

bijdrage van Dr. H.A.M. Voorbij geeft aan dat miniaturisering en de koppeling van diverse soorten detectoren de toepassingsmogelijkheden zal vergroten. In dit artikel wordt tevens een methode beschreven voor de scheiding van racemeren, waaruit blijkt welke mogelijkheden er niet allemaal zijn met deze techniek

Gezien de toenemende belangstelling voor de CE in de klinische chemie en de goed bezochte gebruikersbijeenkomsten probeert de redactie de kennis in het veld te bundelen door middel van een themanummer. Voortrekkers waren Dr. P.N.M. Demacker, Dr. ir. J.P.M. Wiolders en Dr. H.A.M. Voorbij.

Na een aantal E-mails kwam de eerste opzet in een mum van tijd al uit de grondverf. Samen met Prof. Dr. M.P. van Dieijen-Visser, en Dr. Y.M.C. Henskens werden vervolgens auteurs benaderd, die reeds een

bijdragen hadden geleverd op de CE-gebruikersbijeenkomsten of die al jaren actief waren met CE. Er volgden nog vele mails alvorens de eerste concepten klaar waren, referees hun zegje hadden gedaan, revisies opnieuw waren beoordeeld, copyright was geregeld en de bijdragen onderling op elkaar waren afgestemd. In een recordtijd van 6 weken werden aldus 8 concepten als E-mail van de ene PC meermalen naar de andere verstuurd. De nieuwe mogelijkheden van dit medium hebben zeker bijgedragen tot een snelle en effectieve totstandkoming van dit themanummer.

Als (gast-)editoren hopen we dat dit nummer aansluit bij de geconstateerde belangstelling voor CE in de klinische chemie en een stimulans is voor degene die overwegen met deze veelbelovende techniek te starten.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 207-210

De geschiedenis van capillaire elektroforese

F.M. EVERAERTS¹, J.P.M. WIELDERS² en F.J.L. EVERAERTS³

Vroegste geschiedenis

In het midden van de negentiende eeuw rapporteerden Wiedeman (1,2) en Buff (3) over een verschijnsel dat geladen deeltjes in een oplossing bewogen als een elektrisch veld werd toegepast. Fysisch chemici hielden zich vervolgens enige tijd bezig met de meting van zogenaamde Hittorf transportgetallen, welke feitelijk een ratio van mobiliteiten zijn. Later werden experimenten uitgevoerd door Lodge (4) en Whetham (5,6), die de basis vormden voor de theorie van Kohlrausch (7) over elektroforetische migratie. Met de door Kohlrausch opgestelde vergelijking, 'die beharrliche Funktion', kunnen alle elektroforetische principes worden beschreven: zone elektroforese, "moving-boundary" elektroforese en isotachoforese. Alleen het laatstgenoemde elektroforetische principe heeft het 'zelf-corrigerende vermogen' van de zonegrenzen in de "steady-state". Voor de liefhebber dient opgemerkt te worden dat vergelijkbare principes ook bestaan in de chromatografie.

Bij de theorie van "isoelectric focusing" moeten nog andere vergelijkingen worden meegenomen in verband met de scheiding op pI waarden. Ook dit elektroforetische principe heeft in de "steady-state" een 'zelf-corrigerend' vermogen van de zonegrenzen.

Emeritus hoogleraar Technische Universiteit, Eindhoven¹; Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort²; Medtronic, Bakken Research Center, Maastricht³

Correspondentie: Prof. Dr. Ir. F.M. Everaerts, Hallenhof 1, 6006 NC Weert.

