



Electroforese

CAPILLAIRE ELECTROFORESE

H. LINGEMAN, Vrije Universiteit, Vakgroep Analytische Chemie, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam

INLEIDING

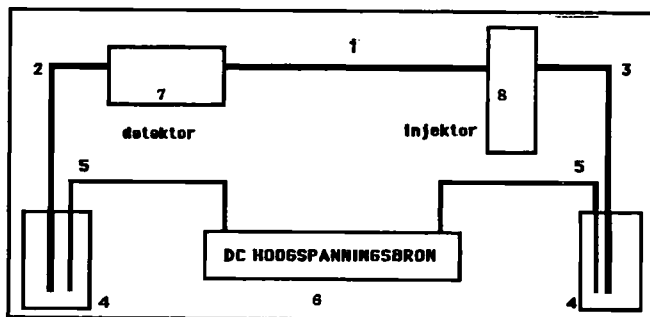
Capillaire electroforese (CE) is een serie van technieken (capillaire-zone electroforese - CZE, isoelectrische focussing - IEF, capillaire-gel electroforese - CGE, isotachoforese - ITP, micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie - MECC) gebaseerd op de migratie van geladen deeltjes onder invloed van een elektrisch veld waarbij capillairen met een inwendige diameter van 20 - 200 μm worden gebruikt. Verschillen in de effectieve lading/massa verhouding en/of verschillen in de micro omgeving van de onderhavige deeltjes resulteert in verschillende migratiesnelheden waardoor een scheiding van zowel laag- als hoog-moleculaire verbindingen plaatsvindt. Een probleem bij enkele van de meer klassieke vormen van electroforese (b.v. polyacrylamide gel electroforese - PAGE) is het beperkte scheidend vermogen door bandverbredings effecten. Door uitvoering van de electroforetische scheiding in een capillair wordt deze bandverbreding, die als gevolg van convectiestromingen ontstaat, significant verminderd - het zogenaamde 'wall effect' [1]. Deze convectie wordt veroorzaakt door een verschil van dichtheid tussen de monsterzone en het elektroliet of door warmte ontwikkeling - de zogenaamde 'Joule heating' [1]. De ontstane warmte wordt in een capillair effectiever afgevoerd, als gevolg van een gunstiger oppervlakte/volume verhouding [2]. Het 'wall effect' en de warmte afvoer nemen beide toe bij afname van de capillair diameter. Daarnaast heeft de miniaturisering nog extra voordelen zoals: een kleinere verdunning van het monster, de mogelijkheid om kleine monsters te analyseren - bijvoorbeeld de inhoud van een enkele cel [2] en het verbruik van zeer kleine hoeveelheden aan chemicaliën.

Capillaire scheidingen vinden plaats onder invloed van hoge spanningen, waardoor een electro-osmotisch en electroforetisch transport van geladen buffer en analyet ionen in het capillair plaats vindt. In vergelijking met bijvoorbeeld vloeistofchromatografie en traditionele electroforesetechnieken heeft CE de volgende eigenschappen [3]:

- de electroforetische scheiding wordt uitgevoerd in een capillair;
- er worden elektrische veldsterktes gebruikt van 500 V/cm en hoger;
- door het gebruik van vloeistofchromatografische detectiesystemen lijkt een electroferogram veel op een chromatogram;
- de schotelgetallen zijn vergelijkbaar met die in de gaschromatografie of zijn zelfs aanzienlijk hoger;
- extreem kleine monstervolumina kunnen in bewerking worden genomen;
- de systemen kunnen relatief eenvoudig geautomatiseerd worden;
- er zijn slechts zeer kleine hoeveelheden reagentia nodig;
- er kan een grote verscheidenheid aan analyeten mee worden bepaald.

CAPILLAIRE-ZONE ELECTROFORESE (CZE)

CZE is de meest eenvoudige vorm van CE omdat hier gebruik wordt gemaakt van een homogene bufferoplossing die zich in het capillair bevindt en een constante veldsterkte over het gehele capillair heerst. Het schema van een CZE opstelling staat weergegeven in Figuur 1 en bestaat uit een capillair (1,2,3), een DC hoogspanningsbron (6), twee electrodevaatjes (4) met (meestal) platina elektroden (5), een detector (7) en een injectiesysteem (8).



