.

Останньою обов'язковою стадією промивання є кондиціонування капіляра, тобто промивання його розчином того ж буферного електроліту, який буде використаний при подальшому аналізі. На завершальній стадії промивання при кондиціонуванні капіляра проводять визначення величини потенціалу течії U_s .

Для чистого капіляра значення U_s , отримане перед проведенням вимірювання калібрувального розчину позначимо U_{eq} . Промивання капіляра перед аналітичними вимірюваннями проводять до тих пір, поки U_s не досягне заданого порогового значення U_{so} .

В процесі промивання величина потенціалу течії прямує до граничного значення, що відповідає рівноважному значенню ζ -потенціалу. На Фіг.1 зображена типова зміна потенціалу течії при послідовних промиваннях дуже забрудненого капіляра. Видно, що при послідовних промиваннях потенціал течії послідовно наростає, прямує до рівноважного значення.

Винахід передбачає щонайменше дві можливості реалізації задачі підвищення відтворюваності електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів шляхом визначення потенціалу течії.

У першому випадку за рахунок виконання промивання капіляра розчином електроліту до досягнення граничного значення потенціалу течії, рівному величині, отриманій перед виконанням електрофоретичного розділення калібрувального (градувального) розчину, знижують розкид швидкостей електроосмотичного потоку і, отже, значень часу виходу компонентів проби до нехтовно малого рівня. У другому випадку промивання проводять до досягнення значення потенціалу течії дещо меншого від граничного, а для ідентифікації компонентів використовують поправки, визначувані із співвідношення граничної величини потенціалу течії і реально досягнутої при промиванні. У обох випадках використовують описаний вище однозначний зв'язок між швидкістю електроосмотичного потоку і величиною потенціалу течії. На Фіг.2 показана зміна швидкості електроосмотичного потоку, що характеризується часом виходу мітки ЕОП при різних значеннях потенціалу течії U_s . Дані отримані в експерименті, в якому забруднення капіляра моделювали шляхом введення в капіляр невеликих кількостей катіонів цетилтриметиламонію, які, сорбуючись на поверхні капіляра, частково порушували будову подвійного електричного шару, і зменшували величину потенціалу течії. Видно, що експеримент підтверджує наявність однозначної відповідності між величиною потенціалу течії і величиною швидкості електроосмотичного потоку. Таким чином, пропоноване в цьому винаході визначення величини потенціалу течії при промиванні капіляра дозволяє визначити, яка буде швидкість електроосмотичного потоку при подальшому електрофоретичному розділенні компонентів проби, і підвищити, тим самим, відтворюваність електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів.

Запропонований спосіб в обох випадках застосовний для будь-якого типу буферного електроліту. Нижче обидва варіанти розглянуто докладніше.

У першому випадку, переважному для забезпечення максимальної відтворюваності визначення складу багатокомпонентних розчинів, для ідентифікації компонентів проби використовують задані значення часу виходу відомих компонентів, а при промиваннях добираються однакової чистоти капіляра як перед розділенням розчинів калібрувальних сумішей, так і перед розділенням проб, компоненти яких підлягають ідентифікації і кількісному визначенню. Як критерій досягнення однакової чистоти капіляра використовують величину допустимого відхилення потенціалу течії dU_s від рівноважного значення U_{eq} , що характеризує чистий капіляр. В цьому випадку вибирають таке порогове значення U_{so} , яке менше від рівноважного значення потенціалу течії U_{eq} на вказану величину допустимого відхилення dU_s , тобто $U_{so} = U_{eq} - dU_s$.

Як задані значення часу виходу відомих компонентів можуть використовуватися літературні або інші апріорні дані. У переважному варіанті винаходу вказані задані значення часу виходу відомих компонентів визначають експериментально при електрофоретичному розділенні калібрувальної суміші цих відомих компонентів, причому перед

вказаним розділенням калібрувальної суміші проводять промивання з вимірюванням потенціалу течії до досягнення порогової величини потенціалу течії U_{so} .

У першому випадку реалізації винаходу для забезпечення високої чистоти капіляра і підвищення відтворюваності як допустиме відхилення потенціалу течії dU_s від рівноважного значення U_{eq} вибирають величину, що має порядок величини похибки вимірювання потенціалу течії.

Проте, при виконанні електрофоретичного розділення розчинів з невеликою кількістю компонентів, значення часу виходу яких значно розрізняються, в першому випадку реалізації винаходу, як правило, збільшують величину допустимого відхилення dU_s з метою скорочення витрат часу на промивання. Для цього визначають допустимий розкид значень часу виходу компонентів проби, в межах якого не виникає помилок ідентифікації компонентів при використанні заданих значень часу виходу відомих компонентів, наприклад, виміряних при розділенні розчину калібрувальної суміші відомих компонентів. Виходячи з допустимого розкиду значень часу виходу, визначають допустимий розкид швидкостей електроосмотичного потоку. Використовуючи залежність часу виходу мітки електроосмотичного потоку від потенціалу течії (Фіг.2), визначають допустиме відхилення потенціалу течії dU_s від рівноважного значення, що характеризує чистий капіляр.

