

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Электрофорез

ОФС.1.2.1.0021.15

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Электрофорез – метод анализа, основанный на способности заряженных частиц, растворенных или диспергированных в электролите, перемещаться под действием внешнего электрического поля.

Различие физико-химических свойств заряженных частиц (размер, форма, величина заряда), а также влияние факторов электролитической среды (напряженность электрического поля, природа среды, вязкость электролита, рН, температура среды, а также продолжительность электрофореза) обуславливают различие скоростей перемещения частиц и, следовательно, обеспечивают их разделение. При электрофорезе на твердых носителях на подвижность и эффективность разделения дополнительное влияние оказывают: адсорбция, неоднородность вещества носителя и его ионообменные свойства, размер пор, электроосмос и капиллярный эффект.

Электрофоретическая подвижность является величиной, характерной для данного вещества. Различают абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность, формирующаяся под влиянием внешнего электрического поля, измеряется в сантиметрах в секунду. Относительная электрофоретическая подвижность представляет собой отношение подвижности исследуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт.

Все электрофоретические методы могут быть разделены на две основные категории: электрофорез в свободном растворе, называемый также электрофорезом с подвижной границей или фронтальным электрофорезом; и

электрофорез на поддерживающих средах, называемый также зональным электрофорезом.

Фронтальный электрофорез

В данном методе воздействию электрического тока подвергается раствор электролита и анализируемые компоненты, помещенные непосредственно в раствор. Этот метод является способом прямого определения электрофоретической подвижности веществ в отсутствие влияния эффектов носителя (адсорбции, электроосмоса, неоднородности среды), однако метод непригоден для выделения чистых компонентов анализируемой смеси из-за низкого разрешения. Метод может применяться для веществ с относительно высокой молекулярной массой, обладающих низкой диффузионной способностью.

Зональный электрофорез

В этом методе используется неподвижный носитель, по поверхности или через объем которого осуществляется миграция ионов, причем стабилизация электролита на плотной матрице позволяет предотвратить конвекцию и смешивание зон после разделения компонентов.

В зависимости от среды и способа проведения зональный электрофорез имеет несколько вариантов. Природа поддерживающей плотной среды (бумага, силикагель, пленки из ацетата целлюлозы, гели на основе крахмала, агарозы, полиамидов или смешанные гели) вносит множество дополнительных факторов, изменяющих подвижность. Если среда не является электрически нейтральной, то в ней на подвижность анализируемых компонентов дополнительное влияние оказывает электроосмотический поток. Например, в капиллярном электрофорезе электроосмотический поток возникает из-за образования двойного слоя между раствором и внутренней стенкой капилляра. Внутренняя стенка плавленого кварца отрицательно заряжена за счет присутствия диссоциированных силанольных групп. Этот отрицательно заряженный слой притягивает положительные ионы из

раствора, в результате чего образуется положительно заряженное кольцо жидкости, движущееся в направлении отрицательно заряженного катода.

Электроосмотический поток сильно зависит от рН. Он присутствует только при значениях рН более 4. Чем выше значение рН, тем более четко выражен эффект. Электроосмотический поток может быть уменьшен в результате химической модификации или покрытия внутренней стенки капилляра положительно заряженными амфолитами.

Профиль электроосмотического потока очень плоский по сравнению с гидродинамическим потоком, профиль которого параболический. В результате электроосмотический поток не вызывает размывания пиков.

Разогрев среды, вследствие эффекта Джоуля, может вызывать некоторое испарение жидкости из поддерживающей среды, которое, вследствие капиллярных взаимодействий, вызывает перемещение раствора от краев пластинки к центру.

Следовательно, скорость перемещения зависит от 4 главных факторов: подвижности заряженной частицы, электроосмотического потока, скорости испарения и напряженности поля. Для достижения воспроизводимых результатов необходимо установить и контролировать определенные условия электрофореза (напряжение, температура и т. д.) и использовать реактивы установленной квалификации.

Многообразие методов электрофореза связано с большим количеством разных способов стабилизации электрофоретической среды (градиенты плотности с добавлением глицерина, гликолей, сахарозы, полиаминополикарбоновых кислот), носителей различной природы и разнообразия способов их использования (электрофорез в крахмальном блоке, в тонком слое, на колонке, в пленке или в пластине геля, в трубках или на бумаге).