Figuur 1

De uiteinden van het capillair zijn in de elektrodevaatjes - die de bufferoplossing bevatten - geplaatst. De detectie 'on-column' uitgevoerd met behulp van massaspectrometrische, thermische, electrochemische of optische technieken. In het algemeen wordt echter de ultraviolet absorptiedetector gebruikt. De capillairen die in CZE gebruikt worden zijn meestal van het 'open tubular' type en gemaakt van glas pyrex, kwarts, fused silica - het meest populair - teflon en andere polymeren zoals kunstharz.

Injectie van het monster kan electrokinetisch [4], hydrodynamisch [5], via het zwaartekrachts principe [6], via een splitter, met behulp van een rotorkraan [8] of met een μ l-injectiespuit [9] worden uitgevoerd. Bij de electrokinetische injectie wordt een uiteinde van het capillair samen met een electrode (meestal de anode) in het monstervat geplaatst. Vervolgens wordt gedurende een bepaalde tijd de stroom ingeschakeld, waardoor het monster electroforetisch in het capillair wordt gebracht. Na injectie wordt het capillair en de electrode weer in het elektrodevaatje gebracht en kan de analyse plaatsvinden. Injectie met behulp van een rotorkraan of een μ l-injectiespuit is alleen geschikt voor capillairen met een relatief grote diameter (I.D. > 200 μ m). De andere technieken kunnen gebruikt worden voor smalle (splitter) tot zeer smalle (I.D. < 10 μ m) capillairen.

THEORIE

De totale electroforetische mobiliteit van een ion, in bijvoorbeeld een fused silica capillair, is opgebouwd uit twee componenten. De eerste component is de effectieve electroforetische mobiliteit:

$$\mu_{\text{eff}} = \sum_i m_i \alpha_i \gamma_i \quad (1)$$

m_i vertegenwoordigt de gecombineerde invloed van verschillende factoren zoals solvatatie, de effectieve straal en lading van de ionen en de diëlectrische constante en viscositeit van het electroforese medium. De splitsingsgraad, α_i , is onder andere afhankelijk van de pKa waarden, de temperatuur en de pH van het medium. γ_i is een correctiefactor voor retardatie en relaxatie effecten.

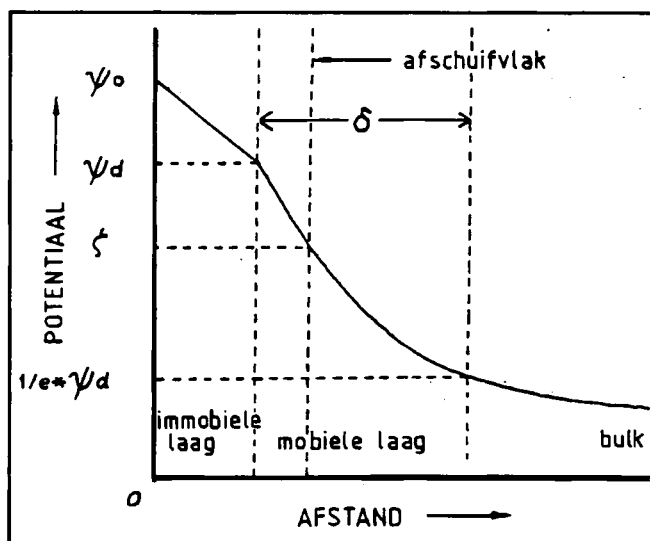
Een electroforetische scheiding is

gebaseerd op een verschil van mobiliteit. De mobiliteit van component q (μ_q) kan worden bepaald met behulp van de volgende vergelijking:

$$\mu_q = v / E \quad (2)$$

Hierin stellen v en E respectievelijk de electroforetische snelheid en de veldsterkte in het capillair voor.

De tweede parameter is de electro-osmotische mobiliteit, die bij gebruik van fused silica capillairen (meestal) de electroforetische mobiliteit overheerst. Als gevolg van een potentiaal gradiënt tussen de capillairwand en de daaraan grenzende electrolyet oplossing ontstaat een ionogene dubbellaag van gedeprotoneerde silanol groepen enerzijds, en electrolyet kationen anderzijds. Deze potentiaal gradiënt wordt beschreven door het zogenaamde Stern model (Figuur 2) [10].



Figuur 2

Schematische weergave van de potentiaalgradiënt aan de capillairwand (Stern-model). ζ is de zeta-potentiaal.

