

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ПОТОЛИЦЫНА ВЕРА ЕВГЕНЬЕВНА

УДК 543.544

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

Специальность 02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Научный руководитель:
доктор химических наук, проф.
Л.А. КАРЦОВА

**Санкт-Петербург
2014**

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1. Основы капиллярной электрохроматографии	10
1.2. <i>PLOT</i> -колонки в капиллярной электрохроматографии.....	20
1.3. Сверхразветвленные полимеры: физико-химические свойства и области применения	32
1.3.1. Терминология, синтез и свойства сверхразветвленных полимеров	34
1.3.2. Синтез и структурные характеристики сверхразветвленных полимеров (СРП).....	36
1.3.3. Дендритные полимеры как стационарные фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ)	37
1.3.4. Использование покрытых капилляров при анализе смесей нейтральных аналитов.....	40
1.4. Метод эллипсометрии для контроля сорбции белков.....	44
1.5. Методы <i>on-line</i> концентрирования в капиллярной электрохроматографии	50
1.5.1. Стэкинг.....	51
1.5.2. Стэкинг нейтральных соединений в мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).....	58
1.5.3. Применение методов стэкинга для анализа.....	58
ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
2. 1. Оборудование	60
2.2. Реактивы.....	61

2.3. Пробоподготовка биологических жидкостей к анализу	62
2.3.1. Фильтрация пробы	62
2.3.2. Пробоподготовка мочи к анализу альбумина	62
2.4. Методы исследования.....	64
2.4.1. Капиллярная электрохроматография с использованием монолитных и <i>PLOT</i> -колонок	64
2.4.2. Синтез динамически модифицированной дендритной капиллярной колонки.....	67
2.4.3. Мицеллярная электрокинетическая хроматография.....	67
2.4.4. Капиллярный электрофорез смеси стандартов белков	68
2.4.5. Эллипсометрический анализ	68
2.5. Приготовление рабочих растворов	70
2.5.1. Приготовление буферных растворов	70
2.5.4. Приготовление стандартных растворов белков.....	71
2.6. Обработка полученных данных.....	71
2.6.1. Определение эффективности в капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ).....	71
2.6.2. Оценка пористости монолитного сорбента.....	72
2.6.3. Оценка воспроизводимости процедуры синтеза монолитных капиллярных колонок.....	73
ГЛАВА 3. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА МОНОЛИТНЫХ И PLOT-МЕТАКРИЛАТНЫХ КОЛОНКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ.....	74
3.1. Синтез полиметакрилатного полимера <i>in situ</i>	76
3.1.1. Капиллярные полиметакрилатные монолитные колонки	77

3.1.2. Капиллярные PLOT-метакрилатные колонки.....	79
3.2. Электрохроматографическое разделение белков.	81
ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ЭКХ)	85
ГЛАВА 5. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА PLOT-ДЕНДРИТНЫХ КОЛОНКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ.....	103
ГЛАВА 6. ЭЛЛИПСОМЕТРИЯ	109
ГЛАВА 7. ON-LINE КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В УСЛОВИЯХ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ НА PLOT-PEI-MAL КОЛОНКАХ.....	118
7.1. Стэкинг с большим объемом образца (<i>LVSS – largevolumesamplestacking</i>).....	119
7.2. Стэкинг с большим объемом образца с водной пробкой	122
7.3. Стэкинг с большим объемом образца с электростэкингом	124
7.4. Анализ реальных объектов	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	136
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	145
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	147
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	155
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	156

ВВЕДЕНИЕ

Анализ белков всегда был и является основной частью любых биохимических исследований. Биодиагностика, поиск биомаркеров, онкомаркеров, а также маркеров различных заболеваний связаны с исследованием протеомной картины человека. Количественное определение целевых белков и белковых комплексов в биологических жидкостях является одной из перспективных областей исследования в современной биоаналитической химии.

Среди разработанных методов определения индивидуальных маркерных белков широко используются иммуноферментные методы (ELISA), Вестерн-блоттинг, различные хроматографические методы. Однако применение их требует большого объема ручного труда, значительных финансовых затрат на оборудование или наборов для анализа (ELISA).

В настоящее время наряду с упомянутыми выше все большее внимание уделяется электрофоретическим методам (традиционный *электрофорез*, *электрокинетическая хроматография*, *капиллярная электрохроматография*, *капиллярный гель-электрофорез*) определения белков и пептидов, что обусловлено, в первую очередь, их высокой эффективностью, экспрессностью и экономичностью.

Тем не менее, и при использовании методов капиллярного электрофореза (КЭ) возникает ряд проблем вследствие необратимой адсорбции белков и пептидов на внутренней поверхности кварцевого капилляра и электростатического взаимодействия заряженных функциональных групп аналитов с заряженными группами сорбента. Все это приводит к недостаточной воспроизводимости параметров миграции, невысокой чувствительности из-за нестабильности базовой линии и снижению продолжительности «жизни» кварцевого капилляра.

Использование покрытых капилляров или введение в состав рабочего буфера веществ, способных модифицировать стенки кварцевого капилляра, является одним из решений обозначенной проблемы.

Перспективными материалами в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ) и электрокинетической хроматографии (ЭКХ) являются метакрилатные и дендритные полимеры. К последним относятся и новые водорастворимые полимеры на основе сверхразветвленного полиэтиленimina, содержащего терминальные олигосахаридные фрагменты [1]. Легкость их модификации позволяет контролировать растворимость, реакционную способность, адгезию к поверхности, увеличивать биосовместимость, изменять комплексообразующие свойства. Наличие внутримолекулярных полостей обеспечивает им способность образовывать комплексы включения типа «*гость-хозяин*» с аналитами различной природы [1]. В диссертационной работе выявляется способность этих полимеров, введенных в состав рабочего буфера, влиять на миграционные характеристики белков и препятствовать их сорбции в процессе их электрофоретического разделения.

Другая проблема, возникающая при электрофоретическом определении белков – высокие пределы обнаружения аналитов, затрудняющие использование метода КЭХ в практике клинической медицины. Ее решением мог бы быть поиск и/или разработка новых вариантов *on-line* концентрирования, включая комбинирование различных механизмов, позволяющих получать сопоставимые с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) отношения сигнал/шум.

Эти задачи ставятся и решаются в данном диссертационном исследовании.

Цель диссертационного исследования

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 рН 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 *on-line* концентрирования с участием дендритных полимеров в составе электрохроматографических систем и предложить вариант внутрикапиллярного концентрирования 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 полиэтиленимины 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.

На защиту выносятся следующие положения:

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 полиэтиленимина.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Основы капиллярной электрохроматографии

Капиллярная электрохроматография (КЭХ) – активно развивающийся гибридный метод разделения, позволивший существенно расширить возможности современной аналитической химии. Специфика метода КЭХ в отличие от ВЭЖХ состоит в том, что гидродинамический поток подвижной фазы заменяется электроосмотическим потоком (ЭОП), формирующимся в капиллярной колонке при наложении внешнего электрического поля.

Различные механизмы, определяющие разделение компонентов смеси в классической хроматографии, капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ), изоэлектрической фокусировке и изотахофорезе, фактически объединены в одном методе - КЭХ, и каждый из вышеперечисленных - привносит элементы своих характерных закономерностей в итоговый процесс разделения. Это значительно увеличивает потенциальные возможности КЭХ как метода разделения и анализа смесей. Например, стало возможным комбинировать обращенно-фазовое или ионообменное разделение с дифференцированной электромиграцией аналитов. Кроме того, в режиме КЭХ возможно разделение смесей нейтральных соединений, следовательно, он является альтернативой мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ).

В капиллярной электрохроматографии (КЭХ) движение жидкости осуществляется под действием электрического поля, что гораздо эффективнее, чем применение давления, как в случае ВЭЖХ. Такое специфическое поведение движущегося потока называется электроосмотическим потоком (ЭОП) (Рисунок 1).

Электроосмотический поток в КЭХ возникает за счет образования двойного электрического слоя (ДЭС). Поэтому при оценке электрофоретической

подвижности аналитов необходимо учитывать такие характеристики как пористость и проницаемость колонки.

Большинство теоретических работ по КЭХ основано на предположении, что капиллярную колонку, заполненную пористым сорбентом, можно в первом приближении, рассматривать, как систему параллельных капиллярных трубок, каждая из которых ведет себя подобно обычному капилляру в капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ) с ζ -потенциалом стенок, равным ζ_m -потенциалу поверхности сорбента [2].

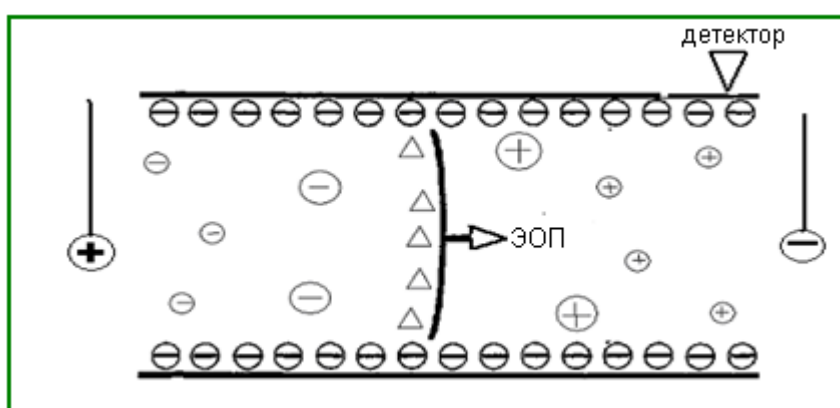


Рис. 1. Движение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля.

Скорость движения электроосмотического потока зависит от свойств электролита: вязкость, диэлектрическая проницаемость, потенциал на поверхности внутренней стенки капилляра или монолита (т.н. дзета-потенциал, ζ).

Линейную скорость ЭОП можно описать уравнением Смолуховского [2](1):

$$u_{\text{ЭОП}} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{\text{с}} \zeta E}{\eta} = \mu_{\text{ЭО}} E \quad (1),$$

где $u_{\text{ЭОП}}$ – линейная скорость ЭОП [см/мин];

ε_0 – диэлектрическая проницаемость среды в вакууме;

ε_{σ} – относительная диэлектрическая проницаемость вещества;

η – вязкость среды [$\text{м}^2/\text{с}$];

E – напряженность электрического поля [В];

$\mu_{\text{ЭОП}}$ – подвижность ЭОП [$\text{см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$].

Уравнение описывает движение жидкости вблизи заряженных стенок капилляра. Для пористых монолитов в КЭХ рассматривают иную модель ЭОП, скорость которого в заполненных капиллярных колонках задается уравнением (2) [2]:

$$u_{\text{ср}} = u_{\text{ЭОП}} \left[1 + \left(\frac{d_{\text{ч}}}{R} \right) \left(\frac{2}{\beta} \right) \left(\frac{\zeta_{\text{кан}}}{\zeta_{\text{м}}} - 1 \right) \right], \quad (2)$$

где $u_{\text{ср}}$ – средняя скорость ЭОП [см/мин];

$u_{\text{эоп}}$ – скорость электроосмотического потока, создаваемая монолитом (см. уравнение (3) [см/мин];

$d_{\text{ч}}$ – диаметр частиц сорбента [мкм];

R – радиус капиллярной колонки [мкм];

$\zeta_{\text{кан}}$ – дзета-потенциал стенок капилляра;

$\zeta_{\text{м}}$ – дзета-потенциал на поверхности монолита;

β – безразмерный параметр (см. уравнение (4)).

$$u_{\text{ЭОП}} = - \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{\sigma} \zeta_{\text{м}} E}{\eta} \left(\frac{\sigma^*}{\sigma_{\text{кан}}} \right), \quad (3)$$

где $\sigma^*/\sigma_{\text{кан}}$ – отношение коэффициентов проводимости заполненной колонки (σ^*) и пустого капилляра ($\sigma_{\text{кан}}$).

$$\beta = 3 \sqrt{\frac{\alpha(1 - \varepsilon_{\text{кол}})}{2}}, \quad (4)$$

$\varepsilon_{\text{кол}}$ – общая пористость колонки;

α – безразмерный параметр, который зависит от структуры монолита и формы частиц.

Для оценки пористости сорбента и характеристики заполненной колонки используют величину (ϕ) (5):

$$\phi = \frac{\sigma^*}{\sigma_n}, \quad (5)$$

Эта величина в идеальных условиях не зависит от свойств подвижной фазы (кроме тех случаев, когда на ионизацию электролита влияет неподвижная фаза), размера частиц, длины колонки и силы электрического поля.

В электрическом поле катионы диффузного слоя мигрируют к катоду, унося с собой сольватные оболочки. В результате движется вся жидкость, а поток имеет плоский профиль, в отличие от гидродинамического потока жидкости в ВЭЖХ, где ламинарный поток имеет параболический профиль (Рисунок 2).

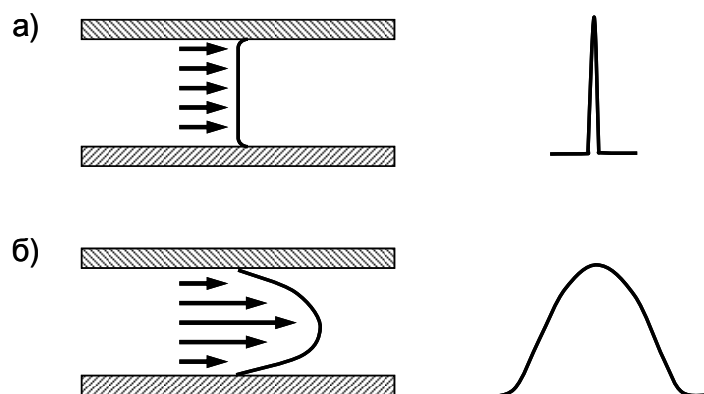


Рис. 2. Профиль потока в условиях электроосмоса (а), в условиях ВЭЖХ (б).

Дальнейшие исследования подтвердили правильность этого предположения [3]. Кроме того, профиль ЭОП зависит от диаметра капилляра (d) и от величины ДЭС (δ). Проведенные теоретические расчеты в [3] выявили, что профиль будет плоским только в том случае, когда величина $d \gg \delta$ (показано, что профиль поток будет преимущественно плоским при $d \geq 10\delta$). Чем ближе между собой значения d и δ , тем более параболическим будет профиль потока.

Плоский профиль потока объясняет и большую эффективность в КЭХ по сравнению с ВЭЖХ, которую можно оценить по уравнению Ван-Деемтера (6):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu, \quad (6),$$

где A – параметр, характеризующий вихревую диффузию.

Он имеет меньшее значение в КЭХ по сравнению с μ -ВЭЖХ благодаря независимости скорости ЭОП от геометрии каналов и диаметра частиц сорбента. Это, в свою очередь, позволяет в КЭХ увеличивать длину колонки, а размер частиц уменьшить до субмикронного уровня, что и приводит в итоге к увеличению эффективности колонки. Параметр B характеризует продольную диффузию. Его вклад становится существенным лишь при низких скоростях потока. В условиях КЭХ он очень мал.

Значение третьего параметра (C), ответственного за межфазный массообмен, также меньше в КЭХ по сравнению с режимом ВЭЖХ. В колонках, заполненных пористым сорбентом с заряженной поверхностью и достаточно широкими порами ($> 300 \text{ \AA}$), под действием напряжения значительный вклад вносит внутрочастичный конвективный массоперенос, что снижает сопротивление массопереносу, и, следовательно, вклад параметра C также уменьшается (Рисунок 3).

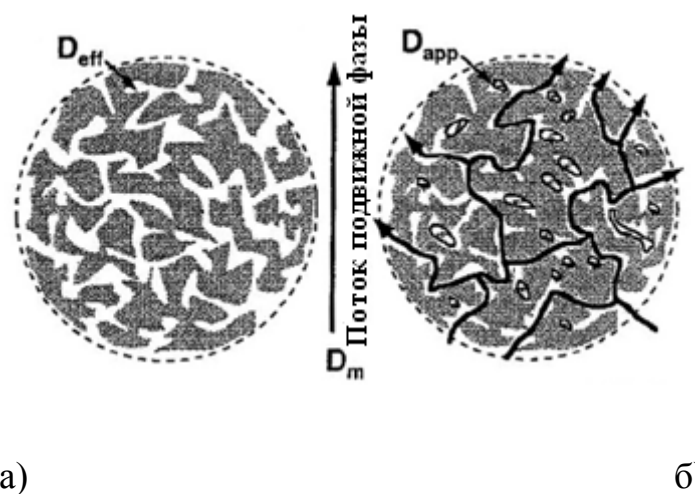


Рис. 3. Массоперенос с гидродинамическим (а) и электроосмотическим (б) потоками.

В ВЭЖХ перенос веществ происходит только за счет диффузии, тогда как в КЭХ массоперенос увеличивается и за счет конвекции [4]. Уменьшение параметров A и C в уравнении Ван-Деемтера в 2-4 раза приводит к снижению высоты, эквивалентной теоретической тарелке (H), что объясняет высокую эффективности в КЭХ по сравнению с μ -ВЭЖХ.

Графическая зависимость высоты эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) от линейной скорости потока для КЭХ и μ -ВЭЖХ представлена на Рисунке 4.

В КЭХ можно использовать более высокие скорости потока для уменьшения времени анализа, поскольку значение ВЭТТ (см. Рисунок 4) возрастает в меньшей степени с увеличением линейной скорости по сравнению с гидродинамическим потоком на кривой Ван-Деемтера.

Таким образом, сочетание механизмов электрофоретической миграции и хроматографического удерживания позволяет значительно уменьшить размывание зоны пробы.

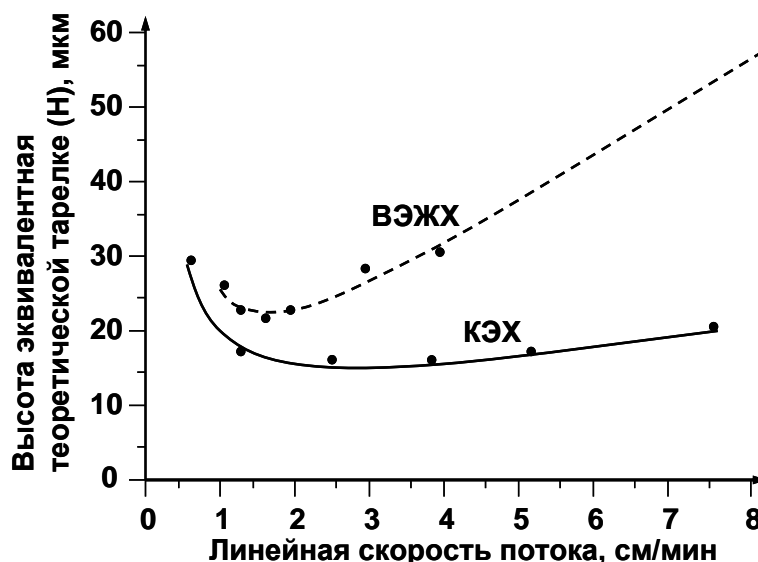


Рис. 4. Сравнение кривых Ван-Деемтера в условиях КЭХ и ВЭЖХ.

Колонка: поли(акрилметакрилат)монолит, содержащий сульфогруппы; длина 41.5 см (8,5 см от окна детектора до конца капилляра); подвижная фаза, 20% (по объему) буфер фосфат натрия (5 мМ, рН 7) и 80% (по объему) ацетонитрил; температура, 21 °С; ввод, 5 кВ 3 с; детектирование, 205 нм; проба: тиомочевина [5].

Необходимо отметить, что классическую теорию хроматографии можно использовать только для описания миграции нейтральных аналитов в КЭХ. Механизм электрохроматографического разделения нейтральных веществ аналогичен хроматографическому и основан на распределении компонентов проб между двумя фазами. Для заряженных веществ механизм разделения более сложный.

Принято считать, что разделение пептидов и белков в КЭХ возможно благодаря совмещению процессов хроматографического удерживания и электрофоретической миграции. Механизм разделения заряженных белков и пептидов методом КЭХ был описан с использованием модели беспорядочного движения [6].

В литературе рассматривается несколько уравнений для миграции разделяемых веществ в КЭХ [7-12]. В одном из них, предложенном Хорватом [7, 10, 11], лежит предположение о независимости процессов хроматографического разделения и электрофоретической миграции. Миграционное поведение заряженных компонентов (белков, пептидов) описано в трех различных режимах разделения:

- *сонаправленная* КЭХ, в которой электрофоретическая миграция компонентов осуществляется в том же направлении, что и ЭОП;

- *противоположнонаправленная* КЭХ, где электрофоретическая миграция компонентов осуществляется против движения ЭОП;

- КЭХ *смешанного типа*, где аналиты движутся в обоих направлениях. Скорость миграции компонентов пробы можно выразить уравнением (7):

$$u_{КЭХ} = \frac{u_{ЭОП} \pm u_{ЭФ,КЭХ}}{1 + k'_{1c}}, \quad (7)$$

где $u_{КЭХ}$ – общая скорость миграции, определяемая из электрофореграммы [см/мин];

$u_{ЭФ,КЭХ}$ – электрофоретическая скорость аналита в КЭХ [см/мин];

k'_{1c} – хроматографический фактор удерживания.

Уравнение (7) можно записать иначе, используя электрофоретические подвижности аналитов (8):

$$\mu_{КЭХ} = \frac{\mu_{ЭОП} \pm \mu_{ЭФ,КЭХ}}{1 + k'_{1c}}, \quad (8)$$

где $\mu_{КЭХ}$ – общая электрофоретическая подвижность, определяемая из электрофореграммы [см/(мин*В)];

$\mu_{ЭОП}$ – электрофоретическая подвижность электроосмотического потока [см/(мин*В)];

$\mu_{ЭФ, КЭХ}$ – электрофоретическая подвижность аналита в КЭХ [см/(мин*В)];

k'_{Ic} – хроматографический фактор удерживания.

При сонаправленном режиме разделения в уравнениях (7) и (8) знак в знаменателе - положительный. В случае противоположнонаправленного процесса – отрицательный.

Выражение для электрофоретической подвижности аналита можно представить следующим образом (9):

$$\mu_{КЭХ} = \frac{\mu_{ЭОП}}{1 + k'_{КЭХ}}, \quad (9)$$

где $k'_{КЭХ}$ – электрохроматографический фактор миграции компонента. Он связан с хроматографическим фактором удерживания ($k'_{КЭХ}$) следующим выражением:

$$k'_{КЭХ} = (1 \mp \mu_r) k'_{Ic} \mp \mu_r, \quad (10)$$

где μ_r – исправленная подвижность, введенная Кенделом [13]:

$$\mu_r = \frac{\mu_{ЭФ, КЭХ}}{\mu_{ЭОП} - \mu_{ЭФ, КЭХ}}, \quad (11)$$

Из уравнений (10) и (11) видно, что μ_r характеризует относительный вклад собственной электрофоретической миграции в общую миграцию. Если вещество не имеет собственной электрофоретической подвижности ($\mu_r = 0$), тогда общая миграция определяется только хроматографическим процессом, т.е. $k'_{КЭХ} = k'_{Ic}$.

С другой стороны, если аналит не удерживается, т. е. $k'_{Ic} = 0$, тогда $k'_{КЭХ} = \mu_r$, т.е. разделение веществ определяется лишь его электрофоретической миграцией.

При достаточно сильном электрическом поле, ионизированные компоненты образца, будут мигрировать, сорбируясь на поверхности ионизированной стационарной фазы. В [2] введены три взаимосвязанных безразмерных параметра:

$$\beta_{кэх} = \frac{\beta_{к}}{1 + \alpha(\gamma\beta_{к} + (1 - \gamma))}, \quad (12)$$

где α – уменьшение подвижности компонентов образца по сравнению с электроосмотической подвижностью (u_m);

$\beta_{кэх}$ – фактор удерживания в КЭХ,

$\beta_{ис}$ – фактор удерживания в изократическом режиме ВЭЖХ,

определяющиеся уравнениями (13) и (14), соответственно;

γ – соотношение скоростей поверхностной электродиффузии (u_{es}) и электрофоретической миграции (u_{em}).

$$\beta_{кэх} = t_{кэх} / t_o = 1 + k_{кэх}, \quad (13)$$

$$\beta_{ис} = t_{ис} / t_o = 1 + k_{ис}, \quad (14)$$

Сочетание электрофоретической миграции в подвижной фазе и поверхностной электродиффузии в стационарной фазе делает метод КЭХ уникальным для разделения пептидов и белков. Значимость вкладов в хроматографическое удерживание и электрофорез зависят от величин параметров миграции α , β и γ в уравнении (12).

Важной задачей является разработка новых стационарных фаз для КЭХ, способных предотвратить необратимую адсорбцию аналитов и при этом обладать высокой и равномерной плотностью заряда на поверхности стационарной фазы с целью достижения оптимальных электрокинетических свойств колонки. В [6] предложено для достижения высокой скорости разделения регулировать давление, не снижая при этом эффективность колонки и селективности.

1.2. *PLOT*-колонки в капиллярной электрохроматографии

В настоящее время для разделения компонентов сложных смесей методом капиллярной электрохроматографии (КЭХ) активно используются полые колонки с иммобилизованным пористым слоем монолитного полимера, т. н. *PLOT*-колонки (*porous-layer open-tubular*).

Несмотря на то, что электрохроматография предложена Преториусом более 30 лет назад [14], лишь недавно удалось оценить по-настоящему достоинства этого метода. Поскольку колонки – наиболее важная часть КЭХ-разделительной системы, особое внимание уделяется технологии их изготовления. Метод КЭХ сочетает достоинства высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Опыт, имеющийся в ВЭЖХ, востребован и при изготовлении колонок, заполненных частицами или монолитной стационарной фазой; развитие метода КЗЭ инициировало создание полых ОТ-колонок (*open-tubular column*) [15].

Впервые ОТ-колонки для КЭХ описаны Tsuda и др. в 1982 г. [16]. Полые колонки с пористым слоем (*PLOT* – колонки) представляют подгруппу капиллярных колонок, на стенках которых иммобилизован пористый полимерный материал. Вначале они использовались в газовой хроматографии (ГХ) [17]. В условиях жидкостной хроматографии из-за низкой диффузии аналитов к функционализированным стенкам кварцевого капилляра, приводящей к заметному размыванию хроматографических зон и, соответственно, снижению эффективности, они не получили достаточно широкого распространения [18].

Теоретические расчеты показали, что влияние диффузии становится незначительным в капиллярах с диаметром $< 15\text{ мкм}$ [19]. В методе КЭХ использование высоких давлений не требуется: подвижная фаза мигрирует за счет электроосмотического потока (ЭОП). Слой пористого полимера в *PLOT*-колонках обеспечивает более высокую площадь поверхности, чем в обыкновенных капиллярах, хотя в сравнении с набивными и монолитными аналогами площадь

поверхности в слое полимера несколько ниже. Несмотря на высокую проницаемость капиллярных *PLOT*-колонок, их получение и применение в КЭХ менее распространено [20]. В принципе, полимерные монолитные слои имеют много общего с монолитными КЭХ-колонками [21]. Единственное различие состоит в том, что пористый материал не полностью заполняет весь внутренний объем капилляра.

Важным направлением в активно развивающейся в настоящее время *протеомике* является электрофоретическое определение белков в сложных биологических матрицах. Перспективным для решения этой задачи стало использование полых колонок благодаря их высокой эффективности, легкости автоматизации, малым расходом реагентов и образцов [22-25]. Однако в протеомическом анализе использование КЭХ с полыми колонками ограничено необратимой сорбцией белков стенками непокрытого кварцевого капилляра и возможными электростатическими взаимодействиями между белками и ионогенными функциональными группами сорбента, формирующими электроосмотический поток (ЭОП) [26].

Рекомендовано использование модифицированных неподвижных фаз, содержащих гидрофобные объемные группы, предотвращающие нежелательный контакт молекул белков с заряженными функциональными группами сорбента или отрицательно заряженными силанольными группами на внутренней поверхности стенок кварцевого капилляра [27,28].

В [29] для этой цели применяли разветвленный полиэтиленимин (*PEI*) – катионный полимер с полярными первичными, вторичными и третичными аминогруппами (Рисунок 5). Большое количество протонированных аминогрупп обеспечивает значительный ($1.98 \times 10^{-4} \text{ см}^2/\text{с} \cdot \text{V}$) отрицательный ЭОП и селективное взаимодействие с аналитами.

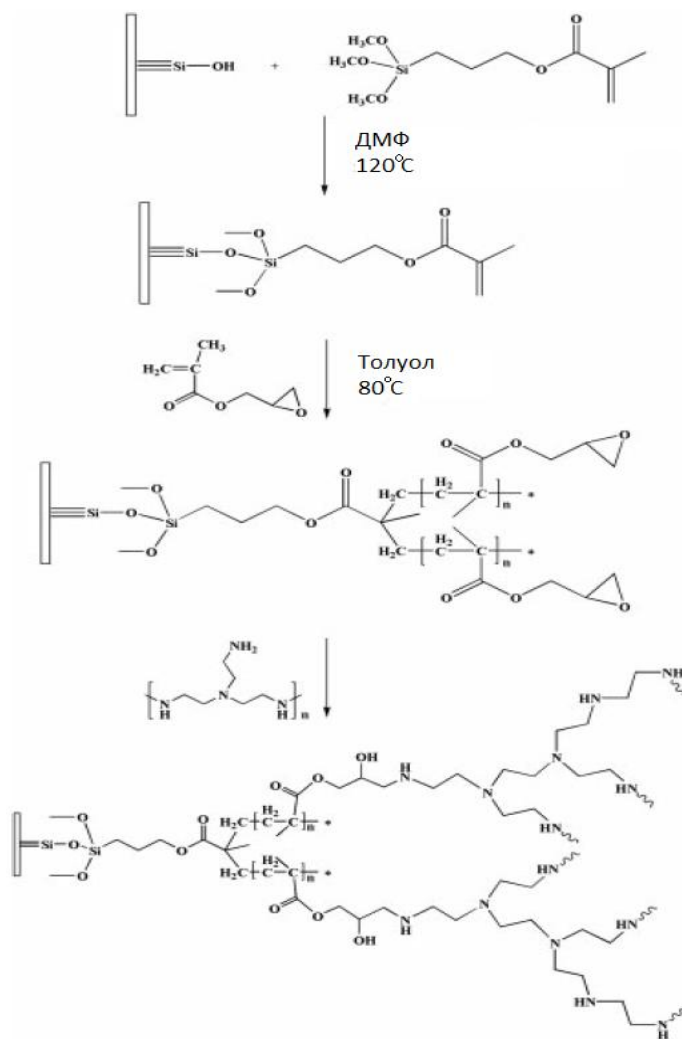


Рис. 5. Схема получения стационарной фазы на основе разветвленного полиэтиленimina щеточного типа [29].

Недостатком ОТ-КЭХ является небольшое число функциональных групп, ковалентно связанных с внутренней стенкой кварцевого капилляра и доступных для модификации [30,31].

Для того чтобы получить сорбент с необходимой реакционной способностью, используют различные подходы: сополимеризация, пост-синтетическая химическая модификация ранее полученного полимера и графтирование (*прививка реакционно-способных полимерных цепей на поверхность синтезированных матриц*).

Одним из интересных способов увеличения лигандной емкости при химической модификации внутренней поверхности капилляра является т.н. *графтинг* [32]: функциональные цепи («*щетки*», или «*щупальцы*») формируются на активных центрах поверхности.

