



Биоаналитическая лаборатория ООО «ЦКП «АС»

195220, г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 27, лит. А, оф. 240

Тел.: +7 (812) 294 -82-04

Факс: +7 (812) 294 -82-04

E-mail: csu@delfa.net

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Потолицыной Веры Евгеньевны на тему:

«Расширение аналитических возможностей капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертационное исследование Потолицыной Веры Евгеньевны посвящено актуальной задаче - поиску новых путей электрофоретического определения микроконцентраций белков в физиологических жидкостях. Количественное определение целевых белков и белковых комплексов является одним из перспективных направлений в биоаналитической химии. Однако, наряду с высокой эффективностью и экспрессностью метода капиллярного электрофореза при работе с белковыми молекулами возникает ряд проблем: низкая УФ-концентрационная чувствительность и недостаточная воспроизводимость параметров миграции вследствие необратимой сорбции белков на внутренней поверхности кварцевого капилляра. Диссертационная работа Потолицыной В.Е. посвящена расширению аналитических возможностей использования сверхразветвленных полимеров для решения указанных проблем.

В литературном обзоре обсуждаются основы метода капиллярной электрохроматографии, физико-химические свойства сверхразветвленных полимеров и области их применения в качестве стационарных и псевдостационарных фаз при электрофоретическом определении пептидов и белков в электрокинетической хроматографии, а также различным вариантам *on-line* концентрирования в капиллярной электрохроматографии.

Диссертантом выполнена очень большая по объему, тщательная и скрупулезная работа по синтезу монолитных и PLOT-колонок на основе метакрилатов и сверхразветвленных полимеров, изучению их аналитических характеристик при различных значениях pH рабочего электролита на примере модельной смеси белков, выявлению возможностей применения сверхразветвленных полимеров, функционализированных мальтозой в различной степени, в качестве стационарной и псевдостационарной фаз в условиях мицеллярной

электрокинетической хроматографии и капиллярной электрохроматографии, поиске вариантов *on-line* концентрирования белков.

Специальный раздел диссертационной работы посвящен изучению влияния различных концентраций сверхразветвленных полимеров, различающихся степенью функционализации мальтозой (PEI Mal A, B, C) и массой ядра (5 и 25 кДа) на эффективность и селективность разделения модельной смеси белков (альбумина, лизоцима, инсулина и миоглобина).

Показано, что дендритные полимеры модифицируют поверхность кварцевого капилляра, препятствуя таким образом адсорбции белков на стенках капилляра, что в свою очередь позволило увеличить воспроизводимость параметров миграции и повысить эффективность при определении белков до $4 \cdot 10^5$ т.г./м. Независимый контроль сорбции белков на внутренней поверхности PLOT-колонок, модифицированных дендритным полимером, проводился диссертантом методом эллипсометрии.

Для снижения пределов обнаружения белков использовано сочетание электростэкинга и стэкинга с большим объемом вводимой пробы на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. При pH 2.2 поверхность капилляра, покрытого сверхразветвленным полиэтиленимином, заряжена положительно, что генерирует отрицательный электроосмотический поток (ЭОП); при этом аналиты электрофоретически мигрируют по направлению к катоду. Такой подход, когда противоположно направленный ЭОП выталкивает из капилляра матрицу образца, а аналиты концентрируются на границе зоны пробы и буферного раствора, позволил получить высокие степени концентрирования. Все это представляет несомненную **научную новизну** данного диссертационного исследования.

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в предложенных технологиях подготовки PLOT-колонок на основе метакрилатов и сверхразветвленных мальтозилированных полиэтилениминов. Предложенный способ *on-line* концентрирования позволяет использовать разработанный вариант электрофоретического определения альбумина для диагностики микроальбуминурии. Подбор конкретного дендритного полимера для динамической модификации поверхности кварцевого капилляра позволит подойти индивидуально к каждой задаче.

По диссертации возник ряд вопросов.

При каких концентрациях дендритных полимеров в составе рабочего электролита можно говорить о режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии. Не происходит ли динамическая модификация поверхности кварцевого капилляра в этих условиях?

Разделение белков проводилось при длине волны детектирования 214 нм. Не

менялся ли фоновый уровень сигнала при введении в состав рабочего электролита дендритных полимеров?

Чем можно объяснить резкое возрастание эффективности при увеличении времени ввода пробы (рис. 73 диссертации)?

В табл. 13 представлены результаты *on-line* концентрирования однако не указаны число опытов (n) и доверительные интервалы для рассчитанных факторов концентрирования и пределов обнаружения. Получены высокие степени концентрирования с использованием электрокинетического ввода пробы, какова воспроизводимость этого способа ввода по сравнению с гидродинамическим вводом пробы?

Возникшие вопросы не отразились на самом благоприятном впечатлении от диссертационной работы.

Диссертационная работа прошла широкую апробацию. По материалам диссертации опубликовано 29 работ, включая 5 статей и 24 тезиса докладов, работы опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и доложены на Всероссийских и Международных конференциях. Содержание диссертации Потолицыной В. Е. достаточно полно отражено в автореферате.

Полученные результаты могут быть включены в курсы аналитической химии, органического анализа и хроматографии на химических факультетах СПбГУ, МГУ, СПбГТУ и других университетов.

Диссертация Потолицыной В. Е. «Расширение аналитических возможностей капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия, является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий. Данное диссертационное исследование существенно расширяет аналитические возможности метода капиллярного электрофореза для определения пептидов и белков в таких сложных многокомпонентных объектах как биологические.

По **актуальности** решаемой задачи, **научной новизне** полученных результатов, **практической значимости** и объему выполненных исследований диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор

Потолицына Вера Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

ООО "Центр коллективного пользования "Аналитическая Спектрометрия"

Заведующая Лабораторией
кандидат химических наук

Алла Анатольевна Сидорова

Почтовый адрес: 195220 Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 27, лит. А, 240

Телефон: 8(812) 294-82-04

Электронная почта: csu@delfa.net

10.10.2011.



Поздрав
Сидорова А.А. заверено
(Удостоверено А.А.)