De dikte van de dubbellaag (δ) is gedefinieerd als de afstand van de immobiele laag tot een punt in de bufferoplossing waarop de potentiaal gelijk is aan 0,37 maal de potentiaal op het afschuifvlak tussen de immobiele en de diffusie laag. Wanneer een potentiaalverschil over het capillair wordt aangelegd zal het mobiele deel van de geadsorbeerde kationen naar de kathode migreren. Het resterende

deel zal geïmmobiliseerd achterblijven op de capillairwand. Tijdens de migratie wordt de rest van de vloeistof in het capillair meegenomen, waardoor een bijna ideaal cilindrisch stromingsprofiel ontstaat [11]. De mathematische definitie van de electro-osmotische snelheid (v_{∞}) wordt gegeven in de Helmholtz-Smolukovski vergelijking (3), die echter niet voor zeer smalle capillairen geldt:

$$v_{\infty} = \frac{E \zeta \epsilon}{4 \pi \eta} \quad (3)$$

Hierin stelt E de elektrische veldsterkte voor, ϵ de diëlectrische constante van de elektroliet oplossing, η de viscositeit en ζ de zèta-potentiaal. De zèta-potentiaal is het potentiaalverschil op het afschuifvlak tussen de geïmmobiliseerde en het stromende medium. Deze potentiaal is afhankelijk van het oppervlak van het capillair, het soort tegenion (kation) en de ionogene concentratie. Tevens kan de zèta-potentiaal beïnvloed worden door de pH van de bufferoplossing. Een verhoging hiervan zal leiden tot een toename van gedeprotooneerde silanol groepen, waardoor het potentiaalverschil over de dubbellaag toeneemt [10].

De electro-osmotische snelheid kan op verschillende manieren bepaald worden. De meest nauwkeurige methode, maar tevens ook een problematische, is het wegen van de hoeveelheid verplaatste buffer met behulp van een microbalans. De meest eenvoudige manier is de introductie van een electrisch neutrale marker. Fenol en aceton worden in veel metingen als neutrale marker ter bepaling van de electro-osmotische snelheid gebruikt [12]. Het, bij een pH van 2 tot 12 ongeladen molecuul, wordt in de ideale situatie door de vloeistof getransporteerd, vrij van beïnvloeding door het electrisch veld of adsorptie effecten. Fenol kan dus bij de juiste pH nagenoeg volledig neutraal zijn, maar zal altijd interacties kunnen vertonen met de fused silica wand, waarvan H-brug vorming de meest voor de hand liggende is. Dergelijke (semi)permanente interacties kunnen dus de zèta-potentiaal in zekere mate beïnvloeden en als gevolg daarvan ook de electro-osmotische snelheid - dus de reproduceerbaarheid - beïnvloeden.

De efficiëntie (N) van een CZE scheiding wordt weergegeven door Vergelijking 4, welke alleen geldt wanneer uitsluitend axiale diffusie optreedt [4]:

$$N = \frac{\mu_{\text{tot}} V}{2 D} \quad (4)$$

Hierin is μ_{tot} de totale mobiliteit van het ion, V het aangelegde potentiaalverschil en D de diffusiecoëfficiënt. De efficiëntie is, tot op zekere hoogte, recht evenredig met de aangelegde spanning. Wanneer de spanning sterk opgevoerd wordt, zal de bandverbreding als gevolg van de Joule heating echter niet meer verwaarloosbaar zijn. Extreem hoge potentiaalverschillen geven uiteraard praktische problemen. Er is zowel theoretisch als experimenteel aangetoond dat er een optimaal potentiaalverschil voor een optimale N bestaat. Deze zijn afhankelijk van de geleidbaarheid van de buffer en de diameter van het capillair. Nauwe capillairen laten een hoger potentiaalverschil toe, terwijl de warmte nog steeds effectief kan worden afgevoerd.

N is eveneens recht evenredig met de totale electroforetische mobiliteit. Dit suggereert dat een forse verhoging van de electro-osmose, ook een grote verbetering van N tot gevolg zal hebben. Dit is echter alleen het geval indien één component aanwezig is. Want, een verhoging van de electro-osmotische mobiliteit reduceert de bandverbreding meestal door de verblijftijd in het CZE capillair te verkorten. Voor de scheiding van een mengsel is een verkorte verblijftijd meestal nadelig voor de resolutie [2].

