

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Капиллярный**

**ОФС.1.2.1.0022.15**

**электрофорез**

---

**Вводится впервые**

Капиллярный электрофорез – это физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных частиц в растворе электролита под влиянием приложенного электрического поля.

Скорость миграции частиц определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотической подвижностью буферного раствора.

Электрофоретическая подвижность вещества ( $\mu_{эф}$ ) зависит от его характеристик (электрического заряда, размеров и формы) и от характеристик буферной среды, в которой происходит разделение (типа и ионной силы электролита, рН, вязкости и добавок):

$$\mu_{эф} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad , \quad (1)$$

где  $q$  – эффективный заряд частицы;

$\eta$  – вязкость раствора электролита;

$r$  – стоксовский радиус частицы.

Электрофоретическую скорость ( $v_{эф}$ ) для вещества сферической формы определяют по формуле:

$$v_{эф} = \mu_{эф} \cdot E = \mu_{эф} \cdot \frac{V}{L} \quad , \quad (2)$$

где  $E$  – сила электрического поля;

$V$  – приложенное напряжение;

$L$  – общая длина капилляра.

Когда к капилляру, заполненному буферным раствором, приложено электрическое поле, внутри капилляра образуется поток растворителя, называемый электроосмотическим потоком. Скорость и направление электроосмотического потока зависят от электроосмотической подвижности ( $\mu_{эо}$ ), определяемой знаком и плотностью заряда на внутренней стенке капилляра, а также характеристиками буфера:

$$\mu_{эо} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} , \quad (3)$$

где  $\varepsilon$  – диэлектрическая константа буфера;

$\zeta$  – дзета-потенциал поверхности капилляра.

Электроосмотическую скорость ( $v_{эо}$ ) рассчитывают по формуле:

$$v_{эо} = \mu_{эо} \cdot E = \mu_{эо} \cdot \frac{V}{L} , \quad (4)$$

Электрофоретическая и электроосмотическая подвижность ионов могут быть направлены в одну и ту же или в противоположные стороны в зависимости от заряда частиц; таким образом, скорость движения растворенного вещества будет определяться уравнением:

$$v = v_{эф} \pm v_{эо} , \quad (5)$$

Если электроосмотическая скорость выше электрофоретической, можно одновременно разделить как положительно, так и отрицательно заряженные ионы. Время, затраченное ионом для миграции от конца, в котором вводится образец, до места детекции ( $l$  – эффективная длина капилляра), определяют по формуле:

$$t = \frac{l}{v_{эф} \pm v_{эо}} = \frac{l \cdot L}{(\mu_{эф} \pm \mu_{эо}) \cdot V} . \quad (6)$$

Как правило, капилляры из плавленого кварца без покрытия при рН выше 3 несут на внутренней поверхности отрицательный заряд из-за диссоциации силанольных групп. При этом электроосмотический поток направлен от анода к катоду.

В некоторых случаях необходимо уменьшить или изменить направление электроосмотического потока. Для этого различным образом модифицируют внутреннюю стенку капилляра или изменяют рН буферного раствора.

После введения образца в капилляр каждый анализируемый ион движется внутри фонового электролита в виде отдельной зоны в соответствии со своей электрофоретической подвижностью. Степень размывания каждой зоны растворенного соединения определяется совокупностью различных причин. В идеальном случае единственной причиной размывания зон является продольная молекулярная диффузия растворенного вещества вдоль капилляра. В этом, идеальном, случае эффективность разделения полосы, характеризуемая числом теоретических тарелок ( $N$ ), выражается формулой:

$$N = \frac{(\mu_{эф} + \mu_{эо}) \cdot V \cdot l}{2 \cdot D \cdot L}, \quad (7)$$

где  $D$  – молекулярный коэффициент диффузии растворенного вещества в буферном растворе.

На практике на размывание полос значительное влияние оказывают тепловое рассеяние, адсорбция образца на стенке капилляра, различная проводимость между образцом и буфером, длительность ввода пробы, размеры детектирующей ячейки и различия уровней жидкости в емкостях с буферными растворами.