Широко описан метод фотоиницируемого графтирования, используемого для химической функционализации макропористых полимерных материалов [33, 34]. В случае пост-модификации монолитов метод фотоиницируемого графтинга имеет ряд ограничений, обусловленный выбором мономеров и форм, в которых проводился синтез материала [35].

Заметный интерес проявляется к стационарным фазам на основе «*полимеров-щеток*», модифицированных металл-хелатными или фенилаланиновыми группами для увеличения площади поверхности, что подтверждено большими значениями факторов удерживания аналитов в сравнении с монослойными лиганд-модифицированными колонками [36-38]. Перспективными оказались разветвленные полиэтиленимины (*PEI*), ковалентно связанные с полимерными цепями типа «щупалец» и выполняющие функции стационарной фазы при разделении пептидов и белков в режиме ОТ-КЭХ.

В [29] с использованием сканирующего электронного микроскопа (Рисунок 6) исследовано покрытие на основе разветвленного *PEI*-полимера «щеточного» типа. Изучена зависимость скорости ЭОП от pH рабочего буфера и концентрации полимера. Воспроизводимость синтеза ОТ-колонок в кислой среде устанавливалась по маркеру ЭОП и составила 4,8%.

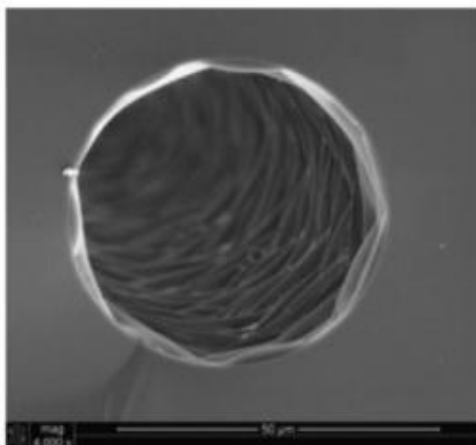


Рис. 6. Фотография внутренней поверхности ОТ-колоники, покрытой разветвленным *PEI*-полимером [29].

Для взаимодействия с аналитами в таких колонках доступна большая площадь поверхности стационарной фазы. При содержании 20% (объемн.) раствора PEI в составе неподвижной фазы генерировался отрицательный ЭОП (рН подвижной фазы <7,5). Подготовленные ОТ-колоники обеспечивали высокую разрешающую способность при разделении пептидов и белков (Рисунок 7) [29].

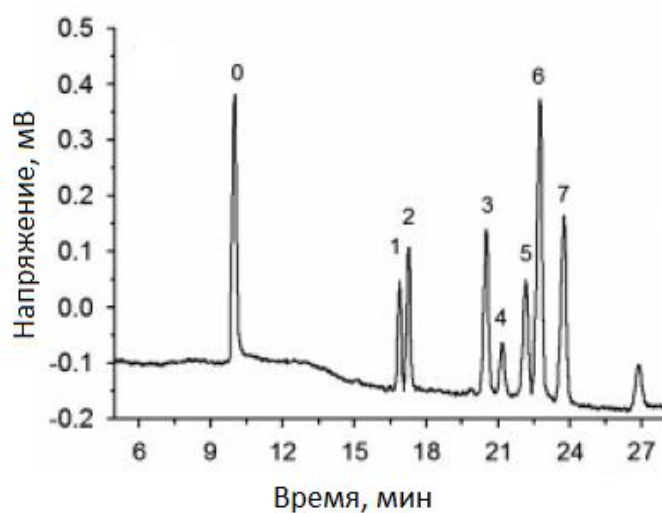


Рис. 7. Электрохроматограмма энкефалин-связанных пептидов на PEI-колонке; 30 мМ фосфатный буфер (рН 2,5), 25% ацетонитрила[29].

В [39] *PLOT*-колонок на основе полистирола и дивинилбензола использовались для разделения интактных белков. Применение более коротких колонок приводило к уширению аналитических сигналов (Рисунок 8).

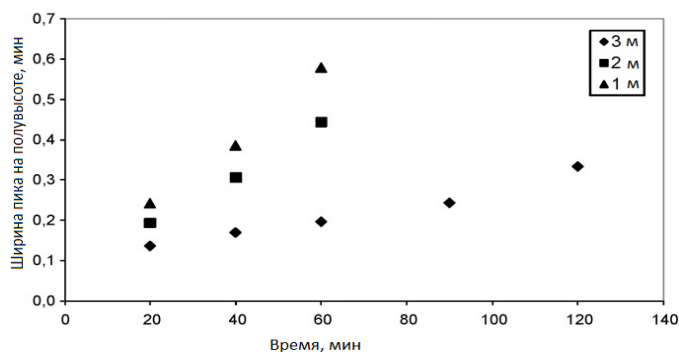


Рис. 8. График зависимости средней ширины пика на полувысоте от времени для колонок различной длины: 1, 2 и 3 м [39].

В [39] исследована зависимость времен удерживания белков в образцах обезжиренного молока от температуры в диапазоне 20-50 °С (Рисунок 9).

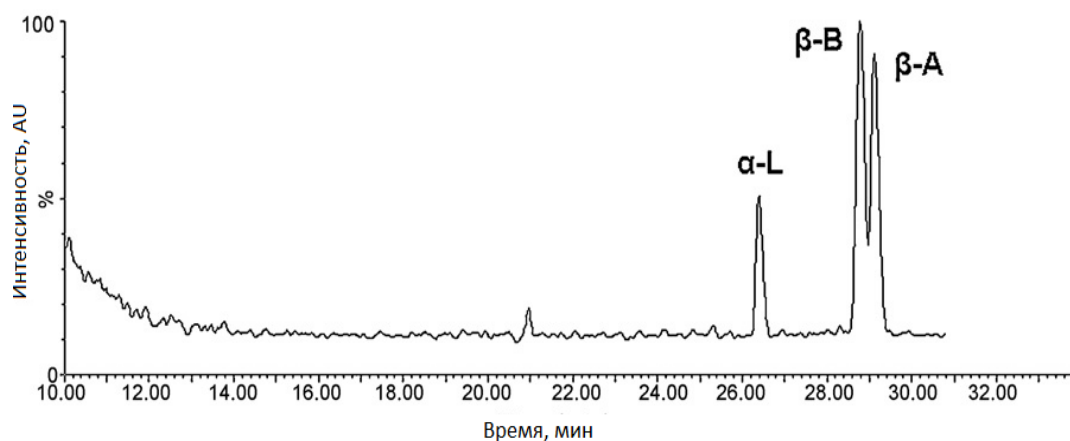


Рис. 9. Хроматограмма белков (α -лактоглобулин, β -лактоглобулин В, β -лактоглобулин А) в образце обезжиренного молока. Градиентный режим элюирования: от 90% А (0,1% фторуксусная кислота, 0,05% трифторуксусная кислота (объемн.) в воде) до 90% В (0,1% фторуксусная кислота, 0,05% трифторуксусная кислота, 10% воды (объемн.) в ацетонитриле); колонка 3 м [39].

В [40] впервые синтезированы *PLOT*-колонок на основе бутилметакрилата (БМА), мономера (моно-(2-(метакрилоилокси)-этилсукцината) (МЭС) и сшивающего агента (этилендиметакрилата). Группой Chen и сотр. [40] получены фотографии поверхности *PLOT*-колонок с использованием сканирующего электронного микроскопа (Рисунок 10).

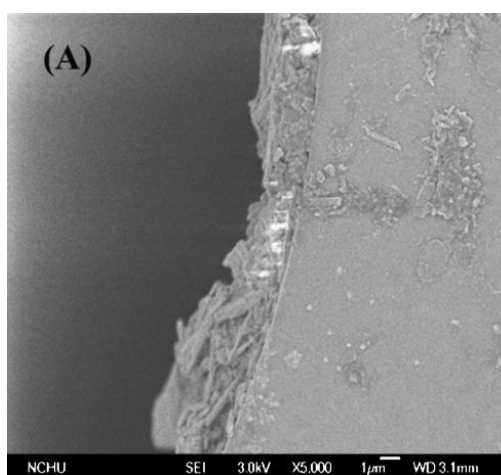


Рис. 10. Фотография внутренней поверхности *PLOT*-колонок на основе БМА-МЭС полимера [40].

Воспроизводимость полученного покрытия по скорости электроосмотического потока составила от 3,7 до 4,7% для трех различных капилляров. Авторами выявлено влияние pH и ионной силы буфера, а также концентрации органического растворителя на скорость ЭОП (Рисунок 11).

С использованием этих колонок оптимизированы условия разделения различных групп аналитов: смесь нуклеозидов и тимина, флавоноидов и фенольных кислот (Рисунок 12).

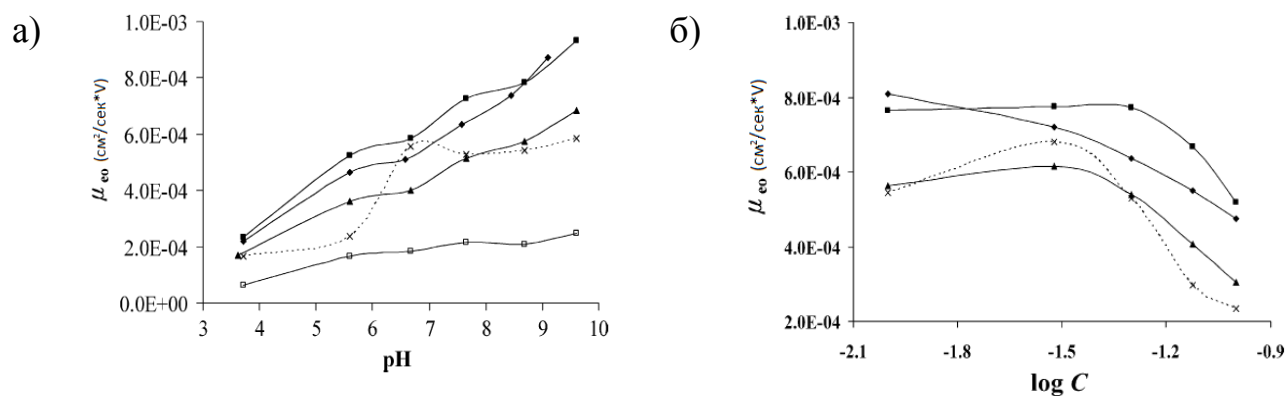


Рис. 11. Зависимость ЭОП от pH буферного электролита (а) и влияние концентрации рабочего буферного электролита на электроосмотическую подвижность (б). Колонки: (◆) пустой капилляр; (▲) колонка, силанизированная 3-метоксисилилпропилметакрилатом; (■) покрытие капилляра БМА-МЭС полимером; (×) - SiH-МЭС покрытие капилляра. Рабочий электролит: 50мМ фосфатный буфер; маркер ЭОП - ДМСО; гидростатический ввод 5см, 2с; +15кВ, УФ-детектирование 214 нм [40].

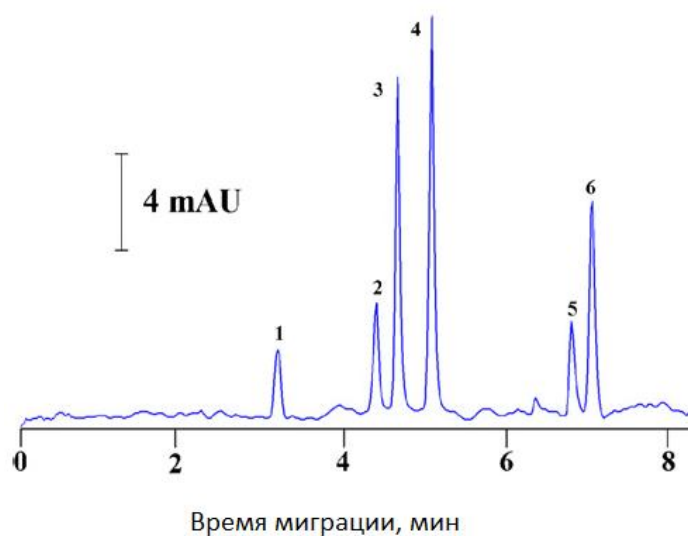


Рис. 12. Электрохроматограмма смеси нуклеозидов и тимина на PLOT-колонке, покрытой БМА-МЭС полимером.

Рабочий электролит: 50 мМ боратный буфер; гидростатический ввод 15 см, 5с; +10кВ; капилляр:60 см×75мкм; 1 – тимин, 2 – аденозин, 3 - тимидин, 4 – дезоскиаденозин, 5 – гуанозин, 6 – уридин [40].

В [41] получен *in situ* фотоинициированной сополимеризацией новый пористый монолит на основе *бис*-фенолдиметакрилата (БФАДМА) (сшивающий агент) и бензилметакрилата; в качестве порогенного растворителя использовалась бинарная система циклогексанол и 1-деканол. Полученные колонки для КЭХ характеризуются хорошей проницаемостью, механической и гидролитической стабильностью, а также высокой селективностью к ароматическим анализам: успешно разделены смеси алкилбензолов, ПАУ и фенольных соединений [41]. Воспроизводимость (RSD) по параметрам миграции ЭОП от анализа к анализу и от колонки к колонке составила $\sim 2,2\% \div 5,6\%$.

В [42] синтезированы цвиттерионные молекулярные мицеллы поли- ϵ -натрий-ундеканойлизината (поли- ϵ -НУЛ) (Рисунок 13), используемые в качестве покрытия внутренней поверхности капилляра в условиях ОТ-КЭХ для разделения белков.

Данный вид мицелл содержит кислотные (*карбоксильные*) и основные (*амино-*) группы, которые могут быть протонированы или депротонированы в зависимости от значения рН рабочего электролита, и заряд поверхности полимера может быть либо положительным, либо - отрицательным. Подобное цвиттерионное покрытие обеспечило разделение смеси 4-х основных (*лизоцим, цитохром, α -химотрипсиноген А и рибонуклеаза А*) и шести кислотных белков (*миоглобин, дезоксирибонуклеаза I, β -лактоглобулин А, β -лактоглобулин В, α -лактальбумин и альбумин*) в нормальном и обращенном режимах (Рисунок 14).

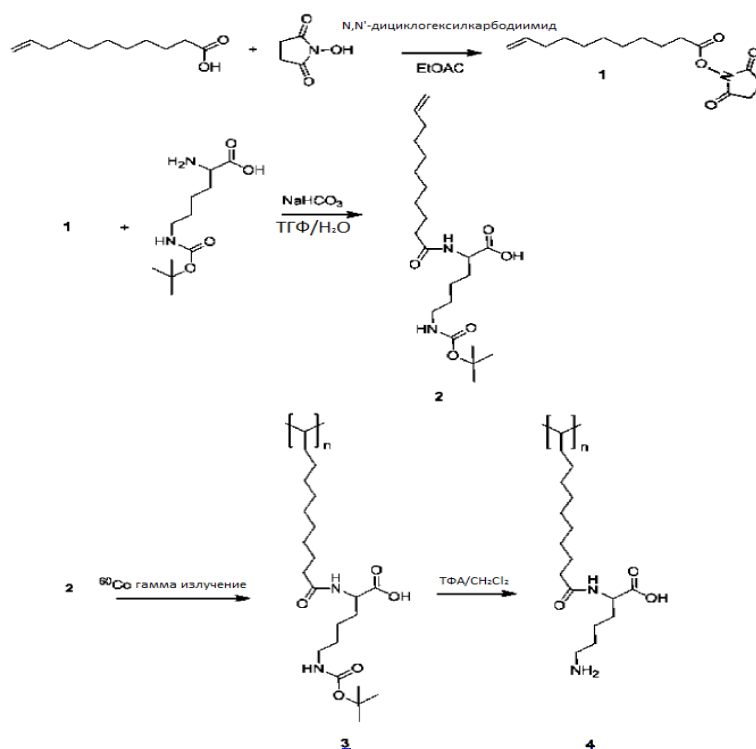


Рис. 13. Схема синтеза поли-ε-НУЛ [42].

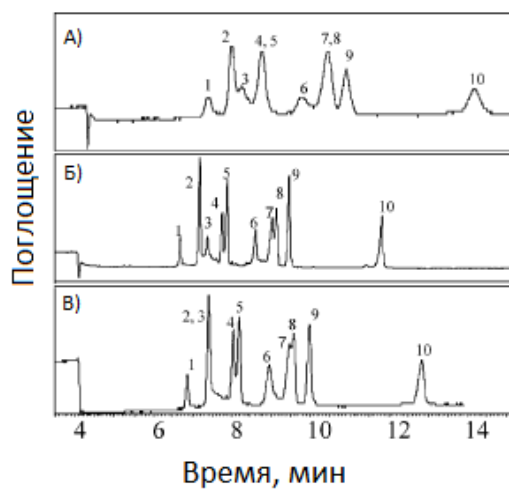


Рис. 14. Влияние концентрации NaCl на разделение 10 кислотных и основных белков [42].

Условия: 0,4% (масс.) поли-ε-НУЛ; концентрация NaCl А) 25 мМ; Б) 20 мМ; В) 15 мМ; рабочий электролит: 20 мМ раствор гидрофосфата натрия (рН 3), 25кВ, 15°С; кварцевый капилляр: внутренний диаметр 50 мкм; эффективная длина 40 см; электрокинетический ввод 5кВ, 5с; УФ-детектирование 200 нм. 1 – дезоксирибонуклеаза I, 2 – α-хемотрипсиноген А, 3 – альбумин, 4 – α-лактоглобулин, 5 – рибонуклеаза, 6 – миоглобин, 7 – β-лактоглобулин А, 8 – β-лактоглобулин В, 9 – лизоцим, 10 – цитохром С.

Установлена высокая стабильность покрытия: до 50 анализов на одном и том же капилляре.

В [43] осуществлено хиральное разделение энантиомеров кетопрофена в условиях КЭХ с ОТ-колонками, содержащими в качестве покрытия полимеры с молекулярными отпечатками на внутренней поверхности кварцевого капилляра. Колонки подготовлены *in situ* термополимеризацией. Мономерная смесь содержала *S*-кетопрофен, метакриловую кислоту (функциональный мономер), этиленгликоль диметакрилат (сшивающий агент) и 4-стиролсульфоновую кислоту в смеси ацетонитрил/пропанол-2 (Рисунок 15).

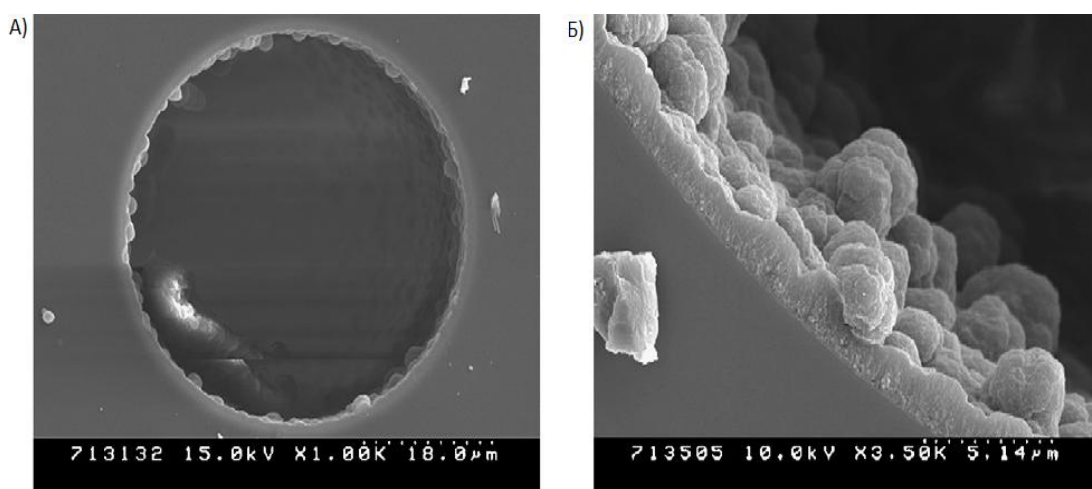


Рис. 15. Фотография внутренней поверхности ОТ-колонки с «отпечатками» *S*-кетопрофена, полученная с помощью электронного сканирующего микроскопа: а) срез ОТ-колонки; б) увеличенный фрагмент полимера между полимерным слоем и внутренней стенкой капилляра [43].

Отмечена высокая эффективность (156 000 т.т./м) и селективность разделения (фактор селективности 10,5) энантиомеров кетопрофена.

В [44] синтезированы ОТ-колонки с полимерным покрытием типа «щупальцев», модифицированного фенилаланином, для синтеза которого использовалась графт-полимеризация глицидилметакрилата с последующей постфункционализацией фенилаланином (Рисунок 16).

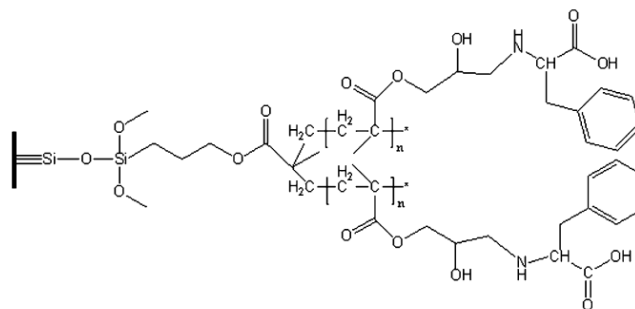


Рис. 16. Структура стационарной фазы на основе полимера типа «щупальца», функционализированного фенилаланином [44].

Полученный сорбент, обладая амфотерным характером, обеспечивал разделение как основных, так и кислотных белков при различных значениях pH рабочего буфера (Рисунок 17).

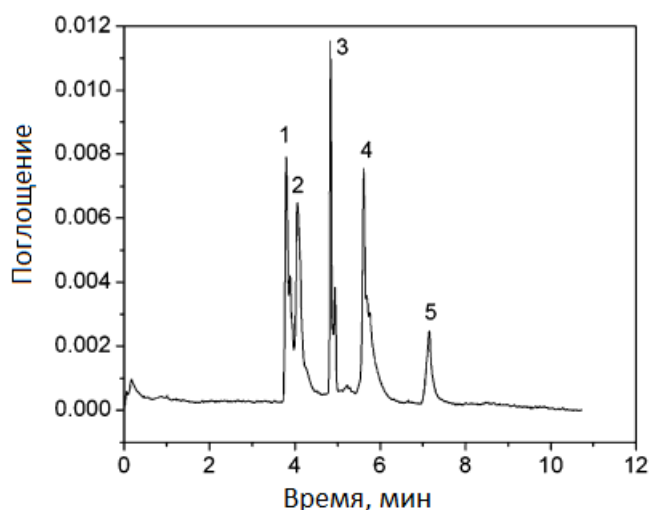


Рис. 17. Электрохроматограмма смеси стандартов белков. Эффективная длина колонки: 40 см, внутр. диаметр 50 мкм. Подвижная фаза: 50мМ боратный буфер, УФ-детектирование 200 нм, 18 кВ. 1– ДМСО, 2 – рибонуклеаза А, 3 – миоглобин, 4 – трансферин, 5 – инсулин [44].

Воспроизводимость времен миграции (RSD) белков не превысила 5%.

Таким образом, поиск новых материалов в качестве стационарных фаз может существенно расширить аналитические возможности метода капиллярной электрохроматографии.

1.3. Сверхразветвленные полимеры: физико-химические свойства и области применения

В течение последнего десятилетия сверхразветвленные полимеры (СРП) стали центром интенсивного междисциплинарного исследования [45]. Стремления продемонстрировать их полный потенциал стимулирует и новые методы синтеза этих материалов с разнообразным дизайном. Некоторые из них уже коммерчески реализованы.

К настоящему времени СРП, благодаря их уникальным свойствам, применяют в процессах разделения, включающих экстракцию, абсорбцию, мембранную или препаративную хроматографию [45].

Различные типы полимеров представлены на Рисунке 18.

На Рисунке 19 представлены различные виды разветвленных полимеров.

Результатом длительного и многошагового синтеза дендримеров, является дорогостоящий продукт с ограничением в промышленном применении. В отличие от последних, беспорядочно разветвленные СРП с близкими свойствами могут быть достаточно легко синтезированы посредством одностадийной реакции, и поэтому представляют продукты, перспективные и для крупномасштабного индустриального применения. Такие компании как Perstorp Group (Perstorp, Sweden), DSM Fine Chemicals (Geleen, Netherlands), BASF AG (Ludwigshafen, Germany), и Hyperpolymers GmbH (Freiburg, Germany) уже производят коммерчески доступные СРП.

Основные виды полимерных архитектур



Рис. 18. Основные виды полимерных структур [45]

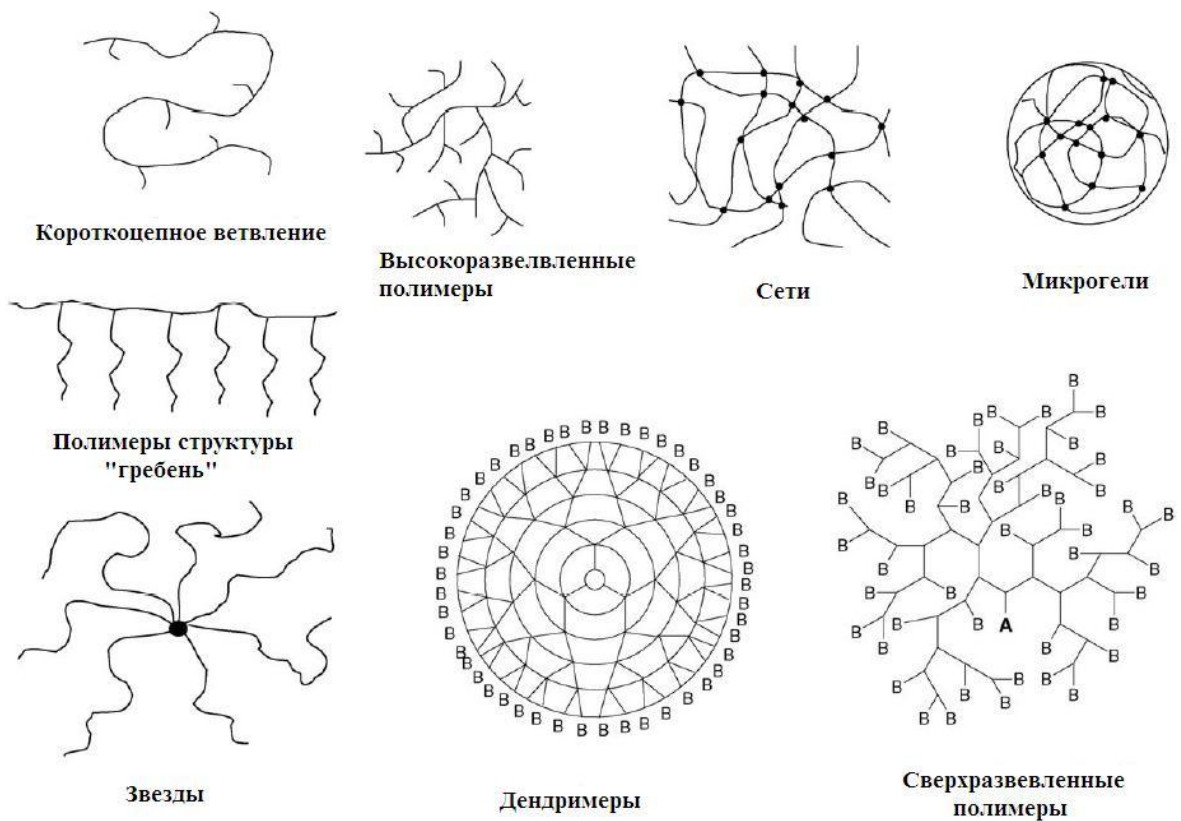


Рис. 19. Основные виды разветвленных полимеров [45].

Большинство применений СРП основано на отсутствии в их молекулах цепных сплетений, глобулярных сфер и значительного количества функциональных групп. При этом модификация функциональных групп позволяет регулировать растворимость, реакционную способность, адгезию к различным поверхностям, «самосборку», электрохимические и люминесцентные свойства [46, 47], обеспечивая большие возможности для дизайна СРП и расширения сферы их использования.

В отличие от стандартных линейных полимеров, СРП не только обладают значительной селективностью и емкостью [48], но и сравнительно низкой вязкостью растворов и расплавов [47-50], высокой термической стабильностью [47,50].

1.3.1. Терминология, синтез и свойства сверхразветвленных полимеров

Дендритные полимеры являются четвертым основным классом макромолекулярных соединений (Рисунок 18) [45], представляющие собой высоко разветвленные симметричные слоистые глобулярные макромолекулы, среди которых выделяют: (а) неупорядоченные СРП, (б) дендриграфты и (в) дендримеры (Рисунок 20). Они состоят из полифункционального ядра, радиально-симметричных повторяющихся слоев (*генераций*) и терминальных функциональных групп.

Дендримеры (*dendron* – «дерево» и *meros* – «часть») – высокоорганизованные, трехмерные, монодисперсные полимеры с глобулярной структурой и большим числом терминальных групп. Первые сообщения появились в 1970-х гг. [47], затем последовали публикации, обсуждающие различные варианты методологии синтеза [45,48]. В отличие от мицелл, образованных поверхностно-активными веществами (ПАВ), дендримеры стабильны в широком диапазоне условий эксперимента. Размеры их молекул можно контролировать в процессе синтеза, что позволяет вводить различные

функциональные группы, обеспечивающие селективность разделения аналитов в электрокинетической хроматографии (ЭКХ) [45].

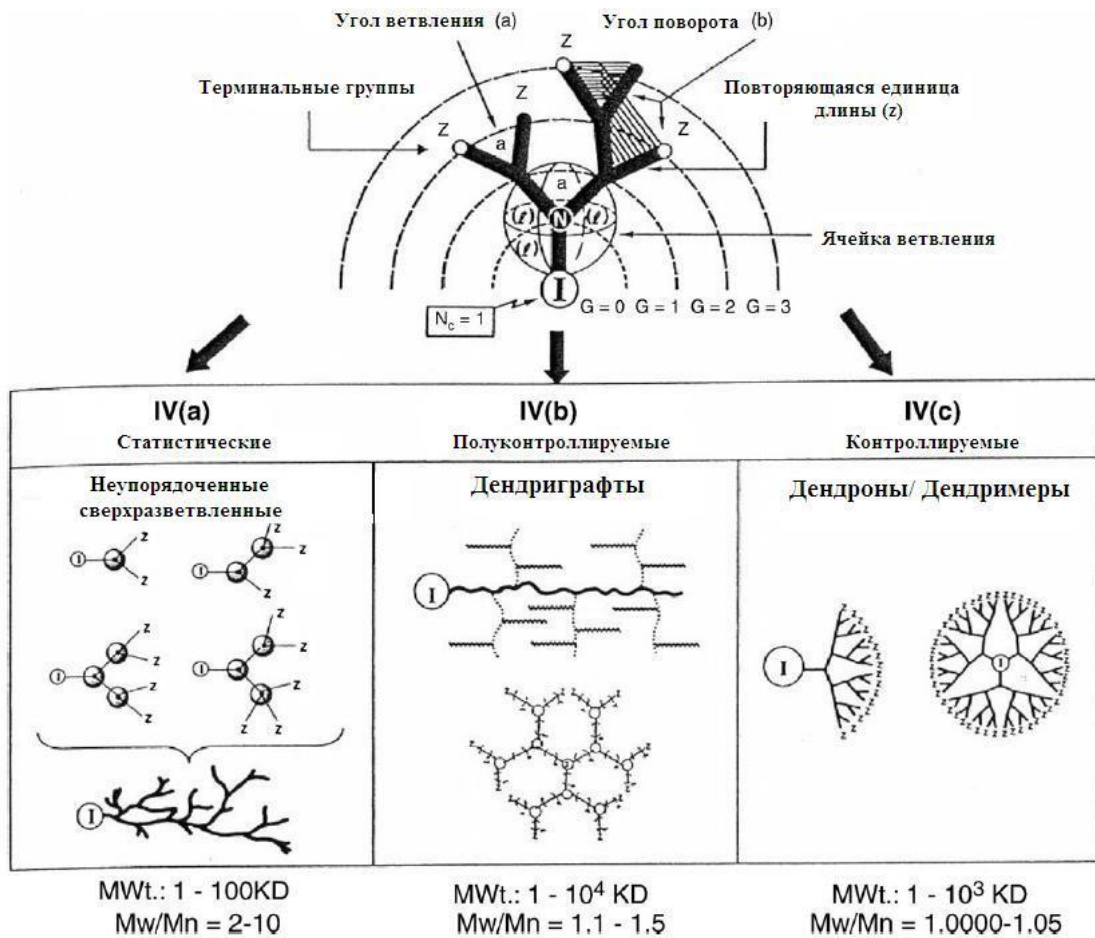


Рис. 20. Разделение дендритных полимеров на подклассы: сверхразветвленные полимеры, дендриграфты и дендроны/дендримеры.

