

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 вариантов капиллярной электрохроматографии (КЭХ) для определения микроконцентраций белков (миоглобина, лизоцим, альбумина и инсулина) в биологических жидкостях с использованием метакрилатных и новых водорастворимых дендритных полимеров на основе полиэтиленimina в качестве стационарных и псевдостационарных фаз. Обычно при электрофоретическом анализе белков возникает ряд проблем: необратимая адсорбция этих аналитов на внутренней поверхности кварцевого капилляра и высокие пределы их обнаружения. Это затрудняет использование электрофоретических методов в практике клинической медицины. Такие цели поставлены и успешно решены в диссертационной работе Потолицыной В.Е.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, пяти глав с обсуждением результатов эксперимента, приложения, списка используемых сокращений, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 79 рисунков и 15 таблиц.

Обширный литературный обзор, предшествующий изложению собственных экспериментальных данных, посвящен рассмотрению основ методов капиллярной электрохроматографии (КЭХ) и эллипсометрии; физико-химическим методам анализа белков (хроматографических, электрофоретических и иммунно-ферментных); уникальным свойствам дендритных полимеров (типа «ядро-оболочка»), обеспечивших их применение в методах разделения и концентрирования; применению различных материалов в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз при анализе смесей биополимеров в условиях капиллярной электрокинетической хроматографии (ЭКХ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Критический обзор литературных данных позволил диссертанту сформировать план собственных экспериментальных исследований.

Диссертантом выполнена очень большая по объему и тщательная по исполнению

работа по изучению влияния сверхразветвленных полиэтилениминов с различной массой ядра и степенью функционализации мальтозой на параметры миграции белков.

Автором работы высказана гипотеза и экспериментально подтверждена, что сверхразветвленные полимеры на основе полиэтиленимина при различных значениях рН буферного электролита могут выполнить роль стационарной и псевдостационарной фаз, а также модификатора стенок кварцевого капилляра.

Интересной и важной частью диссертационной работы явился поиск вариантов внутрикапиллярного концентрирования (различные варианты стэкинга, включая их сочетание) для снижения пределов обнаружения белков (до 0.1 мкг/мл), что позволило проводить электрофоретическое определение этих аналитов в биологических жидкостях. Выявлен эффект *on-line* концентрирования белков, сопровождаемый обращением электроосмотического потока и увеличением эффективности до 4×10^5 т.т./м, при введении в состав рабочего буфера (рН 2,2) дендритного полимера с наименьшей функционализацией мальтозой. Подобный вариант может быть рекомендован при определении суммарного содержания белков.

Оригинальной частью диссертационной работы явилась специальная серия экспериментов, посвященная независимому подтверждению отсутствия сорбции белков на поверхности мальтозилированного сверхразветвленного полиэтиленимина методом эллипсометрии. Такой подход предложен и реализован впервые. Показано, что покрытие стенок кварцевого капилляра мальтозилированными дендритными полимерами практически полностью препятствует сорбции белков при их электрофоретическом определении.

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. Все это представляет несомненную **научную новизну** данного диссертационного исследования.

Диссертантом предложена технология изготовления PLOT-колонок для капиллярной электрохроматографии с использованием метакрилатных и дендритных полимеров на основе полиэтиленимина с мальтозной оболочкой в качестве стационарных фаз, обеспечивших высокую селективность разделения и воспроизводимость параметров миграции белков.

С целью сопоставления результатов, полученных на синтезированных PLOT-колонках, содержащих мальтозилированный полимер в качестве стационарной фазы, синтезированы и полиметакрилатные PLOT-колонки, на основе глицидилметакрилата, метилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата с последующей постфункционализацией N-бутилэтиламином для формирования электроосмотического потока. Получены оценочные характеристики

методов капиллярной электрохроматографии, капиллярного зонного электрофореза и электрокинетической хроматографии при электрофоретическом разделении исследуемых биополимеров. Установлено, что лучшие результаты по эффективности, селективности разделения и воспроизводимости параметров миграции белков достигнуты на колонках с дендритными полимерами в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ). При этом показано, что колонки, модифицированные СРП, имеют более простую процедуру синтеза и лучшую воспроизводимость покрытия поверхности кварцевого капилляра.

Обнаруженные закономерности реализованы диссертантом при анализе реальных объектов (сыворотке крови и мочи) на синтезированных PLOT-колонках с покрытием сверхразветвленными полимерами, что представляет **практическую значимость** данной работы.

По диссертации возник ряд вопросов.

1. Почему в реальных объектах (плазме и сыворотке крови) определяется только альбумин, хотя само диссертационное исследование посвящено выявлению возможностей определения четырех диагностически важных маркеров: альбумина, инсулина, лизоцима и миоглобина?
2. Чем обусловлено резкое снижение пределов обнаружения при сочетании электростэкина и стэкинга с большим объемом вводимой пробы?
3. Диссертантом в качестве стационарных и псевдостационарных фаз использованы новые водорастворимые полимеры типа «ядро-оболочка». Как сказалось влияние массы ядра и различного содержания терминальных олигосахаридных групп на миграционных характеристиках исследуемых белков?

Возникшие вопросы не снизили самого благоприятного впечатления от диссертационной работы.

Диссертационная работа прошла очень широкую апробацию. Результаты диссертационной работы опубликованы в 5 рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, и доложены на Всероссийских и Международных конференциях (24 тезисов). Содержание диссертации Потолицыной В.Е. достаточно полно отражено в автореферате. Работа четко изложена и прекрасно оформлена.

Полученные результаты могут быть включены в курсы аналитической химии, органического анализа, хроматографии на химических факультетах университетов МГУ, СПбГУ, НГУ, в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте,

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 капиллярной электрохроматографии для анализа биологических объектов и внедрения его в практику клинической медицины.

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 достойна присуждения искомой степени по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Официальный оппонент:

руководитель отдела исследований и разработок
компании «Интерлаб», д.х.н., профессор,

Лауреат Государственных премий СССР и РСФСР
127055, г. Москва, Тихвинский пер., д.11, стр.2,

ООО «Интерлаб», Отдел исследований и разработок,
e-mail: yashin@interlab.ru; тел.: (495) 7880983.

 Яков Иванович Яшин

Подпись Я.И.Яшина заверяю

Секретарь Генерального директора

ООО «Интерлаб»





/Н.В.Кочетова/