На Фіг.1 порогова величина потенціалу течії, вибрана відповідно до першого випадку, відповідає першій пороговій величині U_{so-1} , яка досягається тільки при п'ятому промиванні. При подальших промиваннях зміна потенціалу течії неістотна, тому подальших промивань уникають. Таким чином, перший випадок реалізації винаходу забезпечує істотне підвищення відтворюваності електрофоретичного розділення за рахунок того, що розкид швидкостей електроосмотичного потоку не перевищує допустимої величини.

У другому випадку реалізації винаходу, переважному за продуктивністю при виконанні великого числа аналізів однотипних проб, при ідентифікації компонентів проби проводять зіставлення виміряних значень часу виходу компонентів і заданих значень часу виходу відомих компонентів з використанням поправок, визначуваних із співвідношення вимірної граничної величини потенціалу течії U_s із заданою величиною потенціалу течії U_{s-set} .

Вказані поправки визначають, використовуючи залежність швидкості електроосмотичного потоку від потенціалу течії. Вказану залежність визначають або розрахунковим методом, наприклад, з використанням формул (1) і (2), або визначають експериментально, наприклад, з використанням міток ЕОП при різних значеннях потенціалу течії (Фіг.2), або шляхом розділення контрольних розчинів з відомими компонентами при різних значеннях потенціалу течії. Використання вказаних поправок компенсує вплив розкиду швидкостей електроосмотичного потоку на значення часу виходу компонентів. Тому в другому випадку при промиваннях добиваються, щоб швидкість елект-

роосмотичного потоку досягла або перевищила мінімально допустиме значення, при якому загальний час розділення проби не перевищує заданий.

Використовуючи залежність часу виходу мітки електроосмотичного потоку від потенціалу течії (Фіг.2), за мінімально допустимою швидкістю електроосмотичного потоку визначають порогове значення U_{so} .

Так само, як і в першому випадку, доцільно визначати вказані задані значення часу виходу відомих компонентів експериментально при електрофоретичному розділенні калібрувальної суміші цих відомих компонентів причому перед вказаним розділенням калібрувальної суміші проводиться промивання з вимірюванням потенціалу течії до досягнення порогової величини потенціалу течії U_{so} , а виміряна перед завершенням промивання величина потенціалу течії U_{s-cal} фіксується, і використовується при ідентифікації компонентів проби невідомого складу, що розділяється, причому винахід передбачає два способи використання цієї величини при калібруванні. У першому вищезазначену задану величину потенціалу течії U_{s-set} , використовувати для визначення поправок при ідентифікації, приймають рівній вимірній перед розділенням калібрувальної суміші величині U_{s-cal} , а вказані задані значення часу виходу вибирають рівними значенням часу виходу відомих компонентів, виміряним при вказаному розділенні калібрувальної суміші. У другому як вказані задані значення часу виходу відомих компонентів вибирають значення часу виходу відомих компонентів, виміряні при електрофоретичному розділенні калібрувальної суміші відомих компонентів, з поправками, визначуваними із співвідношення величини потенціалу течії U_{s-cal} , визначено перед електрофоретичним розділенням калібрувальної суміші відомих компонентів, із заданою величиною потенціалу течії U_{s-set} . Другий спосіб калібрування доцільний у тому випадку, коли для калібрування потрібно провести розділення декількох калібрувальних розчинів відомих компонентів, а величини потенціалу течії U_{s-cal} , виміряні перед розділенням різних калібрувальних сумішей, розрізняються.

Як правило, в другому випадку реалізації винаходу порогове значення потенціалу течії істотно нижче, ніж в першому, і, отже, досягається значно раніше. На Фіг.1 порогова величина потенціалу течії, вибрана відповідно до другого варіанту, відповідає другій пороговій величині U_{so-2} яка досягається вже при другому промиванні. Таким чином, другий випадок реалізації винаходу дозволяє істотно підвищити продуктивність виконання великої кількості аналізів однотипних проб, і істотно підвищує відтворюваність електрофоретичного розділення за рахунок використання поправок компенсуючих вплив розкиду швидкостей електроосмотичного потоку на значення часу виходу компонентів.

На Фіг.3 показана блок-схема пристрою для електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних розчинів, що реалізовує заявлений спосіб.

Пристрій містить капіляр 1, поміщений в засоби 2 установки капіляра, посудини 3 і 3' для електроду, посудину 4 для проби, засоби 5 переміщення вказаних посудин, виконані з можливістю поміщення кінців капіляра у вказані посудини.

Засоби 6 утворення потоку електроліту через капіляр зв'язані з тією посудиною, в яку поміщений вхідний кінець капіляра 1 (на Фіг.3 і 4 лівий). З тими посудинами, в які поміщені кінці капіляра 1, електрично зв'язані засоби 7 створення напруги між кінцями капіляра.

Засоби 9 вимірювання потенціалу течії виконані з можливістю електричного зв'язку з кінцями капіляра 1 при промиванні. Пристрій містить детектор 8, виконаний з можливістю зв'язку з капіляром 1. Система 10 керування і обробки сигналів зв'язана з детектором 8, із засобами 7 створення напруги, а також із засобами 6 створення потоку електроліту через капіляр і із засобами 9 вимірювання потенціалу течії.