Параметр ячейки ветвления: (a) угол ветвления; (b) угол поворота; (I) повторяющаяся единица длины; (z) терминальная группа [45].

В качестве *псевдостационарной* фазы в методе ЭКХ наиболее широко используются заряженные мицеллы, но структура мицелл динамична, а дендримеров – статична, и все терминальные группы последних ковалентно связаны с ядром [48]. Заряженные мицеллы обычно формируются при добавлении

ПАВ, например, додецилсульфата натрия (ДДСН), к рабочему электролиту в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Помимо мицелл, микроэмульсий [46] и олигомеров [47] в ЭКХ в качестве *псевдостационарной* фазы также могут использоваться дендримеры с водными и водно-органическими элюентами.

Дендриграфты – другой класс дендритных полимеров. Термин введен в 1991 г. [48]. Сверхразветвленные полимеры (СРП) представляют еще один класс глобулярных, высокоразветвленных макромолекул с большим числом терминальных функциональных групп. Однако, в отличие от дендримеров, они полидисперсны и нерегулярны в местах ветвления и структуре (Рисунок 20).

К подобного типа структурам относят, например, такие моносахариды, как гликоген, декстран и амилопектин.

1.3.2. Синтез и структурные характеристики сверхразветвленных полимеров (СРП)

СРП и дендримеры получают из AB_x мономеров, что приводит к образованию сильно разветвленных макромолекул с большим числом терминальных функциональных групп. В отличие от дендримеров СРП могут быть достаточно легко синтезированы в больших количествах и тем самым оказаться им альтернативой. Их получают в одну стадию путем поликонденсации мономеров AB_x [48]. Если $x \geq 2$ и функция А реагирует только с функцией В другой молекулы, и в результате полимеризации AB_x мономеров, образуются высоко разветвленные полимеры [48]. Помимо поликонденсации, для синтеза СРП используют полимеризацию мономеров, содержащих активные группы [50], полимеризацию с раскрытием цикла [48] и самоконденсацию [48]. Возможности их применения рассматривается в обзорах [46,48].

При этом одностадийная процедура синтеза СРП приводит к неконтролируемому статистическому росту [48] (Рисунок 21).

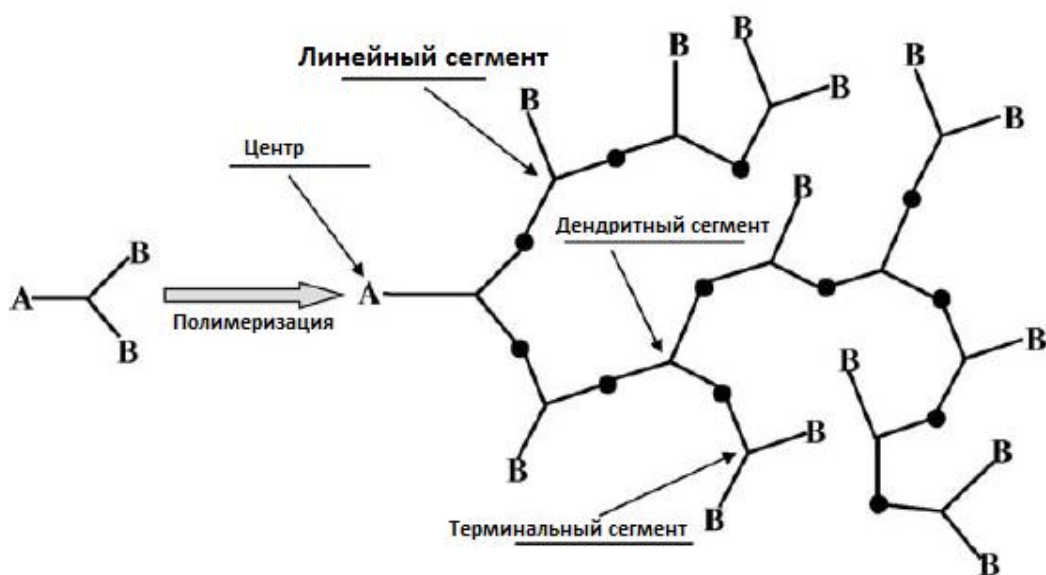


Рис. 21. Сверхразветвленный полимер с различными типами сегментов, полученный при полимеризации из AB_2 мономеров [48].

Выявление новых областей применений полимеров связаны с их свойствами и процессами, в которых они образуются. Поведение СРП при критических нагрузках может быть аналогично поведению ковких металлов [51], что обусловлено их глобулярной структурой. Однако водородные связи и возможность кристаллизации нескольких линейных фрагментов обеспечивают связывание между сверхразветвленными макромолекулами [51].

1.3.3. Дендритные полимеры как стационарные фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ)

Капиллярная электрохроматография может осуществляться с использованием полых, монолитных и набивных капиллярных колонок. Известно, что КЭ характеризуется высокой эффективностью при разделении ионогенных компонентов сложных матриц [52, 53].

Однако при использовании немодифицированного кварцевого капилляра возникают проблемы: плохая воспроизводимость электроосмотического потока и сорбция положительно заряженных аналитов на стенках капилляра. Предварительная силанизация поверхности капилляра позволяет с этими проблемами справиться. Усилия химиков-аналитиков направлены на поиск новых стационарных фаз для КЭХ [54]. Перспективными в этом направлении являются дендритные материалы [54]. Более 50% функциональных групп любой дендримерной структуры являются терминальными, что, в значительной степени, и определяет ее физико-химические свойства. Они могут реагировать как рецепторы по отношению к конкретным аналитам и, подобно мицеллам, инкапсулировать различные молекулы. Дендримеры имеют меньшие радиусы в растворе, чем изомерные линейные структуры [54]. Опубликованы обнадеживающие результаты по использованию полиамидаминного дендримера (*Pamat-SBD*) в качестве *псевдостационарной* фазы в мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии (МЭКХ) [55].

Описаны способы прививки монодендронов к поверхности кварцевого капилляра посредством Si-O-Si связи с использованием 3-(триэтоксисиллил)пропилизационата и 3-аминопропилтриэтоксисилана [55]. Образующееся покрытие стабильно в диапазоне pH подвижной фазы 4-8.

На Рисунке 22 представлены химические структуры, используемые при покрытии капилляра: G1, G2, C18, 4-пиридилкарбинол и бензол(G0)карбомат; в качестве нейтрального маркера взята тиомочевина. Для G1 и C18 покрытых колонок наблюдалось уменьшение электроосмотического потока; G1 стационарная фаза обеспечивала небольшой ЭОП (в отличие от фазы C18) в диапазоне pH от 4 – до 9,3.

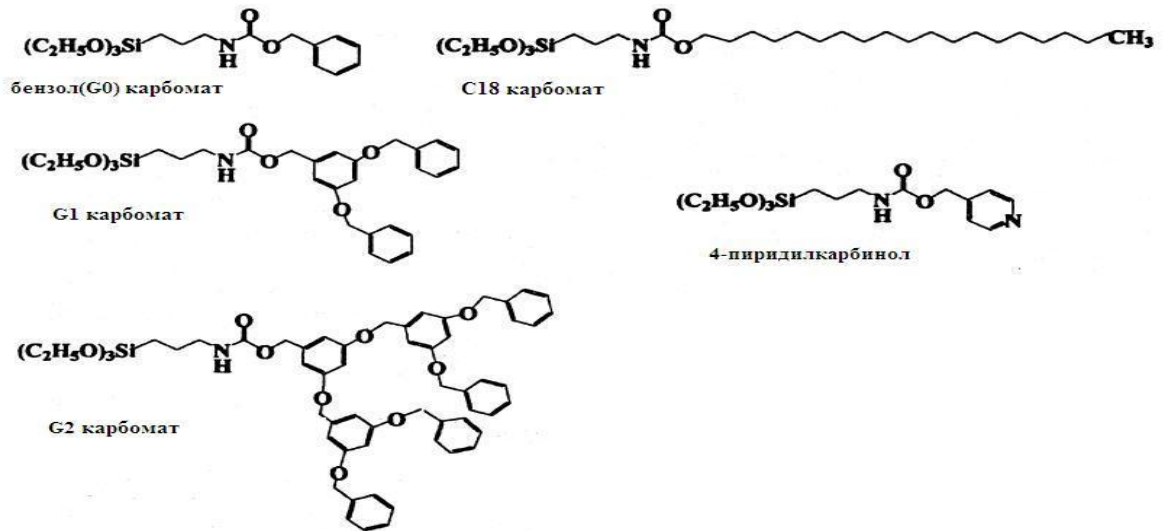


Рис. 22. Химическая структура материалов, используемых для покрытия кварцевых капилляров [54].

Зависимость ЭОП от pH для покрытий G1, C18 и непокрытого кремниевого капилляра представлена на Рисунке 23.

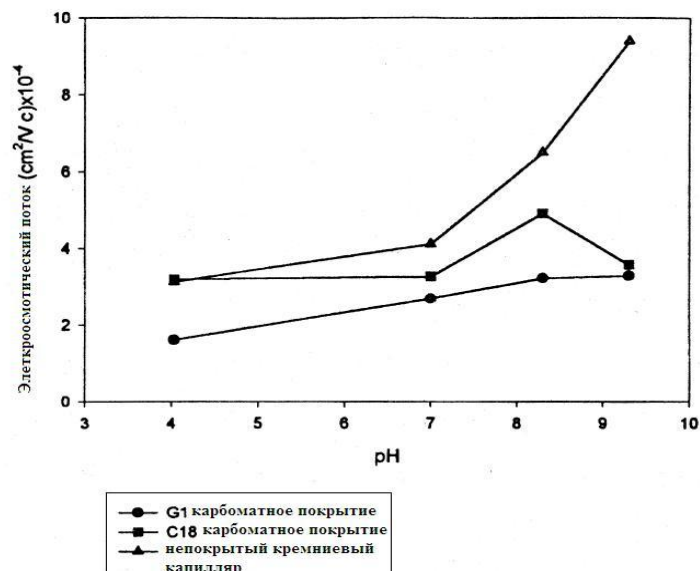


Рис. 23. Зависимость скорости ЭОП от pH раствора для покрытий G1, C18 и непокрытого капилляра [53].

Низкий ЭОП с G1 стационарной фазой в сравнении с C18 указывает и на низкую плотность заряда на внутренней поверхности кварцевого капилляра [54]. С уменьшением плотности заряда на стенках капилляра уменьшается и ЭОП. Работоспособность покрытых капилляров проверена при электрофоретическом разделении смесей аналитов различной природы. Колонки с покрытием обеспечили лучшие результаты по селективности разделения, чем непокрытые.

1.3.4. Использование покрытых капилляров при анализе смесей нейтральных аналитов

В 1992 г. Terabe и др. сообщили, что дендримеры PAMAM-SBD, в отличие от анионных ПАВ, характеризуются низкой селективностью разделения по отношению к алифатическим углеводородам, но проявляют высокое сродство к аренам [54, 55]. Установлен факт влияния температуры на разрешение и форму пика. Изучено разделение полиядерных ароматических соединений при различных температурах (30°C, 25°C, 20°C, 15°C). Заметное улучшение разрешения и формы пиков было достигнуто при 15°C (Рисунок 24).

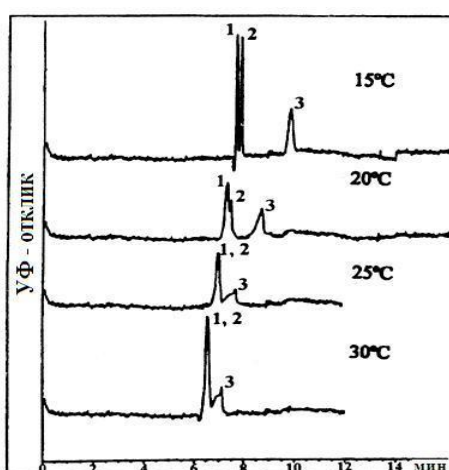


Рис. 24. Разделение толуола (1), нафталина (2) и фенантрена (3) при различных температурах на G1 покрытой колонке [54].

Таким образом, благодаря комплексу уникальных свойств дендритных полимеров, способностью этих материалов образовывать комплексы типа «гость-хозяин», наличием ионогенных групп в составе их молекул открываются перспективы применения этих полимеров в методах разделения при определении различных классов биологически-активных соединений. При этом актуальным остается вопрос поиска подобных материалов, способных выполнять роль стационарных и псевдостационарных фаз и модифицировать стенки кварцевого капилляра, тем самым позволяя регулировать селективность разделения и препятствовать сорбции аналитов на стенках кварцевого капилляра в процессе их электрофоретического разделения.

1.4. Физико-химические методы разделения белков

Основные физико-химические методы определения белков следующие: основанные на иммунном анализе; методы связывания с красителями; хроматографические и электрофоретические, включающие *on-* и *off-line-* концентрирование [56, 57].

В основе иммунологических методов (RIA, ELISA) лежит специфическая реакция *антиген-антитело* по принципу молекулярного распознавания [58, 59].

Так, для радиоизотопного иммунного анализа (РИА) белков имеет место следующая общая схема (Рисунок 25).

Не потерял востребованности и метод диагностических полосок. Их чаще всего изготавливают из волокнистого материала, на котором иммобилизованы специальные составы. Зоны индикации этих полосок после контакта с биологической жидкостью приобретают характерную окраску; интенсивность позволяет оценивать содержание тех или иных компонентов [60].

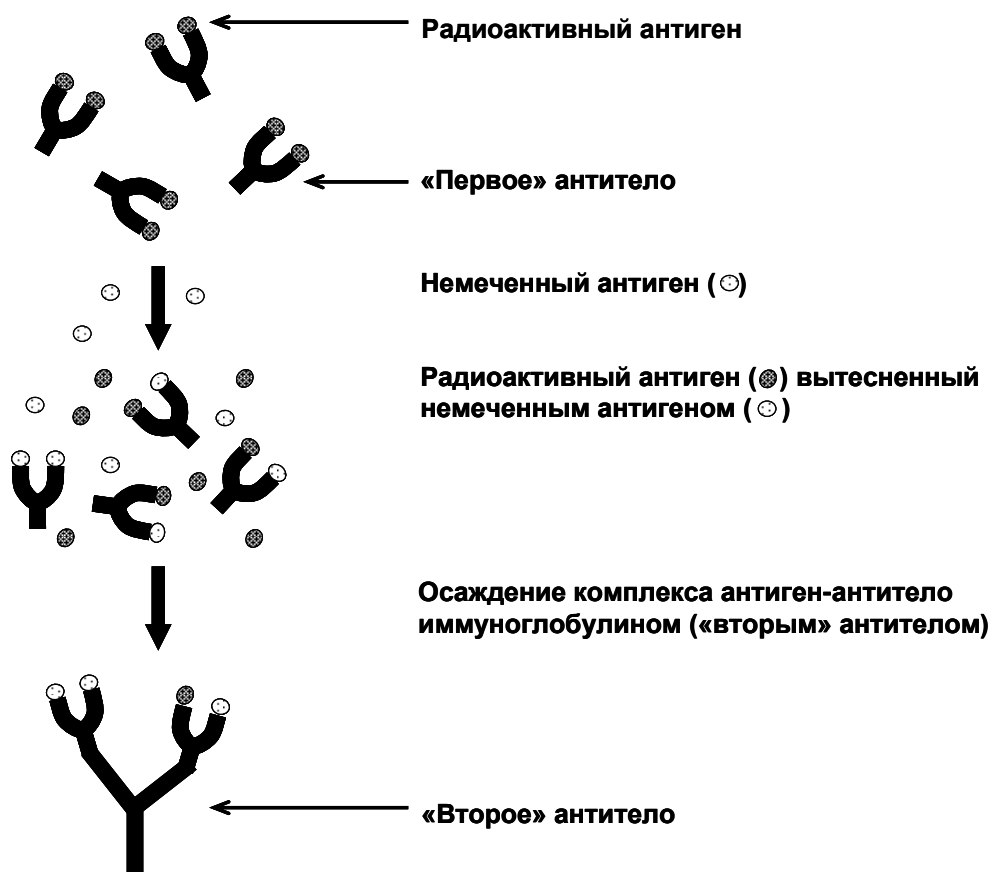
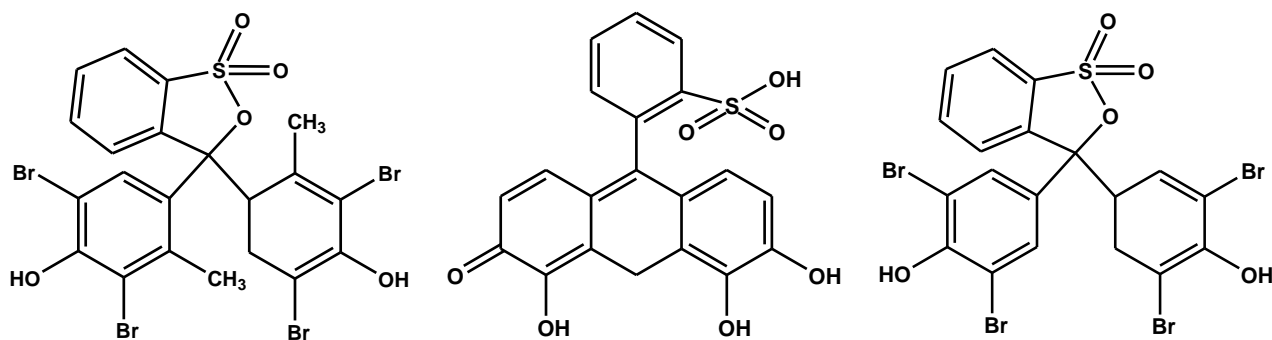


Рис. 25. Схема радиоизотопного иммунного анализа (РИА) [58].

Так, при скрининге для выявления микроальбуминурии допустимо использовать специальные тест-полоски, например, *Micro-Bumin test* (с пределом чувствительности > 40 мкг/мл). Подобные тест-методы не обладают специфичностью и фиксируют скорее общий белок, чем альбумин.

Стоит упомянуть и пирогаллоловый метод, широко применяемый для определения общего белка в моче и основанный на связывании анализата с красителем пирогаллоловым красным (Рисунок 26).



Бромкрезоловый зеленый

Пирогаллоловый красный

Бромфеноловый синий

Рис. 26. Красители обладающие сродством к альбумину: бромкрезоловый зеленый, пирогаллоловый красный, бромфеноловый синий.

Среди хроматографических методов перспективным для решения обсуждаемой задачи является метод капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), важнейшими преимуществами которого являются высокая эффективность, малый объем вводимой пробы, незначительное время анализа, легкость автоматизации и возможность сопряжения с другими спектральными методами (например, с электроспреей ионизацией) [61, 62].

Наиболее распространенными вариантами при определении белков являются ультрацентрифугирование [63], эксклюзионная и гидрофобная хроматография [64], обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) [67], ионообменная [63] и аффинная [65], а также двумерный гель-электрофорез [66]. Из-за высокой эффективности, позволяющей разделять более 1000 белков в одном образце, преимущественно используют последний. Разделение достигается за счет разницы в величинах изоэлектрических точек и размерах молекул белков. К ограничениям можно отнести высокую трудоемкость процесса и сложность разделения смесей, содержащих одновременно кислотные или основные белки, низкую воспроизводимость и чувствительность метода [68].

Одним из вариантов двумерного гель-электрофореза является предварительное разделение смеси методами хроматографии. Так, в [69] предлагается использовать аффинную хроматографию для удаления из сыворотки крови альбумина и иммуноглобулина, содержащихся в значительных количествах. Альтернативой гель-электрофорезу являются методы капиллярного электрофореза: мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ), капиллярный гель-электрофорез (КГЭ), капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и капиллярная электрохроматография (КЭХ) [70,71].

Разделение в МЭКХ основано на распределении аналитов между буферным раствором и мицеллами (*псевдостационарной фазой*) посредством гидрофобных взаимодействий, ионных и водородных связей [72].

В методе КГЭ разделение проводится в заполненном гелем капилляре по механизму эксклюзионной хроматографии. Его применяют для разделения соединений с очень близким соотношением заряд/размер молекулы.

1.4. Метод эллипсометрии для контроля сорбции белков

Известно, что многие белковые молекулы являются маркерами различных заболеваний. Для успешной диагностики требуется их количественное определение. Необратимая адсорбция белков на стенках кварцевого капилляра в процессе электрофоретического разделения аналитов может исказить результаты анализа. Метод эллипсометрии неоднократно и успешно использовался для изучения адсорбции различных веществ из газовой и из жидкой фаз.

Эллипсометрия – неdestructивный оптический метод, применяемый для характеристики поверхностей и тонких пленок, т. е. для определения таких параметров, как показатель преломления, коэффициент экстинкции, толщина пленок. Одно из главных его достоинств - высокая чувствительность, позволяющая измерять толщину пленок на уровне нескольких нм [73]. Эллипсометрия является удобным и перспективным методом в области

биоаналитики, например, при изучении процессов адсорбции белков, выявлении специфических взаимодействий и др.

Основы метода подробно изложены в [73, 74]. Принципиальная схема эллипсометра представлена на Рисунок 27. Пучок света, испускаемый источником, проходит через поляризатор и компенсатор; попадает на образец, далее проходит через анализатор и, в итоге, достигает детектора, который измеряет интенсивность света [74].

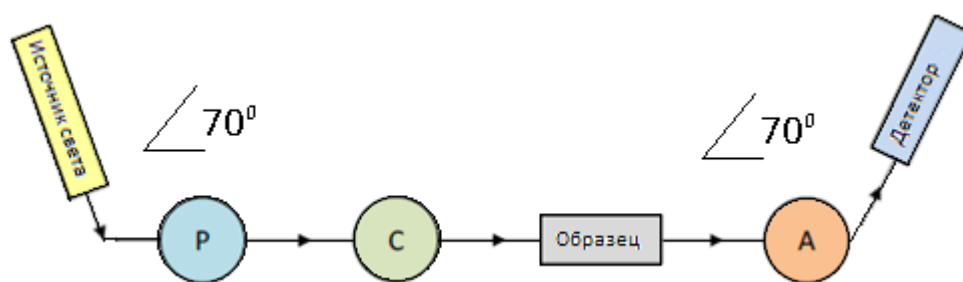


Рис. 27. Принципиальная схема эллипсометра, где P-поляризатор, C-компенсатор, A-анализатор [74].

Падающий на поверхность пучок света может отражаться и преломляться. Угол отражения ϕ_r равен углу падения (Рисунок 28). Угол преломления ϕ_t зависит от показателя преломления (n) вещества в соответствии с законом Снелла (15):

$$\frac{\sin \phi_i}{\sin \phi_t} = \frac{n_1}{n_0}, \quad (15)$$

Световая волна изменяется после прохождения слоя вещества из-за изменения показателей преломления (16):

$$v = \frac{c}{n}, \quad (16),$$

где c – скорость света в вакууме (м/с) и v – скорость света в среде с показателем преломления n (м/с).

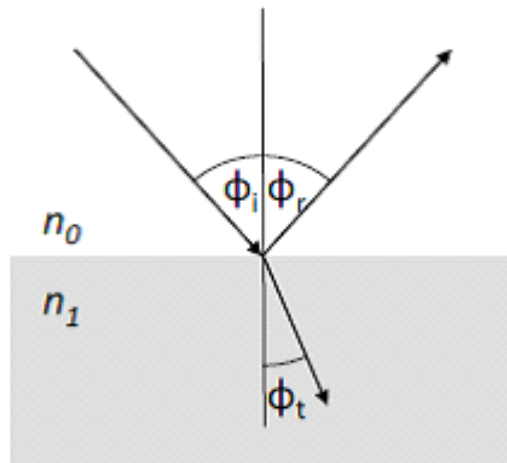


Рис. 28. Схема взаимодействия луча с веществом.

n_0 – показатель преломления окружающей среды;

n_1 – показатель преломления вещества;

ϕ_i – угол падения, ϕ_r – угол отражения;

ϕ_t – угол преломления.

В основе метода эллипсометрии лежит изменение состояния поляризации световой волны при её отражении от поверхности. Экспериментально измеряемые эллипсометрические параметры Ψ и Δ описывают амплитудные и фазовые изменения волны. Эти параметры связаны с комплексными коэффициентами отражения для волн, поляризованных в плоскости падения (R_p) и перпендикулярно ей (R_s) следующим соотношением (17):

$$\operatorname{tg} \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s}, \quad (17)$$

Коэффициенты отражения (R_p , R_s) зависят от показателя преломления внешней среды (n_0), оптических постоянных i -х слоёв исследуемой структуры (показатель преломления (n_i), коэффициент экстинкции (k_i), толщин (d_i)), подложки (n_i , k_i), а также угла падения (φ) и длины волны (λ) света (17).

После отражения и преломления луч света меняет форму поляризации. Этот эффект регистрируется методом эллипсометрии: контролируется изменение состояния поляризации света, отраженного от поверхности. В связи с изменением амплитуды и фазы после взаимодействия с поверхностью падающий линейно-поляризованный свет становится *эллиптически поляризованным*, отсюда и название метода (Рисунок 29).

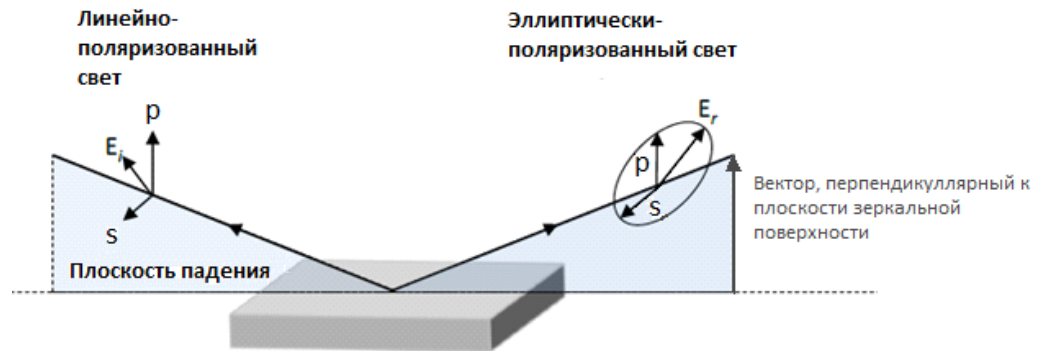


Рис. 29. Взаимодействие пучка света с поверхностью в эллипсометрии. Символы E_i и E_r указывают плоскости, в которых линейно поляризованный свет колеблется перпендикулярно (p) и параллельно (s) к плоскости падения [75].

В методе эллипсометрии измеряется изменение в состоянии поляризации падающего (i) и отраженного (r) света посредством определения значения параметра $\tan \psi$ – отношения амплитуд световой волны до и после отражения в соответствии с уравнением (18); Δ – относительная разность фаз колебаний этой волны (19):

$$\tan \psi = \frac{E_p^r / E_p^i}{E_s^r / E_s^i} \quad (18)$$

$$\Delta = (\delta_p^r - \delta_s^r) - (\delta_p^i - \delta_s^i) \quad (19)$$

где E – амплитуда световой волны; δ – фаза колебаний волны.

Таким образом, в основе метода эллипсометрии лежит измерение значений эллипсометрических углов (Ψ и Δ).

В случае многослойной структуры пучок света отражается и преломляется от каждого слоя, поэтому световая волна на выходе является суперпозицией волн (Рисунок 30).

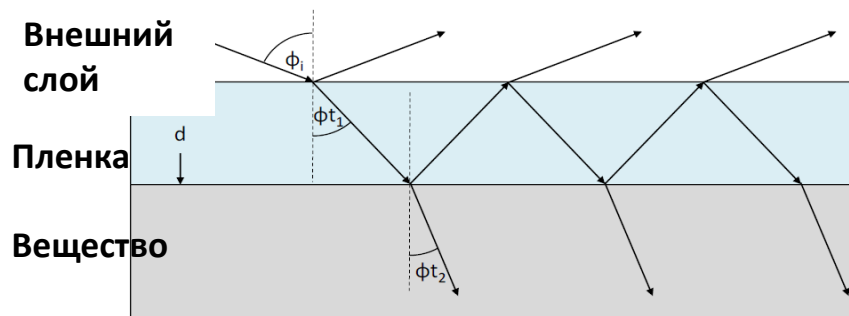


Рис. 30. Множественное отражение и преломление в материале. ϕ_i - угол падения, ϕ_t -угол пропускания, d -толщина.

Комплéксный показатель преломления (N) состоит из вещественной (показатель преломления, n) и мнимой частей (коэффициент экстинкции, k) и зависит от длины волны (20):

$$N(\lambda) = n(\lambda) + ik(\lambda) \quad (20)$$

Коэффициент экстинкции (k) относится к веществам, поглощающим свет при прохождении луча через вещество. Для непоглощающих соединений показатель преломления не является комплéксным. Толщина измеряемой пленки (d) и оптические константы (показатель преломления и коэффициент экстинкции) оцениваются путем сравнения измеренных величин Ψ и Δ с такими же величинами, заданными для модели оптического слоя.

Логика такого подхода представлена на Рисунок 31.

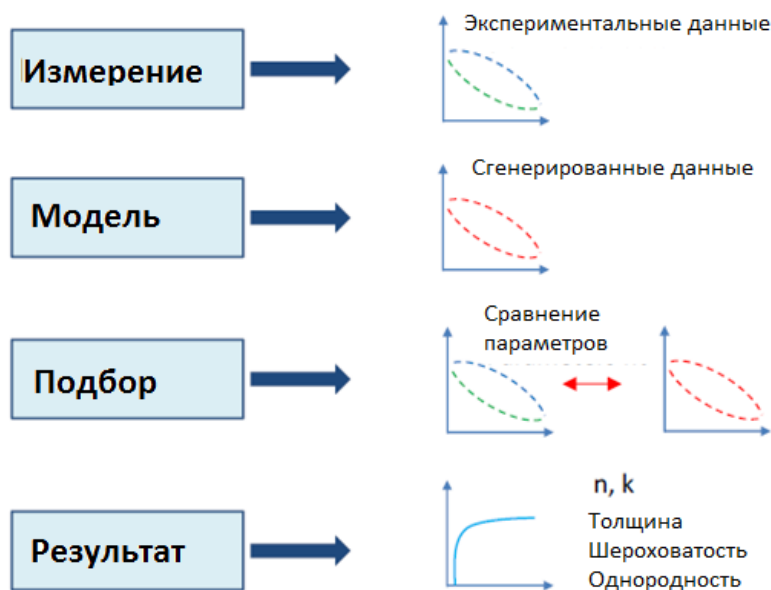


Рис. 31. Основные этапы анализа методом эллипсометрии [74].