Uit Vergelijking 4 blijkt dat N onafhankelijk is van de capillairlengte, hetgeen suggereert dat het capillair onbeperkt kan worden verkort. Dat dit niet het geval is blijkt onder andere uit Vergelijking 5:

$$\frac{P}{L} = \frac{K C r^2 V^2}{L^2} \quad (5)$$

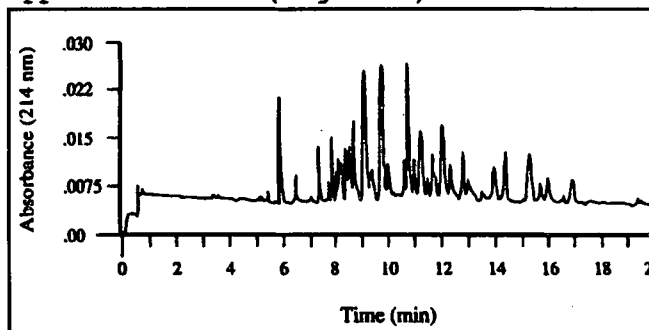
Hierin stelt P het electrisch vermogen voor dat per lengte eenheid (L) ontwikkeld wordt, K is de molaire geleidbaarheid en C stelt de molariteit van het elektroliet voor [13]. V en r vertegenwoordigen respectievelijk het aangelegde

potentiaalverschil en de capillairdiameter. Wanneer L afneemt, neemt P/L (bij constante V) kwadratisch toe, hetgeen weer een toename van de bandverbreding tot gevolg heeft. Daarnaast moet ook rekening worden gehouden met de 'extra volume' bijdragen van het monster- en detectorvolume [2]. Wanneer het capillair wordt verkort, moet ook het monster- en detectorvolume worden aangepast. Dit stuit al snel op praktische bezwaren, daar de gevoeligheid en de injectie betrouwbaarheid afneemt.

TOEPASSINGEN

CZE dankt zijn grote populariteit met name aan de grote verscheidenheid van toepassingen en het feit dat bijzonder efficiënte scheidingen binnen zeer korte tijd kunnen worden uitgevoerd [14]. Andere voordelen zijn verder nog dat methode ontwikkeling relatief snel en de kosten relatief laag zijn. Dit ondanks het feit dat de reproduceerbaarheid (b.v. migratietijden) en nauwkeurigheid en precisie nog niet optimaal is.

Met name voor de scheiding van peptiden en eiwitten is CZE een geschikte techniek. Dit omdat verbindingen die slechts een enkel aminozuur van elkaar verschillen volledig kunnen worden gescheiden. Een andere belangrijke toepassing op dit gebied is de scheiding van een 'tryptic digest' van bijvoorbeeld gereduceerd, gedenatureerd en ge-alkyleerd runder serum albumine. Deze scheiding wordt uitgevoerd bij een lage pH na toevoeging van 0,1 M ureum aan de electrolysebuffer. Toevoeging van ureum zorgt voor het ontvouwen van het peptide waardoor de hydrofobe groepen aan het oppervlak komen (Figuur 3).



Figuur 3
Capillair electroforetische scheiding van een 'Tryptic Digest' van gereduceerd, gedenatureerd en ge-alkyleerd

runder serum albumine. Buffer, 21 mM natrium fosfaat, 1,5 M ureum, pH 2,5; capillair, 59 cm.

Een aantal macromoleculaire verbindingen waarvoor inmiddels scheidingen in de literatuur zijn beschreven staan weergegeven in Tabel I [3].

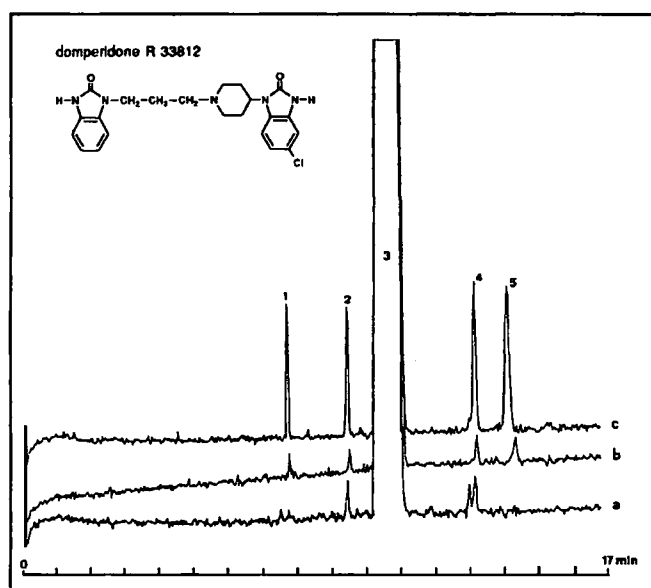
Tabel I
CZE SCHEIDINGEN VOOR MACROMOLECULEN [15]