Засоби 5 переміщення посудин є пристроєм для переміщення посудин з розчинами, і виконуються відомим з рівня техніки чином, наприклад, із застосуванням електромеханічного приводу або пневмоприводу. Положення вибраної посудини, при якому вона підведена до вибраного кінця капіляра, далі називатимемо робочим положенням посудини.

Капіляр 1, як правило, виконується у вигляді кварцового капіляра із захисною полімерною оболонкою, видаленою на занурюваних торцях капіляра і на ділянці капіляра, пов'язаній з детектором 8 при використанні оптичного детектора.

Засоби 2 встановлення капіляра виконані з можливістю занурення кінців капіляра 1 в посудини 3 і 3', що знаходяться в робочому положенні, відділення внутрішньої порожнини щонайменше однієї з посудин, що знаходяться в робочому положенні, від навколишньої атмосфери і зв'язку вказаної внутрішньої порожнини із засобами 6 створення потоку електроліту через капіляр. У переважному варіанті конструкція засобів 2 установки капіляра передбачає розміщення капіляра 1 усередині каналу прокачування рідкого теплоносія із заданою температурою, що забезпечує кращу стабілізацію температури капіляра при електрофоретичному розділенні і зменшення розкиду значень часу виходу компонентів внаслідок неконтрольованої зміни температури.

Засоби 6 створення потоку електроліту через капіляр є пристроєм для створення і підтримки заданого перепаду тиску між кінцями капіляра, зануреними в посудини з розчинами і виконуються відомим з рівня техніки чином, наприклад із застосуванням компресора і датчика перепаду тиску з можливістю підтримки заданого тиску в згаданий внутрішній порожнині.

Засоби 7 створення напруги є стабілізованим джерелом високої напруги виконаним будь-яким відомим чином з можливістю установки вибраної амплітуди високої напруги в діапазоні від нульової до максимальної. Як правило, максимальна амплітуда лежить в діапазоні 20-40 кіловольт. У переважному варіанті засоби 7 створення напруги виконані з можливістю перемикання полярності

високої напруги, прикладеної між кінцями капіляра 1. Засоби 7 створення напруги оснащені електродами 11, встановленими з можливістю занурення їх кінців в посудини 3 і 3', що знаходяться в робочому положенні. Як електроди 11, як правило, використовують платинові електроди.

Засоби 9 вимірювання потенціалу течії включають пристрій 12 вимірювання різниці потенціалів між кінцями капіляра і виконані відомим з рівня техніки чином, наприклад у вигляді диференціального підсилювача з великим вхідним опором, що значно перевищує електричний опір заповненого електролітом капіляра. Оскільки електричний опір капіляра, заповненого електролітом, може досягати декількох сотень мегаом у переважному варіанті вхідний опір підсилювача вибирають в діапазоні десятків гігаом. Засоби вимірювання потенціалу течії, електроліт в посудинах 3, встановлених в робоче положення, і заповнений електролітом капіляр 1 утворюють вимірювальне електричне коло.

Засоби 9 вимірювання потенціалу течії включають також засоби 13 розмикання вимірювального електричного ланцюга виконані з можливістю запобігати дії високої напруги на вказаний пристрій 12 вимірювання різниці потенціалів.

Засоби 13 розмикання вимірювального електричного ланцюга можуть виконуватися будь-яким відомим чином, наприклад, з використанням високовольтного реле, електрично зв'язаного щонайменше з одним з електродів 11.

У варіанті винаходу, переважному по точності вимірювання потенціалу течії, представлений альтернативний спосіб комутації електричних ланцюгів високовольтною, використовуваною при електрофоретичному розділенні, і низьковольтною, вимірником, використовуваною при промиванні. Засоби розмикання вимірювального електричного ланцюга включають вимірювальні електроди 14 (Фіг.4), електрично зв'язані з пристроєм 12 вимірювання різниці потенціалів засобів 9 вимірювання потенціалу течії і встановлені в заповнених буферним електролітом посудинах 3 і 3', які за допомогою засобів 5 переміщення посудин встановлюються в робоче положення при кондиціонуванні капіляра 1 і вимірюванні в ньому потенціалу течії. Перед подачею на електроди 11 високої напруги в робоче положення встановлюються посудини 4 і 4' з буферним електролітом, а посудини 3 і 3' з вимірювальними електродами 14 виводяться з робочого положення, внаслідок чого вимірювальне електричне коло виявляється розімкненим. Як вимірювальні електроди 14 використовують електроди з малою залишковою поляризацією, наприклад, хлор-срібні, що зменшує похибку вимірювання потенціалу течії.

Як детектор 8 використовують будь-який відомий тип детектора для капілярного електрофорезу, наприклад, оптичний, електрохімічний або мас-спектрометричний. Фахівцям зрозуміло що у разі використання мас-спектрометричного детектора при розділенні тільки вхідний кінець капіляра поміщений в посудину з буферним електролітом, а засоби вимірювання потенціалу течії виконуються з урахуванням сумісності з вхідним інтерфейсом

мас-спектрометричного детектора. Система 10 керування і обробки сигналів виконується відомим з рівня техніки чином, наприклад з використанням мікропроцесорного контролера і персонального комп'ютера.