Задаются значения параметров d и n , если $k=0$ (т. е. для пленок, не поглощающих свет), чтобы использовать их для дальнейших вычислений. С учетом введенных данных измеряются значения параметров Ψ и Δ и сравниваются с заданными для модели. Подбор продолжается до тех пор, пока не будут найдены значения, максимально удовлетворяющие экспериментальным данным. Наименьшее значение функции ошибки соответствует наиболее вероятным значениям искомых параметров оптической модели для всех m точек спектра (21):

$$\sigma^2 = \frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^m [(\Delta_{\text{эксп.}} - \Delta_{\text{мод.}})^2 + (\Psi_{\text{эксп.}} - \Psi_{\text{мод.}})^2] \quad (21)$$

В случае тонких слоев ($d < 10-20$ нм) нецелесообразно определять одновременно толщину и показатель преломления пленки из-за имеющейся корреляции между ними. Поэтому рекомендовано использовать известные (справочные) постоянные показателя преломления и измерять только значение толщины пленки [73, 74].

Все вышесказанное свидетельствует о простоте и надежности метода эллипсометрии как инструмента контроля сорбции белков на поверхности сверхразветвленных полимеров.

1.5. Методы *on-line* концентрирования в капиллярной электрохроматографии

Разработка и использование методов *on-line* концентрирования для анализа следовых количеств веществ существенно расширяет аналитические возможности метода капиллярного электрофореза, позволяя получать сопоставимые с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) отношения сигнал/шум. Одни из них основаны на изменении электрофоретических подвижностей аналитов за счет варьирования концентрации и pH буферного электролита или же введения в состав последнего комплексообразующих добавок; другие - на использовании дополнительной (*псевдостационарной*) фазы, роль которой могут выполнить вещества, способные формировать мицеллы и микроэмульсии [76].

Из известных вариантов *on-line* концентрирования в капиллярном электрофорезе выделяют в качестве основных: стэкинг (*stacking*), изотахофорез (*transient isotachopheresis, t-ITP*), динамический pH-скачок (*dynamic pH junction*) и свипинг (*sweeping*). В основе каждого лежит определенный механизм концентрирования, обусловленный различием свойств раствора пробы и рабочего буфера [76].

Для количественной оценки степени концентрирования введен фактор эффективности концентрирования (*SEF-stacking efficiency factor*), рассчитываемый по отношению к высоте (SEF_{height}) или площади пиков (SEF_{Area}):

$$SEF_{height} = \frac{\text{высота пика, полученного при концентрировании}}{\text{высота пика, полученного при обычных условиях ввода пробы (2с)}} \cdot \Delta,$$

где Δ – коэффициент разбавления.

Одним из наиболее общих подходов электрофоретического внутрикапиллярного концентрирования является *стэкинг*.

1.5.1. Стэкинг

Различают несколько вариантов стэкинга [76].

Стэкинг с усилением поля (FASS – field-amplified sample stacking)

Он активно используется в КЗЭ при определении низких концентраций аналитов в клинических лабораториях и основан на различии в электропроводности матрицы образца и рабочего буфера. Анализируемая проба гидродинамически вводится в кварцевый капилляр из раствора меньшей электропроводности, чем электропроводность рабочего буфера. Ионы образца в растворе с более низкой проводимостью имеют повышенную электрофоретическую подвижность, чем в рабочем буфере. Когда приложено напряжение, в зоне пробы возникает сильное электрическое поле, и аналиты движутся с более высокой скоростью (Рисунок 32А). Достижение границы рабочего буфера вызывает замедление скорости аналитов, и они концентрируются в узкие зоны (Рисунок 32Б). Когда градиент проводимости исчезает, сконцентрированные зоны подвергаются обычному электрофоретическому разделению [77].

Такой вариант реализуется для катионов и анионов: первые - концентрируются в начале зоны пробы; анионы – в конце. Для концентрирования и последующего определения катионов используют *положительную* полярность электродов, а для анионов, наоборот, – *отрицательную*. Можно использовать и традиционный вариант (*положительная полярность*), но это требует подавления или обращения ЭОП, что достигается введением специальных добавок (диметилентриамин, тетрадецилтриметиламмоний бромид) в состав рабочего буфера или снижением его pH в случае быстро мигрирующих анионов [78].

Обязательное условие стэкинга с усилением поля заключается в том, что ионная сила раствора образца должна быть значительно ниже, чем рабочего электролита.

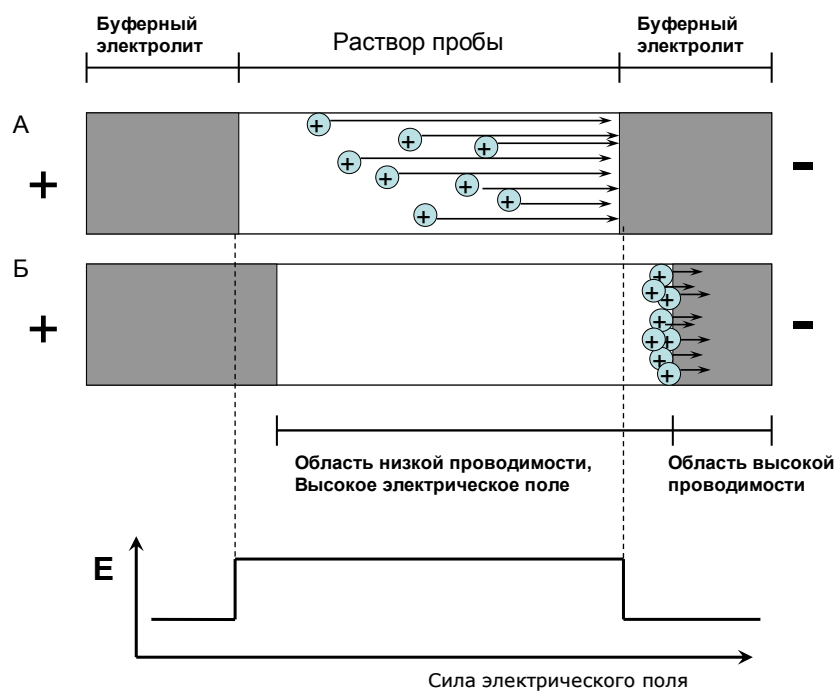


Рис. 32. Схема стэкинга образца с усилением поля в КЭ [77].

(А) Ввод пробы, растворенной в низкопроводящей матрице (разбавленном буфере или воде). При включении напряжения возникает высокое электрическое поле в зоне пробы относительно остальной части капилляра, катионы быстро мигрируют в этой области до границы низкого поля в зоне разделительного буфера;

(Б) катионы замедляются и концентрируются на границе между зоной пробы и буферным электролитом.

С применением стэкинга с усилением поля достигается не менее, чем 10-кратное (для гидродинамического ввода) и более, чем 1000-кратное концентрирование аналита (для электрокинетического ввода).

Эффективность концентрирования пропорциональна степени усиления поля (γ): чем больше разница концентраций между буферным электролитом и раствором пробы, тем уже зона сконцентрированной пробы (22):

$$L_{stack} = L_{inj} \frac{1}{\gamma} \quad (22)$$

где L_{inj} – первоначальная длина зоны пробы,

L_{stack} – длина зоны пробы после стэкинга,

γ – отношение силы электрических полей в растворе пробы (S) и буферном электролите (BGS) (уравнение (23)):

$$\gamma = E_S / E_{BGS} \quad (23)$$

Однако внутри капилляра из-за локальных изменений скорости ЭОП возникает ламинарный поток, снижающий эффективность концентрирования за счет размывания сконцентрированных зон (*дестэкинг*). Поэтому обычно в качестве растворителя пробы используется рабочий буфер, разбавленный ~ в 10 раз [79].

Стэкинг с усилением поля с водной пробкой (HC-FASS – head-column field-amplified sample stacking).

Суть этого варианта внутрикапиллярного концентрирования в следующем: непосредственно перед вводом пробы в капилляр вводится «водная пробка». На входном конце кварцевого капилляра формируется зона высокого поля, что позволяет ввести заряженные аналиты с высокой скоростью. При электрокинетическом вводе пробы аналиты концентрируются на границе между низкопроводящей зоной и рабочим буфером: катионы концентрируются без переключения полярности; для стэкинга анионов используют отрицательную полярность.

Локальная электрофоретическая скорость аналитов намного больше скорости ЭОП. По сравнению с классическим вариантом эффективность этого

способа не ограничена вводимым объемом пробы. Подобный прием используется при анализе ДНК, лекарственных препаратов в сыворотке крови. Достигаются факторы концентрирования > 1000 [80, 81].

Благодаря простоте реализации стэкинг с усилением поля легко сочетается с различными буферными системами и способами детектирования.

Стэкинг с большим объемом вводимого образца (LVSS – large volume sample stacking)

Характерные особенности этого варианта: направление движения всей массы раствора противоположно электрофоретическому движению ионов аналитов; скорость движения рабочего буфера меньше скорости электрофоретической миграции ионов аналита.

При стэкинге с большим объемом образца с переключением полярности гидродинамически вводится объем образца почти до детектора, растворенный в буфере низкой проводимости (Рисунок 33 А). Переключение полярности на короткое время после ввода образца приводит к частичному удалению матрицы из кварцевого капилляра возникающим ЭОП. Анионы концентрируются в конце зоны пробы на границе с рабочим буфером. Когда растворитель пробы почти полностью удален из капилляра (что фиксируется по изменению силы тока в капилляре: достижение 85 - 99% от максимального значения), полярность снова переключают (Рисунок 33 Б)[81].

Полярность электродов в процессе стэкинга выбирают на основании знака заряда определяемых компонентов: для концентрирования анионов – отрицательную, для катионов – положительную и обращение направления ЭОП.

$$SEF_{height} = 1000.$$

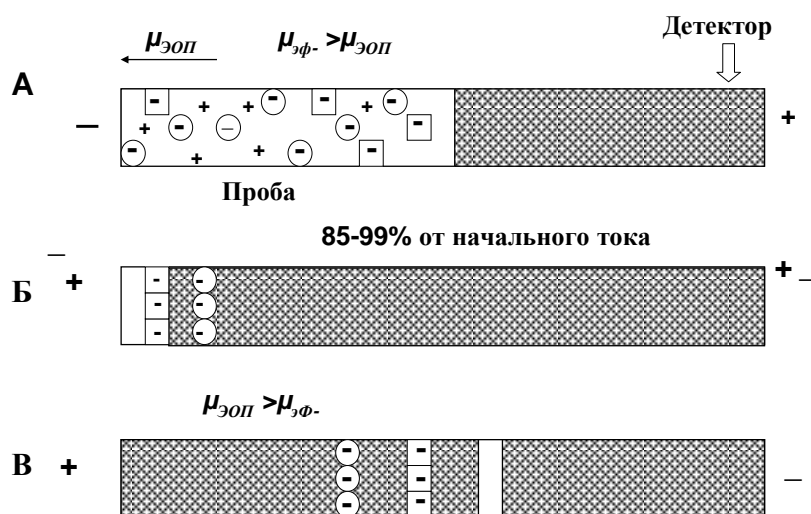


Рис. 33. Схема стэкинга с большим объемом пробы с переключением полярности. □ – область буферного электролита, ▨ – раствор пробы [81].

Рассматривается и другая схема стэкинга с большим объемом образца без переключения полярности. В этом случае за счет варьирования величины и/или направления ЭОП проводят *стэкинг без переключения полярности*.

Пробу растворяют в матрице меньшей электропроводности, чем проводимость буферного раствора и гидродинамически вводят большой объем на катодном конце. Особое условие - использование буферного электролита с низким значением рН либо модификатора ЭОП для его подавления. Анализ проводят при обращенной полярности. При низких значениях рН электрофоретическая подвижность ионов превышает скорость ЭОП, и аналиты мигрируют в направлении детектора, концентрируясь на границе раздела с буферным электролитом. В зоне пробы возникает локальный ЭОП, вытесняющий раствор пробы из капилляра в направлении катода.

Стэкинг с большим объемом образца без переключения полярности используют, когда миграция ионов пробы противоположна ЭОП или превышает его скорость [82].

Модификацией описанного варианта является т.н. *двойной стэкинг*, позволяющий увеличить чувствительность определения аналитов в 400 раз: одновременное применение напряжения и обратного давления.

Электростэкинг

Концентрирование пробы в процессе электрокинетического ввода пробы – *электростэкинг (field amplified sample injection, FASI)* – впервые осуществлено в 1991 г. Большой объем пробы, растворенной в низкопроводящей матрице, вводят в капилляр электрокинетически и количество аналита (N_i), введенное в капилляр, оценивают по уравнению (24):

$$N_i(t_{inj}) = AC_i(\mu_{ЭОП} + \gamma\mu_{epi})E_0t_{inj} \quad (24)$$

где A – площадь сечения капилляра (πr^2),

C_i (мг/мл) – концентрация аналита в пробе,

t_{inj} (с) – время ввода пробы,

μ_{epi} (см²/В*с) – электрофоретическая подвижность иона аналита,

$\mu_{ЭОП}$ (см²/В*с) – подвижность ЭОП.

E_0 (мА) – сила электрического поля в системе КЭ.

Скорость ЭОП должна быть намного меньше электрофоретической скорости аналитов.

С использованием электростэкинга эффективно концентрируют только катионные или анионные аналиты, и при этом в большей степени – ионы с высокой электрофоретической подвижностью.

Основной недостаток электростэкинга - ограниченный объем вводимой пробы. Подавление ЭОП или приложение обратного давления позволяет увеличить степень концентрирования до 800 [76].

Стэкинг с изменением pH (pH -mediated stacking)

Для анализа биологических жидкостей с высокой концентрацией солей предложен вариант стэкинга (pH -mediated stacking), при котором локальное изменение значений pH внутри капилляра приводит к формированию области с низкой проводимостью внутри зоны пробы. Подобный вариант используется для анализа биологических жидкостей и физиологических растворов. Введение кислоты или основания приводит к pH титрованию зоны пробы внутри капилляра: образуется область с высоким электрическим полем внутри зоны пробы (Рисунок 34). Под действием этого поля ионы аналитов ускоряются и концентрируются на границе титрования [83].

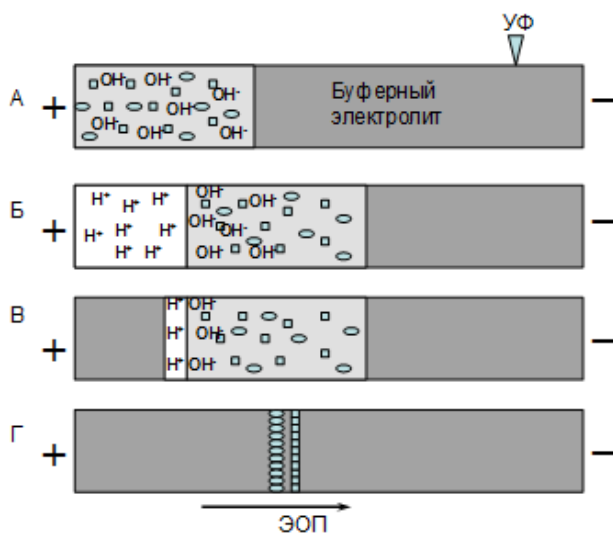


Рис. 34. Схема механизма стэкинга с локальным изменением pH внутри капилляра с использованием кислоты. (А) Электрокинетический ввод пробы в капилляр;

(Б) электрокинетический ввод сильной кислоты;

(В) сильная кислота титрует зону пробы до нейтральной, и проводимость в растворе пробы снижается;

(Г) аналиты концентрируются в узкие зоны на границе титрования и разделяются в условиях КЗЭ [83].

Описанные варианты можно реализовать только для ионных компонентов пробы. Степень концентрирования находится в пределах $10 < SEF_{\text{высота}} < 1000$.

1.5.2. Стэкинг нейтральных соединений в мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ)

Стэкинг нейтральных аналитов в МЭКХ предложен в 1994 г. японским химиком Терабе. Аналиты растворяются в мицеллярном растворе при концентрации, большей критической концентрации мицеллообразования (ККМ), но меньшей, чем концентрация ПАВ в разделительном буфере. За счет усиления поля в зоне пробы образующиеся заряженные комплексы «аналит-мицеллы» имеют большую электрофоретическую подвижность в зоне образца по сравнению с зоной рабочего электролита [81].

Образец растворяют в низкопроводящей матрице. На короткое время после ввода образца переключается полярность с последующим возвращением в нормальный режим (*reversed electrode polarity stacking mode (REPSM)*). За счет инверсии полярности матрица удаляется, образующиеся комплексы мицелл с аналитами концентрируются в пограничном слое между раствором пробы и буфером. Полярность вновь переключают, когда сила тока достигает 90% от его максимального значения.

Позднее был предложен и другой вариант концентрирования: проба вводится из водного раствора; мицеллы из рабочего буфера проникают в зону образца и ускоряются в сильном поле матрицы образца. Аналиты концентрируются мицеллами на входе капилляра. Этот вариант предпочтителен для соединений с большими значениями факторов емкости [84, 85].

1.5.3. Применение методов стэкинга для анализа

Описанные методы концентрирования нейтральных и ионных аналитов позволяют значительно снизить значения пределов обнаружения. Стэкинг

используют при анализе биологических образцов, объектов окружающей среды и пищевых продуктов. Некоторые примеры применения этих методов обсуждаются в [76].

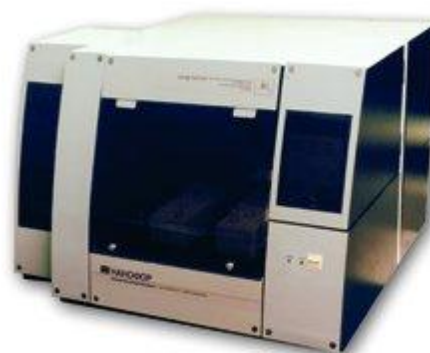
Таким образом, использование существующих, а также поиск новых вариантов on-line концентрирования позволяют добиваться снижения пределов обнаружения для анализа аналитов на уровне их содержания в реальных объектах.

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. 1. Оборудование

Система капиллярного электрофореза «Нанофор 01» (ИАНП РАН) со спектрофотометрическим детектором (214 нм).

Системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105/105М»



Газовый хроматограф «Кристаллюкс 2000М» «Jasco»

Жидкостный хроматограф Jasco.

Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп; спектральный диапазон детектирования 400-850 нм.

Весы аналитические;

pH-термомилливольтметр (ООО «НП ЦЭЗ») с комбинированным pH-электродом (ООО «Потенциал»).

Система обрезания капилляров Supelco 21386-U.

Пластиковые планшеты на 96 проб («Медполимер»).

Автоматические дозаторы «ВЮНИТ» (5-50 мкл, 50-200 мкл, 200-1000 мкл).

Пробирки для микропроб Эппендорфа полипропиленовые (1,5 см³).

Шприц медицинский одноразовый вместимостью 5 см³ с насадкой для подсоединения капилляров.

Капилляры кварцевые с внешним полиимидным покрытием (внешний диаметр – 360 мкм, внутренний – 50 мкм).

Кремниевые пластины (Institut für Halbleiter- und Mikrosystemtechnik TU Dresden (Germany)).

Спин-коутер („SPIN150-TT“, POLOS™).

Эллипсометр („alpha-SE® Ellipsometer“, J. A. Woollam Co., Inc.).

Рефрактометр(DSR-L, Schmidt + Haensch).

Магнитная мешалка с нагревательным элементом („RCT basic IKAMAG® safety control“).

Вакуумная печь („Heraeus VT6025 Vacutherm Oven“).

Нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,2мкм.

Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Мультихром для Windows, версия 1.5» (ООО «Амперсенд», г.Москва).

2.2. Реактивы

Гидроксид натрия (ч.д.а.) («Химреактив»); ацетонитрил (х.ч.) («Реахим»); соляная кислота (х.ч.) («Реахим»); диметилформаид (ч.) («Реахим»); диметилсульфоксид (ч.д.а.)(«Sigma»); (триметоксисилил)пропиловый эфир метакриловой кислоты (MTS)(«Aldrich»); 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) («Sigma»); ацетон («Реахим»); метанол («Реахим»); пропанол-1(ч.д.а) («Реахим»); циклогексанол (х.ч.) («Merck»); глицидилметакрилат (GMA) («Merck»);

метилметакрилат (МА) («Merck»); этиленгликольдиметакрилат (EGDMA) («Merck»); азо-*бис*-изобутиронитрил (AIBN) («Merck»); N-бутилэтиламин (х.ч.) («Merck»); уксусная кислота (х.ч.) («Реахим»); диметилформамид («Реахим»); лизоцим (куриный) (х.ч.) («Sigma-Aldrich»); миоглобин (человеческих скелетных мышц) (95-100%) («Sigma-Aldrich»); инсулин (свиной) («Sigma-Aldrich»); альбумин (человека) (96-99%) («Sigma-Aldrich»); сверхразветвленный полиэтиленимин PEI-25K (M_w 25000 г/мол, M_n 9600 Да г/мол, марка „LupasolWF”) был предоставлен компанией BASF. Деионизированная вода, спирт этиловый (99,5%, VWR prolabo); гидроксид аммония (30%-ый водный раствор, Acros organic); перекись водорода (30%-ый раствор, ч.д.а, Merck); борная кислота (х.ч.) («Реахим»); дигидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, 99%); фосфорная кислота (85%-ый раствор); лимонная кислота (Sigma-Aldrich, 99.5%).

2.3. Пробоподготовка биологических жидкостей к анализу

2.3.1. Фильтрация пробы

Пробу (сыворотка крови, моча) последовательно фильтровали через бумажный и стекловолоконный фильтр с размером пор 1-2 мкм, а затем мембранный (инертный к белкам) микрофильтр с размером пор 0,22 мкм. Далее пробу мочи подвергали обессоливанию и депигментацию.

2.3.2. Пробоподготовка мочи к анализу альбумина

Проводилось обессоливание и депигментация предварительно отфильтрованного образца с помощью самопроточной мини-колонки с гелем, типа SephadexG50, который имеет предел исключения по белкам $M=10000$. На Рисунке 35 проиллюстрирован процесс выделения белковой фракции.

В мини-колонку (с объемом слоя геля 7 мл) вносили 2,5 мл мочи, промывали водой, первые 2,5 мл элюата отбрасывали, а следующие 3,5 мл собирали. Собранный образец дегазировали под ультразвуком и подвергали электрофоретическому анализу. Весь процесс пробоподготовки занимал 10 мин,

причем несколько проб можно было обрабатывать одновременно на серии идентичных миниколонках (Рисунок 35).

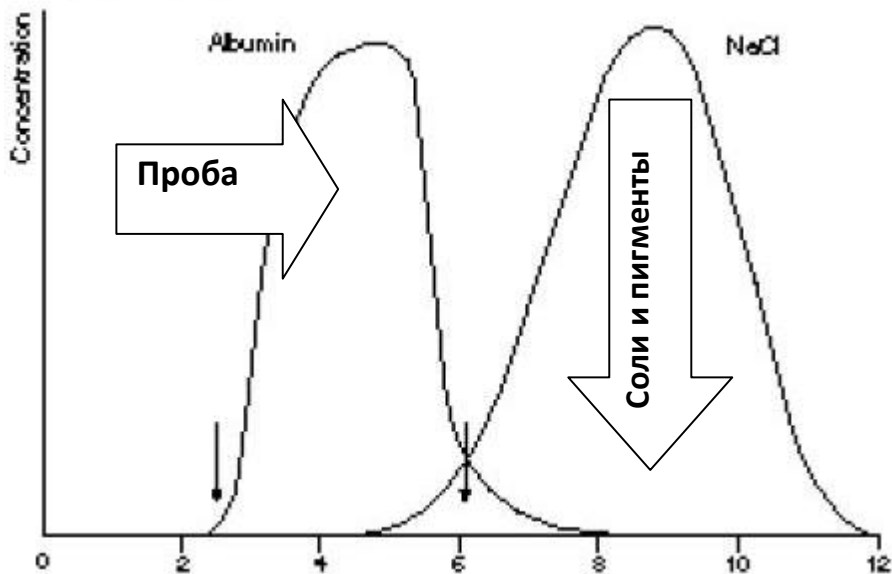


Рис. 35. Пробоподготовка мочи к анализу: быстрое обессоливание и депигментация. Самопроточный гель-фильтр с объемом слоя 7 мл; объем пробы 2,5 мл; слив 2,5 мл; сбор белковой фракции 3,5 мл.

Выход белка 95 % ; разбавление пробы : в 1.4 раза.

Концентрирование пробы, обеспечивающее необходимый уровень чувствительности УФ детектирования по альбумину, проводили на начальной стадии электрофоретического анализа. Для этой цели применялись различные варианты *on-line* концентрирования.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Капиллярная электрохроматография с использованием монолитных и *PLOT*-колонок

2.4.1. 1. Синтез полиметакрилатных капиллярных колонок

На первом этапе осуществляли *травление кварцевого капилляра* (промывка в течение 30 мин 1М раствором NaOH), герметизировали, помещали в термостат (120°C; 2 ч); далее последовательно промывали дистиллированной водой (15 мин) и 0,1М раствором HCl (15 мин); снова водой (15 мин) и ацетоном (15 мин); затем сушили в токе азота (2 атм в течении часа; 120 °C) [86].

После этого проводили *силанизацию кварцевого капилляра*. Для этого кварцевый капилляр промывали водным раствором, содержащим 20% (объемн.) триметоксисилилпропилового эфира метакриловой кислоты, 30% уксусной кислоты (1%-ный раствор); заклеивали концы герметиком; и оставляли на сутки при комнатной температуре; затем капилляр промывали ацетоном (15 мин) и продували током азота (30 мин).

Синтез монолитной капиллярной колонки

В эппендорф (1мл) помещали глицидилметакрилат (200 мкл), метилметакрилат (200 мкл) и этиленгликольдиметакрилат 400 мкл, инициатор - азо-*бис*-изобутиронитрил (0,006 г) и, наконец, смесь порогенных растворителей пропанол-1 (200 мкл) и формамид (1000 мкл).

Капилляр промывали полимеризационным раствором (30 мин), герметизировали и термостатировали (при 65°C в течение 3 ч и при 78°C в течение 16 ч); затем промывали ацетоном (150 мкл/мин; 200-300 атм в течение 30 мин); сушили в токе азота (2 атм; 2 ч).

PLOT-метакрилатная капиллярная колонка

В эппендорфы на 2 мл добавляли 40-80 мкл глицидилметакрилата, 40-80 мкл метилметакрилата и 80-160 мкл этиленгликольдиметакрилата, а затем растворяли 0,00096 г (0,3% от смеси мономеров) азо-*бис*-изобутиронитрила. Далее прибавляли смесь порогенных растворителей, состоящую из 280-293 мкл пропанола-1 и 1400-1467 мкл формамида.

Предварительно силанизированный кварцевый капилляр промывали полимеризационным раствором в течение 30 мин, герметизировали и помещали в термостат при 70°C на 3. Капилляры промывали ацетоном (скорость потока – 150 мкл/мин, давление – 200-300 атм) в течение 30 мин, сушили в токе азота (2 атм) в течение 2 ч.

Постфункционализацию метакрилатного полимера проводили следующим образом: промывали бутилэтиламином (30 мин при 150-200 атм), герметизировали и выдерживали в термостате (8 ч при 70°C); далее промывали ацетоном (30 мин), водой (150-200 атм) и заполняли фосфатным буферным раствором при тех же условиях.

Затем в подготовленном капилляре прожигали окно детектирования пропан-бутановым пламенем. Далее капилляр промывали фосфатным буферным раствором (1 ч) с использованием насоса (50мкл/мин; 150-200 атм) и затем в течение 3 ч - электрокинетически (15кВ).

2.4.1.2. Синтез PLOT-PEI-Mal капиллярной колонки

Травление кварцевого капилляра. Кварцевый капилляр промывали и заполняли 1М раствором NaOH. Заполненный капилляр герметизировали и нагревали в термостате при 100°C в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры капилляр промывали 0,1 М раствором HCl в течение 5 мин, деионизированной водой 10 мин и ацетоном 15 мин, сушили в термостате при 120°C в токе азота (2атм) в течение 1 ч.

Силанизация кварцевого капилляра. Протравленный капилляр промывали раствором, дегазированным в течение 15 мин в ультразвуковой бане, содержащим 30% (объемн.) (3-глицидоксипропил)триэтоксисилана и 0,01% (масс.) 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида в N,N-диметилформамиде (ДМФА). Заполненный капилляр герметизировали и нагревали в термостате при 120°C в течение 6 ч. Затем интенсивно промывали ДМФА, метанолом и высушивали в токе азота.

Функционализация силанизованного капилляра. Силанизованный капилляр заполняли дегазированным в ультразвуковой бане (10 мин) раствором PEI-Mal B – сверхразветвленного полиэтиленimina, функционализированного мальтозой, (0,015 г/мл в воде), герметизировали концы и оставляли на 48 ч при комнатной температуре, затем промывали водой.

2.4.1.3. Разделение белков методом капиллярной электрохроматографии (КЭХ)

Условия электрофоретического анализа

Ввод пробы: а) гидродинамический (0,05 атм) или элетрокинетический (1-1000 мбар·с); б) электрокинетический (10 кВ). В качестве маркера ЭОП использовали 6%-ый раствор диметилсульфоксида в соответствующем рабочем электролите. Рабочее напряжение в начале работы постепенно меняли с -7кВ до -20кВ; анод со стороны окна детектирования. Спектрофотометрическое детектирование осуществляли при $\lambda=214\text{нм}$. Электрокинетический ввод пробы, 10 кВ. Воздушное термостатирование колонки +20°C. Рабочий электролит – 10 – 55мМ фосфатный буферный раствор (4,872 г NaH_2PO_4 и 1,65 мл 85%-ной H_3PO_4 на 1 л дистиллированной воды).

В качестве маркера ЭОП использовали 0,2% (объемн.) раствор тиомочевины в соответствующем рабочем буферном растворе. Перед началом работы промывали монолитную колонку ацетонитрилом (30 мин) для удаления

пузырьков воздуха, между опытами, а после окончания работы – рабочим электролитом (30 мин).

Определение скорости электроосмотического потока (ЭОП)

Кварцевый капилляр в течение 300 с промывался рабочим электролитом, затем электрокинетически ($2\text{с} \times 10\text{ кВ}$) вводился 0,2 %-ый раствор ДМСО в буферном растворе. Монолитную колонку в течение 300 с промывали 27,5 мМ фосфатным буферным раствором, содержащим 50% ацетонитрила. Электрокинетически ($5\text{с} \times 10\text{ кВ}$) вводился раствор, содержащий миоглобин, лизоцим, инсулин и альбумин (концентрация каждого белка составляла 1 мг/мл) в 27,5 мМ фосфатном буферном растворе.

