

ПОТОЛИЦЫНА ВЕРА ЕВГЕНЬЕВНА

**РАСШИРЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КАПИЛЛЯРНОГО
ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОНЦЕНТРАЦИЙ БЕЛКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ**

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Работа выполнена на кафедре органической химии ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель	Доктор химических наук, профессор Карцова Людмила Алексеевна
Официальные оппоненты	Яшин Яков Иванович доктор химических наук, профессор, руководитель отдела исследований и разработок Департамента инжиниринга ООО «Интерлаб» Сидорова Алла Анатольевна кандидат химических наук, ООО "ЦКП" Аналитическая спектрометрия" заведующая лабораторией
Ведущая организация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН), г.Москва

Защита состоится «30» октября 2014 г в 17.00 часов.

На заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43.

Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

/В.В. Панчук/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность. Известно, что многие белковые молекулы являются диагностическими маркерами различных заболеваний. Необратимая адсорбция белков на стенках кварцевого капилляра в процессе их электрофоретического разделения может искажать результаты анализа, приводить к невоспроизводимости параметров их миграции.

В связи с этим перспективным является поиск и использование новых материалов в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз, позволяющих контролировать селективность разделения, модифицировать стенки кварцевого капилляра, способствовать повышению эффективности и снижению пределов обнаружения аналитов за счет различных вариантов *on-line* концентрирования.

Данная работа посвящена расширению аналитических возможностей методов капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии с применением в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз водорастворимых сверхразветвленных полиэтилениминов с мальтозной оболочкой и поиску новых вариантов *on-line* концентрирования для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 11-03-91331-НИИО-а и РФФИ 14-03-00735-а.

Цель работы. Оценить аналитические возможности дендритных полимеров типа «*ядро-оболочка*» на основе полиэтиленимина с мальтозной оболочкой в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в капиллярном электрофорезе и предложить варианты внутрикапиллярного концентрирования для определения белков в биологических жидкостях.

В связи с поставленной целью необходимо было решить задачи:

1. Оценить воспроизводимость и аналитические характеристики синтезированных капиллярных монолитных и PLOT-колонок на основе метакрилатов и сверхразветвленных полимеров при различных значениях pH рабочего электролита на примере разделения модельной смеси белков.

2. Получить экспериментальное подтверждение роли сверхразветвленных полиэтилениминов, функционализированных мальтозой в различной степени, в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ).

3. Выявить возможности различных вариантов *on-line* концентрирования с участием дендритных полимеров в составе электрохроматографических систем и предложить новый вариант с пределами обнаружения, позволяющими определять белки на уровне их содержания в биологических жидкостях.

4. Методом эллипсометрии оценить возможность адсорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированной дендритным полимером.

5. Апробировать установленные закономерности на реальных объектах (сыворотка крови, моча).

Научная новизна. Методом капиллярной электрокинетической хроматографии установлен факт динамической модификации стенок кварцевого капилляра при введении сверхразветвленных полиэтилениминов с мальтозной оболочкой в состав рабочего буфера, что позволяет увеличить воспроизводимость параметров миграции и обеспечить эффективность до 4×10^5 т.т./м при групповом анализе белков.

Показано, что в качестве оценочного контроля сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированных дендритным полимером, может быть использован метод эллипсометрии.

Выявлены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования альбумина, лизоцима, инсулина и миоглобина на PLOT-колонках, модифицированных олигосахаридными производными сверхразветвленного полиэтилениминов и установлено, что сочетание электростэкинга и стэкинга с большим объемом вводимого образца обеспечивает концентрирование белков с факторами концентрирования 900 – 1320.

Практическая значимость работы. Предложена технология подготовки PLOT-колонок на основе метакрилатных полимеров и мальтозилированных сверхразветвленных полиэтилениминов, характеризующихся высокой воспроизводимостью покрытия и параметрами миграции аналитов (для метакрилатных и дендритных полимеров RSD = 0,8 и 0,5%, соответственно).

Методом эллипсометрии предложен оценочный контроль сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированных дендритным полимером.

Установлено, что использование PLOT-колонок на основе полиэтилениминового сверхразветвленного полимера с мальтозной оболочкой обеспечивает снижение предела обнаружения белков до 0,1 мкг/мл (фактор концентрирования >1000).

Предложен вариант электрофоретического определения альбумина в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча) с электрокинетическим вводом (ввод пробы: 90 с×15 кВ) на уровне диагностически значимых концентраций.

Степень достоверности и апробация результатов настоящей работы подтверждается хорошей воспроизводимостью всех полученных результатов, их согласованностью при использовании независимых методов исследования.

Положения, выносимые на защиту.

1. Увеличение воспроизводимости параметров миграции и селективности разделения белков за счет использования в качестве стационарной и *псевдостационарной* фаз сверхразветвленных полиэтилениминов с различной массой ядра и степенью модификации мальтозой при разделении белков методом мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).

2. Комбинированный электрофоретический вариант *on-line* концентрирования, основанный на сочетании электростэкинга со стэкингом с большим объемом образца без переключения полярности и реализованный на PLOT-колонках, содержащих дендритные полимеры в качестве стационарных фаз. Снижение пределов обнаружения белков на уровне их содержания в биологических жидкостях.

3. Оценочный контроль сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонки, модифицированной дендритным полимером методом эллипсометрии.

4. Схема электрофоретического определения альбумина в биологических жидкостях (моча, сыворотка крови) с применением стационарных фаз на основе мальтозилированного сверхразветвленного полиэтиленимирина.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 5 статьях и 24 тезисах докладов. Результаты исследований докладывались на Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2009» (2009 г. Йошкар-Ола, Россия); III Всероссийской конференции с международным участием "Аналитика России" (2009, Краснодар, Россия); Международная конференция по химии «Основные тенденции развития химии в начале XXI века» (2009, Санкт-Петербург, Россия); Всероссийской конференции «Хроматография – народному хозяйству» (2010, Дзержинск, Россия); Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (2010, Краснодар, Россия); IV Научной конференции студентов и аспирантов химического факультета СПбГУ (2010, Санкт-Петербург, Россия); XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (2011, Волгоград, Россия); XIII Международной научной конференции «Физико-химические основы ионообменных процессов-ИОНИТЫ-2011» (2011, Воронеж, Россия); Научной конференции «Аналитика как инструмент клинической химии» (2011, Санкт-Петербург, Россия); V Всероссийской конференции студентов и аспирантов с международным участием «Химия в современном мире» (2011, Санкт-Петербург, Россия); 12th European Meeting on environmental chemistry (2011, Clermont-Ferrand, France); 13th European Meeting on Environmental Chemistry (2012, г. Moscow, Russia); IV Всероссийская конференция «Аналитические приборы» (2012, Санкт-Петербург, Россия); Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия

под знаком СИГМА: исследования, инновации, технологии» (2012, Омск, Россия); Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (2012, Санкт-Петербург, Россия); II Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука в развитии регионов» (2012, Пермь. Березники, Россия); Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Кинетика и динамика обменных процессов» (2012, с. Дивноморское, Краснодарский край, Россия); 1-й Зимней молодежной школе-конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (2013, Санкт-Петербург, Россия); VII Всероссийской конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам «Менделеев-2013» (2013, Санкт-Петербург, Россия); 2-й Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (2013, Краснодар, Россия); Втором съезде аналитиков России (2013, Москва, Россия).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 5-ти глав с обсуждением полученных результатов, списка принятых сокращений, заключения, списка цитируемой литературы (90 наименований), приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 79 рисунков и 15 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении дано обоснование актуальности темы и сформулирована цель исследования. Отмечена целесообразность использования мальтозилированных сверхразветвленных полиэтилениминов в качестве компонентов стационарных и *псевдостационарных* фаз (КЭХ и МЭКХ) для разделения белков.