Розглянемо докладніше приклад реалізації заявленого способу з використанням заявленого пристрою за Фіг.3.

Для підготовки до електрофоретичного розділення капіляр 1 промивають розчинами попереднього промивання вибраними відповідно до типу речовин, що адсорбувалися раніше, а також до типу буферного електроліту, що використався при попередніх аналізах. Новий або тривалий час не використовуваний капіляр заздалегідь промивають розчином кислоти, водою, розчином лугу, знову водою. Потім здійснюють кондиціонування капіляра, тобто промивання розчином того ж буферного електроліту, який буде використаний при подальшому аналізі.

Промивки здійснюються таким чином вибрану промивальну посудину з розчином для наступного попереднього промивання або з буферним електролітом встановлюють в робоче положення в якому кінець капіляра 1 виявляється зануреним в промивальний розчин вибраної посудини, а внутрішня порожнина вибраної посудини відокремлена від навколишнього середовища і пневматично зв'язана із засобами 6 створення потоку електроліту через капіляр, які створюють надлишковий тиск, що витісняє вказаний промивальний розчин через капіляр 1 в зливну посудину (на фігурі не показано).

На завершальній стадії промивання при кондиціонуванні капіляра проводять визначення величини потенціалу течії. Для цього в робоче положення навпроти вхідного і вихідного кінців капіляра 1 встановлюють посудини 3 і 3' з буферним електролітом, в який занурюють кінці капіляра. Синхронно з кінцями капіляра в посудину з розчином буферного електроліту потрапляють і кінці електродів 11 Засоби 7 створення напруги від'єднують від електродів за допомогою високовольтного реле 13, що входить до засобів вимірювання потенціалу течії, причому засоби 9 вимірювання потенціалу течії замикають вимірювальне електричне коло, що включає електроди 11 і буферний електроліт в обох вказаних посудинах і в капілярі. Засоби 6 створення потоку за допомогою створення нульового перепаду тиску між кінцями капіляра забезпечують нульовий потік через капіляр. При цьому засоби вимірювання потенціалу течії вимірюють величину фонові різниці потенціалів між кінцями капіляра, відповідну на Фіг.5 ділянці 0-10сек. Потім засоби 6 створення потоку збільшують різницю тиску між кінцями капіляра від нульової до вибраної величини, забезпечуючи наростання швидкості потоку буферного електроліту через капіляр. На Фіг.5 видно, що зростання різниці тисків між кінцями капіляра на ділянці 10-13,5сек супроводжується пропорційним приростом різниці потенціалів між кінцями капіляра. Після досягнення вибраної величини різниці тисків засоби 6 створення потоку підтримують вказану вибрану різницю тиску між кінцями капіляра і забезпечують

вибрану швидкість потоку буферного електроліту через капіляр. Підтримка постійної швидкості потоку на Фіг.5 відповідає ділянці 13,5-30сек. Видно, що сталій швидкості потоку відповідає стала (робоча) різниця потенціалів між кінцями капіляра. При цьому пристрій вимірювання різниці потенціалів вимірює величину робочої різниці потенціалів між кінцями капіляра при підтримці вибраної різниці тисків між ними. Система керування і обробки сигналів 10 отримує вимірні дані і обчислює потенціал течії віднімаючи з величини робочої різниці потенціалів величину фонові різниці потенціалів.

На Фіг.6 показана зміна в часі величин різниці потенціалів між кінцями чистого капіляра при перемінній наявності і відсутності перепаду тиску між його кінцями. Фонові різниці потенціалів відповідають ділянки меандрів з низькими значеннями а робочою - з вищими значеннями різниці потенціалів. Видно що як фонові, так і робочі різниці потенціалів з часом змінюються внаслідок дрейфу вимірювальної системи, при цьому значення потенціалу течії залишається постійним. Тому в переважному варіанті для підвищення точності вимірювання потенціалу течії проводять серію послідовних промивань, причому при наступному промиванні через заданий проміжок часу після його початку різницю тисків між кінцями капіляра скидають до нуля і знову вимірюють фонову різницю потенціалів. Вимірюючи таким чином зміну фонові різниці потенціалів використовується для корекції обчислюваної величини потенціалу течії, що значно зменшує похибки, пов'язані із згаданим дрейфом.

Якщо вимірний і скоригований таким чином потенціал течії U_5 виявиться рівним або перевищить заздалегідь задане порогове значення U_{s0} процедуру промивання завершують. Якщо ж U_5 виявиться меншим від заданого порогового значення U_{s0} , починають нове промивання, в результаті якого будуть виміряні нові значення фонових і робочих різниць потенціалів, а також визначено нове досягнуте значення U_5 . Вся процедура повторюється до тих пір, поки U_5 не досягне або не перевищить заданого порогового значення U_{s0} .