2.4.2. Синтез динамически модифицированной дендритной капиллярной колонки

Кварцевый капилляр последовательно промывали 1М раствором NaOH в течение 30 мин, затем дистиллированной водой 15 мин, 1М раствором соляной кислоты 30 мин и снова дистиллированной водой 15 мин. Протравленный капилляр заполняли дегазированным в ультразвуковой бане (10 мин) раствором PEI-Mal (0,015 г/мл в воде), герметизировали концы кварцевого капилляра и оставляли на 2 ч при комнатной температуре, затем промывали дистиллированной водой. Электрофоретический анализ проводили с использованием 75 мМ боратного буфера (pH 10,2) без введения сверхразветвленного полимера.

2.4.3. Мицеллярная электрокинетическая хроматография

Перед началом работы и по ее окончанию кварцевый капилляр промывали 0,1 М раствором HCl (5мин), дистиллированной водой (5 мин), 0,1М водным раствором NaOH (5 мин), снова водой и рабочим электролитом с добавкой полимера PEI-Mal (0,5÷8 мг) (5мин). Между опытами капилляр промывали дистиллированной водой в течение 5 мин.

2.4.4. Капиллярный электрофорез смеси стандартов белков

Перед началом работы и между опытами кварцевый капилляр промывали 0,1 М раствором HCl (10мин), дистиллированной водой 5 мин, водным раствором щелочи (0,1М NaOH) в течение 5 мин, снова водой и рабочим электролитом (5мин). По окончании работы капилляр промывали дистиллированной водой (5 мин).

Электрофоретическое разделение белков проводили на кварцевом капилляре с внешним защитным полиимидным покрытием (внутренний диаметр – 50 мкм, наружный диаметр – 360 мкм, общая длина – 45 см); рабочее напряжение 20 кВ, катод со стороны окна детектора. Спектрофотометрическое детектирование осуществляли при $\lambda=214$ нм. Ввод пробы – гидродинамический (давлением); 0,05 атм. Воздушное термостатирование капилляра проводилось при +20°C. В качестве маркера ЭОПа использовался 3%-ый раствор диметилсульфоксида в соответствующем рабочем электролите.

2.4.5. Эллипсометрический анализ

Получение тонкой полимерной пленки PEI-Mal A25

Кремниевую пластину помещали в раствор этанола в ультразвуковую ванну (2×10мин), промывали деионизированной водой. Затем проводили травление поверхности для обеспечения максимального количества гидроксильных групп. Далее кремниевую пластину помещали в смесь, содержащую водный раствор аммиака (конц.), 30%-ый раствор H₂O₂ и H₂O_{деиониз} в соотношении (1:1:1,объемн.) на 30 мин при 65°C, а затем пластину тщательно промывали деионизированной водой и высушивали в токе азота.

Далее готовили раствор полимера PEI-Mal A25: водный раствор полиэтиленимина (1.5%; масс.), модифицированного мальтозой с массой ядра 25кДа (PEI-Mal A25) и содержащий 25 мг лимонной кислоты на каждые 100 мг.

Раствор полимера PEI-Mal A25 фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,2мкм.

Получение тонкой полимерной пленки PEI-Mal A 25.

Раствор полимера PEI-Mal A25 наносился на кремниевую пластину с помощью спин-коутера при скорости вращения 3000 об/мин в течение 15 с. Пластина помещалась в вакуумную печь при 170 °С на 2 ч. Затем ее охлаждали на воздухе до комнатной температуры и промывали деионизированной водой в течение 2ч и высушивали в токе азота.

Условия эллипсометрического определения адсорбции белков

Определение толщины полимерной пленки PEI-Mal A25 (d) и показателя преломления (n) в сухом и набухшем состоянии осуществляли с помощью многоволнового эллипсометра в спектральном диапазоне 380-900 нм и углом падения 70°[69]. Все значения показателей преломления даны для $\lambda=632.8\text{нм}$.

Оптическая модель для оценки оптических параметров (эффективной толщины и показателя преломления) полимерной пленки и белкового слоя представлена на Рисунке 36.

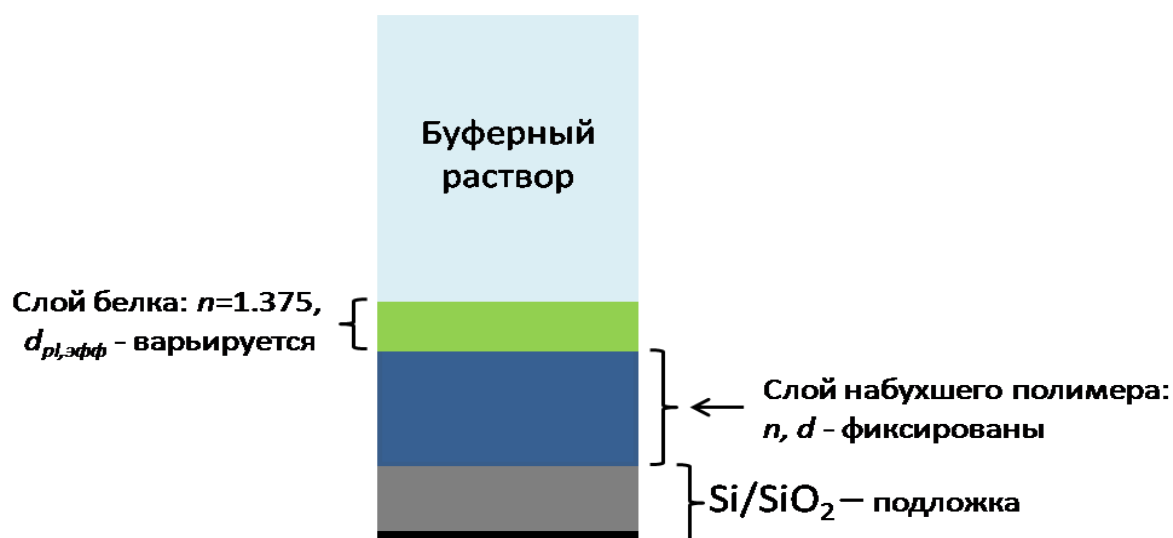


Рис. 36. Модель оптического слоя, использованная при получении эллипсометрических данных.

Масса адсорбированного белка (m , мг/м²) устанавливалась в соответствии с уравнением (25) [75]:

$$m = d_{pl,эфф} \frac{n_{pl} - n_{am}}{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{pl}} \quad (25)$$

где $d_{pl,эфф}$ – эффективная толщина слоя адсорбированного белка (нм); n_{pl} – показатель преломления слоя белка; n_{am} – показатель преломления внешней среды (буфер) и $(dn/dc)_{pl}$ – инкремент показателя преломления белков: 0,187 см³/г для альбумина; 0,188 см³/г для лизоцима; 0,185 см³/г для миоглобина и инсулина [87].

2.5. Приготовление рабочих растворов

2.5.1. Приготовление буферных растворов

Приготовление 1М фосфатного буферного раствора (pH=2,2)

В 40 мл дистиллированной воды растворяли 6,8 г дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 0,25 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты. Объем буфера доводили дистиллированной водой до 50 мл.

Молярность буфера по фосфат-ионам составила 1 М. Готовый буфер фильтровали через бумажный фильтр, дегазировали на ультразвуковой бане и помещали в чистую стеклянную емкость объемом 50 мл, которую герметически закрывали.

Подготовка боратного буферного раствора для КЭ и эллисометрии

В 800 мл дистиллированной воды растворяли 1,85 г борной кислоты, по откалиброванному рН-метру доводили рН до 10,5 добавлением 2М раствора NaOH. Затем объем буфера доводили дистиллированной водой до 1000 мл и достигали требуемого значения рН тем же раствором щелочи. Буфер имел молярность по борной кислоте 0,15 М. Готовый буфер фильтровали через

бумажный фильтр, помещали в чистую стеклянную емкость объемом 1000 мл, дегазировали на ультразвуковой бане и хранили в холодильнике при температуре +4°C. Буферные растворы меньшей молярности получали разбавлением исходного раствора.

Для приготовления раствора каждого из дендритных полимеров с концентрацией (0,5; 1; 2; 4; 8) мг/мл на микроаналитических весах брали точную навеску, помещали в сухие чистые эппендорфы и приливали 1 мл рабочего буферного электролита.

2.5.4. Приготовление стандартных растворов белков

Для приготовления стандартного раствора каждого из белков (*альбумин, лизоцим, миоглобин, инсулин*) с концентрацией 1 мг/мл на микроаналитических весах брали точную навеску (1 мг), помещали в сухие чистые эппендорфы и приливали 1 мл дистиллированной воды. Флаконы с полученными растворами снабжали этикетками с указанием концентрации и хранили в холодильнике до анализа при температуре -10°C. Рабочие растворы с меньшими концентрациями получали количественным разбавлением стандартного раствора с помощью автоматического дозатора.

2.6. Обработка полученных данных

2.6.1. Определение эффективности в капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ)

Эффективность капилляра и монолитной колонки определялась экспериментально из электрофореграмм по формуле (26):

$$N = 5,545 * (t_R/w_h)^2, \quad (26)$$

где N - эффективность хроматографической колонки, т.т./м;

t_R – время удерживания, с;

w_h – ширина пика на полувысоте, с.

2.6.2. Оценка пористости монолитного сорбента

Фотографии среза поверхности монолитного капилляра получали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (LeicaTCSSL) при $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм. Для каждой колонки получали как минимум 30 фотографий (приложение 1).

Обработка фотографий производилась в пакете прикладных программ для решения задач технических вычислений MATLAB 7.5 с использованием приложения Image Processing Toolbox.

Алгоритм вычисления пористости сорбента следующий:

1. Создание бинарного изображения.
2. Определение числа объектов.
3. Построение гистограммы распределения по площадям.

Скрипт для определения числа объектов и построения гистограммы приведен ниже:

```
clear, close all
```

```
I = imread('monolith.jpg');
```

```
BW = imextendedmin(I,20);
```

```
figure,imshow(BW)
```

```
[labeled,numObjects] = bwlabel(BW,4);
```

```
graindata = regionprops(labeled,'basic')
```

```
x = 0:2:70;
```

```
hist([graindata.Area],x)
```

```
axis([0 70 0 250]);
```

```
print -djpeg h-monolith.jpg
```

```
N=hist([graindata.Area],x);
```

```
xlswrite('1', N,'List1', 'B2')
```


2.6.3. Оценка воспроизводимости процедуры синтеза монолитных капиллярных колонок

Из графических зависимостей распределения пор по площади, полученных в п.2.6.2., высчитывали процентное содержание макро- и микропор в структуре монолита для каждой колонки. Затем рассчитывали среднеквадратичное отклонение содержания для макро- и микропор в колонках по уравнению (27, 28):

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n \cdot (n-1)}} \quad (27)$$

где \bar{x} – среднее значение содержания пор;

x_i – содержание пор в i -ой колонке;

n – количество монолитных колонок.

$$RSD(\%) = \frac{S_n}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (28)$$

ГЛАВА 3. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА МОНОЛИТНЫХ И PLOT-МЕТАКРИЛАТНЫХ КОЛОНКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ

Капиллярная электрохроматография (КЭХ) – активно развивающийся гибридный метод разделения. 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 (Рисунки 2, 4). В настоящее время этот метод активно востребован в протеомике при определении пептидов и белков.

Электрофоретические методы в последние годы привлекают все большее внимание химиков-аналитиков при решении различных медико-биологических задач благодаря их высокой эффективности, экспрессности, низкой стоимости и простоте оборудования.

При этом возникает ряд проблем, одна из которых - необратимая адсорбция белков и пептидов на внутренней поверхности кварцевого капилляра вследствие электростатического взаимодействия заряженных функциональных групп аналитов с заряженными группами сорбента. Все это приводит к невоспроизводимости параметров миграции и снижению чувствительности из-за нестабильности базовой линии.

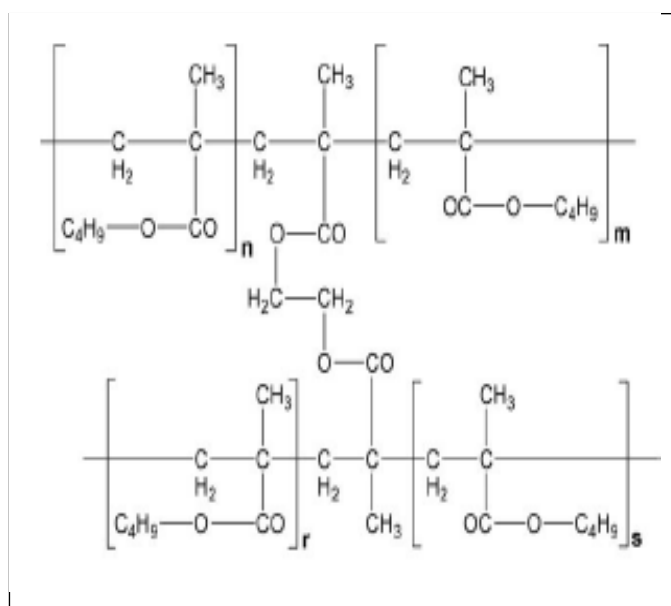
Возможными решениями являются:

- использование динамического или ковалентного покрытия в капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ);
- введение в состав буферного электролита *псевдостационарной* фазы – электрокинетическая хроматография (ЭКХ);

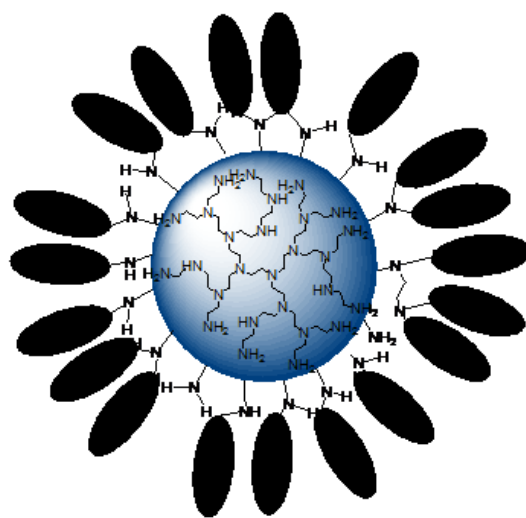
- создание тонкого пористого слоя полимера на внутренней поверхности кварцевого капилляра – создание т.н. *PLOT*-колонок в КЭХ;
- заполнение капилляра пористым монолитным сорбентом (КЭХ).

Все эти варианты реализованы в данной работе.

Перспективными материалами в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в условиях капиллярной электрохроматографии являются метакрилатные и дендритные полимеры типа «ядро-оболочка» (Рисунок 37). Первые уже зарекомендовали себя при определении пептидов и белков [88]. Наличие у последних большого числа терминальных функциональных групп позволяет регулировать их растворимость и термическую стабильность, а мицеллоподобная структура с низкой вязкостью мицеллярных растворов – формировать *псевдостационарные* фазы.



Полиметакрилатные



Сверхразветвленные полимеры
типа «ядро-оболочка»

Рис. 37. Перспективные материалы в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в условиях ЭКХ и КЭХ.

Решение другой проблемы электрофоретического определения белков – высокие пределы обнаружения – мы видим в поиске соответствующего способа *on-line* концентрирования.

Таким образом, цель работы: оценить аналитические возможности дендритных полимеров типа «ядро-оболочка» на основе полиэтиленimina с мальтозной оболочкой в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в капиллярном электрофорезе и предложить варианты внутрикапиллярного концентрирования для определения белков в биологических жидкостях.

В качестве тестовой смеси выбраны белки: миоглобин, инсулин, лизоцим и альбумин – диагностические маркеры многих заболеваний, различающиеся изоэлектрическими точками и молекулярными массами, что принципиально при выявлении работоспособности подготовленных колонок для КЭХ и ЭКХ (таблица 1).

Таблица 1. Исследуемые белки

Белок	Изоэлектрическая точка, <i>pI</i>	<i>Mr</i>, Г/МОЛЬ	Тип заболевания
Миоглобин	7.0	17800	Инфаркт миокарда Травмы ожоги Судороги
Инсулин	5.5	5808	Сахарный диабет
Лизоцим	11.0	14300	Диагностика внутрибрюшных абсцессов Оценка степени риска развития гнойной инфекции.
Альбумин	4.7	66241	Микроальбуминурия

3.1. Синтез полиметакрилатного полимера *in situ*

Нами синтезированы полиметакрилатные монолитные и PLOT-колонки на основе глицидилметакрилата, метилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата.

3.1.1. Капиллярные полиметакрилатные монолитные колонки

Получение полиметакрилатного полимера *in situ* включало травление и силанизацию поверхности кварцевого капилляра (Рисунок 38); полимеризацию в присутствии порогенов (Рисунок 39) и последующую постфункционализацию полимерной поверхности (Рисунок 41).

Силанизация обеспечивала большую смачиваемость поверхности гидрофобным раствором мономеров (Рисунок 38).

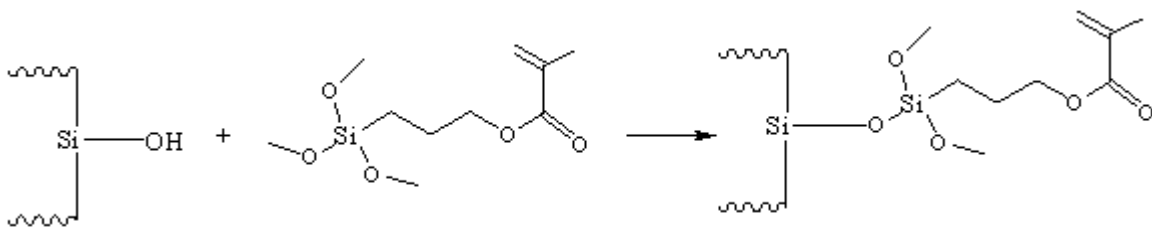


Рис. 38. Схема проводимой силанизации триметоксисилпропиловым эфиром метакриловой кислоты.

Реакционная смесь содержала глицидилметакрилат и метилметакрилат - мономеры, и этиленгликольдиметакрилат в качестве сшивающего агента.

Смесь метакрилатов растворяли в системе 10% пропанола-1 и 50% формамида для обеспечения оптимальной пористости колонки (Рисунок 39).

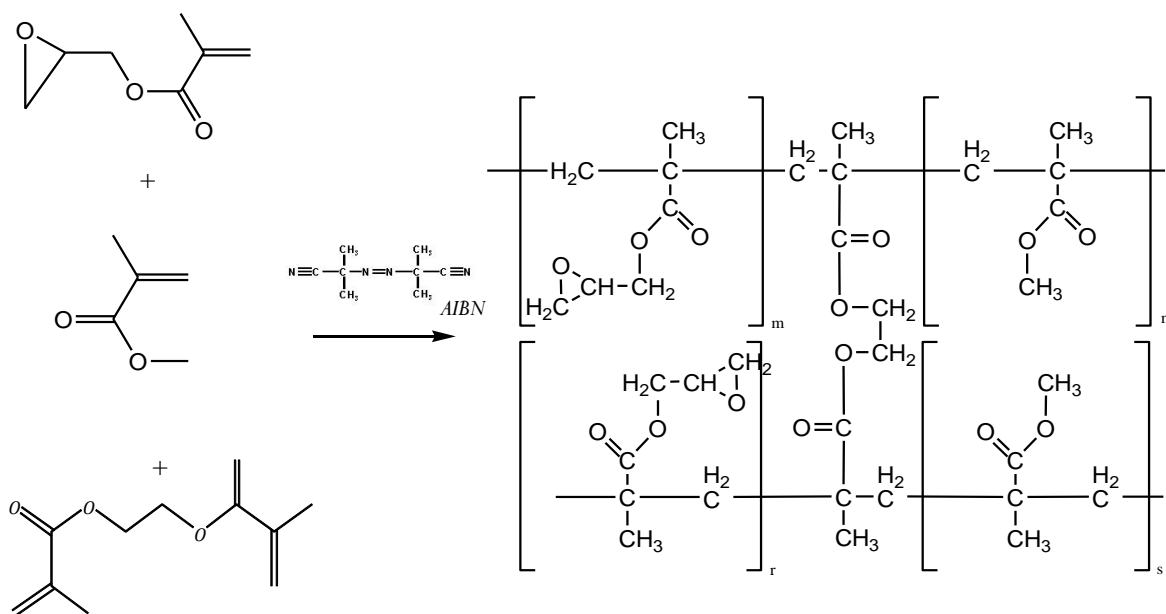


Рис. 39. Схема получения полиметакрилатного монолита

Пористость полученного полимера контролировали методом сканирующей лазерной микроскопии. Фотографии срезов монолитных колонок (приложение 1) обрабатывали в программе MathLab.

На Рисунке 40 приведен график типичного распределения пор по площади. По результатам оценки пористости в подготовленных колонках содержится $87,0 \pm 5,7\%$ макро- и $13 \pm 4,7\%$ микро-пор.

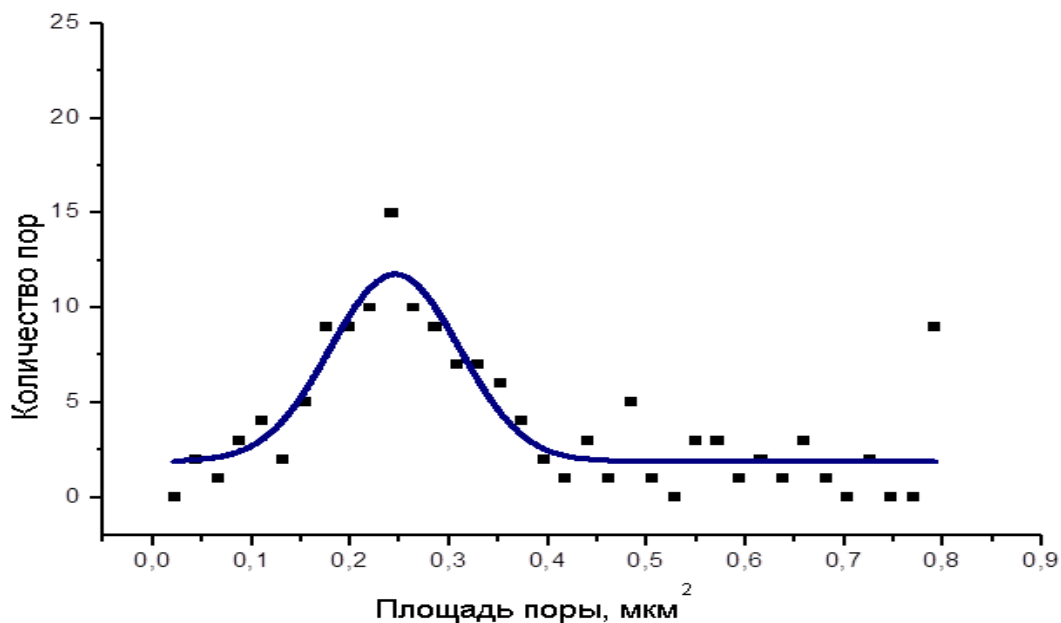


Рис. 40. Распределение пор по площади в структуре монолита.

Для формирования электроосмотического потока (ЭОП) проводили реакцию постфункционализации с N-бутилэтиламином (Рисунок 41).

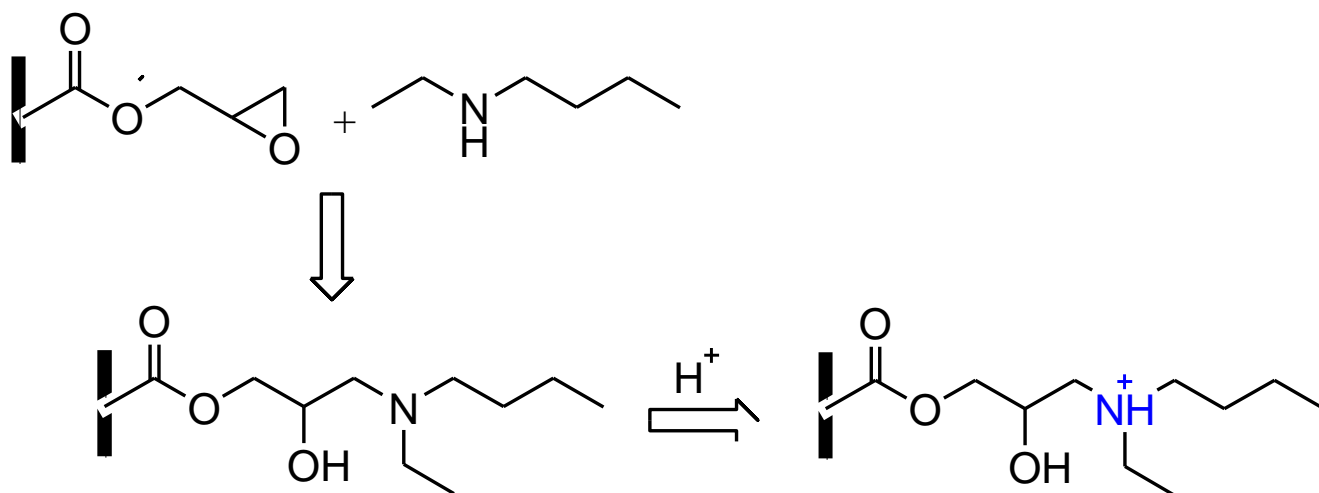


Рис. 41. Схема постфункционализации монолита с N-бутилэтиламином.

3.1.2. Капиллярные PLOT-метакрилатные колонки

Следуя логике предыдущих экспериментов, были синтезированы также и *PLOT*-метакрилатные колонки. Процедура их синтеза аналогична получению монолитных полиметакрилатных и отличается лишь меньшим количеством мономеров в полимеризационной смеси и условиями синтеза.

Варьировали время полимеризации (1-4 ч) и соотношение между смесью мономеров и порогенным растворителем, природу порогенного растворителя (октанол-1, пропанол-1, формамид).

Оценку образования тонкого пористого слоя полимера проводили по фотографиям среза поверхности кварцевого капилляра, которые получали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (LeicaTCSSL) при $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм (Рисунки 42, 43).

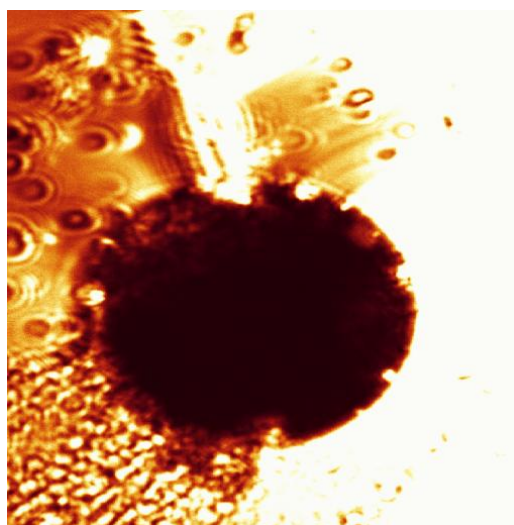


Рис. 42. Фотография среза поверхности PLOT-колонки, полученная на лазерном микроскопе LeicaTCSSL; $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм. Условия полимеризации: 70°C 3ч, порогенный растворитель – октанол-1.

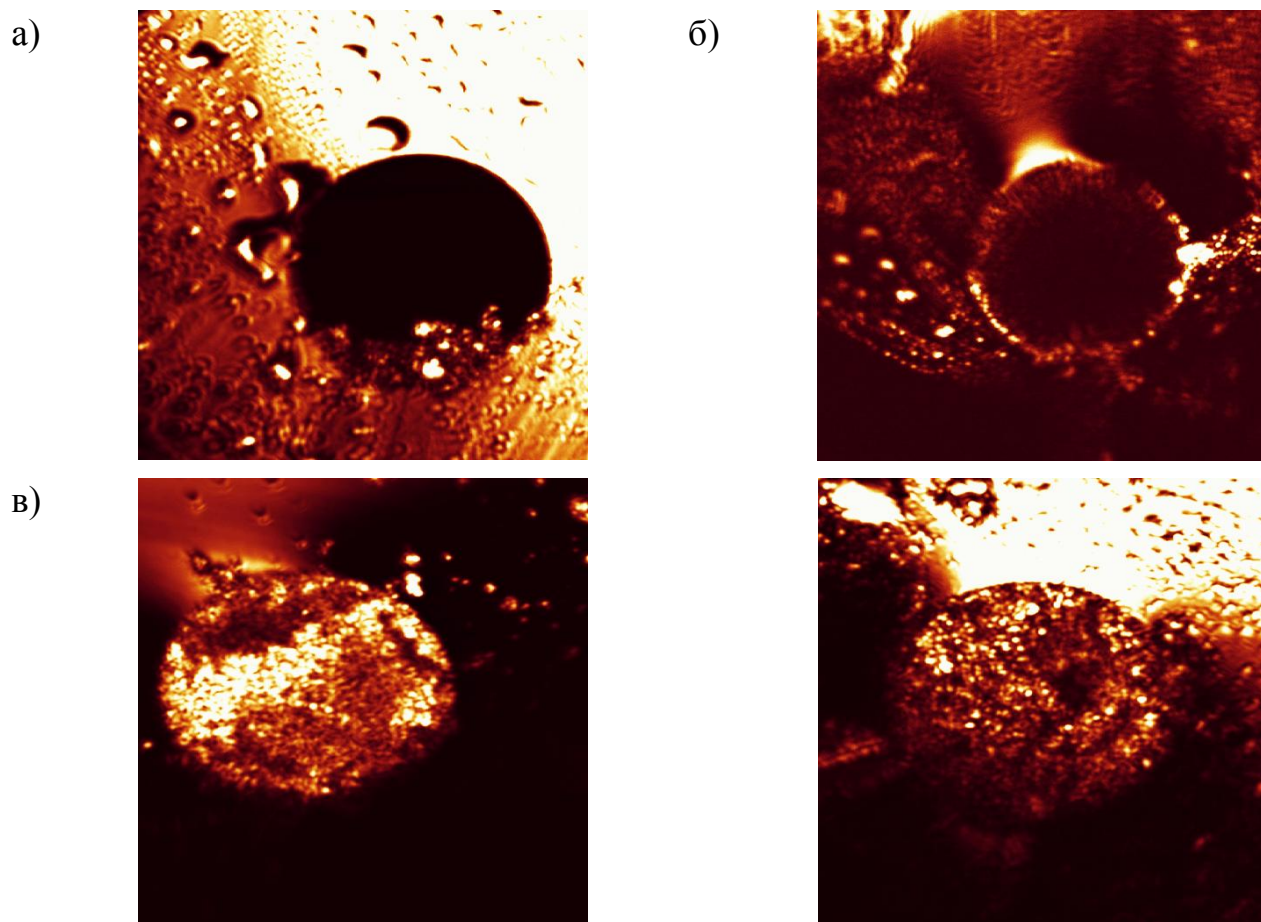


Рис. 43. Фотографии среза поверхности PLOT-колонки, полученные на лазерном микроскопе LeicaTCSSEL; $\lambda_{\text{возб}}$ 488 нм.

Условия полимеризации: 70°C а) 2,5ч и б) 3ч, порогенный растворитель – пропанол-1 (неравномерное покрытие капилляра); в) 70°C 4ч, порогенный растворитель – пропанол-1/формамид (1:5, объемн.) (образуется монолитный сорбент).

Показано, что использование октанола-1 в качестве порогенного растворителя позволяет получать PLOT-колонки с равномерным тонким пористым слоем полимера при термической полимеризации в течении 2,5 ч.

В случае пропанола-1 наблюдалось образование неравномерного слоя полимера, тогда как с использованием смеси пропанол/формамид уже через 4 ч образуется монолитный сорбент, который полностью заполняет внутренний объем капилляра.

