

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 Vestermark A. *Cons Electrophoresis: An Experimental Study* 1966 (unpublished)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.

nomen te hebben die van groot belang zijn bij elektroforetische technieken.

De eerste waarneming betreft het feit dat vloeistoffen kunnen bewegen door een poreus materiaal, onder invloed van een elektrisch veld. Dit verschijnsel wordt elektro-endosmose of elektro-osmose genoemd.

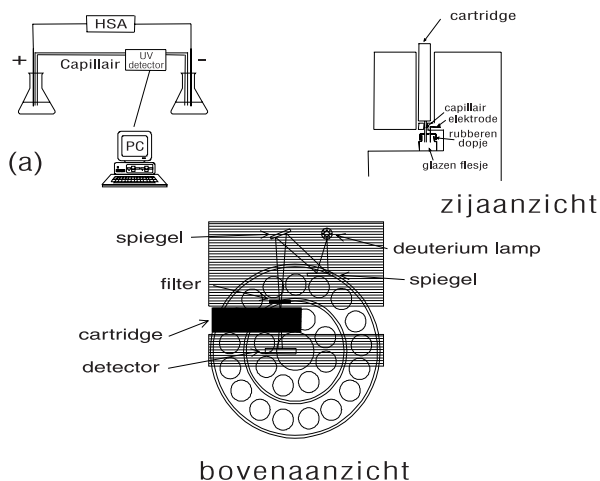
Het verschijnsel dat geladen deeltjes bewegen in een vloeistof onder invloed van een elektrisch veld wordt elektroforese genoemd. Hierbij krijgen alle deeltjes een kenmerkende soort-eigen snelheid, waardoor het mogelijk is de verschillende deeltjes naar soort te scheiden. In de analytische praktijk wordt dan ook onder elektroforese verstaan het scheidingsprincipe dat geladen deeltjes kunnen worden gescheiden doordat ze met verschillende snelheden bewegen onder invloed van een aangelegd elektrisch veld. Vaak verdeelt men de elektroforetische technieken in vier hoofdtypen, waaruit desgewenst hybriden zijn te vormen:

- de "Moving Boundary" Elektroforese (MBE)
- Isotachoforese (ITP)
- Zone Elektroforese (ZE)
- Isoelectricfocusing (IEF)

In dit inleidend artikel worden Isotachoforese, Capillaire Zone Elektroforese (CZE) en Isoelectricfocusing in het kort beschreven. Ook wordt nog de Micellaire Elektrokinetische Capillaire Chromatografie (MECC) beschreven, die gebruikt kan worden voor de scheiding van neutrale componenten en de bepaling van in water slecht-oplosbare componenten. Voor uitvoerige beschrijvingen van de diverse technieken zij verwezen naar de literatuur (2-10). Onder gebruikmaking van de verschillende elektroforetische technieken kunnen diverse stoffen, die een rol spelen in de klinisch-chemische praktijk bepaald worden, zowel grote macromoleculen zoals eiwitten, Hb en DNA, als kleine anionen en kationen.

Apparatuur

De CZE wordt veel toegepast in de klinische chemie voor o.a. de eiwitseparatie als screening op paraproteïnen. De apparatuur die daarvoor gebruikt wordt bestaat uit een basisconfiguratie zoals die onder andere



Figuur 1. (a) Schematische voorstelling van de opbouw van elektroforese apparatuur. Voor verdere toelichting zie tekst. HSA: hoogspanningsapparaat.

geleverd wordt door Beckman Coulter, BioRad en Perkin Elmer. Dergelijke CE-apparatuur bestaat in principe uit twee elektroderuimten ("buffervaatjes"), die met elkaar verbonden worden door het scheidingscapillair, dat gevuld is met een buffer. Over het capillair dat gemaakt is van buigzaam fused silica wordt een hoogspanning gezet in de orde van 10-30 kVolt, waardoor geladen deeltjes gaan bewegen en gescheiden kunnen worden. Een UV- of fluorescentiedetector meet dwars door het capillair, dat een inwendige diameter heeft van ongeveer 25-100 micrometer. De data worden verwerkt door een computer. In fig. 1 (a) is de opbouw van zo'n elektroforese apparaat schematisch weergegeven voor de P/ACE 5500. Dit CE-apparaat bestaat uit een tweetal concentrisch geplaatste draaitafels, zie fig. 1-bovenaanzicht. Hierin bevinden zich glazen flesjes, die de benodigde elektrolyten (onder andere buffers en water) bevatten en de monsters. De flesjes zijn voorzien van perforeerbare dopjes, waarin de naast elkaar gemonteerde elektroden- en capillairuiteinden gepositioneerd worden, zie fig. 1, zijaanzicht. Het capillair waarin de scheiding plaatsvindt, zit in een houder (cartridge), waar het wordt gekoeld door een vloeistof teneinde de temperatuur constant te houden, ondanks de ontwikkelde warmte van het elektroforetische proces. De lengte van het capillair varieert, afhankelijk van de beoogde scheiding en ligt tussen de 30-100 cm. N.B. in fig. 1 (a) bevindt zich de negatieve elektrode aan de detectorzijde. Dit betekent dat de positieve ionen bewegen richting detector. Dat er in deze opstelling toch nog negatieve ionen, zoals de serumproteïnen, worden gedetecteerd komt omdat deze worden meegeleurd door elektro-endosmose. De elektro-endosmose beweegt in silica capillairen namelijk in de richting van de negatieve elektrode (zie verder de paragraaf Mobiliteiten en migratietijden).

Injectie

Het capillair kan gevuld worden met de buffer door een (gas)druk uit te oefenen op de in een vaatje aanwezige bufferoplossing. De draaitafel draait vervolgens naar een andere positie waar het monster staat en injecteert vanuit dit andere vaatje het monster. Deze injectie gebeurt met een veel lagere druk. Een alternatieve manier is elektrokinetisch. Hierbij wordt het monstervaatje wederom aan het uiteinde van het capillair geplaatst, nadat het scheidingscapillair gevuld is met de buffers en door het aanleggen van een potentiaalverschil over het capillair wordt een hoeveelheid monster geïnjecteerd op basis van een ionenstroom. Bij beide soorten injecties worden nanoliters aan monsteroplossing ingebracht. Het gebruik van kleine volumina monsters is één van de vele voordelen van CE.