Після завершення промивання капіляра проводять дозоване введення вибраної проби в капіляр. Для цього за допомогою засобу 5 переміщення посудин встановлюють посудину 4 з вибраною пробю в робоче положення, відповідне вхідному кінцю капіляра 1. Як проба може бути вибраний або розчин калібрувальної суміші відомих компонентів, або розчин невідомого складу, компоненти якого підлягають ідентифікації і кількісному визначенню. Введення проби здійснюють будь-яким відомим чином, наприклад електрокінетичним. У переважному варіанті винаходу пробу вводять за допомогою засобів 6 створення потоку через капіляр, створюючи протягом вибраного інтервалу часу вибраний перепад тисків між кінцями капіляра 1. Після введення проби в робоче положення замість посудини з пробю 4 встановлюють посудину з буферним електролітом 3, розмикають електроди 11 від вимірювального кола і замикають їх на високовольтний ланцюг. Після чого проводять

процедуру електрофоретичного розділення, подаючи на електроди 11 вибрану високу напругу від засобів 7 створення напруги і передаючи сигнали з детектора 8 в систему 10 керування і обробки сигналів.

В результаті прикладення до кінців капіляра високої напруги компоненти введеної проби починають рухатися в капілярі 1 з різною швидкістю. Внаслідок того що величина сигналу детектора 8 залежить від кількості компоненту в пробі, при проходженні черговим рухомим компонентом проби зв'язаної з детектором 8 зони детектування капіляра 1 величина сигналу детектора 8 змінюється. Система 10 керування і обробки сигналів реєструє зміну сигналу детектора 8 в часі, і обчислює час виходу кожного компоненту проби, що детектується, рівний інтервалу часу між початком електрофоретичного розділення і моментом детектування цього компоненту.

Виміряні для різних компонентів проби значення часу виходу використовують для їх ідентифікації, зіставляючи із заданими часом виходу відомих компонентів, а виміряні амплітуди сигналів детектора використовують для розрахунку концентрацій ідентифікованих компонентів в пробі.

Як задані значення часу виходу відомих компонентів можуть використовуватися літературні або інші дані, отримані на іншому пристрої. У переважному варіанті винаходу вказані задані значення часу виходу відомих компонентів визначають при електрофоретичному розділенні калібрувальної суміші цих відомих компонентів, вироблюваному вищеописаним чином з використанням того ж пристрою, який використовується для електрофоретичного розділення проб. У першому вищеописаному випадку реалізації винаходу для ідентифікації компонентів проби проводять

зіставлення вимірних значень часу виходу компонентів і заданих значень часу виходу відомих компонентів. При цьому істотне підвищення відтворюваності електрофоретичного розділення досягається за рахунок того, що розкид швидкостей електроосмотичного потоку від одного аналізу до іншого не перевищує допустимої величини.

У другому вищеописаному випадку реалізації винаходу для ідентифікації компонентів проби проводять зіставлення вимірних значень часу виходу компонентів і заданих значень часу виходу відомих компонентів з використанням поправок, визначуваних вищеописаним чином із співвідношення вимірної величини потенціалу течії із заданою величиною потенціалу течії. При цьому істотно підвищується продуктивність виконання великої кількості аналізів однотипних проб і істотно підвищується відтворюваність електрофоретичного визначення складу проб за рахунок використання поправок, компенсуючих вплив розкиду швидкостей електроосмотичного потоку на значення часу виходу компонентів.

Як приклад розділення і аналізу багатокомпонентної суміші нижче наведений аналіз модельної суміші, що складається з бензилового спирту, N-фенілантранілату літію і бензоату літію в 0,001M розчині тетраборату натрію. Приготований розчин був використаний для градування експериментального макету системи КЕ з блоком вимірювання потенціалу течії. Градування було виконане за допомогою програми збору і обробки даних і записане в метод. Всі подальші визначення виконували цим же методом з використанням записаного градування. Значення часу виходу компонентів, усереднені за трьома вимірюваннями, та їх концентрації (за процедурою приготування) наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Усереднені параметри градувальних електрофореграм

	Бензиловий спирт		N-фенілантранілат		Бензоат літію	
	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³
Результат	3.879	400.00	5.641	50.00	6.474	100.00

Виміряна величина потенціалу течії перед проведенням градувальних вимірювань становила в середньому $82,5 \pm 0,2$ мВ.

Для імітування невідконтрольного операторові забруднення капіляра, аналогічного тому, що буває після виконання аналізів проб з різним вмістом домішок перед промиванням капіляра в нього вводився бромід цетилтриметиламонію так, щоб його концентрація становила 0,001 моль/дм³, і після

цього капіляр промивався протягом різного часу, свідомо недостатнього для повного відмивання внутрішньої поверхні капіляра. Тобто введена після промивання проба аналізувалася в умовах різного ступеня очищення капіляра. При цьому в декількох послідовних аналізах були знайдені наступні значення часу виходу і концентрації визначуваних компонентів.