1-я глава (Обзор литературы) включает разделы, в которых обсуждаются физико-химические методы определения белков, варианты *on-line* концентрирования, особенности применения PLOT-колонок в КЭХ; строение и классификация сверхразветвленных полимеров, области их применения в методах разделения; особенности использования метода эллипсометрии для контроля сорбции белков.

Во 2-й главе (Экспериментальная часть) Рассматривается характеристика объектов и методов исследования, особенности синтеза монолитных и PLOT-колонок на основе метакрилатных и сверхразветвленных полимеров, условия анализов в режимах электрокинетической хроматографии (ЭКХ), капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ), условия эллипсометрического получения данных по сорбции белков, пробоподготовка биологических жидкостей, алгоритм оценки воспроизводимости покрытия подготовленных колонок.

3-я глава посвящена возможностям сверхразветвленных полиэтилениминов, модифицированных мальтозой и полиметакрилатных полимеров как компонентов электрофоретических систем, стационарных и *псевдостационарных* фаз при определении белков методом ЭКХ и КЭХ.

Капиллярная электрохроматография – активно развивающийся гибридный метод, позволяющий существенно расширить возможности аналитической химии. Его специфика, в отличие от ВЭЖХ, состоит в том, что гидродинамический поток подвижной фазы заменяется электроосмотическим (ЭОП), формирующимся в капиллярной колонке при наложении внешнего электрического поля. Плоский профиль потока объясняет и большую эффективность в КЭХ по сравнению с ВЭЖХ. В настоящее время этот метод активно востребован в протеомике при определении пептидов и белков. При этом возникают проблемы: сорбция белков на стенках кварцевого капилляра и высокие пределы обнаружения, затрудняющие использование этого метода в практике клинической медицины.

Возможные решения первой проблемы: использование динамического покрытия в КЗЭ, введение в состав буферного электролита *псевдостационарной* фазы (ЭКХ), создание тонкого пористого слоя полимера на внутренней поверхности кварцевого капилляра (PLOT-колонки), заполнение капилляра монолитным сорбентом (КЭХ). Все эти варианты изучены и реализованы в данной работе.

Решение другой проблемы – снижение пределов обнаружения – мы видим в поиске подходящих вариантов *on-line* концентрирования, позволяющих получать сопоставимые с ВЭЖХ отношения сигнал/шум. Традиционно для концентрирования аналитов в КЭ используют стэкинг, свипинг и динамический pH скачок. В данной работе уделено особое внимание таким вариантам внутрикапиллярного концентрирования как *стэкинг с большим объемом образца* (*large volume sample stacking, LVSS*), стэкинг в сочетании с «водной пробкой» и *электростэкинг* с LVSS.

В работе проведено комплексное исследование по выявлению влияния дендритных полимеров на основе сверхразветвленного полиэтиленимирина, различающихся степенью функционализации мальтозой (PEI-Mal) и массой ядра (5 и 25 кДа) на разделение смеси стандартов белков (рисунок 1).

Была выдвинута гипотеза (рисунок2): обсуждаемые полимеры могли бы выполнить роль *псевдостационарной* и/или стационарной фаз, а также модификатора поверхности кварцевого капилляра, тем самым препятствуя сорбции белков и влияя на эффективность и селективность их разделения. В качестве модельной системы выбрана смесь белков (*лизоцим, миоглобин,*

инсулин и альбумин) с широким диапазоном молекулярных масс ($M_r = 6000 \div 66000$ Да) и значений изоэлектрических точек ($pI = 5,5 \div 11,0$).

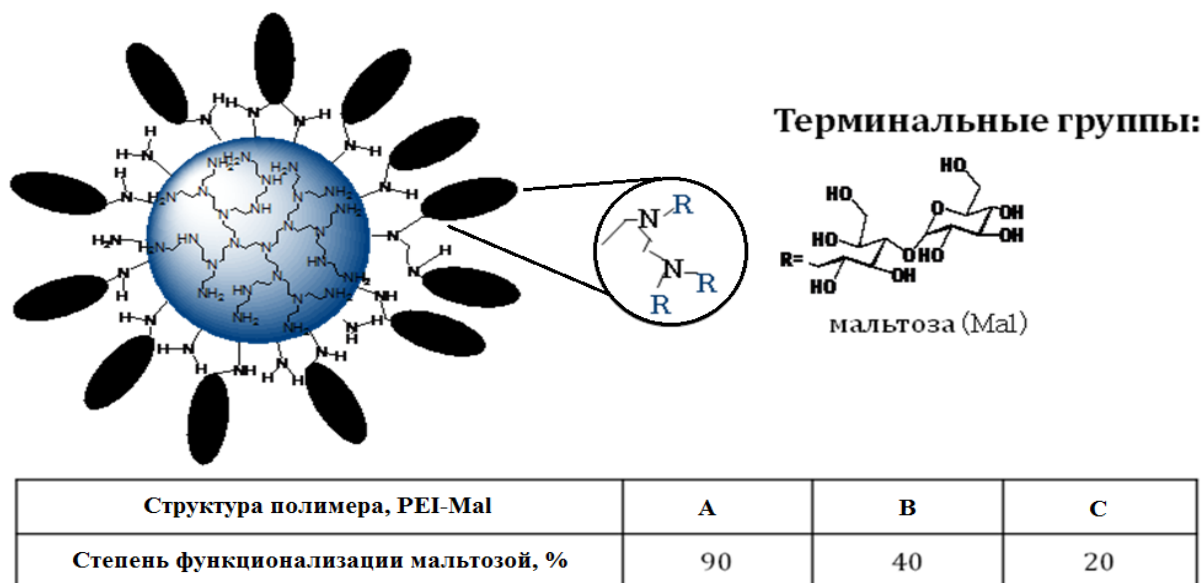


Рис. 1. Исследуемые полимеры сверхразветвленного полиэтиленимина, модифицированные мальтозой (PEI-Mal). Схема синтеза PEI-Mal описана в [1]¹.

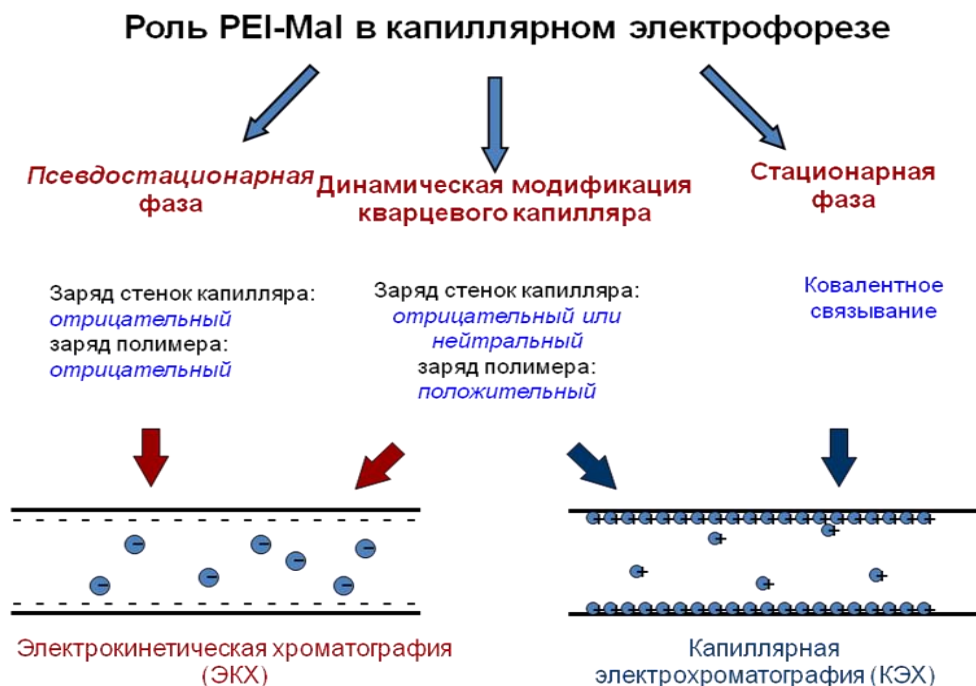


Рис. 2. Реализация различных вариантов КЭ с участием мальтозилированных сверхразветвленных полиэтилениминов.