Detectie en registratie

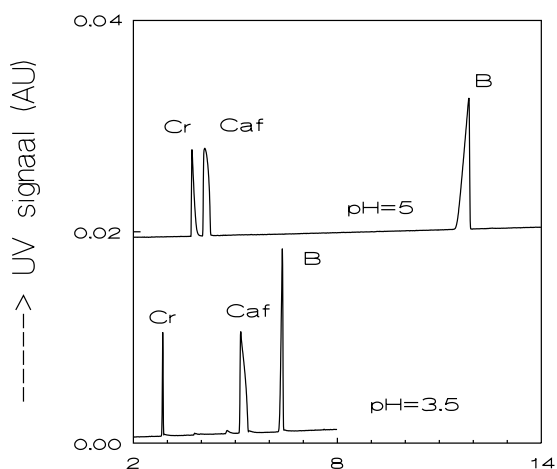
Bij UV-detectie bestaat het detectorsysteem uit een deuteriumlamp met filter, waarvan een bundel UV-licht met de gewenste golflengte naar het capillair wordt geleid, waarna het doorgelaten UV-licht met een foto-elektrische cel gemeten wordt en verder verwerkt wordt door dataverwerking. De hoogte van het

signaal is volgens de wet van Lambert-Beer evenredig aan de concentratie van de gemeten component; dit detectorprincipe is analoog aan dat bij de chromatografie. Wel dient men hierbij te bedenken dat bij chromatografische processen in het algemeen alle monstercomponenten met eenzelfde snelheid de detector passeren, terwijl bij CZE alle componenten met hun eigen verschillende snelheid de detector passeren. Dit heeft consequenties voor de keuze van signaalverwerking; in het algemeen dient men te werken met piekoppervlakken en niet met piekhoogten, terwijl bovendien gecorrigeerd dient te worden voor fluctuaties in migratietijden. Het bij CZE geregistreerde detectorsignaal uitgezet tegen de tijd wordt elektroferogram genoemd. Afwijkend ten opzichte van chromatografische analysemethoden wordt bij CZE gesproken van migratietijden en niet van retentietijden.

Het scheidingsproces bij zone elektroforese

De scheiding van componenten komt tot stand onder invloed van de lading van de componenten, de grootte, de viscositeit van de buffer, de spanning over het silica capillair en de vloeistofbeweging in het capillair. Bij een CZE-scheiding wordt het gehele scheidingssysteem, inclusief elektroderuimten, gevuld met een zogenaamd backgroundelektrolyt of BGE. De pH van het elektrolytsysteem en de viscositeit van de vloeistof (temperatuurafhankelijk) bepalen samen met de pK-waarden de mobiliteit in een elektrisch veld. Om enige typische kenmerken van het scheidingsproces in CZE te demonstreren zijn in fig. 2 de elektroferogrammen voor de scheiding van een mengsel van creatinine, cafeïne en benzoëzuur weergegeven onder gebruikmaking van een BGE op pH's van 3,5 en 5 respectievelijk. In dit artikel gepresenteerde elektroferogrammen zijn gemeten met een P/ACE 5500 van de firma Beckman Coulter, waarvan de instellingen vermeld zijn in Tabel 1.

Als we fig. 2 bekijken vallen een aantal zaken op. Om te beginnen blijkt de neutrale component cafeïne (Caf), die geen eigen lading bezit, toch met een bepaalde snelheid o.i.v. het elektrisch veld door het



Figuur 2. Elektroferogrammen voor de scheiding van een mengsel van creatinine (Cr), cafeïne (Caf) en benzoëzuur (B) gemeten onder gebruikmaking van een BGE op pH's van 3,5 en 5 respectievelijk. Zie tabel 1 voor meetcondities.

Tabel 1. Meetcondities voor de P/ACE 5500 (Beckman)

Temperatuur	30°C
Capillair lengte	0,466 m
Afstand injectie-detectie	0,40 m
Capillair diameter (I.D.)	75 µm
Spanning	15 kV
(negatieve potentiaal aan detector zijde)	
Injectiedruk	0,5 psi
Injectiesnelheid	ca. 1 mm/s
Injectietijd	5 s
Spoeldruk	20 psi
Golfengte detector	214 nm

BGE : 0,01 mol/l Tris + azijnzuur tot pH 5; 0,01 mol/l Tris + mierenzuur tot pH 3,5

systeem te migreren. Dit komt omdat hij meegevoerd wordt met de snelheid van de vloeistof, de elektroosmotische flow (EOF). Omdat hij de snelheid van de EOF markeert wordt hij een EOF-marker genoemd. Uit de figuren blijkt dat de snelheid van de EOF hoger is bij hogere pH. De positief geladen component creatinine (Cr), vertoont een kleinere migratietijd dan de EOF-marker. Hij beweegt ook in de richting van de negatieve elektrode met een extra snelheid. De negatief geladen component benzoëzuur (B) beweegt in de richting van de positieve elektrode, maar wordt toch nog meegesleurd door de EOF. Omdat zijn eigen elektroforetische snelheid tegengesteld aan de EOF is zijn migratietijd groter dan die van de EOF-marker cafeïne. Opmerkelijk is ook de driehoekige vorm van de pieken, vooral duidelijk zichtbaar bij het BGE op pH 5. De geladen deeltjes creatinine en benzoëzuur vertonen smallere pieken dan de neutrale component cafeïne, ze worden opgescherpt (stacking), vooral zichtbaar bij pH 3,5.

Mobiliteiten en migratietijden in CZE

Von Reuss nam in zijn experimenten zowel elektroforese als ook elektro-endosmose waar. Aangezien beide fenomenen opgeteld moeten worden om de migratie van deeltjes in een elektrisch veld te verklaren, zullen ze nu successievelijk behandeld worden.

De elektroforetische mobiliteit

Als men een potentiaalverschil aanlegt over twee elektroden, die geplaatst zijn aan de uiteinden van een scheidingscapillair dat gevuld is met een elektrolytoplossing, stelt zich in het scheidingscapillair een elektrisch veld in. De elektrische veldsterkte E in het capillair wordt:

$$E = \frac{V}{L_C} \quad [V m^{-1}] \quad [1]$$

waarbij V (Volt) het aangelegd potentiaalverschil en L_C (m) de capillairlengte voorstellen. Geladen deeltjes die zich in deze elektrolytoplossing bevinden, gaan bewegen onder invloed van dit elektrische veld en krijgen een snelheid die recht evenredig is met de veldsterkte E , volgens de formules:

$$v = m \cdot E \quad [m s^{-1}] \quad \text{of} \quad m = \frac{v}{E} \quad [m^2 V^{-1} s^{-1}] \quad [2]$$

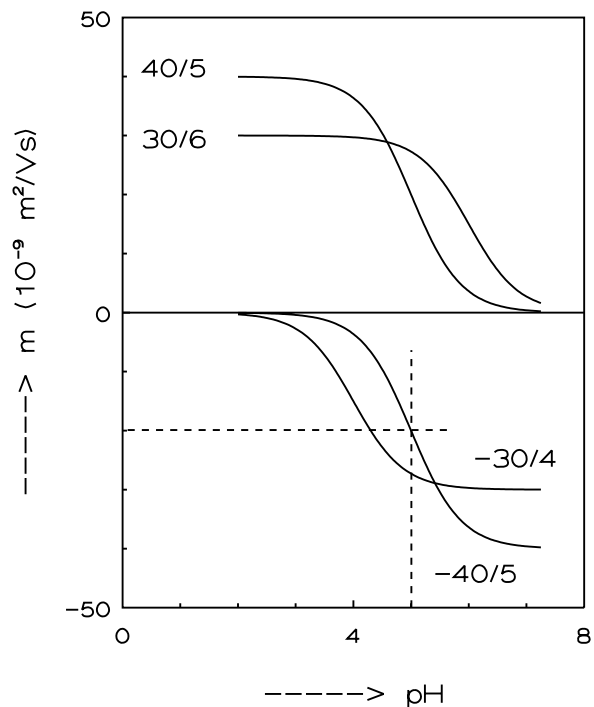
De evenredigheidsconstante m wordt de mobiliteit genoemd en stelt dus de snelheid van een geladen component per eenheid van elektrische veldsterkte voor. Deze mobiliteit is een stoffeigenschap, heeft een bepaalde constante waarde voor een bepaald elektrolyt-systeem en hangt o.a. af van de grootte van het molecuul, de pK waarde van de component, de pH van het elektrolytsysteem, de viscositeit van de vloeistoffen en dus ook van de temperatuur. Bij oneindige verdunning (dus bij een concentratie praktisch gelijk aan nul) als er géén zgn. ionatmosfeer werkzaam is, is de mobiliteit m_i^o afhankelijk van de lading q , de viscositeit η (Pa.s) van het medium en de straal r van het gehydrateerd deeltje volgens de formule:

$$m_i^o = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad [3]$$

Bij een bepaalde concentratie (dus bij eindige verdunning) zijn ionen omringd door tegengesteld geladen ionen. Deze "tegen-ionen" bewegen o.i.v. een elektrisch veld in tegengestelde richting. Een ion moet dus migreren tegen de hem omringende tegengesteld geladen ionen in, waardoor hij vertraagd wordt. De zwaartepunten van het ion en de hem omringende tegengesteld geladen ionen vallen niet meer samen. Voor een uitvoerige beschouwing van deze zgn. elektroforetische en relaxatie effecten zij verwezen naar de Debye-Hückel-Onsager relaties (11). Positief geladen deeltjes (kationen) bewegen in de richting van de negatieve elektrode (kathode) en negatief geladen deeltjes (anionen) in de richting van de positieve elektrode (anode). Voor kationen heeft de mobiliteit een positieve en voor anionen een negatieve waarde. De orde van grootte voor de scalaire waarden van deze mobiliteiten is $20 \text{ á } 80 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Bij potentiaalverschillen van 10 kV over een capillair-lengte van 50 cm, leidt dit tot snelheden van 0,4 á 1,6 mm/s, waardoor analysetijden in de orde van grootte van 10 minuten gebruikelijk zijn. Zwakke zuren en basen zijn niet altijd geheel geprotolyseerd, c.q. geprotoneerd, waardoor hun effectieve mobiliteit kleiner zal zijn dan hun ionmobiliteit. Bij het migreren van gedeeltelijk geprotolyseerde en dus geladen zuren en basen moet men zich voorstellen dat de component in één zone migreert, waarbij beurtelings het molecuul in de geladen c.q. ongeladen vorm aanwezig is. Men kan nooit de geladen en ongeladen fracties van zwakke zuren en basen van elkaar scheiden, omdat het chemisch evenwicht (de protolyse snelheid) in het algemeen beduidend groter is dan de migratiesnelheid. Ook complexering kan de mobiliteit verkleinen, denk bijvoorbeeld maar aan de interactie tussen calcium ionen en EDTA of citraat. De effecten van de pH op het migratiegedrag kunnen ingeschat worden door gebruik te maken van de formules:

$$\text{anionen} : m_{\text{eff},i} = \alpha m_i^c ; \text{ kationen} : m_{\text{eff},i} = (1 - \alpha) m_i^c \quad [4]$$

In deze formule stelt α de dissociatiegraad voor, die bepaald wordt door zowel de pH van de elektrolytoplossing als de pK waarde van de component, volgens de formule van Henderson-Hasselbalch. De m_i^c is de ionmobiliteit bij de toegepaste concentratie.



Figuur 3. Mobiliteiten van componenten als functie der pH, voor verschillende ionmobiliteiten en pK-waarden. De relaties zijn gemarkeerd met twee getallen die de ionmobiliteit m_i^c en pK-waarde voorstellen. Als de pH-waarde gelijk is aan de pK-waarde is de effectieve mobiliteit gelijk aan de helft van de ionmobiliteit (zie stippellijn).

Voor kationen wordt dus bij lage pH en voor anionen bij hoge pH de maximale waarde van de elektroforetische mobiliteit verkregen. In fig. 3 zijn de mobiliteiten van enige componenten als functie der pH, voor verschillende ionmobiliteiten en pK-waarden, weergegeven. De relaties zijn gemarkeerd met twee getallen die de ionmobiliteit en pK-waarde voorstellen. Als de pH-waarde gelijk is aan de pK-waarde is de effectieve mobiliteit gelijk aan de helft van de ionmobiliteit (zie stippellijn). Voor acetaat bijvoorbeeld met een ionmobiliteit van $-42 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ en pK-waarde van 4,75 resulteert een effectieve mobiliteit bij pH 4,75 van $-21 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Belangrijk in fig. 3 zijn ook de snijpunten in de curven; bij een pH van ongeveer 4,5 heeft het kation met ionmobiliteit 40 en pK 5 dezelfde effectieve mobiliteit als het kation met ionmobiliteit 30 en pK 6. Ze vormen in een BGE met pH 4,5 een mengzone terwijl ze bij een hogere of lagere pH van het BGE prima te scheiden zijn. Voor de volledigheid moet hier ook gewezen worden op de mogelijke remmende invloed op de mobiliteit van frictie en tortuositeit in een dragermateriaal met kleine kronkelige poriën, bij bijvoorbeeld eiwit-elektroforese in een gel of membraam.

De EOF-mobiliteit

Als men over een met een elektrolytoplossing gevuld capillair een potentiaalverschil aanlegt, blijkt o.i.v. van het aangelegde veld ook de vloeistof zelf te gaan bewegen: de elektro-osmotische flow (EOF). De snelheid van deze EOF blijkt ook evenredig met de aangelegde veldsterkte te verlopen. Men hanteert daarom

ook wel het begrip “mobiliteit” van de EOF, gedefinieerd als:

$$m_{EOF} = \frac{V_{EOF}}{E} \quad [m^2 V^{-1} s^{-1}] \quad [5]$$

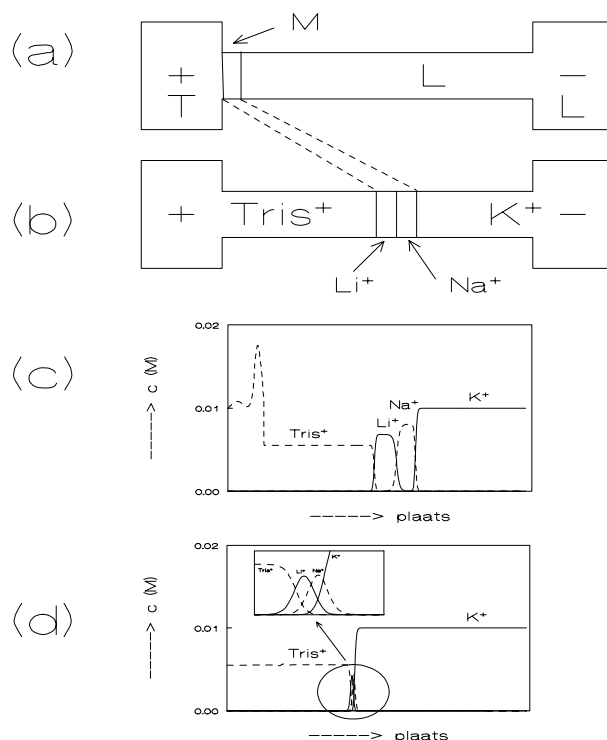
Voor silicacapillairen, die vaak bij elektroforetische technieken gebruikt worden, blijkt de EOF in de richting van de kathode te bewegen, doordat de silica wand negatief geladen is en de aanpalende vloeistoflaag positief. De mobiliteit van de EOF neemt toe bij hogere pH van het gebruikte BGE en varieert voor een pH van ca. 3 tot 9 van $+20$ tot ca. $+80 \times 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$ voor ongecoate capillairen. Afhankelijk van het gewenste resultaat kan de EOF al dan niet onderdrukt of uitgeschakeld worden door enerzijds toevoeging van additieven aan het BGE zoals polyvinylalcohol, oppervlak-actieve stoffen als Tween of proteïnen als albumine (dynamische coating van de wand) of anderzijds door chemische coating van de wand met “end-capping” van de silanolgroepen. Ook kan elektroforese in kunststof capillairen van Teflon worden uitgevoerd, waarbij de EOF grotendeels uitgeschakeld is. Zoals we gezien hebben in fig. 2 heeft de EOF een grote impact op elektroforetische processen. Zo blijken anionen (negatief geladen deeltjes) toch in de richting van de kathode meegesleurd te kunnen worden mits de mobiliteit van de EOF groter is dan die van de anionen. Dit is de reden waarom in de capillaire zone elektroforese in één experiment zowel anionen als kationen bepaald kunnen worden. De netto snelheid van een deeltje wordt dus bepaald door de resultante van de snelheid van het deeltje en de snelheid van de EOF. De schijnbare mobiliteit of apparent mobility m_{app} wordt gedefinieerd als de sommatie van de mobiliteit van de EOF en die van het deeltje zelf. Als de apparent mobility voor een bepaalde component bij het elektroforetisch proces negatief is, dus een netto beweging naar de positieve elektrode, zal de component nooit bij de detector aankomen, als deze zich aan de kathode kant bevindt. Voor de migratietijd kan afgeleid worden:

$$t = \frac{L_d}{v} = \frac{L_d L_c}{m_{app} V} \quad [6]$$

waarbij L_d de afstand is tussen injectie en detectie voorstelt. M.b.v. deze formule kunnen migratietijden berekend worden uit bekende mobiliteiten of mobiliteiten uit gemeten migratietijden.

Elektroforetische uitvoeringstechnieken

Zoals al aangegeven, kunnen elektroforetische processen op verschillende manieren worden uitgevoerd. Hierbij is met name van belang de keuze van het BGE in het scheidingscompartiment in combinatie met de samenstelling van de elektrolyten in de elektroderuimten. Dit alles uiteraard afgestemd op de karakteristieken van het te analyseren monster. Bovendien kunnen de verschillende uitvoeringstechnieken vaak nog gekoppeld worden of kunnen binnen één experiment de verschillende componenten volgens verschillende elektroforetische principes migreren. Elektroforese is multifactorieel bepaald en daardoor soms moeilijker te begrijpen dan vloeistofchromato-



Figuur 4. Isotachoforese voor kationen. (a) Het scheidingscapillair en de kathoderuimte zijn gevuld met een leidend elektrolyt L terwijl de anoderuimte gevuld wordt met het terminerend elektrolyt T. De monsteroplossing M wordt ingebracht tussen L en T. (b) Na enige tijd zijn de monsterionen, hier Na^+ en Li^+ ionen, gescheiden en migreren met gelijke snelheid tussen het leidend elektrolyt KCl en terminerend elektrolyt TrisCl. (c) Gesimuleerde concentratieprofielen voor de situatie onder (b). Let op de verhoogde concentratie aan Tris op de oorspronkelijke bemonsteringsplaats. (d) Ook als er slechts een zeer kleine hoeveelheid monstercomponent aanwezig is, migreren deze gestackt tussen L en T. Voor verdere informatie zie tekst.

grafie. Om de typische verschillen in migratiegedrag te demonstreren zullen we een isotachoforetisch, een zone elektroforetisch en een isoelectricfocusing proces beschrijven, waarna de MECC mode besproken wordt.

Isotachoforese

Bij isotachoforese (ITP) kunnen in één experiment, slechts kationen óf anionen gescheiden worden. Voor de scheiding van kationen worden het scheidingscapillair en de kathoderuimte gevuld met een zogenaamd leidend elektrolyt (L), zie fig. 4. De anoderuimte wordt gevuld met het terminerend elektrolyt (T). Het kation van L dient een mobiliteit te bezitten groter dan de mobiliteit van de te scheiden kationen in het monster. De mobiliteit van het kation van T dient kleiner te zijn dan die van de monsterkationen. Als men de monstercomponenten inbrengt tussen L en T, dan blijven de monstercomponenten ook tussen L en T migreren en worden uiteindelijk gescheiden. In fig. 4 (a) is de uitgangstoestand weergegeven voor de scheiding van een mengsel van $0,01 mol/l Na^+$ en Li^+ met een leidend elektrolyt $0,01 mol/l KCl$ en terminerend elektrolyt $0,01 mol/l TrisCl$. In fig. 4 (b) is de toestand in het capillair na enige tijd weergegeven,

waarbij de gescheiden componenten Na^+ en Li^+ migreren in aansluitende aparte zones, gerangschikt naar afnemende mobiliteit tussen het leidend ion K^+ en het terminerend ion Tris^+ . In fig. 4 (c) zijn de met een simulatieprogramma berekende concentratieprofielen voor de kationen weergegeven, berekend voor de onder (b) beschreven scheiding. Duidelijk is te zien dat de concentraties in de Na^+ , Li^+ en Tris^+ zones achter de K^+ zone aangepast zijn aan die van het leidend ion K^+ volgens de Kohlrausch regulering function (KRF), die later nog wordt besproken. Voor lagere mobiliteiten stellen zich lagere concentraties in. Op de oorspronkelijke bemonsteringsplaats, was de totale concentratie aan ionen 0,02 mol/l en men ziet dat zich daar ter plaatse een Tris^+ concentratie van ca. 0,018 mol/l heeft ingesteld, terwijl op de oorspronkelijke plaats van T de concentratie aan Tris^+ 0,01 mol/l gebleven is. Alle zones bevatten slechts één soort kationen. In fig. 4 (d) is de ITP-simulatie weergegeven voor dezelfde ionsoorten als die in fig. 4 (c), met dien verstande dat slechts een kleine hoeveelheid monster is ingebracht. Men ziet nu dat er niet voldoende monster aanwezig is om volgens de KRF geconcentreerd te kunnen worden tot de aangepaste concentratie en dat dit tot zeer kleine zonelengten leidt (zie de vergrootte inzet), maar de monstercomponenten blijven op hoge concentratie, als vrij scherpe stabiele zones migreren ingeklemd tussen aangrenzende grotere zones. Door deze eigenschap wordt ITP vaak toegepast als pre-concentratie stap voor verdunde monsteroplossingen, waarna men door

wisseling van elektrolyten het scheidingsproces laat voltrekken volgens CZE. Men spreekt in zo'n geval dan van transient ITP of gekoppeld ITP-CZE.