Таблиця 2

Результати електрофоретичного визначення проби після «неконтрольованого» забруднення капіляра

	Бензиловий спирт		N-фенілантранілат		Бензоат літію	
	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр мг/дм ³
№1 бруд	4.733	312.86	7.579	51.03	9.187	111.26
№2 бруд	4.251	262.59	6.488	40.54	7.641	84.47
№3 бруд	4.23	264.29	6.449	38.48	7.598	81.12
№4 бруд	4.223	296.79	6.455	43.34	7.606	90.90
№5 бруд	4.174	301.53	6.341	44.96	7.448	93.22
№6 бруд	4.186	298.18	6.375	45.00	7.505	93.91
№7 бруд	4.084	388.66	5.96	55.35	6.946	106.67
Сер знач	4.27	303.56	6.52	45.53	7.70	94.51
Абс СКВ	0.21	42.09	0.50	5.87	0.70	10.98
Відхил.від градуов.	10.0%	-24.1%	15.6%	-8.9%	19.0%	-5.5%
Відн.СКВ	5.0%	13.9%	7.7%	12.9%	9.0%	11.6%

Типові значення потенціалу течії перед аналітичними вимірюваннями становили від 67мВ (для експерименту №6) до 80мВ (для 7-го експерименту).

Останні два рядки таблиці показують наскільки відхилилися результат вимірювань за таблицею 2 від значень для градуовальних вимірювань за таблицею 1 (відхил від градуов) а також який розкид результатів вимірювань в цій серії з семи послідовних аналізів (Вщн СКВ=відносне середньоквадратичне відхилення результатів від середнього).

Видно, що відхилення від градуовальних значень за часом виходу піку для всіх трьох речовин, що аналізувалися, складає від 10 до 19 відсотків, а за обчисленою концентрацією від 5.5 до 24 відсотків. При цьому і відтворюваність результатів вимірювання (відн. СКВ) також має погані показники за часом виходу від 5 до 9 відсотків, а за обчисленою концентрацією від 8 до 14 відсотків.

Для демонстрації ефекту збільшення відтворюваності значень часу виходу піків і підвищення

точності визначення концентрацій від використання знання величини потенціалу течії при промиванні був проведений наступний експеримент. Після кожного введення забруднюючого розчину бромиду цетилтриметиламонію капіляр промивали розчином провідного електроліту (0,01М розчин бури) спочатку основне промивання протягом трьох хвилин без вимірювання потенціалу течії, а потім додаткове промивання, що чергується з етапами вимірювання потенціалу течії. Періодичність додаткового промивання була вибрана рівною 1 хвилині 30 секунд промивання і 30 секунд вимірювання потенціалу течії. Як граничне значення потенціалу течії, при якій капіляр вважався підготовленим до подальшого введення проби, було вибрано значення 82мВ. Промивання капіляра автоматично закінчувалося при досягненні вказаного значення (як правило, після третього-четвертого додаткового промивання). Після цього виконували аналіз модельного розчину. Отримані дані наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Приклад відтворюваності значень часу виходу компонентів і визначення їх концентрацій з використанням промивання капіляра до досягнення заданого значення потенціалу течії

	Бензиловий спирт		N-фенілантранілат		Бензоат літію	
	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³	Час, хв.	Концентр, мг/дм ³
№1 чисто	3.862	405.93	5.625	49.90	6.466	100.97
№2 чисто	3.85	387.95	5.621	50.12	6.464	101.80
№3 чисто	3.866	368.88	5.647	51.26	6.505	105.21
№4 чисто	3.907	408.79	5.755	50.13	6.645	101.26
№5 чисто	3.923	407.31	5.789	51.25	6.69	104.47
№6 чисто	3.935	394.27	5.817	51.15	6.735	105.96
Сер знач	3.89	395.52	5.71	50.64	6.58	103.28
Абс СКВ	0.04	15.44	0.09	0.65	0.12	12.19
Відхил.від градуов.	0.3%	-1.1%	1.2%	1.3%	1.7%	3.3%
Відн.СКВ	0.9%	3.9%	1.5%	1.3%	1.8%	2.1%

На основі останніх рядків таблиць 2 і 3, що стосуються відхилень результатів вимірювань від

градуовальних і параметрів відтворюваності для цих серій вимірювань складена таблиця 4, в якій

показано, у скільки разів покращали параметри відхилення від градувальних значень і параметр відтворюваності результатів (як за значеннями

часу виходу, так і за обчислюваними значеннями концентрації).

Таблиця 4

Ефект від промивання капіляра до досягнення величини потенціалу течії заданого значення (на основі даних таблиць 2 і 3)

	Бензиловий спирт		N-фенілантранілат		Бензоат літію	
	за часом	за концентр	за часом	за концентр	за часом	за концентр.
Відхил.від градуув.	33.9	21.5	12.9	7.0	11.2	1.7
Відн.СКВ	5.4	3.6	5.0	10.1	4.9	5.5