¹ Appelhans D., Komber H., Voit B. et al. // *Biomacromolecules*. 2009. V. 10. P. 1114-1124

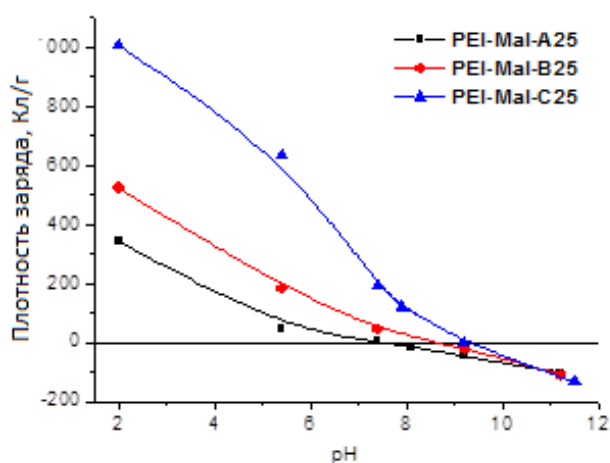


Рис. 3. Зависимость заряда полимера от рН для PEI-Mal-A, PEI-Mal-B и PEI-Mal-C (концентрация полимеров 0,5 мг/мл) [2].

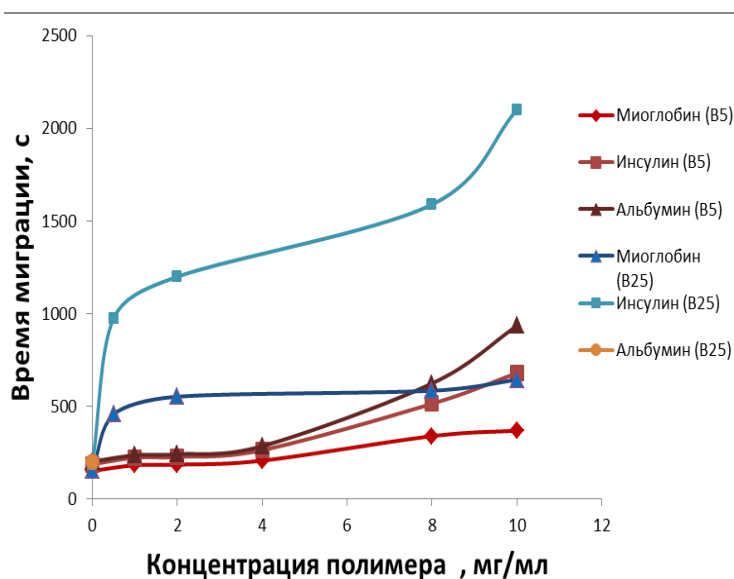


Рис. 4. Зависимость времен миграции белков от концентрации полимеров PEI-Mal B5 и PEI-Mal B25 в составе боратного буферного раствора (рН 8,5).

Электрокинетическая хроматография. При всех выбранных значениях рН увеличение концентрации полимера в составе рабочего электролита приводило к снижению скорости ЭОП.

При рН 10,2 (боратный буферный раствор) молекулы дендритных полимеров, независимо от степени функционализации мальтозой, заряжены отрицательно (рисунок 3); они не взаимодействуют с отрицательно заряженной поверхностью кварцевого капилляра и не изменяют направление и скорость электроосмотического потока.

Электрофоретические

эксперименты проводились при различных значениях рН, выбор которых сделан на основании величин изоэлектрических точек белков и полимеров (рисунок 3)².

Выявлено влияние ядра и оболочки на параметры миграции белков. Наибольшее взаимодействие с аналитами обнаружено для полимеров с массой ядра 25 кДа. Время миграции (особенно в случае инсулина) в случае большей массы полимера существенно возрастает (рисунок 4).

При введении в буферный электролит полимеров структуры А (с максимальной модификацией олигосахаридными фрагментами) и различной массой ядра (5 и 25 кДа) существенных различий в параметрах миграции не обнаружено (рисунок 5). Поэтому для проведения дальнейших детальных исследований взяты полимеры с массой 25 кДа.

² Klajnert B., Appelhans D. et al. // J. Chem. Eur. J. 2008. Vol. 14. P. 7036-7041

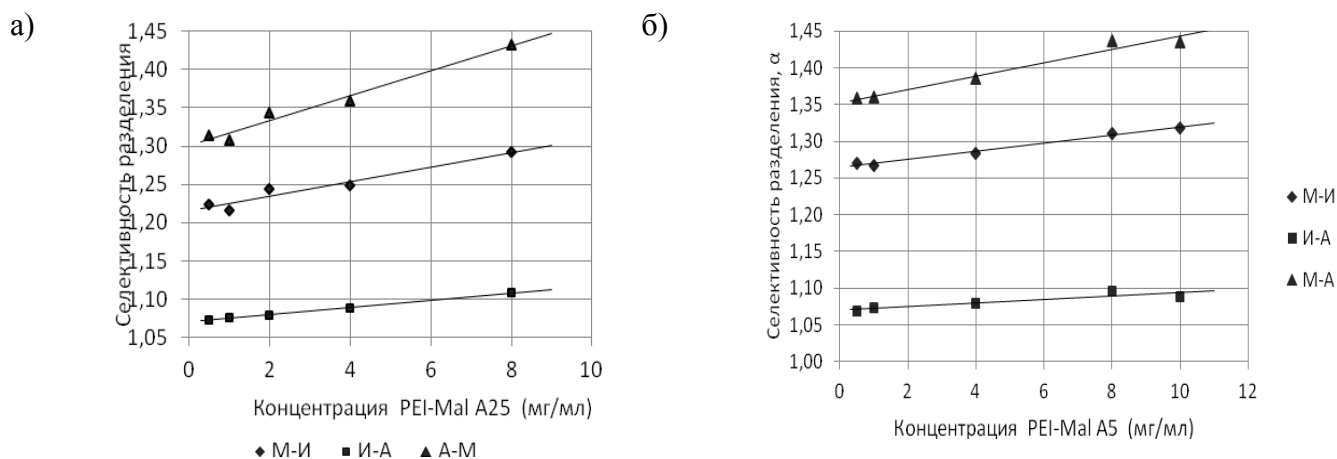


Рис. 5. Зависимость селективности разделения (α) белков в ЭКХ от концентрации полимера. а) PEI-Mal A25; б) PEI-Mal A5; боратный буферный электролит (pH 8,5). М – миоглобин, И – инсулин, А – альбумин.

При введении полимера PEI-Mal A в рабочий буфер отмечено незначительное изменение электрофоретических подвижностей белков. Напротив, введение PEI-Mal B в концентрациях >4 мг/мл привело к заметному увеличению параметров миграции, особенно для инсулина и альбумина. Учитывая постоянное значение тока в капилляре во время электрофоретических анализов (таблица 1) как показателя изменения ионной силы рабочего электролита, можно заключить, что повышение времен миграции свидетельствует о взаимодействии молекул полимера PEI-Mal B с макромолекулами инсулина и альбумина с образованием соответствующих агрегатов, а не об увеличении ионной силы буферного электролита.