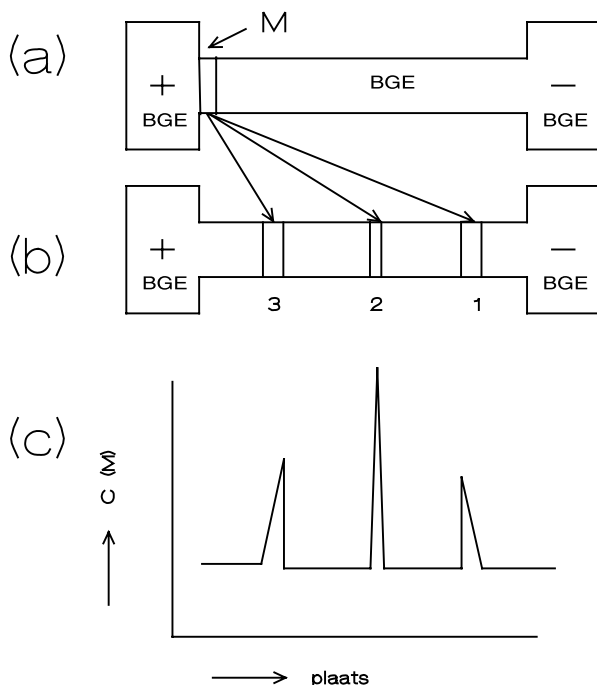
Capillaire zone elektroforese

Bij zone elektroforese wordt het gehele scheidings-systeem, inclusief elektroderuimten, gevuld met het zogenaamde backgroundelektrolyt of BGE. Bij toepassing van een elektrische stroom door dit systeem zal dus overall een vrijwel constante elektrische veldsterkte heersen. Componenten die in dit systeem worden ingebracht, zullen dus elk met een eigen snelheid, bepaald door hun karakteristieke mobiliteit, gaan migreren en aldus gescheiden worden. In fig. 5 is schematisch dit zone elektroforetisch principe weergegeven. In fig. 5 (a) is de beginsituatie gegeven waarbij het gehele apparaat wordt gevuld met eenzelfde BGE. De monsteroplossing M wordt ingebracht in dit BGE. In fig. 5 (b) is de situatie na enige tijd weergegeven. De monstercomponenten migreren elk met hun eigen typische snelheid, bepaald door hun apparent mobiliteit en veldsterkte en worden aldus gescheiden. De niet-geladen component 2, beweegt met de snelheid van de EOF. De positieve ionen 1, bewegen sneller dan de EOF terwijl de negatieve ionen 3 toch richting kathode worden meegesleurd mits de mobiliteit van EOF groter is dan die van de negatieve ionen zelf. Het elektroferogram is in fig. 5 (c) gegeven.

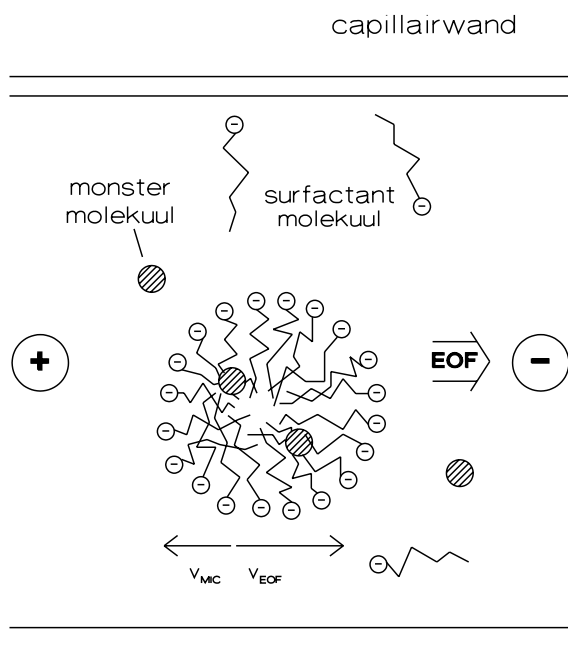
Isoelectricfocusing

Deze techniek is in feite alleen geschikt voor monstercomponenten, welke zowel positief als negatief geladen kunnen zijn: amfolieten. Omdat proteïnen amfolieten zijn, anion bij neutrale en hoge pH en kation bij lage pH, wordt deze techniek vaak ingezet voor scheiding van proteïnen. Men spreekt ook van scheiding op pI-waarde omdat in de eindfase van het elektroforetisch proces, de monstercomponenten gerangschikt volgens hun pI-waarde, ingebed zijn in een gestabiliseerde pH-gradiënt binnen het scheidingscompartiment. Bij capillaire isoelectric focusing (CIEF) wordt in het capillair allereerst een pH-gradiënt opgebouwd met behulp van een mengsel synthetische amfolieten van een bepaalde pH-range, bijvoorbeeld van 5 tot 6. Het monster wordt tezamen met de synthetische amfolieten geïnjecteerd, waarna de scheiding plaats kan vinden. De lage pH zijde van de gradiënt bevindt zich aan de kant van de anode. Tenslotte wordt de hele pH-gradiënt, inclusief de ingebedde monstercomponenten, middels druk langs de detector gevoerd. In principe kan in plaats van gasdruk, ook de EOF benut worden als pomp. In de praktijk is CIEF moeilijk te hanteren en er zal hier dan ook niet verder op worden ingegaan, ofschoon ze voor de ervaren "homo elektroforeticus" zeer nuttig kan zijn als alternatief voor IEF in gels.

Micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie
Door de groep van Terabe is de micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie (MECC) geïntroduceerd, die beschouwd kan worden als een "hybride" scheidingstechniek, waarbij het elektro-



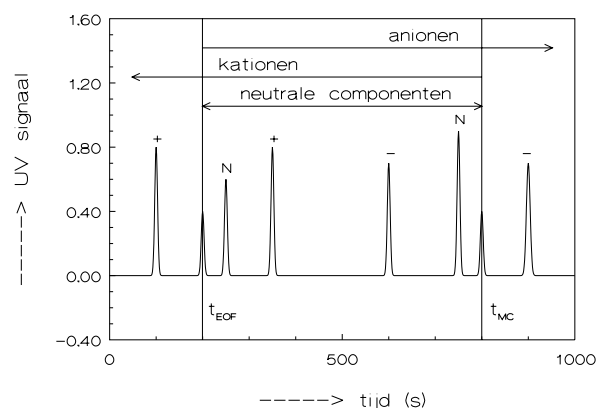
Figuur 5. Capillaire zone elektroforese. (a) Het gehele apparaat wordt gevuld met eenzelfde achtergrondelektrolyt (BGE). De monsteroplossing M wordt ingebracht in dit BGE. (b) Na enige tijd worden de monstercomponenten gescheiden. De niet-geladen component 2, beweegt met de snelheid van de EOF. De positieve ionen 1, bewegen sneller dan de EOF terwijl de negatieve ionen 3 toch richting kathode worden meegesleurd mits de mobiliteit van EOF groter is dan die van de negatieve ionen zelf. Voor verdere informatie zie tekst.