Dipeptiden / eiwitten	Endorfinen
Nucleoside fosfaten	Chymotrypsine
Angiotensine II octapeptiden	Ribonuclease
Immune complexen	Collagenen
Tryptic digest	Adenosine trifosfaat
Membraan eiwitten	β -Lactoglobuline
Humaan groeihormonen	Anhydrasen
Lysozyme	Myoglobine

Behalve peptiden en eiwitten kan CE ook gebruikt worden voor de scheiding van DNA fragmenten, maar omdat bij deze verbindingen sprake is van ongeveer constante massa/ladingsverhouding kan CZE hiervoor niet rechtstreeks gebruikt worden en moet het capillair gevuld worden met een gel waarna we spreken over capillaire gelelectroforese (CGE). Scheiding van DNA-strengen tot ongeveer 10.000 baseparen is haalbaar tegenwoordig.

CZE is niet alleen geschikt voor geladen verbindingen, ook neutrale verbindingen kunnen met behulp van een speciale vorm van CZE: micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie (MECC) worden bepaald. Het anti-AIDS middel AZT, een nucleïnezuur derivaat, kan met deze techniek gescheiden worden van bijvoorbeeld thymidine, thymine, 3-methylthymidine en thymidine-5'-monofosfaat. Opiaten (efedrine, pholcodine, codeine, morfine, dextromorfan) kunnen in ongeveer 8 min met MECC worden gescheiden zelfs tussen morfine en codeine - die slechts een methylgroep van elkaar verschillen - wordt basislijn scheiding verkregen. Ook bij metabole studies kan MECC zeer goede diensten bewijzen omdat deze techniek gebruik maakt van zowel de hydrofobiciteit als de lading van de te scheiden verbindingen. Dit betekent dat zowel Fase I als Fase II metabolieten met behulp van CZE aangepakt kunnen worden. Een aardig voorbeeld hiervan is de scheiding van bilirubine, zijn mono- and di-conjugaten (glucuronzuur, glucose, xylose) en zijn fotoproducten.

Een andere belangrijke toepassing van CZE heeft betrekking op chirale scheidingen. MECC kan hier bijvoorbeeld ook voor gebruikt worden. De enantiomeren van cicletanine kunnen in 3 min van elkaar worden gescheiden door een op SDS (natrium laurylsulfaat) gebaseerd micellairsysteem te gebruiken. Enantiomere scheidingen worden in CZE echter met name uitgevoerd door het toevoegen van een cyclodextrine aan de bufferoplossing [16]. Chirale verbindingen die hier ondermeer mee gescheiden kunnen worden zijn: amino zuren, primaire aminen, barbituraten, peptiden, atropine, terbutaline, leucoverine, chlorpheniramine en fenylethanol.



Figuur 4
Capillair electroforetische scheiding van domperidon en zijn belangrijkste verontreinigingen.

Een veel belovend toepassingsgebied van CZE is zeker de kwaliteitscontrole van farmaceutische producten. Het aantonen van 0,1% van een verontreiniging naast de moederverbinding is zeker mogelijk [17]. De resolutie van CZE is zeker voldoende om dit soort problemen aan te pakken, een probleem kan echter de detectie zijn omdat in de meeste gevallen gebruik gemaakt zal worden van het universele karakter van UV detectie. Echter door het speciale ontwerp van capillaire cellen zal, ondanks de wat hogere ruis (ca. 8×10^{-5}), de absolute gevoeligheid in CZE vaak ongeveer een factor 10^3 beter zijn. Bijvoorbeeld voor domperidon

geldt dat de detectiegrens met CZE ongeveer 6×10^{-3} ng is terwijl deze ongeveer 6 ng is voor vloeistofchromatografie (Figuur 4) [17].

Hierbij moet wel opgemerkt worden dat het hier om massagrenzen gaat en dat wat betreft de concentratiegrenzen het verhaal precies omgekeerd is. Een vergelijking van de relatieve standaard deviatie van tabletten waarin domperidon voorkomt geeft 1,55% voor de CZE bepaling en 0,43% voor een vloeistofchromatografische methode.