Таблица 1. Значения тока внутри капилляра во время анализа при введении PEI-Mal в состав рабочего буфера (pH 10,2)

Концентрация PEI-Mal-A, мг/мл	Ток, мА	Образец	Концентрация PEI-Mal B25, мг/мл	Ток, мА	Образец
0	55-56 55	ДМСО Белки*	0	53-54 54	ДМСО Белки
0,5	54.5 55 54.5	ДМСО Белки Белки	0,5	52 53 53 54	ДМСО Белки Белки Белки
1	58 56.5 57	ДМСО Белки Белки	1	54 54 55	ДМСО Белки Белки
2	55 54 54	ДМСО Белки Белки	2	54,5 55,5 55,5	ДМСО Белки Белки
4	56 55.5 56.0	ДМСО Белки Белки	4	54,5 55,0 55,5	ДМСО Белки Белки

8	57 57.0	ДМСО Белки	8	54,5 55,5	ДМСО Белки
---	------------	---------------	---	--------------	---------------

*Белки – водный раствор стандартов белков (*миоглобин, инсулин, альбумин*), 1 мг/мл.

По сравнению с режимом капиллярного зонного электрофореза введение полимеров в боратный буферный раствор (рН 8,5) привело к росту эффективности и селективности разделения (рисунки 6, 7). Параметры миграции аналитов сохранялись даже при последующих электрофоретических экспериментах, в которых рабочий буфер не содержал добавки полимера, что свидетельствует о модификации последним стенок кварцевого капилляра.

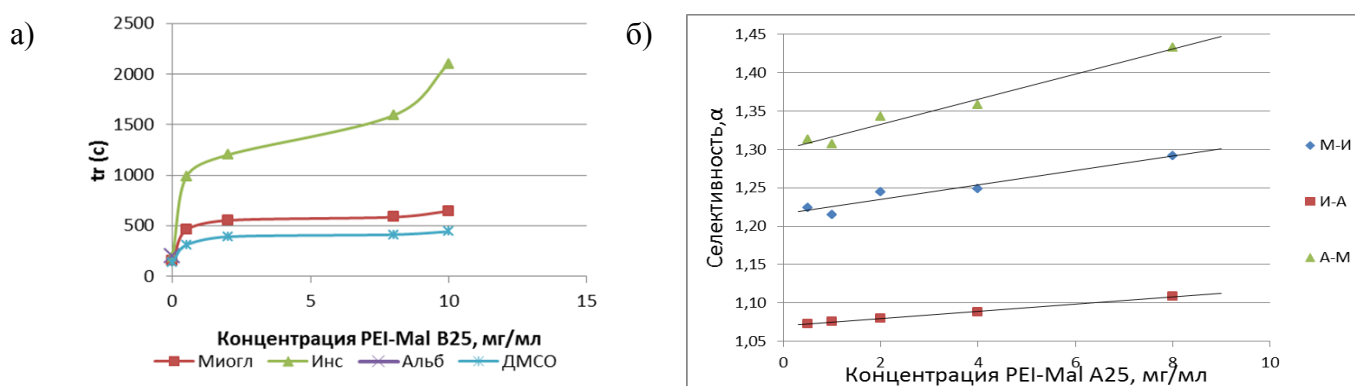


Рис. 6. Зависимость (а) селективности разделения (а) и (б) эффективности (N) при разделении белков от концентрации полимера PEI-Mal A25 в боратном буфере (рН 8,5); М – миоглобин, И – инсулин, А – альбумин.

Это приводит к усилению электростатических взаимодействий между положительно заряженными аминогруппами полиэтиленимина и отрицательно заряженными силанольными группами ОН стенок кварцевого капилляра; ЭОП отсутствует: взаимодействия молекул полимера с отрицательно заряженными молекулами аналитов возрастают.

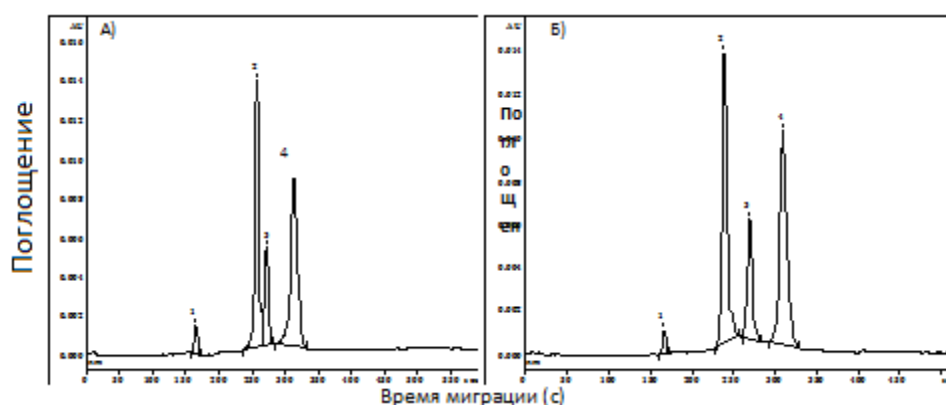


Рис. 7. Электрофореграмма модельной смеси белков (*лизоцим, миоглобин, инсулин, альбумин*). Ввод пробы: 5с×30мбар; 15кВ; $\lambda=214$ нм. Рабочий электролит: 75 мМ боратный буфер (рН 10,2). а) Без добавки полимера PEI-Mal A25 в составе буфера; б) с добавкой полимера PEI-Mal A25 в боратный буфер.
1 – лизоцим, 2 –миоглобин, 3 – инсулин, 4 – альбумин.

Факт модификации подтвержден и при pH 2,2 (фосфатный буферный раствор). В этих условиях диссоциация силанольных гидроксильных групп капилляра подавлена; ЭОП отсутствует, молекулы полимеров обладают значительным положительным зарядом за счет протонирования аминогрупп полиэтилениминового ядра (*значение pH рабочего буфера ниже изоэлектрической точки полимеров*). При введении PEI-Mal в состав буфера наблюдается обращение ЭОП, что объясняется следующим: молекулы полимеров адсорбируются на поверхности капилляра с формированием катионного динамического покрытия. Это способствует генерации анодного электроосмотического потока.

Проведена оценка полученного динамического покрытия: воспроизводимость по величине ЭОП от анализа к анализу составила 1,4-3,3% (n=50); день/день 3,6-4,4 % (n=50). Высокая стабильность покрытия обеспечила и воспроизводимость времен миграции аналитов (от анализа к анализу 1,6-1,8% (n=5); день/день 2,0-3,1 % (n=5))

Обнаружено, что при концентрациях полимера 0 – 5 мг/мл с уменьшением плотности мальтозной оболочки происходит увеличение эффективных электрофоретических подвижностей ($\mu_{эф}$) аналитов, т.е. более сильные взаимодействия с молекулами белков характерны для полимеров структуры С (содержание Mal – 20%): мальтозные фрагменты в меньшей степени участвуют во внутримолекулярных водородных связях. Это, в свою очередь, обеспечивает возможность более активного взаимодействия с силанольными группами капилляра. С увеличением концентрации полимера С в составе рабочего буфера генерируется отрицательный ЭОП, что препятствует сорбции положительно заряженных аналитов на стенках кварцевого капилляра. В результате скорость миграции белков уменьшается, селективность разделения снижается, а эффективность возрастает до $4 \cdot 10^5$ т.т./м; наблюдается эффект концентрирования (рисунки 8, 9). Подобный вариант может быть рекомендован для группового анализа белков.

Таким образом, обнаружено, что исследуемый дендритный полимер выполняет двойную функцию: выступает в качестве *псевдостационарной* фазы и модификатора поверхности кварцевого капилляра.