Figuur 6. In MECC is aan het achtergrondelektrolyt een surfactant toegevoegd waardoor negatief geladen micellen gevormd worden. Als de snelheid van de EOF groter is dan die van de negatieve micellen bewegen deze toch naar de negatieve elektrode. Neutrale componenten die in de micellen oplossen zullen dus ook richting negatieve elektrode bewegen. Voor verdere informatie zie tekst.

foretische en chromatografische scheidingsprincipe gecombineerd zijn. Met deze methode kunnen ook neutrale componenten bepaald worden, dit ter onderscheid met de gewone elektroforetische scheidings-techniek. Het principe bij MECC is dat men aan het achtergrondelektrolyt een micelvormer (surfactant) toevoegt op een concentratie boven de zgn. kritische micelconcentratie (CMC). Er worden dus micellen gevormd die inwendig hydrofoob zijn en waarvan de buitenkant hydrofiel is, door de in de micel-vormer aanwezige geladen functionele groepen. De micellen verkeren in een dynamisch evenwicht met de monomeren van de micel-vormer. Vaak gebruikt men als micel-vormers de negatief geladen dodecylsulfaat ionen (uit SDS) of de positief geladen cetyltrimethylammonium ionen (uit CTAB). De gevormde micellen zullen door hun lading migreren met een door het elektrolytsysteem bepaalde mobiliteit. Het elektrolytsysteem in MECC bestaat dus uit twee mobiele fasen, namelijk de waterige en de micellaire fase.

Voor de volgende beschouwing nemen we aan dat we silica capillairen gebruiken, waarvan de mobiliteit van de EOF groter is dan de absolute waarde van die van negatief geladen micellen. We krijgen dan de situatie zoals geschetst in fig. 6. De gevormde micellen zullen naar de positieve elektrode bewegen met een bepaalde snelheid v_{MC} . Als de capillairwand uit silica bestaat, zal er een EOF richting negatieve elektrode optreden. Als de snelheid van de EOF (v_{EOF}) groter is dan de die van de tegengesteld gerichte snelheid van de micellen, worden deze toch richting negatieve elektrode getransporteerd. Neutrale componenten die in bepaalde mate opgelost zijn in de micellaire fase,



Figuur 7. Schematische voorstelling van een elektroferogram voor componenten, gemeten in de MECC mode. Neutrale componenten bewegen altijd tussen de t_{EOF} -en de t_{MC} -marker. Positieve ionen bewegen vóór de t_{MC} -marker en de negatieve ionen na de t_{EOF} -marker. Voor verdere informatie zie tekst.

zullen dus ook richting negatieve elektrode bewegen. Men kan dus aan neutrale componenten in MECC een zgn. pseudo-mobiliteit toekennen, die o.a. afhangt van de mobiliteit van de micellen. Als neutrale deeltjes met een andere verdelingscoëfficiënt over de micellaire en waterige fase verdeeld zijn en dus een andere pseudo-mobiliteit bezitten zijn ze in de MECC-mode te scheiden. In fig. 7 zijn de verschillende mogelijkheden van migratiegedrag in MECC weergegeven. Positieve ionen die geen interactie met de micellen aangaan zullen migreren voor de t_{eof} , maar als ze wel een interactie aangaan met de micellen kunnen ze vertraagd worden waardoor het migratietijdsinterval voor kationen loopt van $t=0$ tot t_{MC} . Het migratietijdsinterval voor anionen loopt van t_{eof} tot $t=\infty$. Voor neutrale componenten loopt het migratietijdsinterval van t_{eof} (geen interactie met micellen) tot t_{MC} (volledige interactie met micellen).

Bijzondere kenmerken van CZE

Elektroforetische processen worden gereguleerd door enige fysisch-chemische wetten en kunnen beschreven worden door een beperkt aantal mathematische relaties. Naast de chemische evenwichtsvoorwaarden, massabalansen en de elektroneutraliteitsvoorwaarde, zijn de gemodificeerde wet van Ohm en de "regulating function" van Kohlrausch belangrijk, omdat met deze wetten vele facetten en merkwaardige verschijnselen in elektroforetische processen doorzien en verklaard kunnen worden. Ook kunnen elektroforetische scheidingsprocessen gesimuleerd worden uitgaande van deze mathematische relaties. In deze paragraaf gaan we eerst de gemodificeerde wet van Ohm en de Kohlrausch regulating function bekijken, waarna we beknopt de indirecte UV-mode, het stacking mechanisme en de piekvorm zullen bespreken.

De gemodificeerde wet van Ohm

De weerstand van een geleider kan berekend worden met de formule:

$$R = \rho \cdot \frac{L}{A} \quad [\Omega] \quad [7]$$

waarbij ρ (Ωm) de specifieke weerstand van het materiaal, L (m) de lengte en A (m^2) de doorsnede van de draad voorstellen. Voor een met elektrolyt gevuld capillair geldt dezelfde relatie en gecombineerd met de wet van Ohm verkrijgt men dan:

$$V = I \cdot R = I \cdot \rho \cdot \frac{Lc}{A} \text{ of } \frac{V}{Lc} \frac{I}{\rho} = \frac{I}{A} \text{ of } E \cdot \sigma = j \quad [8]$$

Deze laatste formule is de zogenaamde gemodificeerde wet van Ohm. In deze formule is σ ($\Omega^{-1}\text{m}^{-1}$) de specifieke geleidbaarheid, E de elektrische veldsterkte en j de stroomdichtheid. Aannemende dat er nergens ladingsopbouw plaats vindt, is op elk moment in elk punt van een geleider de stroomdichtheid j constant. Uit de gemodificeerde wet van Ohm volgt dan, dat op plaatsen met een hogere specifieke geleidbaarheid de lokale veldsterkte lager is en v.v.

Kohlrausch regulating function

Een elektrolyt vertoont bij stroomdoorgang, in afwezigheid van convectie, als het ware een geheugen. Belangrijke karakteristieken op een bepaalde plaats worden bepaald (gereguleerd) door de karakteristieken van het oorspronkelijk aanwezige elektrolyt. De Kohlrausch regulating function (KRF) schrijft voor dat de numerieke waarde ω op elke plaats in het scheidingscapillair constant is gedurende een elektroforetisch proces en gelijk blijft aan de initiële waarde van vóór het aanleggen van een elektrische stroom. Voor volledig geïoniseerde monovalente ionaire componenten, is de ω gedefinieerd als:

$$\omega = \sum_i \frac{c_i}{m_i} \quad [9]$$

waarbij de c_i en m_i staan voor de ionenconcentraties en effectieve mobiliteiten van de ionen. Het feit dat de plaatsbepaalde waarden voor de ω constant blijven gedurende het gehele elektroforetisch proces leidt tot enige opmerkelijke kenmerken van elektroforetische processen.