Wat betreft de detectiegevoeligheid kan voor tryptofaan bijvoorbeeld het volgende worden gegeven (Tabel II) [18]:

Tabel II
DETECTIEGRENZEN VOOR TRYPTOFAAN

	UV detectie (280 nm)		Fluorescentie detectie	
	CZE	RP-LC	CZE	RP-LC
Monstervolume	8.3 nl	20 μ l	8.3 nl	20 μ l
Concentratie	9 μ M	850 nM	1.4 μ M	5.5 nM
gevoeligheid				
Massa gevoeligheid	75 fmol	17 pmol	10 fmol	110 fmol
heid				

RP-LC, Reversed-phase vloeistofchromatografie

Aan dit voorbeeld valt inderdaad af te lezen dat er een belangrijk verschil is tussen concentratie en massa gevoeligheid, maar ook dat met behulp van fluorescentiedetectie - al dan niet in combinatie met een derivatiseringsreactie - goede gevoeligheden kunnen worden behaald.

Evenals bij de chromatografische technieken kan piek identificatie een probleem zijn. Sinds kort zijn er echter enkele CZE systemen op de markt die uitgerust zijn met een diode-array detector waardoor ook dit probleem gedeeltelijk wordt ondervangen. Tevens is het natuurlijk mogelijk om met behulp van dit type detector iets over de zuiverheid van een piek te zeggen.

CONCLUSIES

De hier genoemde voorbeelden van CZE vormen slechts een kleine greep uit het totaal aan toepassingsmogelijkheden die moderne CE technieken bieden. Duidelijk zal wel zijn dat CZE snel is met betrekking tot methode ontwikkeling en de analyse zelf en dat het een relatief goedkope techniek is met een bijzonder groot scheidend vermogen. Het resultaat is dat CZE duidelijk complementair is aan vloeistof- en gaschromatografie en in staat is om een aantal problemen op te lossen die met de traditionele technieken niet aangepakt kunnen worden. Een voorbeeld hiervan zijn de kationische en anionische kleurstoffen die met chromatografische technieken vaak problemen opleveren [19]

Kortom een techniek met toekomst, alhoewel met name op het gebied van nauwkeurigheid en precisie van kwantitatieve bepalingen nog al wat werk moet gebeuren. Hetzelfde gaat op voor de gevoeligheid van de methode: toepassing van (diode) laser fluorescentie, amperometrische en massaspectrometrische technieken zal duidelijk moeten verbeteren de komende jaren. Samenvattend kan gezegd worden dat het grootste probleem bij de CZE scheiding van eiwitmonsters de robuustheid van de methode is. Standaardmonsters laten een goede reproduceerbaarheid zien, maar bij 'echte' monsters is het electroferogram door matrix effecten veel minder betrouwbaar.

Tenslotte worden nog een tweetal goede artikelen, die gebruikt kunnen worden om de basis begrippen van CZE te doorgronden, gegeven in de referenties 12 en 18.

REFERENTIES

- 1 F.E. Mikkers, F.M. Everaerts en Th.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 11.
- 2 W.Th. Kok en G.J.M. Bruin, *Eur. Chromatogr. News*, 2 (1988) 22.
- 3 M. Parker en J. Chapman, *Eur. Chromatogr. Anal.*, 5 (1993) 9.
- 4 J.W. Jorgenson en K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298.
- 5 T. Tsuda, G. Nakagawa, M. Sato en K. Yagi, *J. Appl. Biochem.*, 5 (1983) 330.
- 6 T. Tsuda, K. Nomura en G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, 264 (1983) 385.
- 7 T. Tsuda en R.N. Zare, *J. Chromatogr.*, 559 (1991) 103.
- 8 T. Tsuda, T. Mizuno en J. Akiyama, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 799.
- 9 F.M. Everaerts, J.L. Beckers, Th.P.E.M. Verheggen, in *Isotachopheresis: Theory, Instrumentations and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- 10 C. Schwer en E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1801.
- 11 A.G. Ewing, R.A. Wallingford en T.M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 292A.
- 12 W.G. Kuhr, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 403R.
- 13 K.D. Lukacs en J.W. Jorgenson, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 8 (1985) 407.
- 14 K.D. Altria en M.M. Rogan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8 (1990) 1005.
- 15 H.E. Schwartz, R.H. Palmieri, J.A. Nolan en R. Brown, *Introduction to Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides*, Beckman, Fullerton, CA, 1993.
- 16 Th. L. Bereuter, *LC.GC Int.*, 7 (1994) 78.
- 17 A. Pluym, W. van Ael en M. de Smet, *Trends Anal. Chem.*, 11 (1992) 27.
- 18 R.A. Wallingford en A.G. Ewing, *Adv. Chromatogr.*, 29 (1989) 1.
- 19 D. Hinks en D.M. Lewis, *Eur. Chromatogr. Anal.*, 7 (1993) 9.