Rond 1900 ontstaat het besef dat de pH van belang is voor de migratiesnelheid van eiwitten (Hardy (8-9)). Het onderzoek van Michaelis (10), tevens bekend van de Michaelis-Menten-vergelijking, moet speciaal genoemd worden. Bij zijn studie van enzymreacties had hij behoefte aan zuivere enzymen, welke toendertijd niet verkrijgbaar waren. Hij vond dat enzymen te scheiden en te karakteriseren zijn op basis van hun karakteristieke migratiepatroon tijdens elektroforese, waarbij de pH van de gebruikte buffer een belangrijke rol speelt. De term elektroforese zou voor het eerst door hem gebruikt zijn. Vroeger gebruikte men de namen cataforese en elektroforese enkel voor scheiding van geladen colloïdale deeltjes. Ionoforese of iontoforese werd gereserveerd voor het werk met laagmoleculaire stoffen. Men zag op tijd in dat deze spraakverwarring tot niets leidde. De meeste wetenschappers hadden dan ook niet het werk van Kohlrausch (7), een fysicus, gelezen. Dit puur theoretisch betoog was te moeilijk voor de gemiddelde (bio)chemicus, arts en zelfs menig fysicus.

In 1923 lukte het Kendall en Crittenden (11) elementen van de 'zeldzame aarden' (lanthanidengroep) te scheiden, wat een doorbraak betekende. De oxiden van deze metalen worden aarden genoemd. De zeldzame aarden zijn niet zeldzaam, alleen vreemd en relatief laat ontdekt. De Zweedse naam "rare metale", was voor de Engelsen verwarrend en werd vertaald als 'zeldzame metalen'. Kendall en Crittenden noemden de techniek "ion migration method", wat tegenwoordig isotachoforese zou worden genoemd. Zij beweerden dat de ionen niet alleen gescheiden werden, maar hun concentraties ook aanpasten aan die van de eerste zone.

Het was Kendall (12) die voorstelde het elektroforetisch scheidingsmechanisme te bestuderen. Door gebruik te maken van geladen kleurstoffen met mobiliteiten tussen die van de te scheiden componenten, was het mogelijk om de niet gekleurde ionen te volgen. Ook stelde hij voor thermometrische, conductometrische en spectrofotometrische detectoren te ontwikkelen. Zelfs radioactieve ionen zouden bij gebruik van detectoren voor radioactiviteit geanalyseerd kunnen worden met elektroforese. Lindemann (13) probeerde op deze wijze twee chloorisotopen te scheiden, maar het experiment mislukte. Ook MacInnes en Longworth (14) faalden bij hun pogingen om isotopen te scheiden met "moving boundary" elektroforese. Maar ze hadden de publicatie van Kohlrausch (7) niet begrepen, met isotachoforese zouden ze waarschijnlijk wel succes hebben gehad.

In 1937 beschreef Tiselius eiwitseparaties in een U-vormige buis, waarbij een eiwit oplossing onderin en een buffer aan weerszijde daar bovenop werd geplaatst (45). Dit leidt tot een "moving boundary" scheiding met aan een zijde een zuivere zone van negatief geladen en aan de andere zijde een zuivere zone van positief geladen eiwitcomponenten van het mengsel. Hij verkreeg hiervoor de Nobelprijs.

De methode leidt echter niet verder dan een partiële scheiding van twee componenten uit een mengsel, bijvoorbeeld de snelste en de traagste monstercomponent. De praktische toepasbaarheid is dan ook beperkt. Omdat men zeer geïnteresseerd was in alles wat met eiwitstructuren te maken had, werd eind dertiger jaren de scheiding op papieren strips ontwikkeld en het kleuren met geschikt materiaal zoals amidozwart en ponceaurood. Met capillairen werkten men nog niet en gevoelige detectoren waren nog lang niet ontwikkeld. Overigens is pas in de vijftiger jaren het gebruik van elektroforese op papierstrips voor eiwitseparaties in de klinische chemie in opkomst gekomen, welke vele uren nodig had voor de scheiding. Toen het later overgezet kon worden op cellulose acetaat folie op basis van het werk van Kohn was de tijdswinst aanzienlijk.

In 1942 was het Martin (Nobelprijs winnaar 1952, chromatografie), die met 'displacement electrophoresis' (isotachophorese) een prachtige scheiding verkreeg van chloride, acetaat, aspartaat en glutamaat (15).

Tot 1953 was het weer stil op het front van elektroforese. Maar Longworth (16) begreep het werk van Kohlrausch (7) en hij realiseerde scheidingen van aardalkalimetalen tussen een "leading" en een "trailing" zone via isotachoforese in de U-vormige buis van het Tiselius apparaat.