Выбраны условия: 16% смеси мономеров, 2,5 ч полимеризация при 70 °С, порогенный растворитель-октанол-1; эти условия в дальнейшем и были использованы нами для синтеза *PLOT*-колонок.

3.2. Электрохроматографическое разделение белков.

Разделение смеси стандартов белков проводилось в кислой среде (рН 2,2; условия на Рисунки 10, 11). Поток жидкости в капилляре, заполненном положительно заряженным монолитным сорбентом, генерирует ЭОП, направленный к аноду. В этих условиях все белки модельной смеси заряжены положительно и электрофоретически мигрируют в противоположном по отношению к ЭОП направлению.

С другой стороны, аналиты и поверхность монолитного сорбента имеют одноименные заряды. Это вызывает электростатическое отталкивание молекул белков от поверхности сорбента, что исключает возможность их адсорбции. Однако, наличие слабых гидрофобных взаимодействий с функциональными группами монолита способствует удерживанию компонентов пробы.

В серии предварительных экспериментов оптимизированы условия разделения смеси тестовых белков в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ) на монолитной и *PLOT*-метакрилатной колонках.

Варьировали концентрацию ацетонитрила (0-50%) (Рисунок 44) и концентрацию рабочего буфера (10-100 мМ фосфорная кислота, рН 2,2) (Рисунок 45).

Оптимизированы условия электрофоретического разделения на монолитной и *PLOT*-метакрилатной колонках:

монолитная колонка: 30 мМ раствор фосфорной кислоты: ацетонитрил (4: 1, объемн.); электрокинетический ввод пробы: -10кВ, 5с;

PLOT-метакрилатная колонка: 0,1 мМ раствор фосфорной кислоты: ацетонитрил (9: 1, объемн.); электрокинетический ввод пробы: 20кВ, 5с. Рабочее напряжение 20кВ. УФ-детектирование (214 нм).

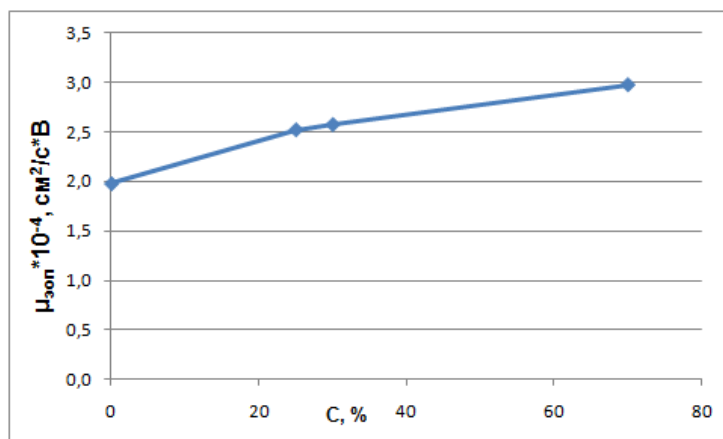


Рис. 44. Зависимость скорости ЭОП от концентрации ацетонитрила.

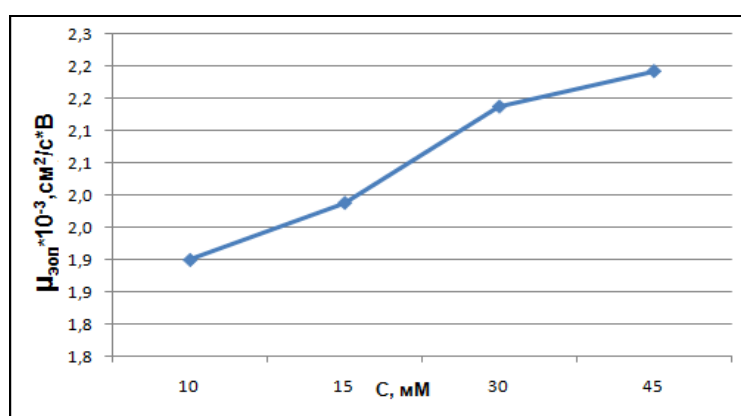


Рис. 45. Зависимость скорости ЭОП от концентрации фосфорной кислоты.

На Рисунках 46, 47 представлены электрофореграммы смеси стандартов белков в условиях КЭХ.

Таким образом, положительный заряд на поверхности полимера при рН 2,2 препятствует адсорбции белков, которые в этих условиях имеют тот же заряд. Возрастает эффективность и селективность разделения по сравнению с КЗЭ (таблица 2).

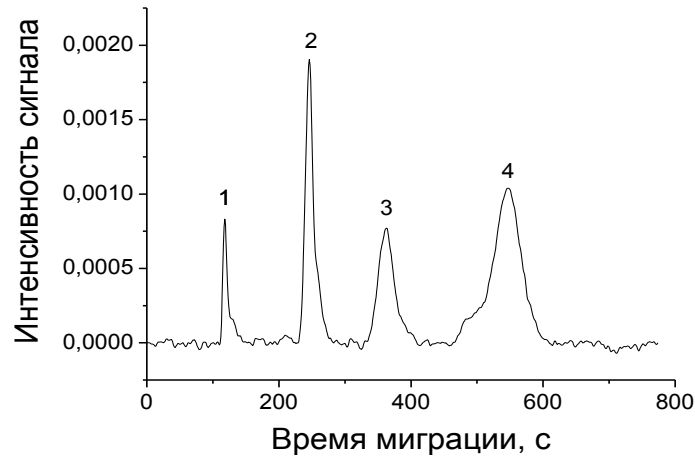


Рис. 46. Электрохроматограмма смеси белков (1 мг/мл). Электрокинетический ввод пробы: -10кВ, 5с. Монолитная капиллярная колонка: $L_{эфф}/L_{общ} = 8,5/45$ см. УФ-детектирование: 214 нм. 1 – альбумин, 2 – инсулин, 3 – миоглобин, 4 – лизоцим. Рабочий электролит: 30 мМ раствор фосфорной кислоты: ацетонитрил (4: 1, объемн.).

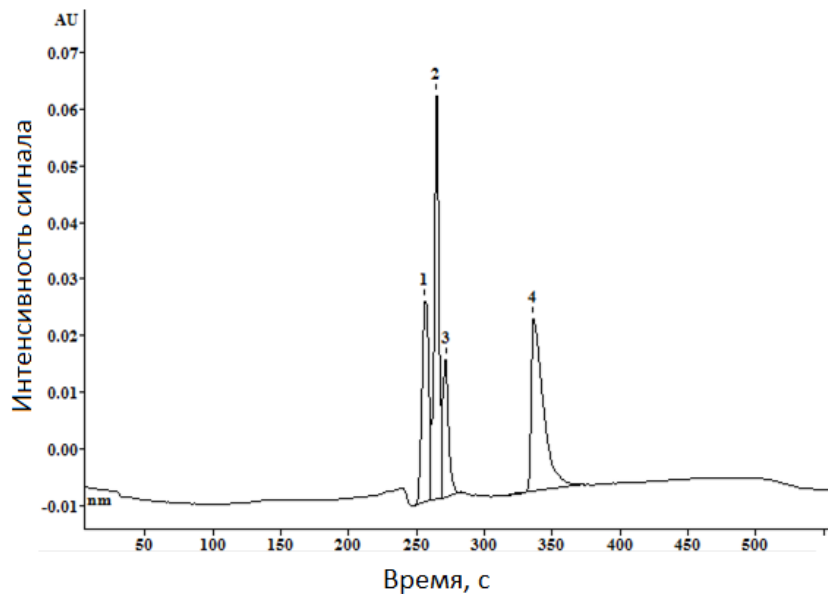


Рис. 47. Электрохроматограмма смеси стандартов белков (1 мг/мл). Рабочий электролит: 0,1 мМ раствор фосфорной кислоты: ацетонитрил (9: 1, объемн.). Электрокинетический ввод пробы: 20кВ, 5с. PLOT-метакрилатная капиллярная колонка: $L_{эфф}/L_{общ} = 8,5/45$ см. УФ-детектирование: 214 нм. 1 – альбумин, 2 – инсулин, 3 – миоглобин, 4 – лизоцим.

Таблица 2. Сопоставление методов КЭХ (метакрилатный полимер) и КЗЭ, используемых для разделения белков.

Контролируемый параметр	КЗЭ	Метакрилатный полимер	
		PLOT-колонки	Монолитные колонки
Эффективность (т.г./м)	10000÷15000	56 000	25000÷35000
Фактор селективности (R_s Alb/Ins)	0,70	1,03	1,50÷2,10

Однако сам процесс получения таких колонок длителен; возможно, образование пузырьков воздуха внутри капилляра приводящих к обрыву тока.

Требовался поиск альтернативного катионного покрытия.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ЭКХ)

Отмечено, что использование дендримеров и сверхразветвленных полимеров (СПР) в качестве стационарных и *псевдостационарных* фаз в КЭХ и ЭКХ является весьма перспективным направлением [1]. Удобство применения их в качестве компонентов хроматографических и электрофоретических систем обусловлено следующими причинами:

- дендримеры и сверхразветвленные полимеры (СПП) имеют большое число полярных терминальных групп, что обеспечивает им хорошую растворимость и высокую термическую устойчивость;

- различные модификации терминальных групп позволяют контролировать их растворимость, реакционную способность и адгезию к поверхности, что, в свою очередь, позволит повысить селективность разделения;

- внутримолекулярные полости (гидрофильные или гидрофобные) обеспечивают способность этим полимерам образовывать комплексы включения типа «*гость-хозяин*» с аналитами различной природы;

- в растворах макромолекулы СПП образуют стабильные и не зависящие от внешней среды мицеллоподобные структуры. Вязкость таких мицеллярных растворов невысокая в отличие от растворов поверхностно-активных веществ.

Для создания альтернативных катионных покрытий испытаны новые полимеры на основе сверхразветвленного полиэтиленimina с различной массой ядра 5 и 25 кДа и степенью модификации мальтозой. Наибольшее - в структуре А (90%), а наименьшее – в С (20%), что определяет и различие их по гидрофильности и заряду (Рисунок 48).

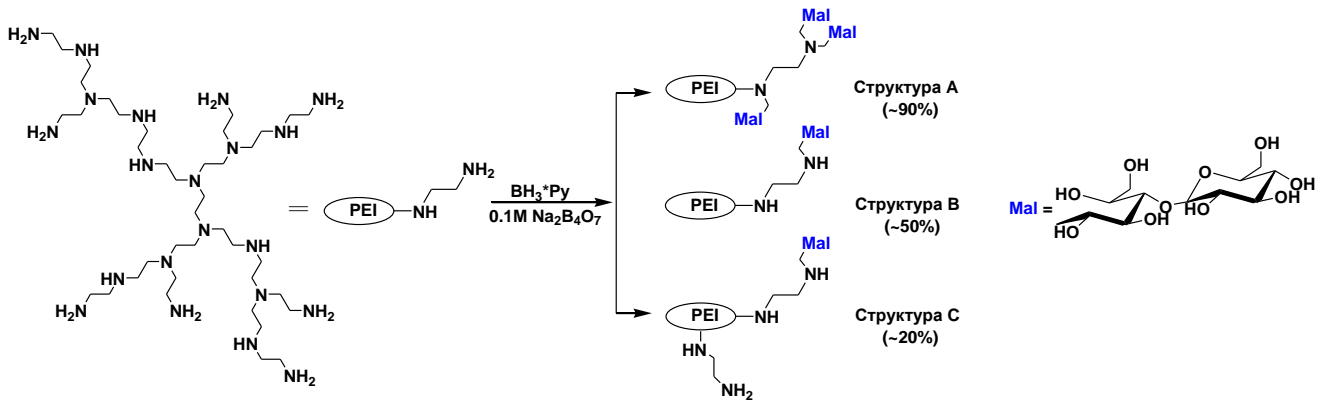


Рис. 48. Модификация сверхразветвленного полиэтиленimina мальтозой (Mal-PEI).

Была выдвинута гипотеза: обсуждаемые полимеры могли бы сыграть роль *псевдостационарной*, стационарной фазы и/или модификатора поверхности кварцевого капилляра, обеспечивая взаимодействие с аналитами с участием ядра и оболочки, тем самым, препятствуя сорбции белков и влияя на эффективность и селективность их разделения (Рисунки 49, 50).

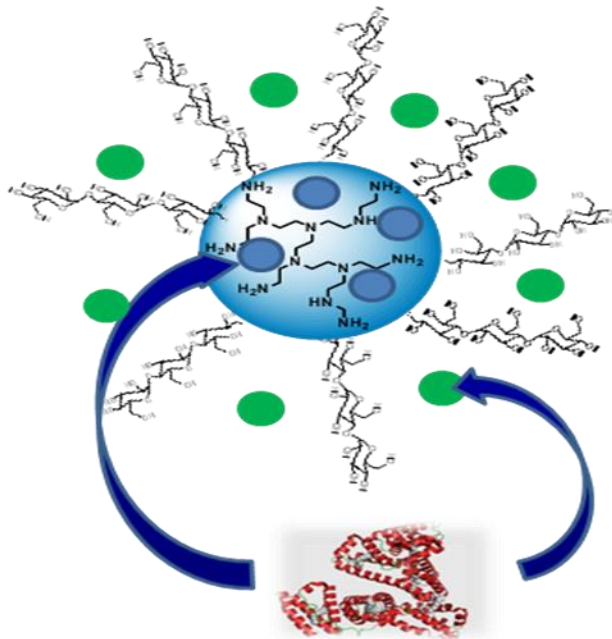


Рис. 49. Возможные взаимодействия белка с дендритным полимером.

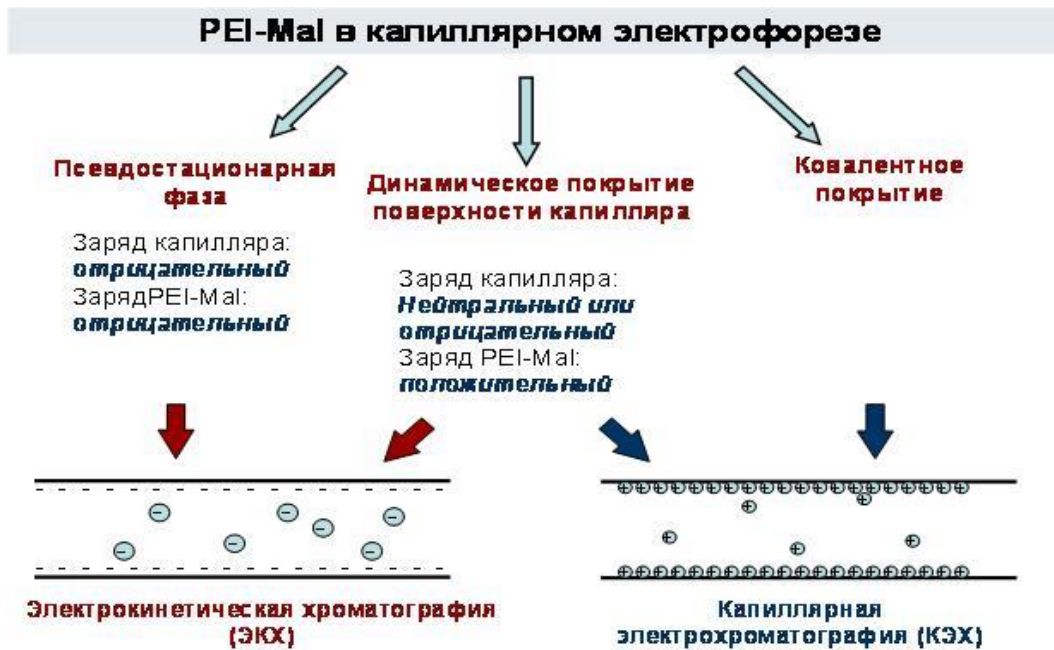


Рис. 50. Реализация различных вариантов капиллярного электрофореза с использованием мальтозилированного сверхразветвленного полиэтиленimina.

Выбор полиэтилениминного модифицированного дедримера обусловлен наличием терминальных мальтозных групп и внутренних третичных и вторичных аминогрупп, которые обеспечивают различный заряд сверхразветвленному полимеру в зависимости от значения pH буферного раствора (Рисунок 51).

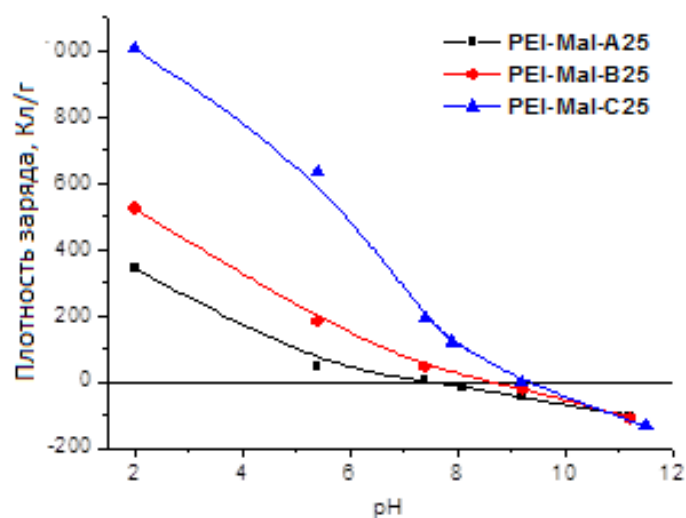


Рис. 51. Зависимость заряда полимера от значения pH (концентрация полимеров 0,5мг/мл) [89].

Степень взаимодействия полимера PEI-Mal с белками (альбумином) в существенной степени определяется размером полиэтилениминового ядра: чем оно меньше, тем слабее эти взаимодействия [90].

Для подтверждения этого обстоятельства проведена серия электрофоретических экспериментов с участием полимера PEI-Mal B (с массой ядра 5 и 25 кДа) при pH рабочего буфера 8,5. Установлено, что с уменьшением размера ядра взаимодействия молекул полимера с разделяемыми белками снижаются и проявляются лишь при больших концентрациях СРП (10 мг/мл). Поэтому для проведения дальнейших детальных исследований были взяты полимеры PEI-Mal 25кДа, имеющие большую массу.

В аналогичных условиях при введении в состав буферного электролита полимеров структуры А (с максимальной модификацией олигосахаридными фрагментами) различных генераций (А5 и А25) заметных различий в параметрах миграции аналитов обнаружено не было (Рисунок 52).

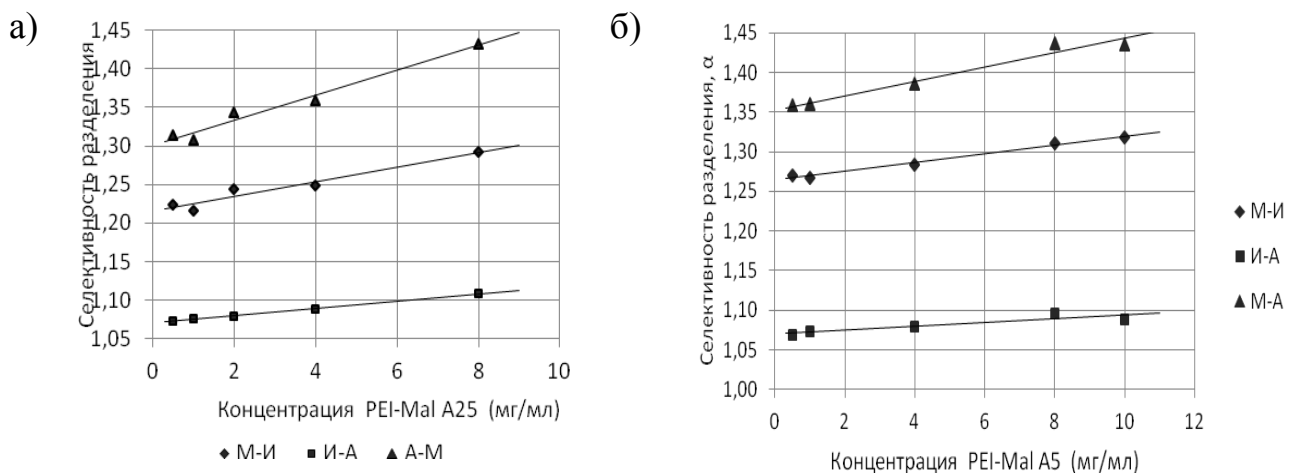


Рис. 52. Зависимость селективности разделения при определении белков в ЭКХ от концентрации полимера

а) PEI-Mal A25; б) PEI-Mal A5 в боратном буферном электролите (pH 8,5);

М – миоглобин, И – инсулин, А – альбумин.

Следует отметить важность такого фактора как значение рН буферного электролита. Выбранные аналиты и дендритные полимеры являются ионогенными соединениями. При изменении величины рН меняется их аналитическая форма, что может сказаться на скорости и направлении электроосмотического потока, временах миграции аналитов, эффективности и селективности разделения.

В первоначальной серии электрофоретических экспериментов изучено влияние сверхразветвленного полиэтиленimina в качестве *псевдостационарной* фазы (ПСФ) на параметры миграции белков – альбумина, лизоцима, миоглобина, инсулина – при различных значениях рН рабочего буфера: 2,2; 8,5; 10,2.

Отметим, что

- *при рН 2,2*: молекулы белков и полимеров находятся в катионной форме;
- *при рН 8,5*: молекулы белков – в анионной форме, а полимеров – в катионной;
- *при рН 10,2*: молекулы белков и полимеров находятся в *анионной* форме.

Значения рН рабочего буфера выбирались в соответствии со значениями изоэлектрических точек (*pI*) определяемых белков (таблица 1) и полимера. Структура А содержит наибольшее количество мальтозных концевых групп, обладает плотной мальтозной оболочкой и, как следствие, низким значением изоэлектрической точки (*pI*=8,1). Структуры В и С содержат значительно меньшее количество мальтозных остатков (40 и 20%, соответственно), в меньшей степени экранируют положительно заряженное ядро и характеризуются более высокими значениями *pI* (9.1 и 9.4, соответственно). Таким образом, правильный выбор замещенного гликозилированного полимера и фонового электролита позволяет регулировать селективность разделения маркерных белков в капиллярном электрофорезе (КЭ).

Зависимость скорости электроосмотического потока от концентрации полимера в рабочем буферном растворе и его типа представлена на Рисунок 53.

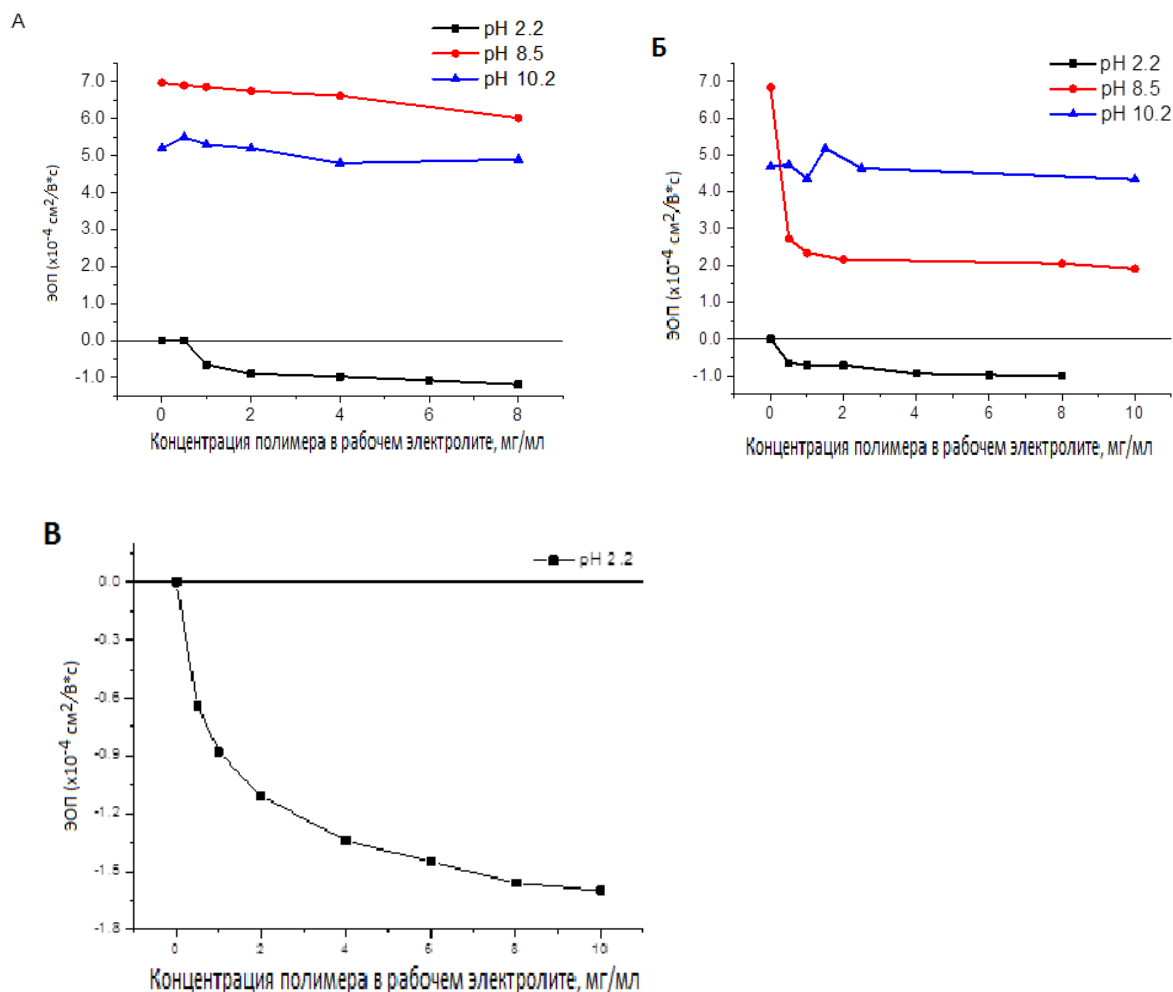


Рис. 53. Подвижность электроосмотического потока (по сравнению с ДМСО) в присутствии (А) PEI-Mal A, (Б) PEI-Mal B и (В) PEI-Mal C в составе буферного раствора.

Условия электрофоретического анализа: +20 кВ (pH 10,2) или –20 кВ (pH 2,2 и 8,5); капилляр: 45.5 см x 50 мкм (внутренний диаметр) $L_{эфф}$ 38 см; рабочий электролит: 100 мМ фосфатный буферный раствор (pH 2,2); 50 мМ боратный буферный раствор (pH 8,5); 100 мМ боратный буферный раствор (pH 10,2); 214 нМ.

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

При pH 10,2 полимеры структуры А и В (PEI-Mal A и PEI-Mal B) выполняют роль *псевдостационарной* фазы, все дендритные полимеры, независимо от степени функционализации мальтозой, заряжены отрицательно

(Рисунок 48), и поэтому не взаимодействуют с отрицательно заряженной поверхностью кварцевого капилляра и не вносят изменений в направление и скорость электроосмотического потока.

Полимер с меньшей функционализацией мальтозой PEI-Mal C при увеличении концентрации образует межмолекулярные агрегаты, что приводит к закупориванию кварцевого капилляра, и работа с ним становится нецелесообразной.

Изучено влияние концентрации сверхразветвленных полиэтилениминов на разделение четырех белков: миоглобин (pI 7.0), инсулин (pI 5.5), лизоцим (pI 11.0) и альбумин (pI 4.7) в условиях ЭКХ. При pH 10,2 все белки (кроме лизоцима) находятся в анионной форме, что снижает и препятствует адсорбции белков на отрицательно заряженной поверхности кварцевого капилляра.

В этих условиях лизоцим заряжен положительно и не детектируется. Введение полимеров структур А и В в рабочий буфер привело лишь к незначительному изменению электрофоретических подвижностей аналитов. (таблица 3).

Таблица 3. Эффективные электрофоретические подвижности белков (μ_{eff}) и воспроизводимость при введении полимера PEI-Mal В в состав рабочего буфера (pH 10,2).

Концентрация PEI-Mal В, мг/мл		Миоглобин	Инсулин	Альбумин
0	RSD, %	2,1	2,0	0,8
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,90 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-4}$
0,5	RSD, %	0,7	0,4	0,2
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,89 \times 10^{-4}$	$1,99 \times 10^{-4}$	$2,47 \times 10^{-4}$
1	RSD, %	1,9	3,0	1,7
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,53 \times 10^{-4}$	$1,71 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-4}$

2	RSD, %	0,7	0,4	0,3
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,81 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^{-4}$	$2,56 \times 10^{-4}$
4	RSD, %	0,4	1,1	0,4
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,68 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
8	RSD, %	2,3	2,5	1,8
	μ_{eff} , м ² /В·с	$1,72 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$2,36 \times 10^{-4}$

Однако при бóльших концентрациях полимера структуры В (≥ 4 мг/мл) наблюдалось значительное увеличение параметров миграции (особенно для инсулина и альбумина).

Учитывая постоянное значение тока в капилляре во время анализов (таблица 4) как показателя изменения ионной силы рабочего электролита, можно заключить, что увеличение времен миграции аналитов свидетельствует о взаимодействии полимера PEI-Mal В с макромолекулами инсулина и альбумина и образовании соответствующих агрегатов.

Таблица 4. Значения тока внутри капилляра во время анализа при введении PEI-Mal в состав рабочего буфера (рН 10,2)

Концентрация PEI-Mal А, мг/мл	Ток, мА	Образец	Концентрация PEI-Mal В25, мг/мл	Ток, мА	Образец
0	55,0-56,0	ДМСО	0	53,0-54,0	ДМСО
	55,0	Белки*		54,0	Белки
0,5	54,5	ДМСО	0,5	52,0	ДМСО
	55,0	Белки		53,0	Белки
	54,5	Белки		53,0	Белки
				54,0	Белки
1	58,0	ДМСО	1	54,0	ДМСО
	56,5	Белки		54,0	Белки

	57,0	Белки		55,0	Белки
2	55,0	ДМСО	2	54,5	ДМСО
	54,0	Белки		55,5	Белки
	54,0	Белки		55,5	Белки
4	56,0	ДМСО	4	54,5	ДМСО
	55,5	Белки		55,0	Белки
	56,0	Белки		55,5	Белки
8	57,0	ДМСО	8	54,5	ДМСО
	57,0	Белки		55,5	Белки

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

Выявленные различия во взаимодействии PEI-Mal A и PEI-Mal B с белками могут быть обусловлены разницей в гидрофильности макромолекул полимеров, их способностью образовывать комплексы с боратными ионами, находящимися в буферном растворе, распределением заряда на поверхности и др.

Рассмотрим другую ситуацию: значение pH рабочего буфера 8,5.

При pH 8,5 наличие полимеров структуры PEI-Mal A (максимально плотная олигосахаридная оболочка) в буферном растворе привело лишь к незначительному снижению скорости ЭОП, что по-прежнему явилось следствием незначительной сорбции отрицательно заряженного PEI-Mal A на внутренней поверхности капилляра.

При этом добавка PEI-Mal B в буферный раствор значительно изменила скорость электроосмотического потока. При pH=8,5 молекулы полимера PEI-Mal B, в отличие от молекул PEI-Mal A, все еще положительно заряжены и могут достаточно эффективно сорбироваться на отрицательно заряженной внутренней поверхности кварцевого капилляра.

Итак, при pH рабочего буфера 8,5 стенки кварцевого капилляра заряжены отрицательно; молекулы полимеров (структуры B и C) – положительно; молекулы белка лизоцима также заряжены положительно (pI=11,0) и, в отличие от других белков, сильно сорбируются стенками кварцевого капилляра. Поэтому в

последующих экспериментах влияние сверхразветвленных полимеров изучалось на модельной смеси трех белков: миоглобина, альбумина и инсулина.