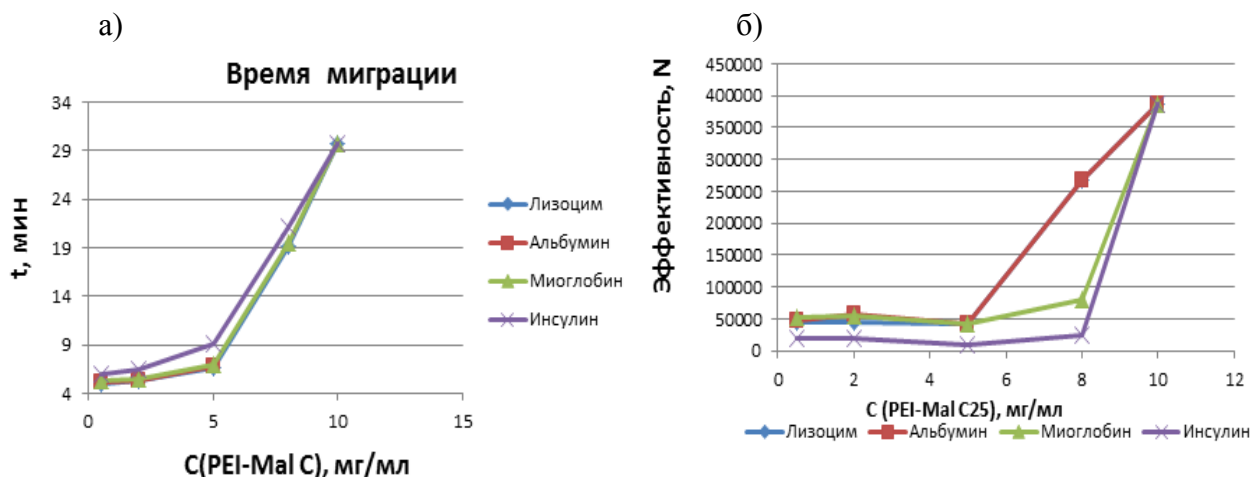


Рис. 8. Зависимость (а) времени миграции и (б) эффективности (N) при электрофоретическом разделении белков от концентрации полимера PEI-Mal C25 в фосфатном буферном растворе (pH 2,2).

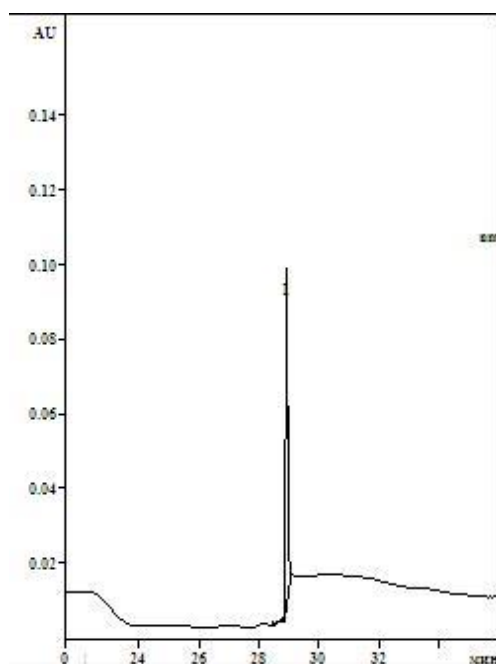


Рис. 9. Электрофореграмма модельной смеси белков. Ввод пробы: 5с×30мбар. КЭ:15кВ; $\lambda=214$ нм. Рабочий электролит: 100 мМ фосфатный буфер (pH 2,2). N= 400 000 т.т./м.

Для увеличения стабильности покрытия и селективности разделения аналитов синтезированы PLOT-колонки на основе полимеров, макромолекулы которого ковалентно связаны со стенками капилляра (рисунок 10). Изучены возможности различных вариантов внутрикапиллярного концентрирования с использованием таких колонок.

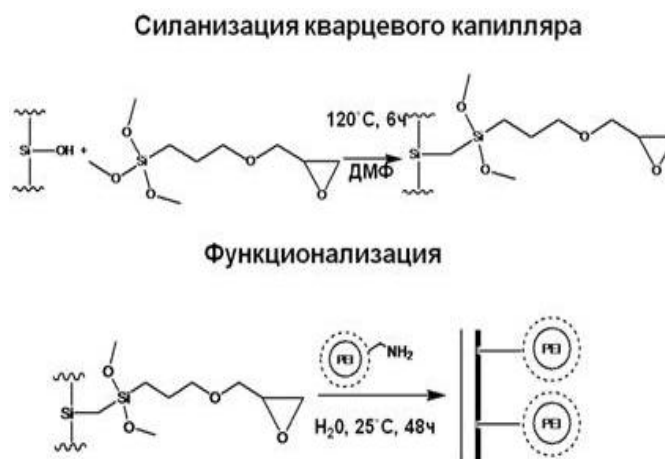


Рис. 10. Схема синтеза PLOT-PEI-MAL колонки.

Лучшее разделение наблюдалось в условиях КЭХ при pH 2,2 на PLOT-PEI-Mal колонках. ЭОП – отрицательный; электрофоретическое разделение осуществляется при положительной полярности, поскольку аналиты имеют большой положительный заряд. Подобная ситуация независимо подтверждает обнаруженную ранее модификацию стенок

кварцевого капилляра дендритным полимером структуры С в условиях МЭХ. Аналитические характеристики подготовленных PLOT-дендритных колонок представлены в таблице 2.

При сопоставимых значениях эффективности и селективности разделения электрофоретическое разделение на колонках, модифицированных полимером структуры А, требует значительно меньшего времени анализа. Для последующих экспериментов по поиску вариантов *on-line* концентрирования взят полимер структуры А с массой ядра 25 кДа.

Таблица 2. Сравнительная характеристика PLOT-дендритных колонок.

	Полимер А (90%)	Полимер В (40%)	Полимер С (20%)
μ(ЭОП), мин	7,53	10,66	12,93
Эффективность (N), т.т./м	66200	70000	58000
Селективность (α) для пары Mio-Alb	1,04	1,05	1,06

Изучены различные варианты *on-line* концентрирования в условиях КЭХ: стэкинг с большим объемом образца (*large volume sample stacking*, LVSS), тот же вариант, но с «водной пробкой» и электростэкинг в сочетании со стэкингом с большим объемом образца (таблица 3).

Таблица 3. Результаты *on-line* концентрирования белков с использованием PLOT-колонок с свехразветвленными полимерами в КЭХ

Вариант концентрирования	Определяемые компоненты			
	Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
1. Стэкинг с большими объемом вводимой пробы (LVSS)	SEF _s			
	79 ± 1	50 ± 2	56 ± 2	68 ± 1
	Условия: матрица пробы – вода, ввод пробы (300сек×30 мбар)			
	ПО, мкг/мл			
	2,0	1,0	2,0	2,5
2. Стэкинг с большим объемом вводимой пробы с «водной пробкой» (LVSS-HCFASS)	SEF _s			
	81 ± 1	62 ± 2	60 ± 2	82 ± 1
	Условия: матрица пробы – вода, Ввод воды (25сек×30 мбар), ввод пробы (300сек×30 мбар)			
	ПО, мкг/мл			
	1,0	1,0	1,5	1,0
3. Электростэкинг с LVSS	SEF _s			
	1320 ± 1	970 ± 1	1040 ± 1	340 ± 2
	Условия: матрица пробы – вода, Электрокинетический ввод пробы (15 кВ, 90 сек)			
	ПО, мкг/мл			
	0,2	0,1	0,2	0,5

Для подтверждения отсутствия сорбции белков на поверхности полимера проведена серия специальных экспериментов — методом **эллисометрии**, позволяющим исследовать поверхности и границы раздела различных сред.