Onderdrukken convectie bij elektroforese

Een probleem waarmee elektroforese altijd te kampen had gehad was de stabilisatie van de vloeistof tegen convectie, welke zowel mechanisch als ook thermisch (Joule hitte tgv de stroom doorgang) veroorzaakt kon zijn. Oplossingen werden gezocht in stabilisatie met behulp van dragermateriaal als glaswol in de Tiselius buis of papier en gel voor vlakke platen en strips.

In de zestiger jaren werd agarose van voldoende zuiver-

heid geproduceerd om er gelplaten voor elektroforese mee te kunnen maken voor de scheiding van serumproteïnen en enzymen. Nog later volgden de polyacrylamidegels. Speciale elektroforesegels werden geproduceerd door LKB, Bromma in Stockholm. Na scheiding en aankleuring van de proteïnen kon men met fotometrische detectoren de zones scannen en verder verwerken. Computersystemen werden ontwikkeld, waardoor deze systemen snel in ziekenhuislaboratoria konden worden ingevoerd. De medicus Prof Bergström van het Karolinska Instituut in Stockholm (Nobelprijs winnaar) stond achter deze ontwikkeling.

Capillaire elektroforese en isotachophorese in de jaren 1960 tot 1980

Een andere aanpak om convectie tegen te gaan was gebruik te maken van glazen capillairen (0,1 tot 0,5 mm inwendige diameter). Deze laatste benadering werd gekozen door Konstantinov en Oshurkva (1963) voor hun isotopenscheidingsexperimenten. Onafhankelijk van deze Russen gebruikten Martin en Everaerts (1964) in Eindhoven eveneens glazen capillairen voor "displacement" (isotachophorese) elektroforetische experimenten.

Als detector gebruikten zij een thermokoppel, dat ze op de capillairwand fixeerden. Immers de warmte geproduceerd in een zone is afhankelijk van de geleidbaarheid en dus van de mobiliteit van de ionen in die zone.

Bergström was ook zeer geïnteresseerd in het werk uit Eindhoven, waardoor Everaerts in 1970 drie maanden bij hem op het laboratorium mocht werken. Dit werd een band voor het leven.

De volgende jaren werd de thermometrische detector verbeterd en snel gevolgd door de UV-detector, welke ontwikkeld werd door Arlinger en Routs (1970). Vervolgens werd de conductometrische detector ontwikkeld in Eindhoven (Verheggen, Everaerts, et al 1972). In het begin had Martin hier geen vertrouwen in. Maar toen hem door Everaerts werd uitgelegd en bewezen dat het om een bipolaire elektrode ging, die men kon beheersen door Pt/Ir10% te gebruiken van 10 µm, zei hij: "Congratulations".

Vooraf in de jaren 1970 werd in Europa stormachtig gewerkt op het gebied van de capillaire elektroforese. Groepen uit Stockholm, Uppsala, Praag, Bratislava en Olomouc werkten samen met de Eindhovense groep van Everaerts, Beckers en Verheggen. In plaats van glazen capillairen werd veelal gebruik gemaakt van teflon capillairen met een inwendige diameter van ca. 0,5 mm. Aan de elektrolyt oplossing werd polyvinylalcohol of hydroxyethylcellulose toegevoegd om de viscositeit te verhogen en de EOF tegen te gaan. Belangrijk was ook de toegepaste afsluiting tussen het capillair en een elektrode ruimte met een semi-permeabel membraan, teneinde de netto vloeistofstroom te onderdrukken.

In Praag en Brno werd een hoogfrequent conductiviteitsdetector ontwikkeld. Met deze detector kon men meten, zonder direct contact te hebben met de elektrolyten in het capillair. Hierdoor wordt contaminatie van de elektrolyten met elektrolyseproducten voorko-

men, welke ontstaan aan de elektroden. In Bratislava ontwikkelde men een detector op basis van radioactiviteit. Met een speciaal kristal, gedoopt met I, kon men zelfs in een open laboratorium werken, de straling was te verwaarlozen. De kernreactor van Slowakije ligt naast de Comenius Universiteit in Bratislava, waar de eerste experimenten werden uitgevoerd.