Gevolgen van KRF

De gevolgen van KRF zijn:

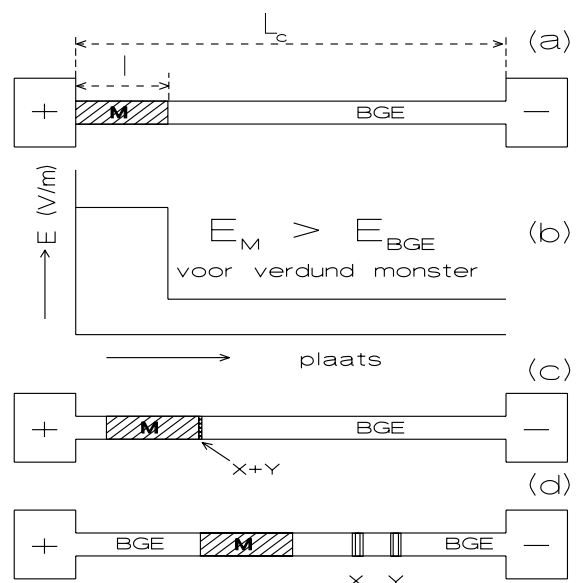
- Als een monsteroplossing met afwijkende ω waarde wordt geïnjecteerd in een BGE, blijft op de plaats van bemonstering deze ω -waarde geldig gedurende het hele elektroforetisch proces. Dit leidt tot de zgn. EOF- of "water-dip" in elektroferogrammen.
- Monstercomponenten, ingebracht op lage concentratie, worden geconcentreerd zodra ze migreren in het BGE-compartiment in een mate afhankelijk van mobiliteit en concentratie van de BGE-ionen. Dit leidt tot de zgn. "stacking".
- Na concentrering gaan de monstercomponenten migreren in de zone elektroforetische mode. De zones worden steeds breder door diverse piekverbreidingseffecten en de monsterconcentraties worden steeds lager. Kenmerkend is dat deze piekverbreiding vaak overwegend aan één zijde optreedt, door de zgn. elektrodispersie, waardoor de pieken driehoekig zijn.

Indirecte UV-mode

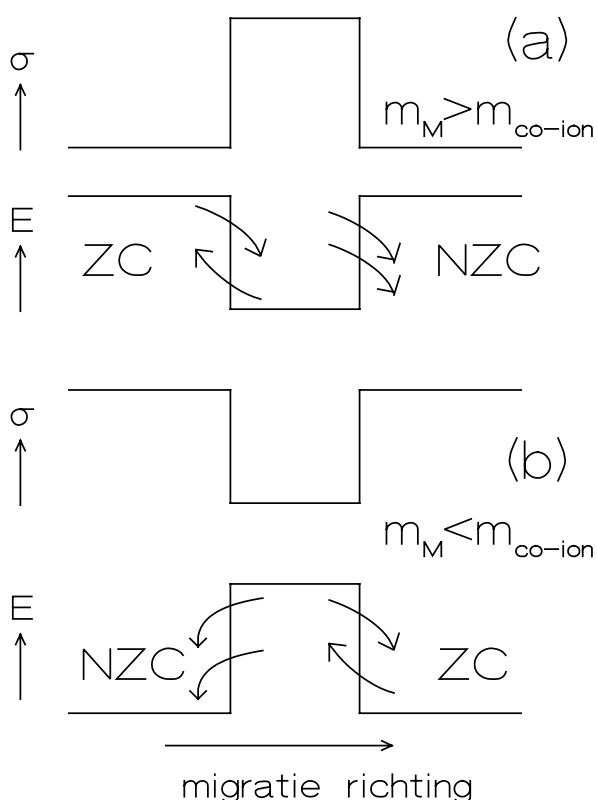
Bij elektroforese apparatuur wordt vaak gebruik gemaakt van UV-detectoren, hetgeen betekent dat UV-transparante componenten niet door de detector waargenomen zullen worden. Om toch UV-transparante componenten met een UV-detector te kunnen detecteren kan de zogenaamde indirecte UV-mode toegepast worden. Bij de indirecte UV-mode wordt een BGE toegepast, waarvan het co-ion wél UV-absorberend is. Het co-ion is het BGE-ion met dezelfde soort lading als de te scheiden monsterionen. In een monsterzone zitten minder co-ionen dan in het BGE zelf, omdat co-ionen vervangen zijn door monsterionen. De juiste concentraties kunnen met de KRF berekend worden (12) en hierbij blijkt dat in het algemeen geen één-op-één vervanging zal optreden. Als we het UV-signaal bekijken, zal in het segment waar de monsterionen aanwezig zijn, en dus minder UV-absorberende co-ionen, een verlaagde UV-absorptie waargenomen worden. De monsterzones verschijnen dus als een dip in het elektroferogram ("negatieve UV-piek"), die vaak driekantig van vorm is.

Stacking (concentrering) in CZE

Bij elektroforetische processen nemen de analiet (te meten monstercomponent) concentraties af gedurende de migratie, door de diverse piekverbreidingseffecten binnen de monsterzones, net als bij chromatografische technieken. Uitgaande van de gebruikelijke monsterconcentraties zou dit tot problemen leiden, omdat de minimaal aantoonbare concentratie aan de detector al vrij hoog is, vanwege de zeer geringe optische weglengte in de detector (in de orde van grootte van de capillairdiameter). Gelukkig kunnen tijdens de elektroforese de monstercomponenten geconcentreerd worden (stacking). De meest simpele stacking proces-



Figuur 8. Bij sample stacking kan een monster M ingebracht worden op een verlaagde ionsterkte. In de monsterzone M zal dus een hogere veldsterkte E_M heersen dan in het BGE. De monsterionen zullen zich dus concentreren tussen de oorspronkelijke bemonsteringsplaats en het BGE, waarna ze gescheiden worden volgens het zone elektroforetisch principe. Voor verdere informatie zie tekst.



Figuur 9. Als monsterionen een grotere mobiliteit hebben dan de co-ionen, is de specifieke geleidbaarheid in de monsterzone groter dan die van het BGE en is de lokale E kleiner. (a) De monsterzone is aan de voorzijde niet zelf-corrigerend (NZC) en vertoont fronting, zie ook piek 1 in fig. 5 (c). Als de monsterionen kleinere mobiliteiten bezitten dan het BGE co-ion (b) is de voorzijde zelf-corrigerend (ZC) en zijn de zones tailend. Voor verdere toelichting zie tekst.

ture (13) bestaat uit de injectie van verdunde monsteroplossing. In wezen wordt bij stacking een concentrering verkregen omdat de monstercomponenten moeten voldoen aan de KRF, zie fig. 8. (a) Het monster is op lage ionsterkte ingebracht met een lengte l , op de bemonsteringsplaats M . (b) Door de lage specifieke geleidbaarheid op de bemonsteringsplaats M , zal ter plaatse volgens de wet van Ohm een hoge veldsterkte heersen. (c) Daardoor migreren de monsterionen X en Y met zeer grote snelheid uit de bemonsteringsplaats en komen dan terecht in het BGE waar een veel lagere veldsterkte heerst. Ze verliezen dus aanzienlijk aan snelheid en zullen zich dus concentreren tussen de oorspronkelijke bemonsteringsplaats M en het BGE. (d) Vervolgens worden ze zone elektroforetisch gescheiden. Te lange geïnjecteerde monsterpluggen op te lage concentraties leiden tot verlies aan resolutie (13).