Разделение между двумя полосами, называемое разрешением ( $R_s$ ), определяют по формуле (8):

$$R_s = \frac{\sqrt{N} \cdot (\mu_{эфб} - \mu_{эфа})}{4 \cdot (\bar{\mu}_{эф} + \mu_{эо})}, \quad (8)$$

где  $\mu_{эфб}$  и  $\mu_{эфа}$  – электрофоретические подвижности каждого из двух разделенных ионов;

$\bar{\mu}_{эф}$  – их средняя электрофоретическая подвижность.

Среднюю электрофоретическую подвижность определяют по формуле:

$$\bar{\mu}_{эф} = 0,5 \cdot (\mu_{эфб} + \mu_{эфг}), \quad (9)$$

### Оборудование

Система для капиллярного электрофореза состоит из высоковольтного источника напряжения; двух флаконов с буферными растворами и погруженными в них электродами; капилляра, заполненного соответствующим раствором и погруженного обоими концами во флаконы с буферными растворами; системы ввода образца; детектора, способного в режиме реального времени регистрировать вещества, проходящие мимо оптического окна капилляра; системы термостатирования; регистрирующего прибора или подключенного компьютера.

Для введения пробы могут использоваться три способа: гидростатический – за счет разного уровня буферных растворов, гидродинамический – с помощью прилагаемого давления или вакуума и электрокинетический – благодаря прилагаемому напряжению. В последнем случае степень ввода в капилляр каждого компонента пробы зависит от соответствующей электрофоретической подвижности. Электрокинетическая система ввода для многокомпонентной смеси с разной электрофоретической подвижностью ведет к изменению соотношения концентраций ее составляющих и в данном случае может адекватно применяться лишь для качественного анализа. При условии определения в многокомпонентной смеси одного или двух соединений этот метод может использоваться и для количественного анализа. Кроме того, такой способ введения может позволить увеличить чувствительность анализа.

Детектирование осуществляется с помощью абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, флуориметрии, кондуктометрии, амперометрии или масс-спектрометрии.

Для обнаружения не поглощающих в ультрафиолетовой области и не флуоресцирующих соединений используется не прямое детектирование. В этом случае в ведущий электролит вводится вещество, поглощающее

ультрафиолетовое излучение и образующее выраженное фоновое поглощение. При этом зона определяемого вещества визуализируется в виде обратного пика. С использованием специального программного обеспечения электрофореграмме придают стандартный вид.

Применяемый раствор электролита фильтруют для того, чтобы удалить крупные частицы (размером более 0,45 мкм), и дегазируют для предотвращения образования пузырьков воздуха, которые могут быть помехой для детектирующей системы или могут нарушить электропроводность в капилляре во время проведения анализа. Для хорошей воспроизводимости времени миграции анализируемых компонентов проб для каждого определения должна быть разработана определенная процедура промывки капилляра.

Основными формами проведения капиллярного электрофореза являются: капиллярный зонный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, капиллярный гель-электрофорез, капиллярное изоэлектрическое фокусирование и капиллярный изотахофорез.

### **Капиллярный зонный электрофорез**

Аналиты разделяются в капилляре, содержащем только буферный раствор. Разделение происходит за счет того, что различные компоненты образца движутся с разными скоростями, образуя так называемые зоны. Скорость движения каждой зоны зависит от электрофоретической подвижности растворенного вещества и от электроосмотического потока в капилляре. Для уменьшения адсорбции веществ на поверхности плавленого кварца могут использоваться капилляры с модифицированной внутренней поверхностью.

Использование капиллярного зонного электрофореза позволяет выполнить разделение как малых (молекулярная масса < 2 кДа), так и больших молекул (2 кДа < молекулярная масса < 100 кДа). При этом может быть обеспечено разделение молекул, имеющих лишь незначительные

отличия в соотношениях заряда к массе. Этот способ позволяет также разделять хиральные соединения, для чего в буферный раствор вводятся хиральные селекторы.

Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению, однако увеличение используемого напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, приводящее к возникновению градиентов температуры и, как следствие, вязкости буфера внутри капилляра. Этот эффект вызывает уширение полос и уменьшение разрешения. Температура изменяет вязкость буфера и электропроводность и, следовательно, влияет на скорость миграции. В некоторых случаях возрастание температуры в капилляре может вызвать конформационные изменения белков, изменяя времена их миграции и эффективность разделения.