Instrumenten werden in de zestiger en zeventiger jaren zelf gebouwd, later bracht de firma LKB de Tachophor op de markt, welke voorzien was van een UV-detector en een conductiviteitsdetector. Rond 1980 leverde Shimadzu een IP-2A isotachophorese-apparaat. Vermeldenswaard is ook de discontinue elektroforese (1964) van Ornstein en Davis, waarbij in de bovenste gel een isotachophoretische concentrering optreedt, welke in de onderste gel overgaat in een zone elektroforetische scheiding teneinde voldoende afstand tussen de zones te creëren voor de fotometrische detectie.

Overigens is de naam isotachophorese voorgesteld door Haglund en collega wetenschappers (1970) om een einde te maken aan de veelheid van namen voor dezelfde methode. Isotachophorese betekent letterlijk "met gelijke snelheid doen bewegen".

Theoretische aspecten van isotachophorese werden onder meer beschreven door Beckers en Everaerts en later door Mikkers, welke laatste in 1979 ook theoretische aspecten van capillaire zone-elektroforese-experimenten beschreef (40). Overigens publiceerde ook Everaerts in 1970 al capillaire zone-elektroforese-experimenten (41). Ofschoon de diverse isotachophorese-researchgroepen bekend waren met de elektro-endosmotische flow en de mogelijkheid om met een tegenovergestelde vloeistofstroom het capillair schijnbaar te verlengen bij kleine mobiliteitsverschillen, werd de EOF vooral gezien als een moeilijk controleerbaar fenomeen, dat de resolutie verstoortte en daarom bij voorkeur uitgeschakeld diende te worden. Deze EOF-onderdrukking is momenteel weer actueel door het gebruik van gecoate capillairen bij de moderne CZE.

De Amerikaanse aanpak

In 1981 beschreef Prof. J. Jorgenson en K.D. Lukacs (University North Carolina, USA), dat een vloeistofstroom kon worden opgewekt in een glazen capillair onder invloed van een elektrisch veld (42). Net zoals vroeger bij de productie van capillairen voor gaschromatografie trokken zij uit Pyrex glas een capillar met een inwendige diameter van 75 μm en uitwendige diameter van 550 μm , ten einde bij wat zij noemden vrije zone-elektroforese, de afvoer van warmte te optimaliseren. Hierbij verwezen zij o.a. naar het werk van Mikkers en Everaerts. Verder gebruikte Jorgenson een fluorescentiedetector en een elektrokinetische injectie. Als chromatograficus zag hij wel iets in de pompwerking van de EOF die tijdens de elektroforese ontstond. Hij berekende voor de verkregen scheidingen een indrukwekkend aantal theoretische schotels in analogie met de chromatografie, ofschoon deze benadering voor een elektroforetische scheiding strikt genomen discutabel is. Diverse grote firma's in de USA waren erg geïnteresseerd in deze techniek en

zorgden voor een nieuwe generatie instrumenten met onder meer fused silica capillairen, betere warmte afvoer door thermostatisering van het capillair, betere injectiemethode en dataverwerking analoog aan HPLC.

Een interessante mengvorm van chromatografie en elektroforese vormt de micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie, welke in 1984 door Terabe en collega's werd gepubliceerd.

Tot grote verbazing van ons Europeanen, claimden de Amerikanen, dat capillaire elektroforese een Amerikaanse uitvinding was. Zij vergaten hierbij dat Prof. Arne Tiselius (Nobelprijs elektroforese) uit Uppsala (Zweden) komt, evenals zijn opvolger Prof. Stellan Hjerten, welke in 1967 reeds over zone-elektroforese publiceerde. Zij "vergeten" ook het werk van de diverse laboratoria uit Europa, die theorie, instrumentatie en toepassingen voor capillaire elektroforese hadden ontwikkeld. Alleen in de Europese laboratoria werd in de beginjaren geen fused silica gebruikt en werd de EOF juist onderdrukt, omdat het een nadelige invloed had op de scherpte van de zonegrenzen in gesloten scheidingsystemen, waardoor de detectie verslechterde.