Нами зафиксирован факт динамической модификации отрицательно заряженной поверхности кварцевого капилляра молекулами полимеров. Отрицательно заряженные белки электростатически взаимодействуют с положительно заряженным дендритным полимером на поверхности капилляра и сорбируются, что приводит к значительному увеличению времен миграции белков и увеличению селективности разделения (см. приложение 2).

Влияние плотности мальтозной оболочки и, соответственно, значений изоэлектрических точек полимеров PEI-Mal A и PEI-Mal B (Рисунок 48) при рН 8,5 может быть проиллюстрировано сравнением соответствующих электрофореграмм (Рисунок 54).

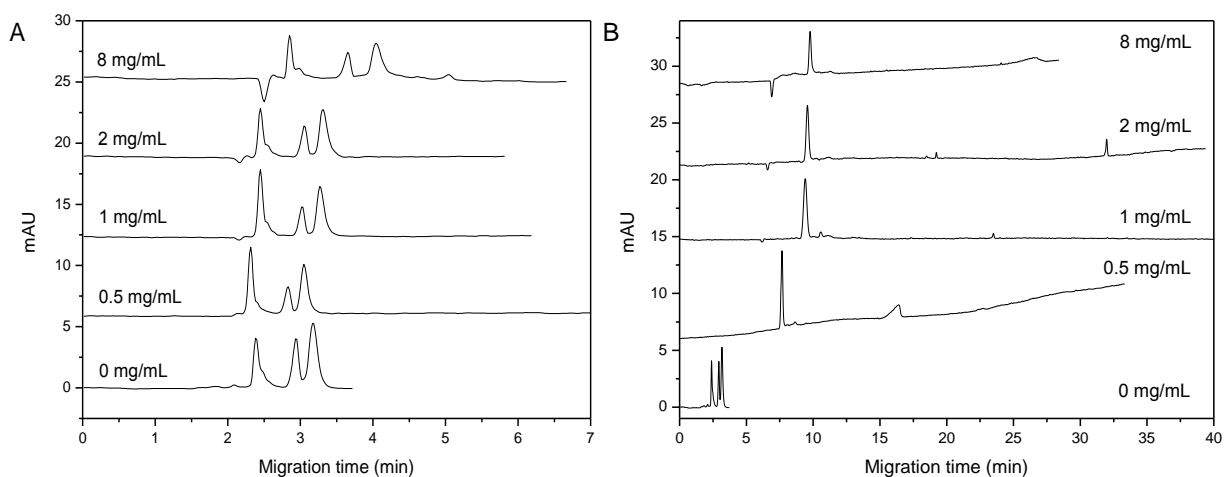


Рис. 54. Разделение белков в условиях МЭКХ при различных концентрациях добавок полимеров

(А) PEI-Mal A25 и (Б) PEI-Mal B25 в составе буферного электролита (50 мМ боратный буфер, рН 8,5) УФ: 214 нм.

Порядок миграции аналитов: миоглобин, инсулин, альбумин.

Полимер PEI-Mal A (0,5-2 мг/мл) выполнял в рабочем буферном электролите роль *псевдостационарной* фазы (Рисунок 54А). Лишь при высоких концентрациях (8 мг/мл) присутствие модифицированного полиэтиленимина PEI-Mal A вызывало увеличение времен миграции аналитов (Рисунок 54 А: верхняя электрофореграмма). Обнаружено, что небольшие концентрации положительно заряженного полимера В (с меньшим содержанием мальтозных фрагментов, чем в случае полимера структуры А) в составе буфера приводили к заметному росту времен миграции белков (Рисунок 54 В).

При этом альбумин не регистрируется уже при добавлении 0,5 мг/мл полимера как при положительной, так и при отрицательной полярности: скорее всего это вызвано образованием довольно прочного его комплекса с полимером структуры В на стенках капилляра.

С использованием дендритного полимера PEI-MalC25, содержащего наименьшее число мальтозных фрагментов, в качестве *псевдостационарной* фазы – ни один белок на электрофореграмме не был зарегистрирован.

Объяснение этому следующее: наименьшее экранирование положительно заряженного полиэтилениминового ядра в случае полимера С приводит к усилению электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной поверхностью кварцевого капилляра; ЭОП подавлен; взаимодействия полимера с отрицательно заряженными молекулами аналитов возрастают.

Кроме того, важно отметить, что после проведения электрофоретических экспериментов с введением полимера С в рабочий буфер, требуется значительно более длительная промывка, чем для других полимеров, кварцевого капилляра.

В кислой среде (рН=2,2) диссоциация силанольных гидроксильных групп капилляра подавлена; ЭОП отсутствует; значение рН рабочего буфера ниже изоэлектрической точки полимеров); доступные аминокгруппы полимеров В и С протонируются. В результате, при введении этих полимеров в состав буфера наблюдается обращение ЭОП, поскольку они адсорбируются на поверхности капилляра с формированием катионного динамического покрытия, что вызывает генерацию анодного электроосмотического потока.

Нами 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) (таблица 5).

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)).

Таблица 5. Воспроизводимость скорости ЭОП и RSD белков на колонках, модифицированных полимерами PEI-Mal (*динамическое покрытие и ковалентно связанное*) (pH 2,2)

Структура полимера	<i>RSD</i> времен миграции (% , n=50) от анализа к анализу / день-день				
	DMCO	Альбумин	Инсулин	Миоглобин	Лизоцим
<i>Динамическое покрытие</i>					
PEI-Mal A	2,0 / 4,3	1,8 / 2,5	1,7 / 2,0	1,6 / 2,7	1,7 / 3,1
PEI-Mal B	1,4 / 3,8				
PEI-Mal C	3,3 / 4,0				
<i>Ковалентное покрытие</i>					
PEI-Mal A	1,8 / 5,8	2,0 / 3,0	2,1 / 3,8	2,5 / 3,6	3,0 / 2,8
PEI-Mal B	1,0 / 4,4				
PEI-Mal C	3,5 / 3,6				

Обнаружено, что при концентрациях полимера 0-5 мг/мл с уменьшением плотности мальтозной оболочки дендритного полимера происходит увеличение эффективных электрофоретических подвижностей (μ_{eff}) аналитов (таблицы 6-8). Это свидетельствует о более сильных взаимодействиях между полимером с меньшим числом мальтозных фрагментов и молекулами белков.

Таблица 6. Эффективные электрофоретические подвижности белков (μ_{eff}) и воспроизводимость этих величин при введении PEI-Mal A в состав рабочего буфера (рН 2,2).

PEI-Mal A (мг/мл)		Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
0	RSD, %	0,7	0,9	1,7	1,5
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,76 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-4}$	$2,61 \times 10^{-4}$	$2,28 \times 10^{-4}$
1	RSD, %	2,0	2,2	3,0	0,8
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,64 \times 10^{-4}$	$2,57 \times 10^{-4}$	$2,48 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-4}$
2	RSD, %	1,9	2,1	2,1	5,4
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,58 \times 10^{-4}$	$2,52 \times 10^{-4}$	$2,44 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-4}$
4	RSD, %	6,2	6,1	5,6	4,1
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,96 \times 10^{-4}$	$2,90 \times 10^{-4}$	$2,83 \times 10^{-4}$	$2,42 \times 10^{-4}$
8	RSD, %				
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,16 \times 10^{-4}$	$3,11 \times 10^{-4}$	$3,05 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-4}$
10	RSD, %	1,7	1,7	1,6	-
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$< 2,0 \times 10^{-4}$

Таблица 7. Эффективные электрофоретические подвижности белков (μ_{eff}) и их воспроизводимость при введении PEI-Mal B в состав рабочего буфера (pH 2,2).

PEI-Mal B (мг/мл)		Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
0	RSD, %	0,7	0,9	1,7	1,5
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,92 \times 10^{-4}$	$2,84 \times 10^{-4}$	$2,69 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-4}$
0,5	RSD, %	0,4	0,5	1,8	0,6
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,56 \times 10^{-4}$	$3,48 \times 10^{-4}$	$3,32 \times 10^{-4}$	$2,87 \times 10^{-4}$
1	RSD, %	0,5	0,7	1,2	1,1
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,63 \times 10^{-4}$	$3,56 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	$2,95 \times 10^{-4}$
2	RSD, %	0,3	0,8	0,6	0,4
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,52 \times 10^{-4}$	$3,46 \times 10^{-4}$	$3,33 \times 10^{-4}$	$2,90 \times 10^{-4}$
5	RSD, %	1,3	1,1	1,0	1,0
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,59 \times 10^{-4}$	$3,54 \times 10^{-4}$	$3,45 \times 10^{-4}$	$3,01 \times 10^{-4}$
10	RSD, %	0,7	0,6	1,1	-
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,63 \times 10^{-4}$	$3,62 \times 10^{-4}$	$3,59 \times 10^{-4}$	$3,03 \times 10^{-4}$

Таблица 8. Эффективные электрофоретические подвижности белков (μ_{eff}) и их воспроизводимость при введении PEI-Mal C в состав рабочего буфера (pH 2,2).

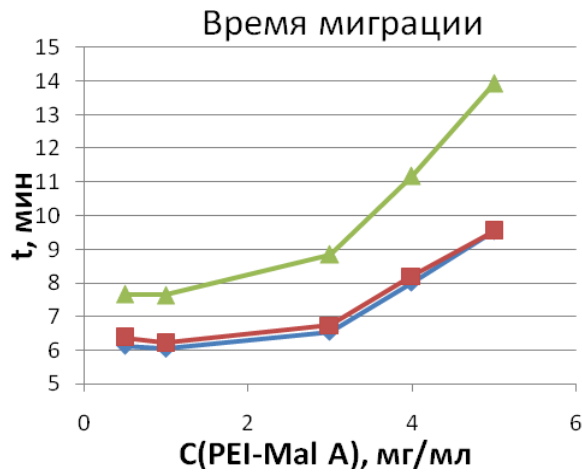
PEI-Mal C (мг/мл)		Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
0	RSD, %	0,7	0,9	1,7	1,5
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,76 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-4}$	$2,61 \times 10^{-4}$	$2,28 \times 10^{-4}$
0,5	RSD, %	4,9	3,3	3,1	3,2
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,50 \times 10^{-4}$	$3,47 \times 10^{-4}$	$3,35 \times 10^{-4}$	$3,03 \times 10^{-4}$
2	RSD, %	2,3	2,1	1,9	2,2
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,86 \times 10^{-4}$	$3,80 \times 10^{-4}$	$3,70 \times 10^{-4}$	$3,36 \times 10^{-4}$
5	RSD, %	1,9	1,4	1,3	1,8
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$3,55 \times 10^{-4}$	$3,51 \times 10^{-4}$	$3,46 \times 10^{-4}$	$2,99 \times 10^{-4}$
8	RSD, %				
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,30 \times 10^{-4}$	$2,30 \times 10^{-4}$	$2,30 \times 10^{-4}$	$2,24 \times 10^{-4}$
10	RSD, %	1,7	1,7	1,6	-
	μ_{eff} , $\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$2,10 \times 10^{-4}$	$< 2, 0 \times 10^{-4}$

Наблюдалось постепенное уменьшение скорости ЭОП с -6.4×10^{-5} до -1.6×10^{-4} $\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$ при повышении концентрации полимера PEI-Mal C с 0,5 до 10 мг/мл из-за увеличения количества адсорбированных положительно-заряженных молекул полимера на поверхности кварцевого капилляра.

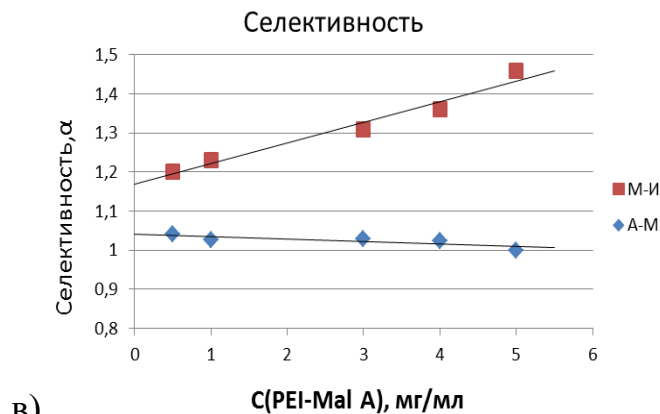
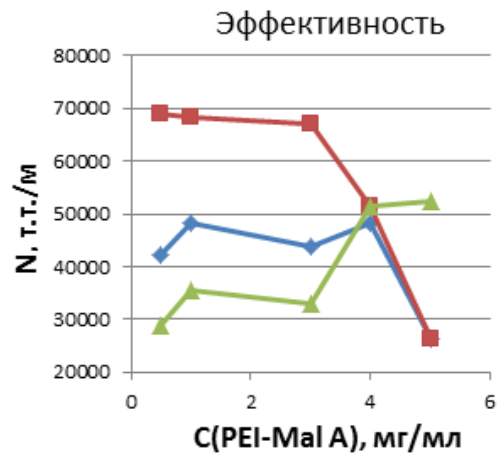
Введение полимеров структур А и В (бóльшая степень функционализации мальтозой) в рабочий буфер приводило к увеличению времен миграции и

снижению эффективности; селективность разделения при этом практически не менялась (Рисунок 55).

а)



б)



в)

— Альбумин — Миоглобин — Инсулин

Рис. 55. Зависимость (а) времен миграции, (б) эффективности (N) и (в) селективности разделения (α) от концентрации полимера PEI-MalA25 в фосфатном буферном растворе (рН 2,2); М – миоглобин, И – инсулин, А – альбумин.

Введение 0,5-2 мг/мл полимера структуры С (PEI-Mal С) приводит лишь к незначительному увеличению эффективности, однако уже при концентрациях полимера выше 10 мг/мл скорость ЭОП возрастает, а селективность разделения снижается. При этом параметры миграции заметно растут (до 10 мин) и резко увеличивается эффективность (до 400 000 т.т./м) (Рисунок 56). Этот полимер

характеризуется наименьшей степенью функционализации мальтозными группами, и положительно заряженное ядро полимера более доступно. Важно отметить, что при концентрации более 5 мг/мл появляется отрицательный ЭОП: заряженные молекулы полимеров модифицируют поверхность капилляра с участием водородных связей.

Обнаружен интересный факт. ЭОП движется в противоположном направлении по отношению к анализам. В результате эффективная скорость миграции белков уменьшается, и наблюдается эффект концентрирования, что важно как при определении суммарного содержания белка, так и индивидуального анализа (Рисунок 56).

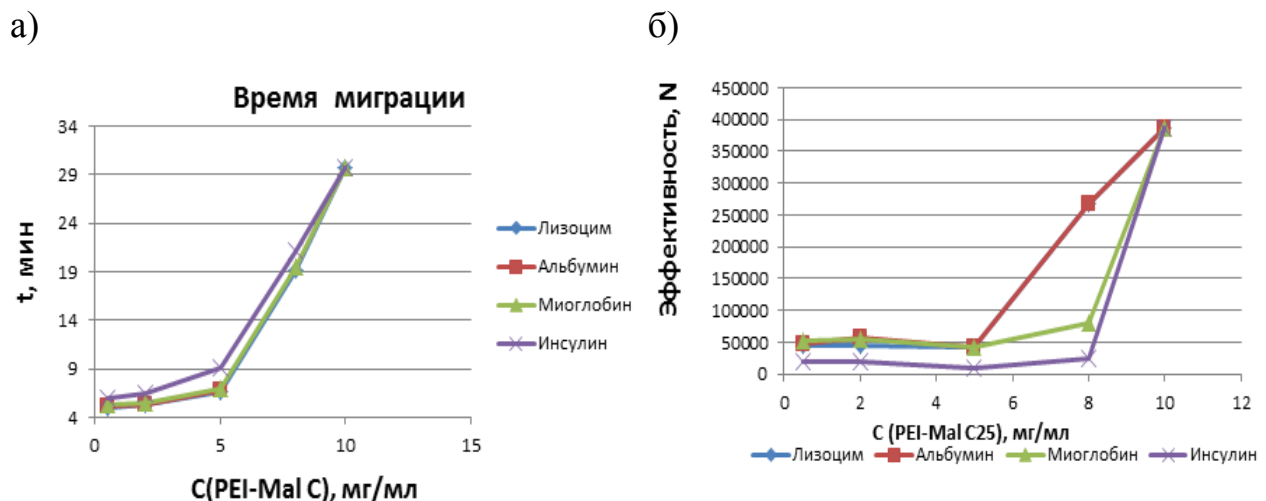


Рис. 56. Зависимость (а) времен миграции и (б) эффективности (N) при электрофоретическом разделении белков (ЭКХ) от концентрации полимера PEI-Mal C25 в фосфатном буферном растворе (pH 2,2).

Таким образом, обнаружено, что дендритный полимер выполняет двойную функцию: он выступает в качестве псевдостационарной фазы и модификатора поверхности кварцевого капилляра (Рисунок 57). Это, в свою очередь, препятствует адсорбции белков на стенках капилляра, увеличивая воспроизводимость параметров миграции при pH=10,2, а при pH=8,5 – приводит

к сильной адсорбции белков на модифицированных стенках капилляра за счет электростатических взаимодействий.

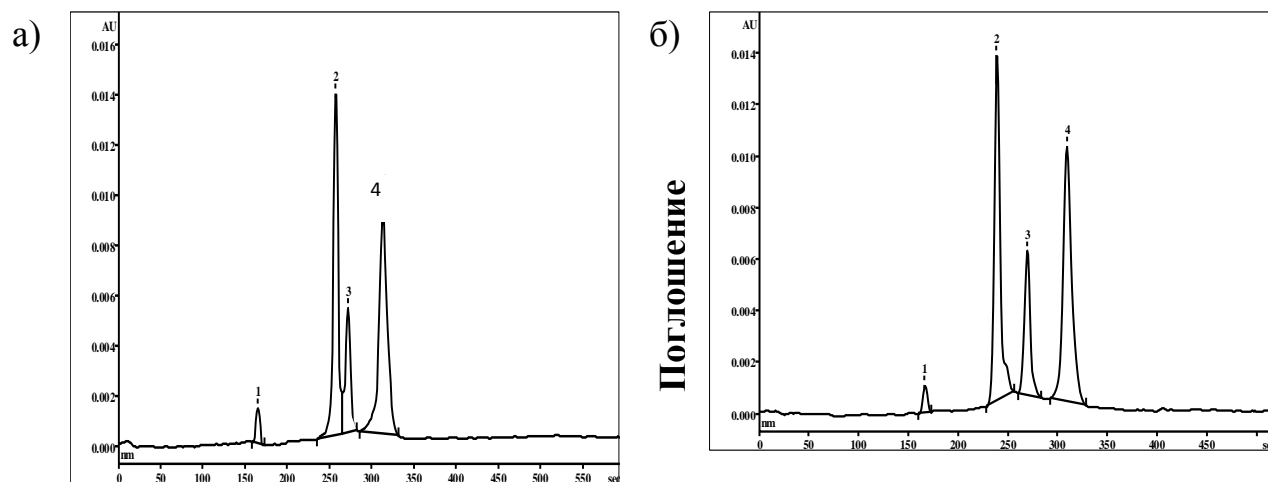


Рис. 57. Электрофореграмма модельной смеси белков (лизозим, миоглобин, инсулин, альбумин). Ввод пробы: $5\text{с} \times 30\text{мбар}$; 15кВ ; $\lambda=214\text{ нм}$. Рабочий электролит: 75 мМ боратный буфер ($\text{pH } 10,2$).

1 – лизоцим, 2 – миоглобин, 3 – инсулин, 4 – альбумин.

а) Без добавки полимера PEI-MalA25;

б) С добавкой полимера PEI-MalA25 в боратный буфер

Полученные результаты позволяют утверждать, что полимеры PEI-Mal, введенные в состав рабочего электролита при низких концентрациях ($0,5\text{ мг/мл}$), могут быть использованы в качестве динамического покрытия для подавления необратимой адсорбции белка при $\text{pH} < 7$. Применение высоких концентраций PEI-Mal приводит к ко-миграции белков. Чтобы улучшить стабильность покрытия и избежать высоких концентраций полимеров в растворе, нами была предпринята попытка ковалентного связывания макромолекул дендритного полимера к внутренней поверхности кварцевого капилляра.

ГЛАВА 5. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА PLOT-ДЕНДРИТНЫХ КОЛОНКАХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ

Альтернативой динамическому покрытию явилось создание тонкого слоя полимера на внутренней поверхности кварцевого капилляра. С этой целью были синтезированы *PLOT*-дендритные, монолитные и *PLOT*-метакрилатные колонки и изучено влияние состава и концентрации буферного электролита на электрофоретическое разделение белков с контролем скорости ЭОП в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ) и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ).

Получение колонок с ковалентным покрытием, мальтозилированным сверхразветвленным полиэтиленимином, включало травление кварцевого капилляра, силанизацию (Рисунок 58) и последующую функционализацию для обеспечения ЭОПа.

Значение первых двух этапов синтеза колонки аналогично получению монолитных и *PLOT*-метакрилатных колонок.

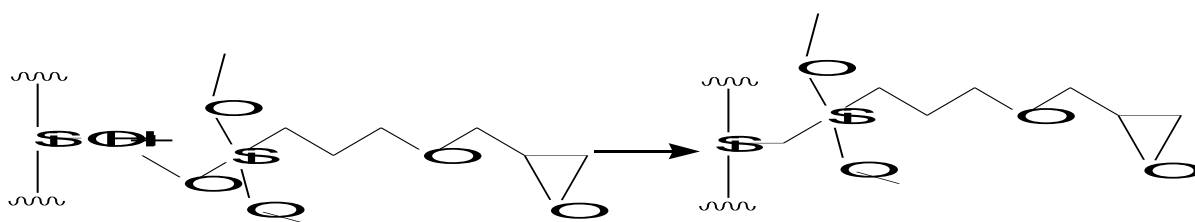


Рис. 58. Схема взаимодействия силанольных групп с силанизирующим агентом (3-глицидоксипропил)триэтоксисиланом.

Далее силанизированный капилляр заполняли дегазированным раствором дендритного полимера (Рисунок 59).

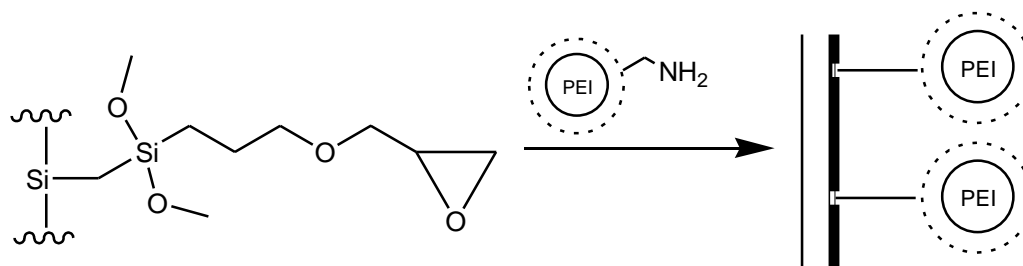


Рис. 59. Схема получения PEI-Mal покрытия.

На Рисунках 60 и 61 приведены соответствующие электрохроматограммы в условиях КЭХ и МЭКХ маркера электроосмотического потока – ДМСО.

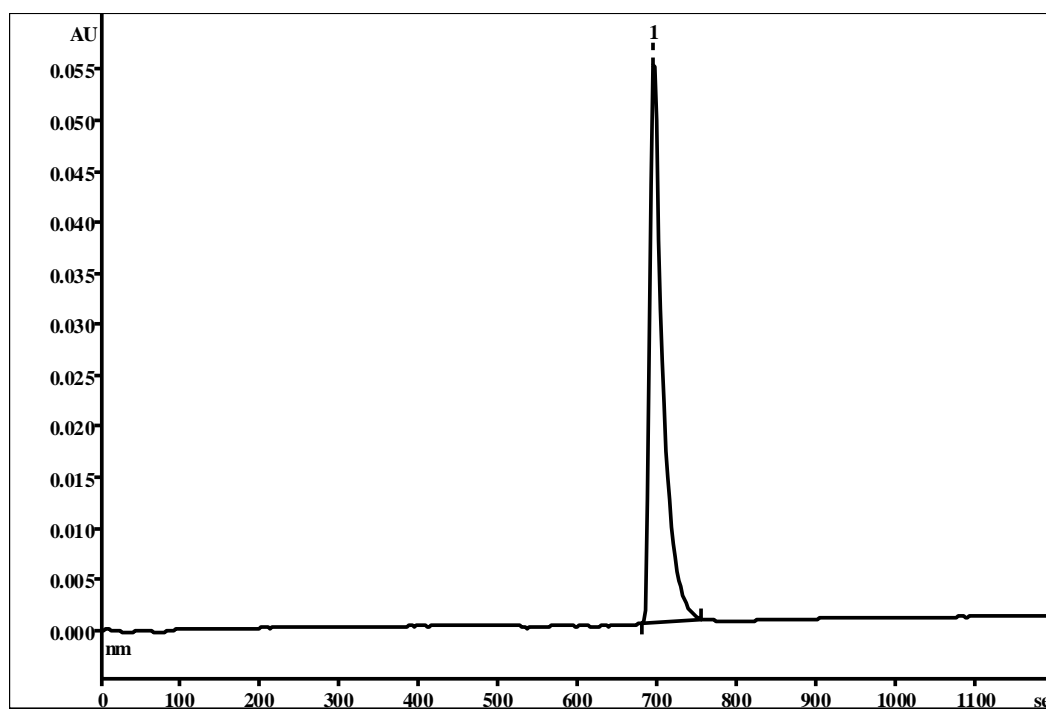


Рис. 60. Электрохроматограмма ДМСО (3% от объема рабочего буфера); кварцевый капилляр 45см×50 мкм; 100 мМ фосфатный буфер (pH=2,2); напряжение -20 кВ, детектирование при 214 нм.

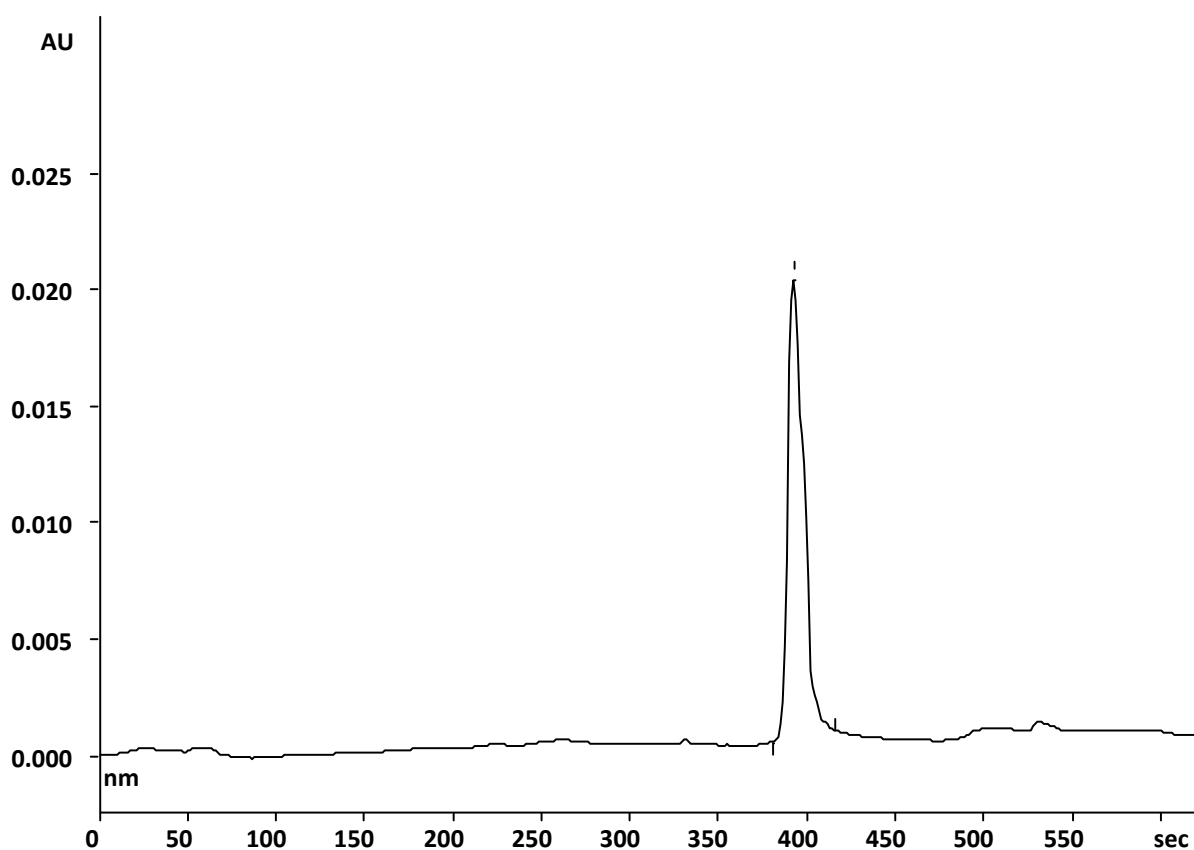


Рис. 61. Электрофореграмма ДМСО (3% от объема рабочего буфера) 45см×50 мкм кварцевый капилляр; 100мМ фосфатный буфер (рН=2,2); Напряжение +20 кВ, детектирование при 214 нм (на примере PEI-MalB(25)).

Лучшее разделение белков наблюдалось в кислой среде (рН 2,2); электрофоретическое разделение белков проводилось при положительной полярности. Нами обнаружен эффект концентрирования в условиях стэкинга с большим объемом вводимого образца без переключения полярности, (известного в англоязычной литературе как LVSS - *Large Volume Sample Stacking*): при введении большого количества пробы ЭОП выталкивал раствор матрицы пробы из капилляра, что и приводило к концентрированию аналитов.

Подобная ситуация независимо подтверждала обнаруженную нами ранее модификацию стенок кварцевого капилляра дендритным полимером структуры С в условиях МЭКХ при рН=2,2.

На Рисунках 62 и 63 приведены электрохроматограммы смеси четырех тестовых белков в условиях КЭХ на колонках PLOT-PEI-25k-Mal-A и PLOT-PEI-25k-Mal-C. Характеристика колонок дана в таблице 9.

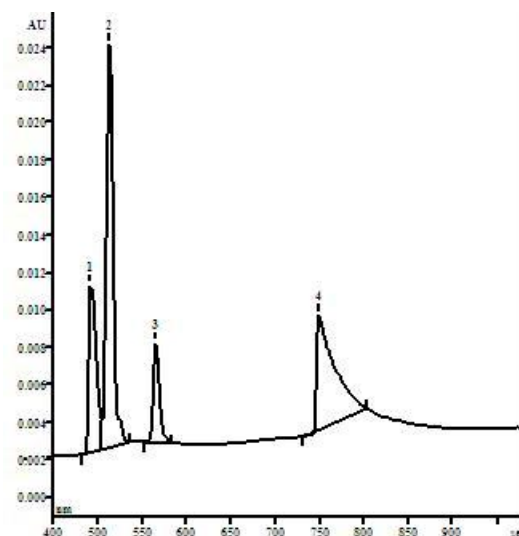


Рис. 62. Электрофореграмма смеси стандартов белков (1 мг/мл) на PLOT-колонке PEI-25k-Mal-A. Буферный электролит: 100 мМ фосфатный буфер (pH=2,2). Гидродинамический ввод пробы 5с×30мбар. Рабочее напряжение 20кВ. УФ-детектирование (214 нм).