На рисунок 11 приведен фрагмент структуры пленки сверхразветвленного полиэтиленimina на поверхности кварцевой пластинки. Толщина измеряемой пленки (d) и оптические константы (показатель преломления и коэффициент экстинкции) оценивались путем сравнения измеренных величин Ψ ($\tan \psi$ – отношения амплитуд световой волны до и после отражения света) и Δ (относительная разность фаз колебаний этой волны) с такими же величинами, заданными для модели оптического слоя.

Логика такого подхода представлена на рисунок 12. По данным эллисометрического анализа синтезирован на пластинке слой полимера толщиной около 20 нм .

Адсорбция белка на полимерной пленке *in situ* исследовалась эллисометрически в течении 30 мин. Затем, раствор, содержащий белок, удалялся из кюветы пипеткой. К пластине с набухшим полимером и адсорбированным белком в той же кювете добавляли чистый буферный раствор для выявления возможной десорбции белка *in situ* методом эллисометрии. Пример результатов эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка представлен на рисунок 13. Видно, что процесс адсорбции происходит почти мгновенно и является необратимым. Из результатов представленных в таблица 4 следует, что количество адсорбированного белка при рН 2,2 не превышает 1 мг/м^2 , что соответствует $< 0,1\%$ от общего его содержания в растворе.

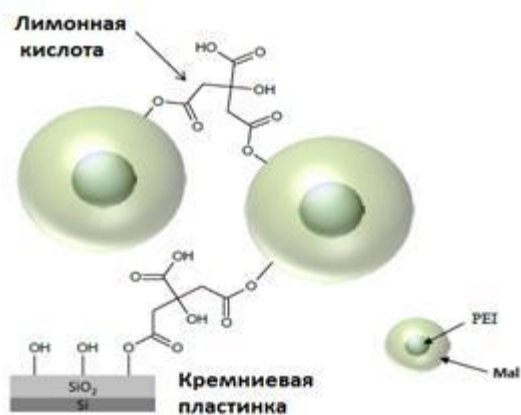


Рис. 11. Структура полимерного слоя на поверхности кварцевой пластинки. PEI - полиэтиленимин, Mal – мальтозные фрагменты.

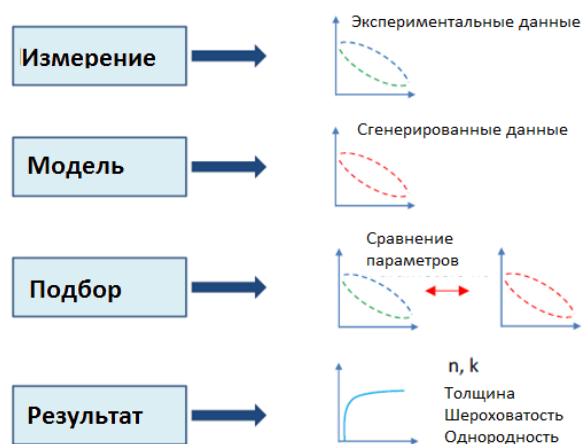


Рис. 12. Основные этапы анализа методом эллисометрии.

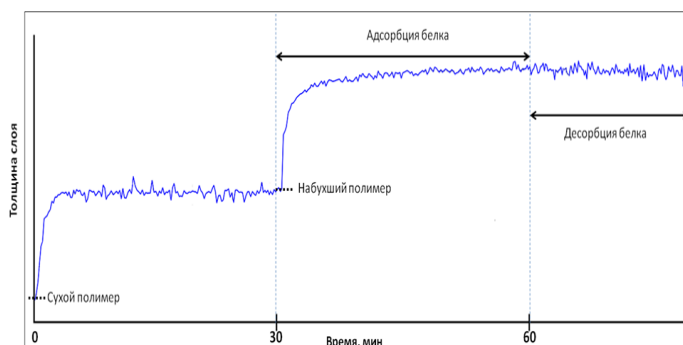


Рис. 13. Результат эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка методом эллипсометрии. А – первый этап: набухание полимерной пленки; Б – второй этап: процесс адсорбции белка; В – третий этап: процесс десорбции белка.

Таким образом, в этих условиях количественных потерь белков при электрохроматографическом определении практически не происходит. Но при pH рабочего буфера 8,5 толщина слоя адсорбированного лизоцима оказалась равной ~ 18 нм (это соответствует 4 мг/м², или 0,4%, от общего содержания белка в растворе). Незначительное увеличение адсорбции связано с тем, что лизоцим (pI=11,0) имеет противоположный полимеру заряд, и его молекулы могут

электростатически притягиваться к поверхности полимерной пленки.

С целью сопоставления результатов, полученных на PLOT-колонках, содержащих PEI-Mal в качестве стационарной фазы, синтезированы полиметакрилатные PLOT-колонки, на основе глицидилметакрилата, метилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата. с последующей постфункционализацией N-бутилэтиламином для формирования ЭОП.

Таблица 4. Исследование адсорбции белков на поверхности полимерной пленки при pH буферного раствора 2,2 и 8,5.

Белок	pH 2,2			pH 8,5		
	№	$d_{эфф}$, нм	m [мг/м ²]	№	$d_{эфф}$, нм	m [мг/м ²]
Альбумин	1	2,8	0,7	1	2,07	0,5
	2	3,1	0,7	2	2,25	0,5
	3	3,1	0,7	3	3,02	0,7
	4	1,9	0,5	4	2,33	0,6
	5	2,1	0,5	5	2,54	0,6
	6	2,0	0,5	-		
	7	1,9	0,5			
СКО, %	22,1%			13,4%		
Лизоцим	1	1,9	0,5	1	17,9	4,3
	2	1,6	0,4	2	12,1	2,9
	3	1,5	0,4	3	13,9	3,3
	4	1,7	0,4	4	16,4	3,9
	5	1,6	0,4	-		
	6	1,8	0,4			
	7	1,2	0,3			
СКО, %	13,49%			14,95%		
Инсулин	1	2,0	0,5	1	1,0	0,3

	2	1,8	0,4	2	1,5	0,4
	3	1,6	0,4	3	2,0	0,5
	4	1,5	0,4	-		
СКО, %	10,80%			26,15%		
Миоглобин	1	5	1,2	1	1,0	0,2
	2	4,0	1,0	2	0,4	0,1
	3	3,6	0,9	3	0,9	0,2
СКО, %	14,19%			34,23%		

Получены оценочные характеристики методов КЭХ, КЗЭ и ЭКХ при электрофоретическом разделении белков (таблица 5).

Таблица 5. Сопоставление аналитических характеристик методов КЭХ и КЗЭ при электрофоретическом разделении белков с участием дендритных полимеров

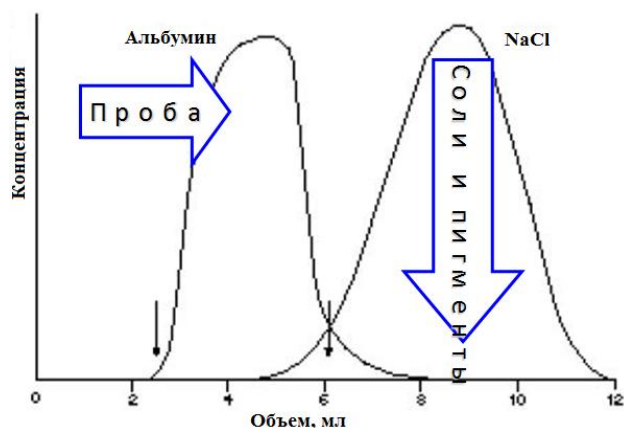
Контролируемый параметр	КЗЭ	МЭКХ	Полые колонки (КЭХ)		Монолитные колонки
			Метакр.	PEI-Mal	
Эффективность (т.т./м)	10÷15 тыс.	А и В: 10÷30 тыс. С: до $4 \cdot 10^5$	56 тыс.	50÷70 тыс.	25÷35 тыс.
Предел обнаружения, мг/мл	0,08÷0,15	А и В: 0,08÷0,10 С: 0,005	0,02÷0,05	0,01÷0,04 1÷2,5 мкг/мл (конц.)	0,02÷0,06
Время анализа, мин	6	10	6	25	10
Фактор селективности (α)	1,00÷1,30	1,01÷1,04	1,03	1,05÷1,10	1,50÷2,10
Воспроизводимость параметров миграции (RSD, %)	2,8	0,8	0,8	0,5	0,5

Лучшие результаты по эффективности, селективности разделения и воспроизводимости параметров миграции отмечены в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ). При этом колонки, модифицированные СРП, имеют более простую процедуру синтеза и лучшую воспроизводимость покрытия поверхности кварцевого капилляра.