Er zijn zelfs chromatografici, die capillaire elektroforese als een vorm van chromatografie zien met een zeer hoog schotelgetal, vanwege het gebruik van een "pomp" (de EOF), de vergelijkbare instrumentatie, dataverwerking en een oppervlakkig geziene gelijkheid qua piek vorm. Wellicht dat de opmars van CE hierdoor zelfs vertraagd wordt, want juist deze groep heeft vaak te weinig inzicht in de specifieke theoretische achtergrond van elektroforese, hetgeen een voorwaarde tot succes is bij het ontwikkelen van applicaties.

Capillaire elektroforese nu

Als we de opbouw van (capillaire) elektroforese als analysetechniek in de zestiger en zeventiger jaren door de Europese onderzoeker als de eerste periode beschouwen, dan is capillaire elektroforese momenteel bezig aan haar tweede jeugd. Mits met verstand toegepast, zal het een belangrijke plaats innemen in het palet van mogelijkheden die de analyticus in de biowetenschappen tot zijn beschikking heeft.

In de literatuurlijst worden een aantal auteurs opgesomd, die bij de ontwikkeling van de capillaire elektroforese een belangrijke rol gespeeld hebben (referenties 17 – 45).

Jaarlijks wordt een symposium over capillaire elektroforese en verwante technieken georganiseerd. Het laatste symposium telde meer dan 200 bijdragen die in de "Symposia Volumes" door Elsevier (Amsterdam) worden uitgegeven.

Literatuur

1. Wiedeman G. Pogg Ann 1856; 99: 197.
2. Wiedeman G. Pogg Ann 1858; 104: 166.
3. Buff H. Ann Chem Pharm 1858; 105: 168.
4. Lodge O. Brit Ass Advan Sci Rep 1886; 56: 389.
5. Whetham WCD. Phil Trans Roy Soc London, Ser. A 1893; 184: 337.

6. Whetham WCD. *Phil Trans Roy Soc London, Ser. A* 1895; 186: 507.
7. Kohlrausch F, *Ann Phys (Leipzig)* 1897; 62: 209.
8. Hardy WB. *J Physiol* 1899; 24: 288.
9. Hardy WB. *J Physiol* 1905; 33: 251.
10. Michaelis L. *Biochem Z* 1909; 16: 81.
11. Kendall J and Crittenden ED. *Proc Nat Acad Sci, US*, 1923; 9: 75.
12. Kendall J. *Science* 1928; 87: 163.
13. Lindemann A. *Proc Roy Soc, Ser. A* 1921; 99: 102.
14. MacInnes DA and Longworth LG. *Chem Rev* 1932; 11: 171.
15. Martin AJP. *Mondelinge mededeling*
16. Longworth LG. *Nat Bur Stand (US) Circ No.* 524, 1953; 59.
17. Poulik MD. *Nature* 1957; 180: 1477.
18. Kaimakov EA and Fiks VB. *Russ J Phys Chem* 1961; 35: 873.
19. Kaimakov EA. *Russ J Phys Chem* 1961; 36: 436.
20. Konstantinov BP and Kaimakov EA. *Russ J Phys Chem* 1962; 32: 437.
21. Konstantinov BP, Kaimakov EA and Varshovkaya NL. *Russ J Phys Chem* 1962; 36: 535.
22. Konstantinov BP, Kaimakov EA and Varshovkaya NL. *Russ J Phys Chem* 1962; 36: 540.
23. Hartley GS. *Trans Faraday Soc* 1934; 30: 648.
24. Gordon AR and Kay RL. *J Chem Phys* 1953; 21: 131.
25. Konstantinov BP and Oshurkova OV. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1963; 148: 1110.
26. Konstantinov BP and Oshurkova OV. *Sov Phys Tech Phys* 1966; 11: 693.
27. Everaerts FM, *Graduation Report, University of Technology, Eindhoven* 1964., verkrijgbaar bij de auteur.
28. Kaimakov EA and Sharkov VT. *Russ J Phys Chem* 1964; 38: 893.
29. Ornstein L. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 321.
30. Davis BJ. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 404.
31. Vestermark A. *Cons Electrophoresis: An Experimental Study* 1966 (unpublished)
32. Preetz W. *Talanta* 1966; 13: 1649.
33. Preetz W and Pfeifer HL. *Talanta* 1967; 14: 255.
34. Preetz W and Pfeifer HL. *Anal Chim Acta* 1967; 38: 255.
35. Everaerts FM. *Thesis, University of Technology, Eindhoven*, 1968.
36. Martin AJP and Everaerts FM. *Anal Chim Acta* 1967; 38: 233.
37. Haglund H. *Sci Tools* 1970; 17: 2.
38. Arlinger L and Routs RJ. *Sci Tools* 1970; 17: 21.
39. Verheggen Th, Ballegooyen E van, Massen C and Everaerts FM. *J Chromatog* 1972; 64: 185.
40. Mikkers FEP, Everaerts FM and Verheggen Th. *J Chromatogr* 1979; 169: 11.
41. Keulemans AIM, Everaerts FM. *Sci Tools* 1970; 17: 25.
42. Jorgenson JW and Lukacs KD. *Clin Chem* 1981; 27: 1551.
43. Terabe S, Otsuka K, Itchikawa K et al. *Anal Chem* 1984; 56: 111.
44. Hjertén S. *Chromatogr Rev* 1967; 9: 122.
45. Tiselius A. *Trans Faraday Soc* 1937; 33: 524.