Длина и внутренний диаметр капилляра влияют на время анализа, эффективность разделения и нагрузочную емкость. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может уменьшить электрическое поле, что увеличивает время миграции. При заданном буфере и электрическом поле от внутреннего диаметра капилляра зависят тепловое рассеивание и, следовательно, уширение полос образца.

Для предотвращения адсорбции компонентов анализируемой пробы на стенке капилляра применяются различные подходы: экстремальные значения рН, адсорбция положительно заряженных буферных добавок, покрытие внутренней стенки капилляра различными полимерами (нейтральными, гидрофильными, катионными или анионными).

Ведущий электролит для капиллярного электрофореза должен иметь оптимальное значение ионной силы, увеличение которой приводит к возрастанию силы тока, уменьшению электроосмотического потока и, соответственно, снижению скорости движения пробы.

Буферные системы для капиллярного электрофореза должны иметь оптимальную буферную емкость в выбранном диапазоне рН и низкую электропроводность для уменьшения возникающего тока. Для симметричной

формы регистрируемого пика необходимо, чтобы скорость движения ионов буфера примерно соответствовала скорости движения аналита. Увеличение концентрации буфера (при заданном рН) уменьшает электроосмотический поток и скорость движения пробы.

Значение рН буферного раствора влияет на разделение, изменяя заряд анализируемого соединения и добавок, а также электроосмотический поток. При разделении белков и пептидов изменение рН буфера от более низкого, чем изоэлектрическая точка, к более высокому изменяет суммарный заряд растворенного вещества от отрицательного к положительному. Увеличение рН буфера обычно увеличивает электроосмотический поток.

Среда для растворения пробы важна для достижения концентрирования образца. Органические модификаторы (метанол, ацетонитрил и др.) добавляют к водному буферному раствору для увеличения растворимости пробы, а также для изменения степени ионизации компонентов образца. Добавление этих органических модификаторов обычно вызывает уменьшение электроосмотического потока.

Для разделения оптических изомеров к буферному раствору добавляют хиральные модификаторы: циклодекстрины, краун-эфир, полисахариды и белки. Другими факторами, контролирующими разрешение в хиральном разделении, являются концентрация хирального модификатора, состав и рН буфера, а также температура. Использование органических компонентов, таких, как метанол или мочевины, может также влиять на достигаемое разрешение.

### **Мицеллярная электрокинетическая хроматография**

В мицеллярной электрокинетической хроматографии разделение осуществляется в растворе электролита, содержащего поверхностно-активное вещество в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования. Молекулы растворенного вещества распределяются между буферным раствором и псевдостационарной фазой, состоящей из

мицелл. Этот метод может использоваться для разделения как заряженных, так и нейтральных молекул. В качестве анионного поверхностно-активного вещества наиболее часто используется додецилсульфат натрия, в качестве катионного – соли цетилтриметиламмония.

При нейтральных и щелочных значениях pH возникает сильный электроосмотический поток, который движет ионы разделяющего буфера в сторону катода. При использовании в качестве поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия электрофоретическое движение анионных мицелл направлено в противоположную сторону – к аноду. В результате суммарная скорость движения мицелл снижена по сравнению с основным потоком раствора электролита. В случае нейтральных веществ скорость движения компонента, не имеющего электрофоретической подвижности, зависит только от его коэффициента распределения между мицеллой и водной средой. На электрофореграмме сначала появляется пик маркера электроосмотического потока, затем пики аналитов, и в конце – пик маркера мицелл. Время между первым и последним пиком называется окном разделения. На движение заряженных веществ влияют как их коэффициенты распределения между мицеллой и водным буферным раствором, так и их собственная электрофоретическая подвижность.

Движение аналитов и разрешение может быть описано термином «фактор удерживания ( $k$ )», представляющим собой отношение молярных долей аналита в мицелле и в подвижной фазе. Для нейтрального вещества  $k$  вычисляют по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left( 1 - \frac{t_R}{t_{mc}} \right)} = K \frac{V_S}{V_M}, \quad (10)$$

где  $t_R$  – время миграции аналита;  
 $t_0$  – время миграции неудерживаемого вещества;  
 $t_{mc}$  – время миграции мицеллы;  
 $K$  – коэффициент распределения аналита;  
 $V_S$  – объем мицеллярной фазы;  
 $V_M$  – объем подвижной фазы.