В оптимизированных условиях с использованием PLOT-колонок с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal проведен анализ реальных объектов (*сыворотка крови и моча*).

Пробоподготовка в случае сыворотки крови заключалась в фильтрации пробы через стекловолоконный и мембранный (инертный к белкам) микрофильтр с размерами пор 1-2 мкм и 0,2 мкм, соответственно. При анализе белков в моче задача осложнялась тем, что в моче присутствуют низкомолекулярные компоненты самой разнообразной химической природы, включая пигменты, которые могут находиться в очень больших концентрациях. Эти вещества

поглощают при тех же длинах волн, что и белки (200-214 нм). Поэтому перед электрофоретическим разделением белков необходима была предварительная очистка биологической жидкости.



Обессоливание и депигментацию мочи проводили на самопроточной мини-колонке с гелем SefadexG25 (предел исключения по белкам $M=10000$) (рисунок14).

Электрофореграмма экстракта мочи представлена на рисунок 15.

Рис. 14. Пробоподготовка мочи (больной с синдромом Иценко-Кушинга) для анализа на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. Разделение на самопроточном гель-фильтре с объемом слоя 7 мл (Sephadex G-50, $M_w = 10000$) Объем пробы 2,5 мл; слив: 2,5 мл; сбор белковой фракции 3,5 мл; общее время: 10 мин; степень извлечения белка 95 %. разбавление пробы: $\times 1,4$.

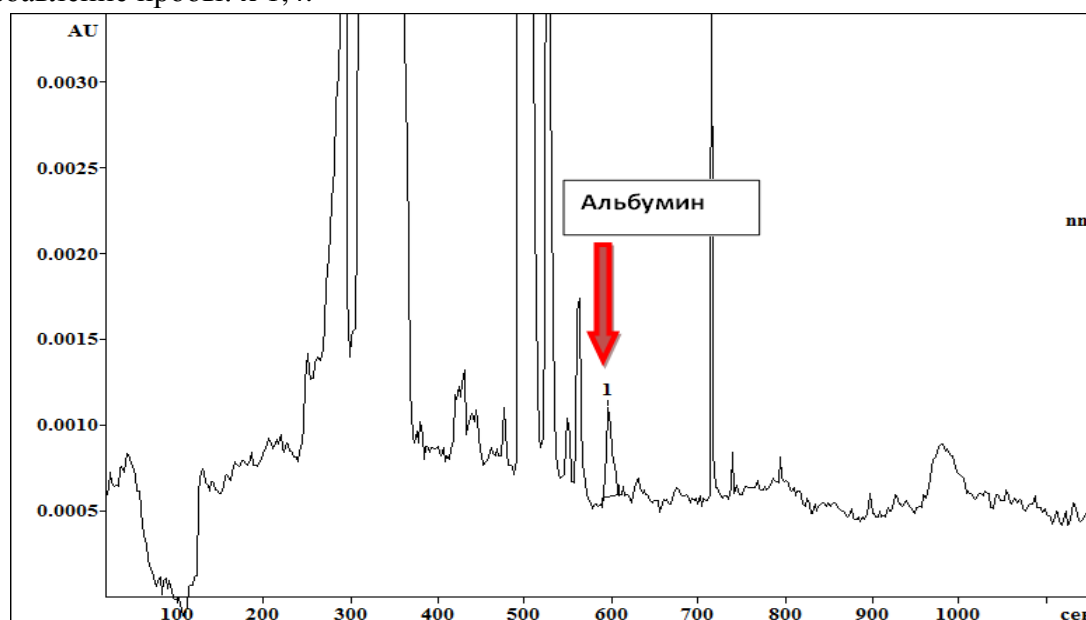


Рис. 15. Электрофореграмма обессоленной мочи (больной с синдромом Иценко-Кушинга) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. Объем пробы 2,5 мл. Ввод пробы: $90 \text{ с} \times 15 \text{ кВ}$. УФ: 214 нм. Условия анализа: -20 кВ , $-82-95 \text{ мкА}$; рабочий электролит: 0,1 М фосфатный буфер (pH 2,2).

1-альбумин.

ВЫВОДЫ

1. Методом электрокинетической хроматографии установлено, что сверхразветвленные полиэтиленимины с различной массой ядра и степенью функционализации мальтозой, введенные в состав рабочего буфера, модифицируют стенки кварцевого капилляра и выполняют роль *псевдостационарной* фазы, что повышает воспроизводимость параметров миграции и селективность разделения белков (альбумина, миоглобина, инсулина, лизоцима).

2. Выявлен эффект *on-line* концентрирования белков, сопровождаемый обращением электроосмотического потока и увеличением эффективности до 4×10^5 т.т./м, при использовании в составе рабочего буфера (рН 2,2) дендритного полимера с наименьшей функционализацией мальтозой (PEI-Mal C).

3. Предложена технология изготовления PLOT-колонок для капиллярной электрохроматографии с использованием в качестве стационарных фаз метакрилатных и дендритных полимеров на основе полиэтиленимина с мальтозной оболочкой, обеспечивших высокую селективность разделения и воспроизводимость параметров миграции белков (RSD%: 0,5-1,8)

4. Показано, что в качестве оценочного контроля сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированных дендритным полимером, может быть использован метод эллипсометрии. Установлено, что количество адсорбированного белка не превышает 1 мг/м^2 , что соответствует $< 0,1\%$ (рН=2,2) и 4 мг/м^2 , или $0,4\%$ (рН=8,5) от общего содержания белка в растворе.

5. Выявлены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования альбумина, лизоцима, инсулина и миоглобина на PLOT-колонках, модифицированных олигосахаридными производными сверхразветвленного полиэтиленимина и установлено, что сочетание электростэкинга и стэкинга с большим объемом вводимого образца обеспечивает концентрирование белков с факторами концентрирования 900 – 1320.

6. Предложен электрофоретический способ определения альбумина в моче и сыворотке крови (предел обнаружения $0,1 \text{ мкг/мл}$, $N = 80000 \text{ т.т./м}$).

Основные материалы работы опубликованы в следующих работах:

1. Е.А. Бессонова, Л.А. Карцова, Н.А. Поликарпов, В.Е. Потолицына. Исследование возможностей новых сверхразветвленных полимеров в качестве псевдостационарных фаз в электрокинетической хроматографии при определении белков. // Вестник СПбГУ. 2011. Сер.11. Вып.1. С.100-106.