Aanbevolen boeken:

Everaerts FM, Beckers JL and Verheggen ThPEM. "Isotachopheresis, Theory, Instrumentation and Applications". *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, Amsterdam 1976; 6.

Deyl Z, Everaerts FM, Prusik Z and Svendsen PJ. "Electrophoresis: a survey of techniques and applications". *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, Amsterdam 1979; 18A.

Deyl Z, Chrambach A, Everaerts FM and Prusik Z. "Electrophoresis: a survey of techniques and applications". *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, Amsterdam 1983; 18B.

Li SFY. "Capillary Electrophoresis-Principles, practice and applications" *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, Amsterdam 1992; 52.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 210-219

Inleiding in de capillaire elektroforese: basisbegrippen, uitvoeringsvormen en karakteristieken

J.L. BECKERS¹ en J.P.M. WIELDERS²

In de verschillende bijdragen aan dit themanummer Capillaire Elektroforese (CE) worden diverse toepassingen van de CE in de klinische chemie beschreven. Alhoewel "elektroferogrammen" vaak sterk lijken op "chromatogrammen" is het scheidingsprincipe elektroforese duidelijk verschillend van het chromatografisch scheidingsprincipe. Teneinde de verschillende toepassingen van CE te kunnen doorzien wordt in dit inleidend artikel uitgelegd wat elektroforese is, wordt

de opbouw van een CE-apparaat beschreven en wordt een aantal basisbegrippen uit de elektroforese behandeld. Ook komen de verschillende uitvoeringsvormen en enige typische kenmerken van elektroforese aan de orde.

Wat is elektroforese?

Al in 1808 beschrijft von Reuss (1) een experiment, waarbij hij een potentiaalverschil aanlegt over twee elektroden, die zich bevinden in twee glazen buisjes, gestoken in een brok vochtige klei. Hij neemt waar dat in één buisje het waterniveau stijgt ten gevolge van wat later elektro-endosmose wordt genoemd, terwijl in het andere buisje een vertroebeling optreedt door opstijgen van kleideeltjes onder invloed van het aangelegde elektrische veld. Von Reuss blijkt in dit experiment twee belangrijke verschijnselen waarge-

Faculteit der Scheikundige Technologie (SPO), Technische Universiteit Eindhoven¹ en Klinisch Chemisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort²

Correspondentie: Dr. Ir. J.L. Beckers, Faculteit der Scheikundige Technologie (SPO), Technische Universiteit Eindhoven, Postbus 513, 5600 MB Eindhoven.