De piekvorm : fronting of tailing

In elektroforese zijn in het algemeen de gemeten zones niet gaussisch maar driehoekig van vorm. De reden hiervoor is dat een der grensvlakken tussen monsterzone en BGE een zogenaamd zelf-corrigerend vermogen heeft om het grensvlak te stabiliseren, terwijl het andere grensvlak diffuus wordt. Dit kan verklaard worden als volgt, zie fig. 9 (a). Als de mobiliteit van

het monsterion groter is dan die van het co-ion, dat gedeeltelijk wordt verdrongen in de monsterzone, is de specifieke geleidbaarheid in de monsterzone groter dan die in het BGE waardoor de lokale E ter plaatse kleiner is. Als nu een monsterion, door een of andere reden achterblijft, komt hij in de hogere veldsterkte van het BGE terecht, krijgt daardoor een grotere snelheid en bereikt weer zijn eigen zone. Dit grensvlak is dus zelf-corrigerend (ZC). Als een monsterion voorijlt op zijn zone, komt hij ook terecht in een hogere veldsterkte, krijgt dus een nog grotere snelheid en zal dus vooruit blijven, dus een niet zelf-corrigerend (NZC) grensvlak. Dit proces aan de voorkant blijft doorgaan, waardoor deze zones driehoekig zijn en diffuus aan de voorzijde (fronting). Men noemt deze vorm van piekverbreding elektrodispersie. Het omgekeerde vindt plaats als het monsterion een kleinere mobiliteit bezit dan het co-ion, zie fig. 9 (b). Als het ion achterblijft, komt het terecht in een gebied met lagere veldsterkte, het ion wordt vertraagd en blijft achter. Er ontstaat een diffuse achterzijde met een niet zelf-corrigerend (NZC) grensvlak; dit noemen we tailing. IJlt een ion naar voren, dan komt het terecht in een lagere veldsterkte en wordt weer ingehaald door zijn eigen zone. Voor componenten, waarvan de mobiliteit gelijk is aan die van het co-ion, is de lokale veldsterkte gelijk aan die van het BGE. Zo'n component vertoont geen elektrodispersie, maar vertoont slechts piekverbreding door diffusie en is dus ook smaller. Teneinde smalle hoge pieken te verkrijgen (optimale detectie) is het dus raadzaam om een BGE te kiezen waarvan de mobiliteit van het co-ion in de buurt ligt van de belangrijkste analieten.

Conclusie

Ofschoon de eerste waarnemingen van het verschijnsel elektroforese al bijna 200 jaar geleden beschreven zijn en Kohlrausch de grondslagen van elektroforetische processen al meer dan 100 jaar geleden wiskundig formuleerde (18) wordt het principe van elektroforese als scheidingstechniek pas een vijftigtal jaren gebruikt. De Capillaire elektroforese in zijn verschillende verschijningsvormen is met behulp van de moderne instrumentele mogelijkheden zelfs pas gedurende de laatste 20 jaar zodanig verder ontwikkeld, dat ze nu op vele gebieden gezien wordt als een waardevolle nieuwe analysetechniek voor met name hydrofiele componenten en zal naar verwachting in de komende decennia een belangrijke plaats verwerven in de klinisch-chemische praktijk.

Reviews met overzichten van klinisch-chemische en farmacologische applicaties zijn te vinden in de literatuur (14-17).

Literatuur

1. Reuss F von. Comment Soc Phys Univ Mosquensem 1808; 1: 141.
2. Everaerts FM, Beckers JL, Verheggen ThPEM. Isotachopheresis - Theory, Instrumentation and Applications. Elsevier, Amsterdam, 1976.
3. Bocek P, Deml M, Gebauer P, Dolnik V. Analytical Isotachopheresis, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1988.

4. Grossman PD, Colburn JC (eds.). *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, California, USA, 1992.
5. Vindevogel J, Sandra P. *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*. Hüthig Buch Verlag GmbH, Heidelberg, 1992.
6. Li SFH. *Capillary Electrophoresis, Principle, Practice and Applications*. Elsevier, Amsterdam, 1992.
7. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1993.
8. Foret F, Krivankova L, Bocek P. *Capillary Zone Electrophoresis*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1993.
9. Altria KD. *Quantitative Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*. Vieweg Press, Weisbaden, 1998.
10. CE and CEC Reviews. Ziad El Rassi (ed.). *Electrophoresis* 1999; 20: No. 15-16.
11. Atkins PW. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, Oxford, 1982.
12. Ackermans MT, Everaerts FM, Beckers JL. *J Chromatogr* 1991; 549: 345-355.
13. Speciale editie over "Isotachoforese en stacking techniques" van *Electrophoresis*.
14. Thormann W et al. *Electrophoresis* 1994; 15: 3-12.
15. Jellum EJ. *Cap Elec* 1994; 1: 97-105.
16. Chen F-TA et al. *Clin Chem* 1991; 37: 14-19.
17. Landers JP. *Clin Chem* 1995; 41: 495-509.
18. Kohlrausch F. *Ann Phys (Leipzig)* 1897; 62: 209-239.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 219-229

Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: reproducibility, comparison with conventional methods and a review of the literature

Y.M.C. HENSKENS¹ and M.P. van DIEIJEN-VISSER²

Capillary zone electrophoresis involves the separation of charged molecules, e.g. proteins, in a buffer-filled capillary tube by application of high voltage. CZE is a sensitive and rapid alternative for conventional gel electrophoresis techniques to separate proteins in body fluids. Serum, urine, cerebrospinal fluid, synovial fluid and saliva analysis by CZE have been investigated in the past 10 years. CZE is a promising tool for routine clinical laboratories to automate serum protein analysis. At present the separation and identification of serum proteins in order to detect monoclonal gammopathies has been extensively studied. For this purpose, a complete automated system was evaluated (Paragon CZE 2000) and already introduced into routine clinical chemistry laboratories. In general, CZE shows comparable results to conventional methods for serum protein screening and monoclonal component detection and identification. Applications for routine CZE analysis of urine or cerebrospinal fluid analysis are still in development and might be suitable to replace the conventional methods in the near future.

Medical Laboratories, Reinier de Graaf Group, Delft¹; Department of Clinical Chemistry, Academic Hospital, Maastricht²

Correspondence to: Dr. ir. Y.M.C. Henskens, Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie (LAKC), Academisch Medisch Centrum, F1-213, Postbus 22660, 1100 DD Amsterdam.
E-mail: y.m.henskens@amc.uva.nl

Key-words: capillary electrophoresis (CE); capillary zone electrophoresis (CZE); agarose gel electrophoresis (AGE); immunosubtraction capillary zone electrophoresis (CZE/IS); immunofixation electrophoresis (IFE); monoclonal component (MC)

Capillary electrophoresis (CE) is an analytical tool for separating molecules based on molecular size, electric charge and hydrophobicity. Capillaries can be filled with a replaceable or fixed solid gel (capillary gel electrophoresis) or with a replaceable running buffer (capillary zone electrophoresis). Capillary zone electrophoresis (CZE) has been suggested as a new tool for separation and quantification of serum proteins (1-12). In addition, proteins in other body fluids such as urine (13-19), cerebrospinal fluid (15), synovial fluid (20, 21) and saliva (22) can also be detected or quantified by CZE. CZE combines the separation principles of conventional electrophoresis with the advanced instrumental design of high-performance liquid chromatography and capillary technology. The sample is introduced into a buffer-filled fused silica capillary (internal diameter 20 to 200 µm and lengths of 10-100 cm), either electrokinetically or hydrodynamically with pressure. Figure 1 presents the specific requirements for (serum) protein analysis as used by Wijnen and van Dieijen-Visser (11). Changing the injection time can regulate the amount of sample applied. For separation, both ends of the capillary are placed into a buffer solution that also contains the electrodes and high voltage is applied to the system.