Разрешение для двух близко движущихся аналитов ( $R_S$ ) рассчитывают по формуле:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k_b}{(k_b + 1)} \cdot \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + k_a \cdot \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}, \quad (11)$$

где  $N$  – число теоретических тарелок для одного из аналитов;

$\alpha$  – селективность разделения;

$k_a$  и  $k_b$  – коэффициенты удерживания обоих аналитов соответственно ( $k_b > k_a$ ).

Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению, однако следует учитывать, что увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, приводящее к возникновению градиентов температуры и вязкости буферного раствора. Этот эффект вызывает уширение полос и уменьшение разрешения.

Как и в капиллярном зонном электрофорезе, при мицеллярной электрокинетической хроматографии длина и внутренний диаметр капилляра влияют на время анализа и эффективность разделения. Увеличение длины капилляра уменьшает электрическое поле, увеличивает время миграции и повышает эффективность разделения. Уменьшение внутреннего диаметра повышает рассеяние тепла и увеличивает разрешение.

Величина рН среды влияет на электроосмотический поток в немодифицированных капиллярах. Уменьшение рН снижает электроосмотический поток и вследствие этого увеличивает разрешение нейтральных веществ в мицеллярной электрокинетической хроматографии за счет увеличения времени анализа.

Для улучшения разделения гидрофобных веществ в мицеллярной электрокинетической хроматографии используют органические модификаторы (метанол, пропанол, ацетонитрил и др.). При этом необходимо учитывать, что добавление органического модификатора влияет на критическую концентрацию мицеллообразования.

Для разделения с помощью мицеллярной электрокинетической хроматографии энантиомеров в мицеллярную систему включают хиральные селекторы: ковалентно связанные с поверхностно-активным веществом (соли N-додеcanoил-L-аминокислот, соли желчных кислот и др.) или вводимые в состав электролита (циклодекстрины).

Для улучшения селективности разделения в мицеллярной электрокинетической хроматографии применяют также вещества, способные изменить взаимодействие аналита с мицеллой путем адсорбции на последней. Этими добавками могут быть второе поверхностно-активное вещество (ионное или неионное), ведущее к образованию смешанных мицелл, катионы металлов, которые распределяются в мицелле и образуют координационные комплексы с аналитом, а также ион-парные соединения, которые взаимодействуют с заряженными компонентами пробы и задерживают их, например, тетрабутиламмония бромид.

### **Капиллярный гель-электрофорез**

В капиллярном гель-электрофорезе разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, действующим в качестве молекулярного сита. При равном отношении заряда к массе более мелкие компоненты движутся в капилляре быстрее, чем более крупные. Капиллярный гель-электрофорез может быть использован для разделения биологических макромолекул по их молекулярной массе. Электроосмотический поток при этом полностью устраняется путем модификации внутренней стенки капилляра.

В капиллярном гель-электрофорезе используются два типа гелей: химически модифицированные и динамически модифицированные. Химически модифицированные гели, как, например, поперечно-сшитый полиакриламид, поливинилпирролидон, готовятся внутри капилляра посредством полимеризации мономеров. Они обычно связаны с кварцевой стенкой капилляра и не могут быть удалены без его разрушения. При использовании таких гелей для анализа белков в редуцирующих условиях

буферный раствор содержит обычно додецилсульфат натрия и образцы перед вводом денатурируют нагреванием в смеси додецилсульфата натрия с 2-меркаптоэтанолом или дитиотрейтолом. При анализе в нередуцирующих условиях 2-меркаптоэтанол и дитиотрейтол не используют. Разделение в поперечно сшитых гелях оптимизируют модификацией буферного раствора (как указано в разделе «Капиллярный зонный электрофорез») и контролем пористости геля во время его приготовления. Пористость этих гелей регулируют изменением концентрации акриламида, а также его соотношения со сшивающим реагентом. Уменьшение пористости геля ведет к уменьшению подвижности аналитов. Из-за неподвижности таких гелей допустимо только электрокинетическое введение пробы.