2. В.Е. Потолицына, Л.А.Карцова, Е.А.Бессонова. Синтез и изучение свойств PLOT-колонок на основе новых дендритных полимеров для разделения белков методом капиллярной электрохроматографии. // Журнал аналитической химии. 2013. Т.68. № 11. С. 1096 — 1100.
3. В.Е. Потолицына, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова. Эллипсометрический контроль сорбции белков при использовании PLOT-колонок с дендритной стационарной фазой. // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 1. С. 82-90.
4. Потолицына В.Е., Карцова Л.А. PLOT-колонки в капиллярной электрохроматографии (обзор). // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 1. С. 31-41.
5. Е.А. Бессонова, Л.А. Карцова, В.Ю. Королева, В.Е. Потолицына. On-line концентрирование белков в условиях капиллярной электрохроматографии с использованием PLOT-колонок на основе сверхразветвленных полимеров. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т. 14. Вып. 2. С. 275-285.
6. Л.А. Карцова, Н.А. Поликарпов, В.Е. Потолицына. Проблемы и решения определения белков методом капиллярной электрохроматографии на монолитных сорбентах. // Тезисы VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2009». 21–27 июня 2009 г. Йошкар-Ола. С.38.
7. Карцова Л.А. Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А., Потолицына В.Е. Изучение возможностей электрофоретических методов при анализе белков в биологических объектах. // Тезисы III Всероссийской съезда с международным участием. Краснодар. 2009. С. 56.
8. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А., Потолицына В.Е. Достоинства и ограничения электрофоретических методов определения белков в биологических объектах. Международная конференция по химии «Основные тенденции развития химии в начале XXI века». С.-Петербург. 21-24 апреля 2009. С.209.
9. Н.А. Поликарпов, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова, В.Е. Потолицына. Получение и использование монолитный и дендримерных PLOT-колонок для анализа белков методом капиллярной электрохроматографии. // Всероссийская конференция «Хроматография – народному хозяйству». Тезисы докладов. 19-23 апреля 2010. Дзержинск. С. 155.
10. Л.А.Карцова, Е.А. Бессонова, Н.А.Поликарпов, В.Е. Потолицына, Ю.Н. Мартыч. Перспективы использования сверхразветвленных полимеров для электрофоретического и хроматографического определения биологически активных веществ. // Тезисы докладов. Краснодар. 25-30 сентября 2010 г. С. 235.

11. Н.А. Поликарпов, Л.А.Карцова, Е.А. Бессонова, В.Е. Потолицына. Электрокинетическая хроматография с использованием сверхразветвленных мальтозилированных полиэтилениминов. // Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Тезисы докладов. Краснодар. 25-30 сентября 2010 г. С. 234.
12. Потолицына В. Е. Анализ белков методом капиллярной электрохроматографии с использованием полиметакрилатных и дендримерных PLOT-колонок. // IV Научная конференция студентов и аспирантов химического факультета СПбГУ. 20–23 апреля, 2010 г. Россия, СПб, тезисы докладов С. 33.
13. Потолицына В.Е., Бессонова Е.А., Карцова Л.А. Сверхразветвленные полимеры как компоненты электрофоретических систем при определении белков. V-ая Всероссийская конференция студентов и аспирантов «Химия в современном мире». Тезисы докладов. 2011. С.-Петербург. 18-22 апреля. С.42-43.
14. Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Поликарпов Н.А., Потолицына В.Е. Капиллярная электрохроматография белков с использованием полиметакрилатных и дендримерных колонок. Тезисы докладов XIX менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Волгоград. 25-30 сентября 2011 г. Т. 4. С. 322.
15. Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Потолицына В.Е., Поликарпов Н.А. Влияние сверхразветвленных мальтозилированных полиэтилениминов на миграционные характеристики белков при их электрофоретическом определении. Тезисы докладов XIX менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Волгоград. 25-30 сентября 2011 г. Т. 4. С.323.
16. Bessonova E.A., Kartsova L.A., Potolicina V.E., Polykarpov N.A. The possibilities of hyperbranched polymer PEI-Mal as an additives in mobile and stationary phases in electrophoretic determination of bioactive organic compounds. 12th European Meeting on environmental chemistry. France. Clermont-Ferrand. 7-10 декабря. 2011г. С.
17. Бессонова Е.А., Потолицына В.Е., Карцова Л.А., Королева В.Ю. «Полые капиллярные колонки на основе полиметакрилатов и сверхразветвленных полиэтилениминов для КЭХ биополимеров». IV Всероссийская конференция «Аналитические приборы». 25-30 июня 2012 г. Санкт-Петербург. С. 37.
18. Потолицына В.Е., Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Поликарпов Н.А. «Синтез капиллярных PLOT-колонок на основе полиметакрилатных и дендритных полимеров для системы высокоэффективного капиллярного электрофореза «Нанофор 01». IV Всероссийская конференция «Аналитические приборы». 25-30 июня 2012 г. Санкт-Петербург. С. 35.

19. Потолицына В.Е., Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Поликарпов Н.А. PLOT-колонки на основе новых дендритных полимеров для анализа белков методом капиллярной электрохроматографии. // Всероссийская научная молодежная школа конференция «Химия под знаком Σ : исследования, инновации, технологии». Омск. 14-22 мая 2012 г. С.363.

20. Потолицына В.Е., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Изучение возможностей использования новых дендритных и полиметакрилатных полимеров в качестве компонентов электрофоретических и электрохроматографических систем для анализа белков. Тезисы докладов VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием Менделеев-2012. С.263-264.

21. В.Е. Потолицына, Л.А.Карцова, Е.А.Бессонова. Варианты решения проблем сорбции белков при их электрофоретическом определении с использованием новых сверхразветвленных полимеров. Сборник материалов II Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука в развитии регионов». Пермь. Березники. 2012 г. 25 апреля. С.366 – 369.

22. Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Королева В.Ю., Потолицына В.Е. Разработка вариантов *on-line* концентрирования при электрофоретическом определении белков в условиях капиллярной электрохроматографии. Всероссийская конференция «Кинетика и динамика обменных процессов». 2012. 25 ноября — 2 декабря. Дивноморское. Краснодарский край. С. 25.

23. L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, V.E. Potolitsyna, V.U. Koroleva, D.E. Dzema., Electrophoretic and chromatographic separations of bioactive compounds using hyperbranched polymer PEI-MAL as an additives in mobile and stationary phases. 13th European Meeting on Environmental Chemistry. December 05-08, 2012 г. Moscow, Russia. P.31.

24. E.A. Bessonova, L.A. Kartsova, V.E. Potolitsyna, E. V. Obedkova., Use of new preconcentration techniques in CE to effectively focus on bioactive analytes in complex biological mixtures. 13th European Meeting on Environmental Chemistry. December 05-08, 2012 г. Moscow, Russia. P.56.

25. V.E.Potolitsyna, L.A.Kartsova, E.A.Bessonova. Synthesis and Study of the Properties of PLOT Columns Based on New Dendritic Polymers for the Separation of Proteins by Capillary Electrochromatography. Journal of Analytical Chemistry, 2013, Vol. 68, No. 11, pp. 981–985.

26. В.Е. Потолицына, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова. Применение полимерных материалов в качестве стационарных и псевдостационарных фаз для решения проблемы сорбции белков при их электрофоретическом определении. Тезисы 1-ой Зимней молодежной школы-конференции с международным участием. 2013. 17-22 февраля. Санкт-Петербург. С.82.

27. Потолицына В.Е., Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Исследования возможностей использования новых дендритных полимеров для решения проблемы сорбции белков при их электрофоретическом определении. Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам. Менделеев-2013. 2-5 апреля 2013 г. Санкт- Петербург. С.147-148.

28. Потолицына В.Е., Карцова Е.А., Бессонова Е.А. Изучение возможностей использования производных сверхразветвленнополиэтиленimina в качестве стационарных фаз при разделении белков методом капиллярной электрохроматографии. Материалы II Всероссийской конференции «аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». Краснодар 26-31 мая. 2013. С.72

29. Потолицына В.Е., Бессонова Е.А., Карцова Л.А. Электрокинетическая хроматография нуклеотидов и аминокислот с участием дендритных полимеров. Второй съезд аналитиков России. 23-27 сентября 2013. Тезисы докладов. С. 423.