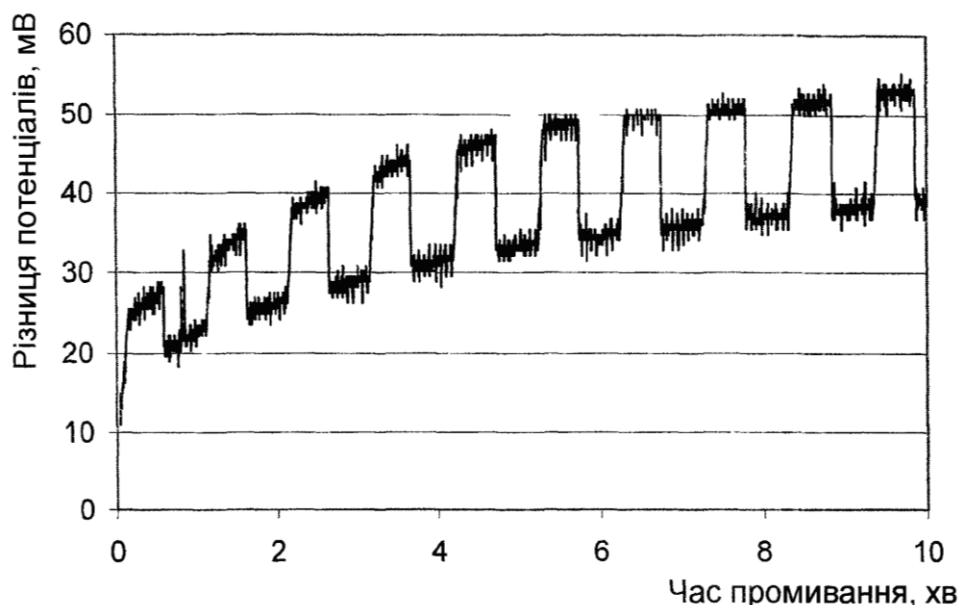
З таблиці 4 видно, що для виконання електрофоретичного визначення складу багатокомпонентних проб з використанням вимірювання потенціалу течії спостерігається істотне поліпшення як відтворюваності значень часу виходу, так і точності визначення концентрацій. Так поліпшення відтворюваності значень часу виходу для трьох речовин модельного розчину (Відн СКВ, за часом) склало від 4.9 до 5.4 разів, а поліпшення відтворюваності визначення концентрації компонентів (Відн СКВ, за концентрацією) склало від 5.5 до 10 разів. При цьому точність визначення середніх значень часу виходу і концентрацій відносно значень для градувальних розчинів покращала ще значніше за часом виходу від 11 до 34 разів, а за концентраціями від 1.7 до 21.5 разів.

Фахівцям зрозуміло, що наведений вище докладний опис наведений як приклад, і може бути запропоновано безліч інших варіантів що не виходять за межі цього винаходу, включають, наприклад, не описані тут детально варіант вимірювання потенціалу течії відразу після

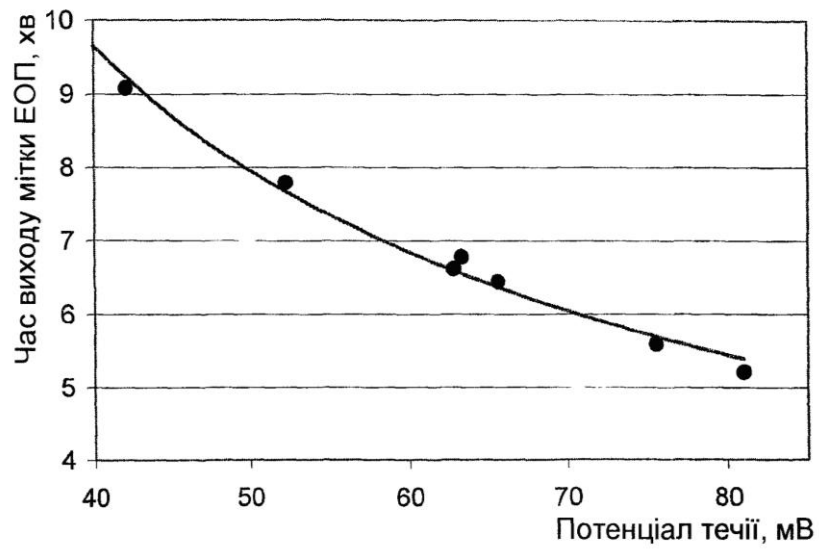
електрофоретичного розділення з визначенням відповідних поправок або варіант утворення потоку електроліту через капіляр шляхом створення негативного перепаду тиску на вихідному кінці капіляра, а також варіант модифікації реалізації способу в пристрої при використанні мас-спектрометричного детектора, але не обмежених цими прикладами.

Література:

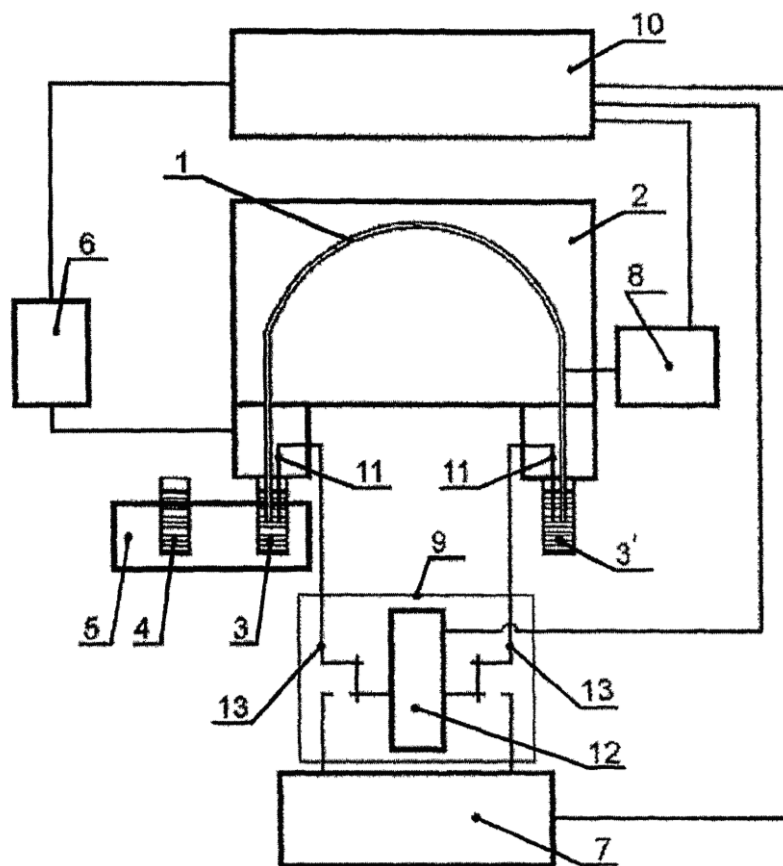
1. R. Weinberger. Practical Capillary Electrophoresis. 2 Edit, Academic Press, 2000.
2. Dale R. Baker. Capillary Electrophoresis. John Wiley & sons, Inc, 1995.
3. Руководство по капиллярному электрофорезу. Под ред. А.М.Волощука, М., 1996г.
4. Система капиллярного электрофореза. Основы метода. Аппаратура. Примеры использования систем капиллярного электрофореза «Капель - 103, - 104, - 105». СПб, изд-во «Петрополис» 2001г.
5. Патент US №05441613 (він же WO-A1 NQ 1996022151).



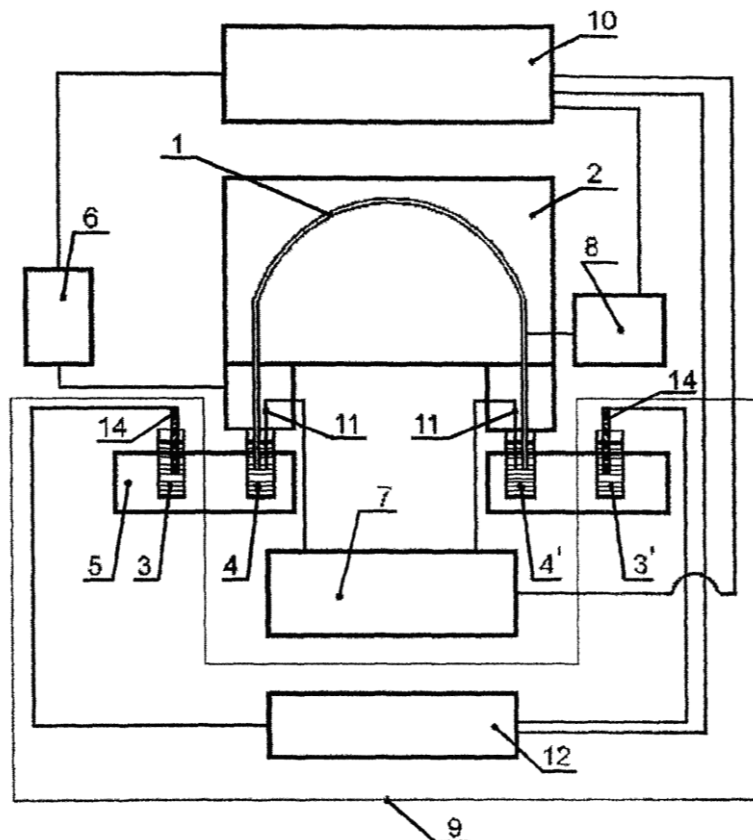
ФІГ. 1



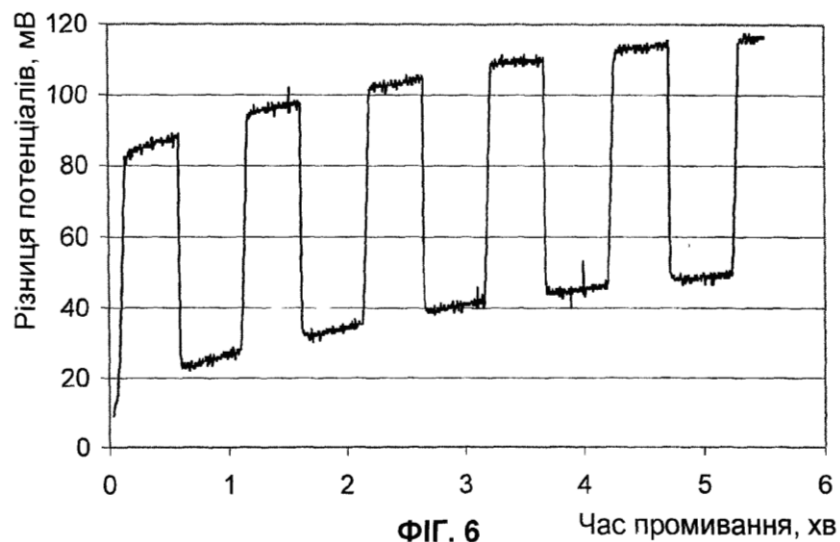
ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФІГ. 6