Динамически модифицированные гели являются гидрофильными полимерами, как, например, линейный полиакриламид, производные целлюлозы, декстран и т. п., которые могут быть растворены в водных разделительных буферных растворах с образованием разделяющей среды, действующей как молекулярное сито. После приготовления они могут быть введены в капилляр под давлением. Замена геля перед каждой инъекцией улучшает воспроизводимость разделения. Пористость гелей увеличивается при использовании полимеров с большей молекулярной массой или уменьшении концентрации полимера. Для выбранного буферного раствора уменьшение пористости геля ведет к уменьшению подвижности компонентов раствора. Так как растворение этих полимеров в буферном растворе дает растворы с низкой вязкостью, может быть использован гидродинамический или электрокинетический ввод пробы.

### **Капиллярное изоэлектрическое фокусирование**

В изоэлектрическом фокусировании заряженные молекулы движутся под воздействием электрического поля в рН-градиенте, созданном амфолитами с широким диапазоном значений  $pI$ , растворенными в буфере разделения.

Тремя основными этапами изоэлектрического фокусирования являются введение пробы, фокусирование и мобилизация.

Этап введения пробы осуществляют в один прием, когда образец смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или под вакуумом, или в несколько приемов, когда в капилляр последовательно вводится ведущий буферный раствор, амфолиты, образец, смешанный с амфолитами, снова амфолиты и, наконец, заключающий буферный раствор. Объем образца должен быть достаточно малым, чтобы не изменять рН-градиент.

На этапе фокусирования амфолиты движутся после приложения напряжения к катоду или аноду согласно их суммарному заряду, создавая, таким образом, рН-градиент от более низкого рН (у анода) к более высокому рН (у катода). Движение каждого аналита продолжается до тех пор, пока он не достигнет рН, соответствующего его изоэлектрической точке ( $pI$ ).

На этапе мобилизации полосы разделенных компонентов приводятся в движение в сторону детектора благодаря электроосмотическому потоку путем приложения давления после стадии фокусирования или с помощью добавления солей к флакону у катода или анода.

Достигнутое разделение, выражаемое как  $\Delta rI$ , зависит от градиента рН  $dpH/dx$ , количества амфолитов, имеющих различные значения  $pI$ , молекулярного коэффициента диффузии ( $D$ ), интенсивности электрического поля ( $E$ ) и вариации электрофоретической подвижности аналита в зависимости от рН  $-d\mu/dpH$ :

$$\Delta rI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D (dpH/dx)}{E (-d\mu/dpH)}}. \quad (12)$$

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке разделения, являются:

– *Напряжение.* В капиллярном изоэлектрическом фокусировании используется очень высокое электрическое поле – от 300 до 1000 В/см на этапе фокусирования.

– *Капилляр.* Электроосмотический поток должен быть уменьшен или полностью подавлен. Для уменьшения электроосмотического потока используют капилляры с модифицированной внутренней поверхностью.

– *Растворы.* Анодный флакон заполняется буферным раствором с рН ниже, чем  $pI$  наиболее кислого амфолита, а катодный флакон заполняется раствором с рН выше, чем  $pI$  наиболее щелочного амфолита. Обычно для анода используется фосфорная кислота, а для катода – натрия гидроксид.

Добавление в раствор амфолита полимера, такого как метилцеллюлоза, ведет к подавлению конвекции и электроосмотического потока при увеличении вязкости. Широкие диапазоны рН используются для оценки изоэлектрической точки, в то время как более узкие диапазоны применяются для улучшения точности.

Осаждение белков в их изоэлектрической точке во время этапа фокусирования предотвращают в случае необходимости с помощью таких буферных добавок, как глицерин, поверхностно-активные вещества, мочевины или цвиттерионные буферные соли.

### **Капиллярный изотахофорез**

Изоахофорез – это метод разделения, который проводится в режиме поддержания постоянства тока (все разделенные зоны движутся с одной скоростью). При этом должно обеспечиваться постоянное отношение между концентрацией и подвижностью ионов в каждой зоне.