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКУЮ ПОДВИЖНОСТЬ

Влияние заряда, размера частицы, вязкости электролита и градиента напряжения. Электрофоретическая подвижность заряженной частицы непосредственно связана с величиной заряда и обратно пропорциональна размеру частицы, непосредственно связанному, в свою очередь, с ее молекулярной массой. Поскольку пептиды и другие биологически активные вещества, которые могут быть проанализированы методом электрофореза, обычно не имеют идеальной сферической формы и не подчиняются закону Стокса, то их электрофоретическая подвижность (u_0) лучше всего

описывается уравнением:

$$u_0 = \frac{v}{E} = \frac{Q}{A \cdot 3,14 \cdot r^2 \cdot \eta},$$

где v – скорость частицы;

E – градиент напряжения, наложенный на электролит;

A – коэффициент формы, обычно в диапазоне от 4 до 6, который показывает обратную зависимость подвижности от квадрата радиуса. В терминах молекулярной массы это подразумевает обратную зависимость подвижности от $2/3$ единицы молекулярной массы;

Q – заряд частицы;

r – радиус частицы;

η – вязкость электролита.

Влияние величины рН. Электрофоретическая подвижность зависит от величины рН раствора, влияющей на степень ионизации вещества. В качестве примера на рисунке приведена зависимость подвижности глицина от величины рН.

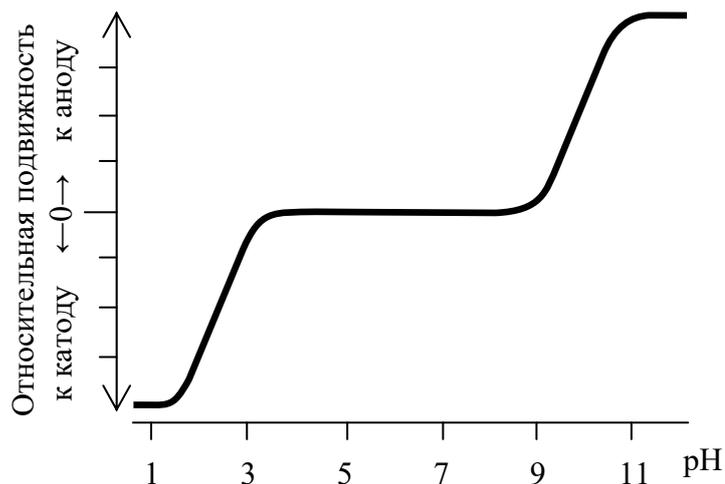


Рисунок – Зависимость подвижности глицина от величины pH

Значения pK_a 2,2 и 9,9 совпадают с точками перегиба графика. Так как соответствующие функциональные группы на 50 % ионизированы при тех значениях, где $pH = pK_a$, то электрофоретическая подвижность в этих точках составляет половину от величины, наблюдаемой для полностью ионизированного катиона и аниона, существующего при очень низком и очень высоком значении pH, соответственно. Цвиттер-ион, который существует в промежуточном диапазоне значений pH, электрически нейтрален и имеет нулевую подвижность.

Влияние ионной силы и температуры. Электрофоретическая подвижность уменьшается с увеличением ионной силы применяемого электролита. Ионная сила μ определяется как:

$$\mu = 0,5 \sum C_i Z_i ,$$

где C_i – концентрация иона, моль/л;

Z_i – валентность иона.

Для буферных растворов, в которых и анион, и катион являются одновалентными, ионная сила равна молярности.

Ионная сила электролитов, используемых для электрофореза, обычно выбирается в пределах от 0,01 до 0,10, что зависит от состава образца, так как буферная емкость должна быть достаточно большой, чтобы поддерживалось постоянное значение pH по области расположения зон компонентов.

Температура влияет на подвижность косвенно, так как вязкость η применяемого электролита является величиной, зависимой от температуры. Вязкость воды уменьшается приблизительно на 3 % при изменении температуры на 1 °С в диапазоне температур от 0 до 5 °С и, с меньшей скоростью, в диапазоне комнатных температур. Поэтому подвижность увеличивается с увеличением температуры электролита.