В капиллярном изотахофорезе применяются два буферных раствора, между которыми находятся зоны аналита. Например, для анализа анионов буфер должен быть выбран таким образом, чтобы ведущий электролит

содержал анион с фактической подвижностью, превышающей характерную для разделяемых веществ. Аналогично ион завершающего электролита должен иметь меньшую подвижность, чем подвижность разделяемых веществ. В результате разделения ведущий анион движется первым, за ним движется анион с очередной высокой подвижностью и т. д. В капиллярном изотахофорезе индивидуальные анионы мигрируют в дискретных зонах, но все движутся с той же скоростью, что и ведущий анион. Концентрации анализируемых веществ одинаковы в каждой зоне; таким образом, длина каждой зоны пропорциональна количеству отдельного компонента. Зоны менее сконцентрированные, чем ведущий электролит, сужаются, зоны более сконцентрированные – расширяются. Принцип изотахофореза используется для предварительного концентрирования образца перед разделением его компонентов с помощью других методик капиллярного электрофореза.

### **Обработка результатов**

*Качественный анализ.* К качественным результатам относится определение идентичности компонента пробы внутреннему или внешнему стандартному веществу по времени появления соответствующего пика.

*Полуколичественный анализ.* Полуколичественным результатом считается определение концентрации компонента пробы по площади или высоте пика при соотношении сигнал/фон от 2:1 до 3:1.

Отношение сигнал/шум ( $S/N$ ) рассчитывают по формуле:

$$S/N = \frac{2H}{h}, \quad (13)$$

где:  $H$  – высота пика целевого компонента на электрофореграмме раствора сравнения, измеренная от максимума пика до базовой линии сигнала;

$h$  – уровень шума на электрофореграмме, полученной после ввода холостой пробы.

*Количественный анализ.* Количественным результатом является определение концентрации искомого компонента пробы по площади пика при соотношении сигнал/шум больше, чем 3:1.

При количественном анализе образца для компенсации различий во временах миграции от анализа к анализу и для устранения различий в сигналах компонентов образца, обладающих различными временами миграции, площади пиков должны быть нормированы на соответствующие времена миграции. При использовании внутреннего стандарта необходимо убедиться, что ни один пик исследуемого вещества не маскируется пиком внутреннего стандарта.

Абсолютное содержание компонентов рассчитывают по отношению площадей анализируемого пика и пика стандарта. Процентное содержание одного или более компонентов анализируемого образца рассчитывают путем определения процентной доли скорректированных площадей пиков от общей площади всех пиков, за исключением пиков, вызванных растворителями или другими добавленными реактивами (процедура нормализации).

В качестве параметров пригодности системы используются: кажущееся число теоретических тарелок ( $N$ ), разрешение ( $R_s$ ), фактор емкости ( $k'$ ) (только для мицеллярной электрокинетической хроматографии) и фактор симметричности ( $A_s$ ).

Кажущееся число теоретических тарелок ( $N$ ) может быть рассчитано эмпирически по формуле:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{w_{0,5}} \right)^2, \quad (14)$$

где  $t_r$  – время миграции или расстояние вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика соответствующего компонента;

$w_{0,5}$  – ширина пика на половине высоты.

Разрешение ( $R_s$ ) между пиками схожей величины двух компонентов вычисляют по формуле:

$$R_s = \frac{1,18(t_{r,b} - t_{r,a})}{w_{0,5,a} + w_{0,5,b}}, \quad (15)$$

$$t_{r,b} > t_{r,a},$$

где  $t_{r,b}$  и  $t_{r,a}$  – времена миграции или расстояния вдоль базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков;

$w_{0,5,a}$  и  $w_{0,5,b}$  – ширина пиков на половине высоты.

Фактор симметричности пика рассчитывают по формуле:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \quad (16)$$

где  $w_{0,05}$  – ширина пика на 1/20 от его высоты;

$d$  – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика, и передним краем пика на 1/20 от высоты пика.

В качестве параметров пригодности используются также испытания на воспроизводимость площади (стандартное отклонение площади или отношения площади к времени миграции) и воспроизводимость времени миграции (стандартное отклонение времени миграции).

#### **Перечень условий, подлежащих указанию**

В фармакопейной статье указывают использование определенного капилляра, буферного раствора, метода предварительной подготовки капилляра, пробоподготовки и условий миграции.