1 – альбумин, 2 – миоглобин, 3 – лизоцим, 4 – инсулин.

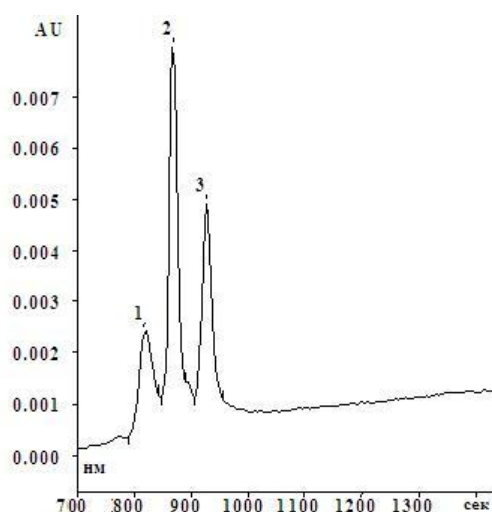


Рис. 63. Электрофореграмма смеси стандартов белков (1 мг/мл) на PLOT-колонке 25k-Mal-C. Буферный электролит: 100 мМ фосфатный буфер (pH=2,2). Гидродинамический ввод пробы 5с×30мбар. Рабочее напряжение 20кВ. УФ-детектирование (214 нм).

1 – альбумин, 2 – миоглобин, 3 – лизоцим.

Таблица 9. Сравнительные аналитические характеристики подготовленных *PLOT*-дендритных колонок

	Полимер А	Полимер В	Полимер С
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

Лучшие результаты по эффективности получены, на колонке, модифицированной сверхразветвленным полиэтиленимином структуры В, а наиболее сильный ЭОП наблюдался при проведении КЭХ на колонке, модифицированной полимером А (таблица 9). При этом стоит отметить, что при хранении колонок скорость электроосмотического потока уменьшалась в наибольшей степени для полимера структуры А (максимально функционализированный мальтозой сверхразветвленный полиэтиленимин), что объясняется частичным гидролизом мальтозных фрагментов в водном растворе.

Большая селективность разделения для трудно разделяемой пары белков *альбумин-миоглобин* получена на колонке с полимером С. При этом следует отметить, что инсулин (белок с наименьшей молекулярной массой) не достигал окна детектирования, вероятно за счет образования наиболее прочного комплекса его с полимером С.

Подобная картина наблюдалась и при динамическом покрытии капилляра полимером С. В процессе работы полимерный адсорбированный слой постепенно вымывался, и регистрировался пик инсулина, что подтверждает наше предположение (Рисунок 64).

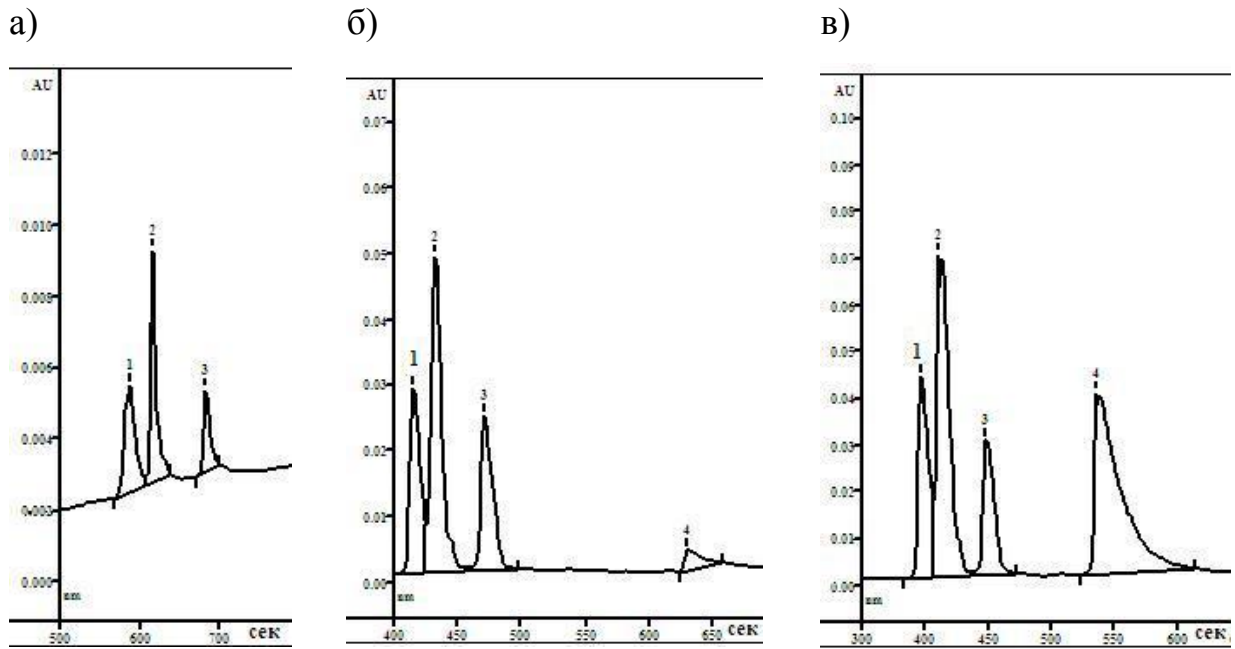


Рис. 64. Электрофореграммы смеси стандартов белков на динамически модифицированной PEI-25k-Mal-C колонке

а) после 1 анализа, б) после 4 анализов, в) после 5 анализов.

Ввод пробы: $5\text{с} \times 30\text{мбар}$. $\underline{\text{КЭ}}$: 20кВ; $\lambda=214\text{ нм}$;

рабочий электролит: 100 мМ фосфатный буфер (рН 2,2).

1 – альбумин, 2 – миоглобин, 3 – лизоцим, 4 – инсулин.

Исходя из результатов всех предыдущих экспериментов, а также принимая во внимание меньшее время анализа, для дальнейшей работы выбран полимер структуры А с массой ядра 25 кДа полимер с наиболее плотной мальтозной оболочкой.

Для независимого подтверждения отсутствия сорбции белков на поверхности СРП проведен ряд специальных экспериментов методом эллипсометрии.

ГЛАВА 6. ЭЛЛИПСОМЕТРИЯ

Оставался нерешенным вопрос: не происходит ли на модифицированной полимером поверхности капилляра сорбция белков, приводящая к потерям аналитов в процессе анализа?

Для ответа на этот вопрос нами проведен ряд независимых экспериментов методом эллипсометрии [73].

Для исследования методом эллипсометрии в качестве модели внутренней поверхности кварцевого капилляра использовалась кремниевая пластина. Поскольку кварц и биоорганические среды имеют весьма близкие значения показателя преломления (n , значит, и низкий оптический контраст), выбранным модельным объектом стала кремниевая поверхность. Поверхность кремния в реальных условиях всегда покрыта оксидной пленкой (2-3 нм) и может рассматриваться в первом приближении, как аналог кварцевой поверхности. Кремний же в качестве подложки дает хороший контраст с биоорганическими покрытиями и позволяет измерять толщину последних до размеров в нескольких нм.

Для измерения адсорбции белков на поверхности сверхразветвленного полиэтиленimina, модифицированного мальтозой, проводили процедуру синтеза пленки полимера на поверхности кремниевой пластинки. Для этого после травления на поверхность пластинки с помощью спин-коатера наносилась смесь, содержащую полимер с максимальным содержанием олигосахаридных фрагментов (структура А. Рисунок 48) и лимонную кислоту, в качестве сшивающего агента (Рисунок 65). В результате по данным эллипсометрического анализа формировался слой полимера толщиной ~ 20 нм.

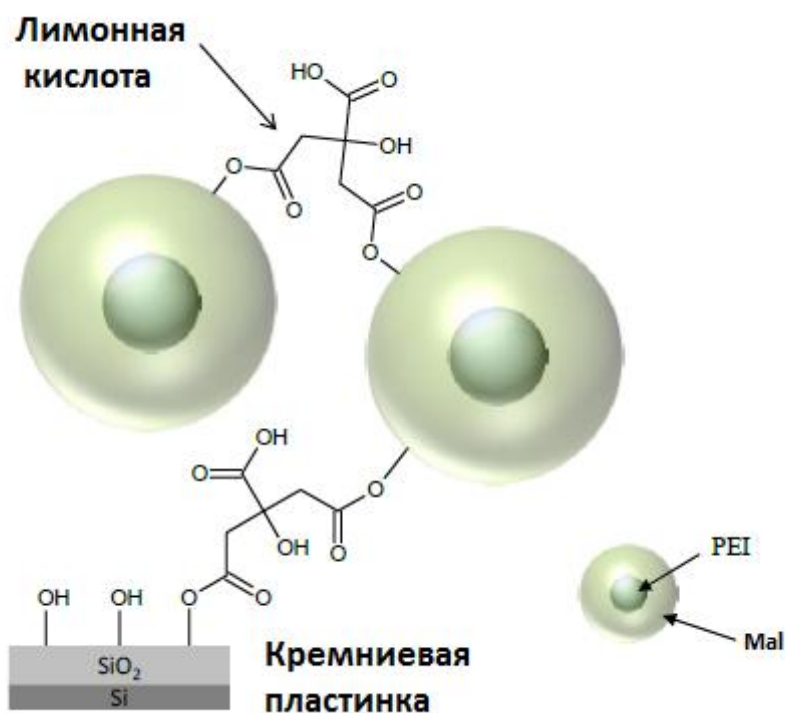


Рис. 65. Структура полимерной пленки на поверхности кварцевой пластины. PEI – сверхразветвленный полиэтиленимин, Mal – мальтозные фрагменты.

Возможность адсорбции белков (*альбумин, инсулин, миоглобин и лизоцим*) на поверхности (PEI-Mal A25) полимерной пленки изучалась при различных значениях pH рабочего буфера (2,2 и 8,5).

Для этого кремниевая пластинка со слоем полимера помещалась в буферные растворы - фосфатный (pH 2,2) или боратный (pH 8,5), и *in situ* эллипсометр регистрировал изменение толщины пленки в течение 10 ч (Рисунок 66 А, 66 Б); (таблица 10, 11) до достижения постоянного значения.

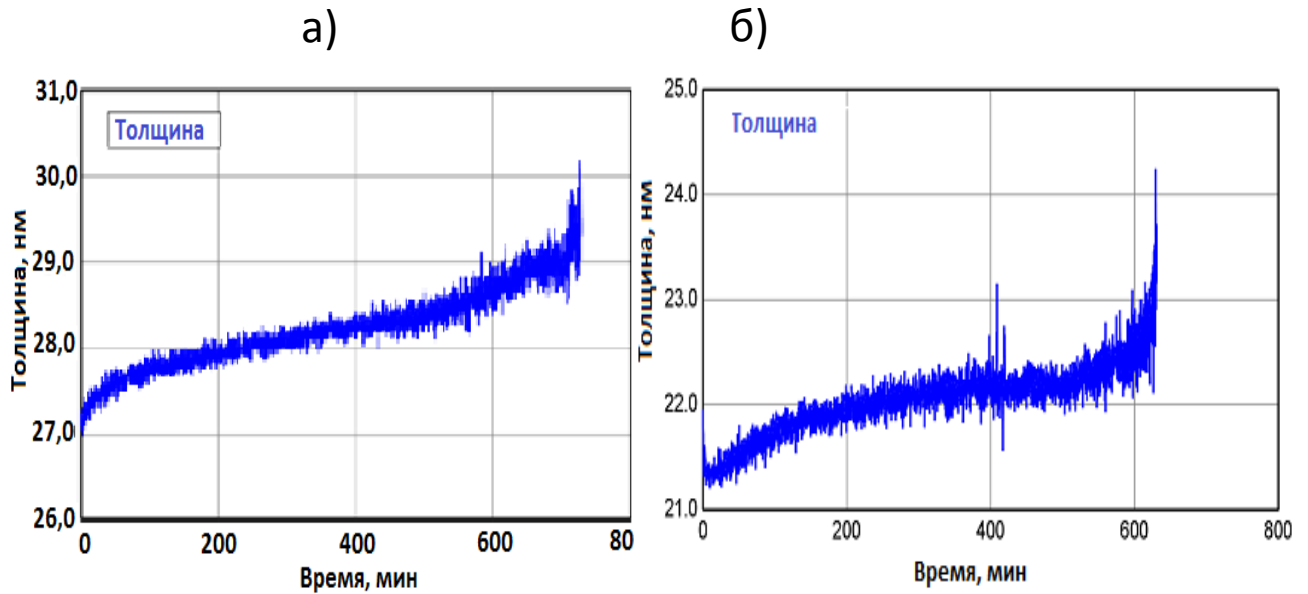


Рис. 66. Типичное набухание *in situ* полимерной пленки в а) фосфатном буферном растворе (рН=2,2); б) в боратном буферном растворе (рН=8,5) при 25°C.

Таблица 10. Значение толщины ($d_{эфф}$) и показателя преломления (n) сухого и набухшего полимерного слоя в фосфатном буфере (рН=2,2)

Толщина полимерной пленки*, 0,1М фосфатный буферный раствор, рН=2,2					
№	Перед набуханием (высушенная пластина), нм	После набухания (высушенная пластина), нм	Δd , нм	d набухшего (в буферном растворе), нм	n - набухшего
1	20,64	20,15	0,49	28,93	1,486
2	21,56	20,72	0,84	29,44	1,480
3	21,03	20,85	0,18	28,01	1,486

* Погрешность измерения толщины пленки составляет 0,5 нм (по паспорту прибора).

Таблица 11. Толщина ($d_{эфф}$) и показатель преломления (n) сухого и набухшего полимерного слоя в боратном буфере (рН=8,5)

Толщина полимерной пленки*, 0,1М боратный буферный раствор, рН=8,5					
№	Перед набуханием (высушенная пластина), нм	После набухания (высушенная пластина), нм	Δd, нм	d набухшего (в буферном растворе), нм	n- набухшего
1	20,64	19,08	1,56	29,17	1,498
2	19,38	17,95	1,43	28,27	1,498
3	20,59	20,25	0,34	30,34	1,493

* Погрешность измерения толщины пленки составляет 0,5 нм (по паспорту прибора).

Из таблицы 10,11 следует, что полимерный слой стабилен, т.е. изменение толщины слоя незначительно и составляет не более 2 нм за 10 ч. При этом изменение толщины слоя в течение одного эксперимента (2 ч) находится в пределах погрешности (0,5 нм).

Это позволило измерять адсорбцию белков после 30-минутного процесса набухания и получать результаты в пределах погрешности эксперимента. В ходе эксперимента в кювету объемом 3 мл, содержащую исследуемую пластину с уже набухшим полимером и буферный электролит (2970 мкл), добавлялся раствора белка (30 мкл) с концентрацией 10 мг/мл ($C_{\text{белка}}=0,1$ мг/мл в кювете).

Адсорбция белка на полимерной пленке *in situ* исследовалась эллипсометрически в течение 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 эллипсометрии. Пример результатов эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка представлен на Рисунке 67.

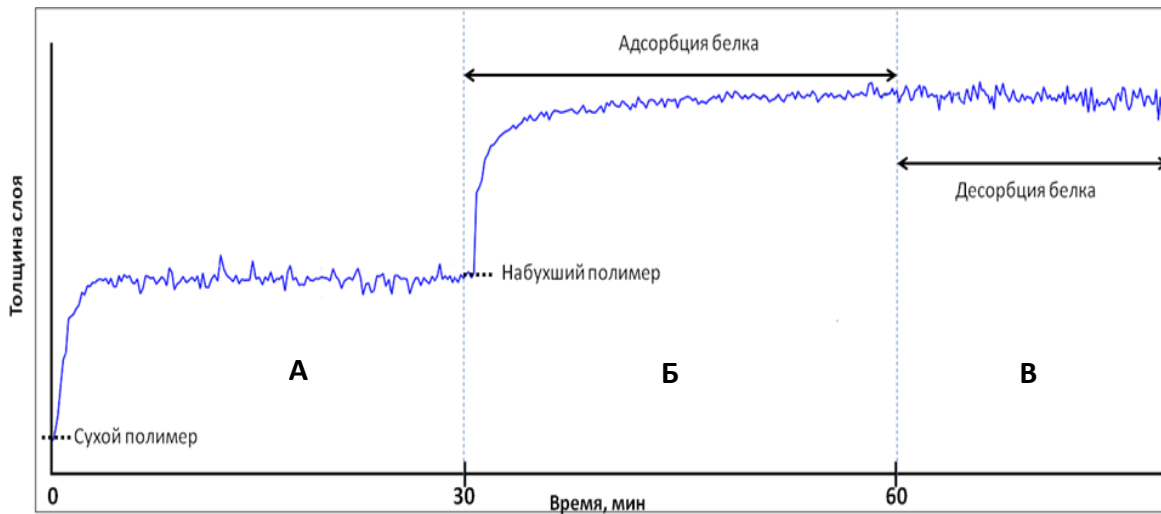


Рис. 67. Результат эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка методом эллипсометрии. **А** – первый этап: набухание полимерной пленки; **Б** – второй этап: процесс адсорбции белка; **В** – третий этап: процесс десорбции белка.

В экспериментах с использованием фосфатного буферного электролита (рН 2,2) молекулы белка и полимера находятся в катионной форме (Рисунок 68) за счет протонирования аминогрупп. Это приводит к электростатическому отталкиванию между ними.

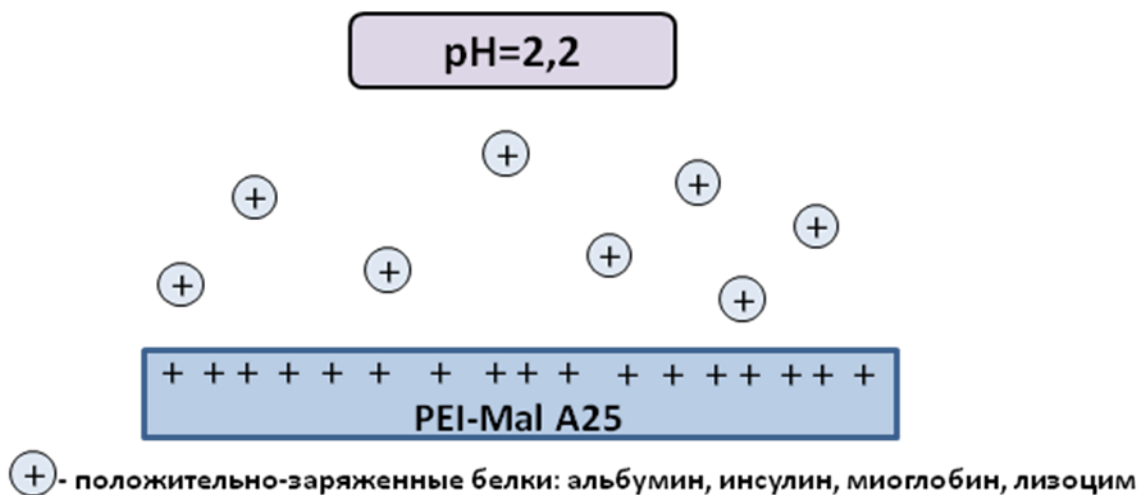


Рис. 68. Адсорбция белков на поверхности полимерной пленки при рН=2,2.

Из таблицы 12 видно, что количество адсорбированного белка не превышает 1 мг/м^2 , что соответствует $< 0,1\%$ от общего содержания белка в растворе. Таким образом, в этих условиях количественных потерь белков при их электрохроматографическом определении практически не происходит.

Таблица 12. 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	2,80	0,7	1	2,07	0,5
	2	3,10	0,7	2	2,25	0,5
	3	3,10	0,7	3	3,02	0,7
	4	1,90	0,5	4	2,33	0,6
	5	2,10	0,5	5	2,54	0,6
	6	2,00	0,5	-		
	7	1,90	0,5			
СКО, %	22,1%			13,4%		
Лизоцим	1	1,90	0,5	1	17,90	4,3
	2	1,60	0,4	2	12,10	2,9
	3	1,50	0,4	3	13,90	3,3
	4	1,70	0,4	4	16,40	3,9
	5	1,60	0,4	-		
	6	1,80	0,4			
	7	1,20	0,3			
СКО, %	13,49%			14,95%		
Инсулин	1	2,00	0,5	1	1,00	0,3
	2	1,80	0,4	2	1,50	0,4

	3	1,60	0,4	3	2,00	0,5
	4	1,50	0,4	-		
СКО, %	10,80%			26,15%		
Миоглобин	1	5,00	1,2	1	1,00	0,2
	2	4,00	1,0	2	0,40	0,1
	3	3,60	0,9	3	0,90	0,2
СКО, %	14,19%			34,23%		

В другом случае ($pH=8,5$) только один белок (*лизоцим*) имеет противоположный полимеру заряд. Полимер, альбумин, миоглобин и инсулин заряжены отрицательно, а лизоцим – положительно (Рисунок 69).

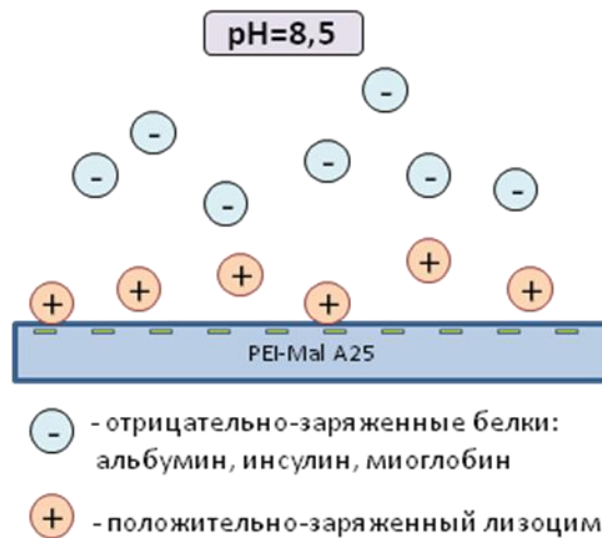


Рис. 69. Адсорбция белков на поверхности полимерной пленки при $pH=8,5$.

В данном варианте толщина слоя адсорбированного лизоцима оказалась равной ~ 18 нм (это соответствует 4 мг/м^2 , или $0,4\%$, от общего содержания белка в растворе). Процесс адсорбции протекает достаточно быстро (<1 мин), после чего толщина пленки практически не меняется. Наблюдаемая адсорбция необратима: десорбция белков с поверхности полимера при замене раствора белка на чистый буферный электролит не наблюдалась.

На Рисунках 70 и 71 приведены графические зависимости толщины белкового слоя на поверхности полимера после адсорбции, а также первичной и

вторичной замены буферного электролита (*измерение десорбции*), содержащего белок на чистый буферный электролит при рН 2,2 и 8,5 соответственно.

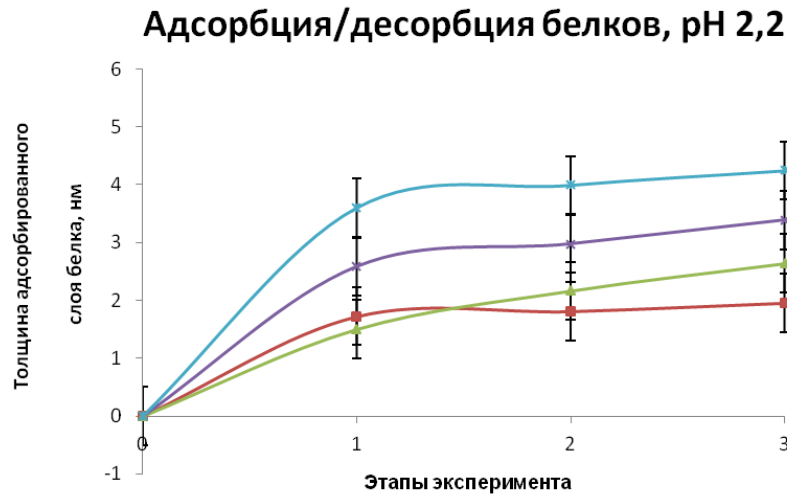


Рис. 70. Изменение толщины белкового слоя на поверхности полимера при рН=2,2.

□ — инсулин, ◇ — миоглобин, × — альбумин, Δ — лизоцим.

Этапы: 0 — набухший слой полимера, 1 — адсорбция белков, 2 — десорбция, 3 — повторная десорбция.

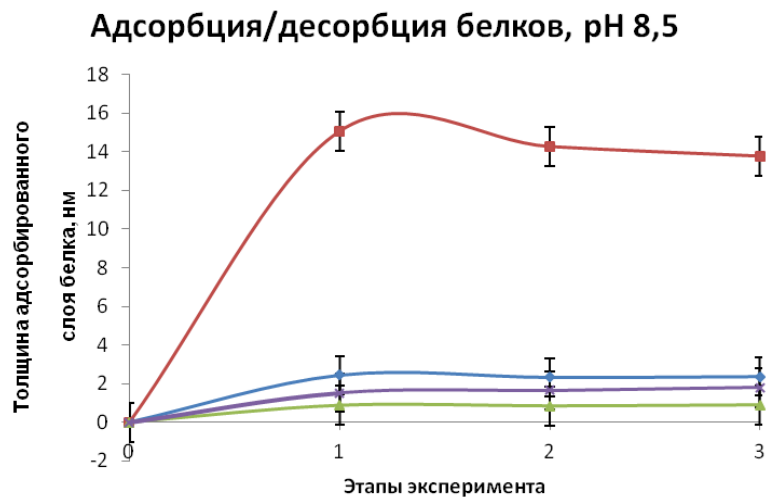


Рис. 71. Изменение толщины белкового слоя на поверхности полимера при рН 8,5. □ — лизоцим, ◇ — альбумин, × — инсулин, Δ — миоглобин.

Этапы: 0 — набухший слой полимера, 1 — адсорбция белков, 2 — десорбция, 3 — повторная десорбция.

На основании полученных результатов можно заключить, что полимерный слой на внутренней поверхности кварцевого капилляра действительно препятствует адсорбции белков и является перспективной стационарной фазой в условиях капиллярной электрохроматографии.

ГЛАВА 7. *ON-LINE* КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В УСЛОВИЯХ КАПИЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОХРОМАТОГРАФИИ НА *PLOT-PEI-MAL* КОЛОНКАХ

Другая проблема при электрофоретическом разделении белков – высокие пределы обнаружения аналитов, затрудняющие использование КЭХ в практике клинической медицины. Решением таких проблем мог быть поиск новых вариантов *on-line* концентрирования, включая комбинирование различных механизмов, позволяющих получать сопоставимые с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) отношения сигнал/шум. Традиционно для концентрирования аналитов в КЭ используют стэкинг, свипинг и динамический рН скачок. В данной работе уделено особое внимание таким вариантам *on-line* концентрирования как стэкингу с большим объемом образца (LVSS), LVSS с «водной пробкой» и электростэкингу.

Как уже отмечалось, лучшее разделение белков наблюдалось при рН рабочего буфера 2,2. В этих условиях поверхность капилляра, покрытого сверхразветвленным полиэтиленимином, заряжена положительно, что, в свою очередь, генерирует отрицательный электроосмотический поток. При этом белки электрофоретически мигрируют к катоду, поскольку аналиты имеют большой положительный заряд.

В КЭ различают два способа ввода пробы:

- гидродинамический,
- электрокинетический.

Ввод пробы давлением (гидродинамический) обеспечивается созданием разницы давлений между сосудом для пробы и выходным концом капилляра, при этом давление либо повышается в сосуде для пробы, либо снижается на конце капилляра. Объем вводимой пробы зависит только от разницы давлений и времени ввода пробы; при временах 3-7 с разность значений давлений лежит в области нескольких миллибар (1000 мбар). Не зная строгого объема введенной

пробы, мы, тем не менее, всегда уверены в точности дозирования, поскольку все системы КЭ оперируют величиной произведения давления на время ввода. Гидродинамический способ ввода не нарушает состав пробы. Это позволяет проводить дозирование из одной пробирки несколько раз.

Электрокинетический ввод пробы. При данном способе ввод пробы осуществляется путем подачи высокого напряжения на электроды, когда на входе установлена пробирка с раствором пробы, а на выходе — с рабочим буфером. За счет возникающего при этом ЭОП компоненты пробы поступают в капилляр. Количество введенной пробы зависит от величины приложенного напряжения, времени, в течение которого оно приложено, и подвижности компонентов пробы. Особенностью такого ввода пробы является и то, что компоненты с большей подвижностью будут концентрироваться эффективнее по сравнению с малоподвижными ионами, которые в случае недостаточного времени ввода, вообще могут не попасть в капилляр.

Таким образом, по сравнению с гидродинамическим вариантом мы имеем в большей или меньшей степени дифференциацию состава пробы в капилляре и в исходном растворе. Это означает, что электрокинетический способ ввода пробы подразумевает только однократный ввод образца из одной пробирки. Этот вариант является наименее воспроизводимым [76].

Для анализа белков, содержащихся в низких концентрациях в биологических жидкостях, нами испытано и реализовано несколько вариантов *on-line* концентрирования белков с использованием стэкинга с большим объемом вводимого образца (LVSS) и его комбинацию с электростэкингом (FESI-LVSS), т.е. концентрированием пробы в процессе электрокинетического ввода пробы.

7.1. Стэкинг с большим объемом образца (LVSS – *large volume sample stacking*).

Изучены возможности стэкинга без переключения полярности (LVSS, *large volume sample stacking*). При этом выполнялись условия: направление движения всей массы раствора противоположно электрофоретическому движению ионов

аналитов, и скорость движения рабочего буфера меньше скорости электрофоретической миграции ионов аналита.

Важным обстоятельством является то, что LVSS вариант концентрирования позволяет вводить значительно больший объем образца, чем обычно.

Так, большой объем образца, растворенного в слабопроводящей матрице (в водном растворе или разбавленном буфере), вводили в покрытый полимером капилляр, который предварительно заполнялся буферным электролитом с $\text{pH} < 7$.

Поскольку определяемые белки в этих условиях имеют положительный заряд, они мигрируют к катодному концу капилляра под действием электрического поля, а противоположно направленный ЭОП выталкивает из капилляра матрицу (Рисунок 72). Это способствует концентрированию положительно заряженных аналитов на границе водного и буферного растворов.

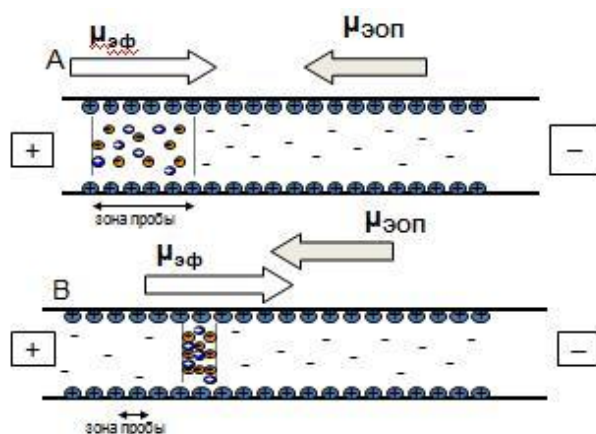


Рис. 72. Схема стэкинга с большим объемом пробы без переключения полярности.

Достигнуты высокие степени концентрирования (таблица 13). Пределы обнаружения составили 2,5 мкг/мл.

Выбор условий стэкинга проводился с учетом концентрации смеси белков и влияния времени ввода на эффективность (Рисунок 73).

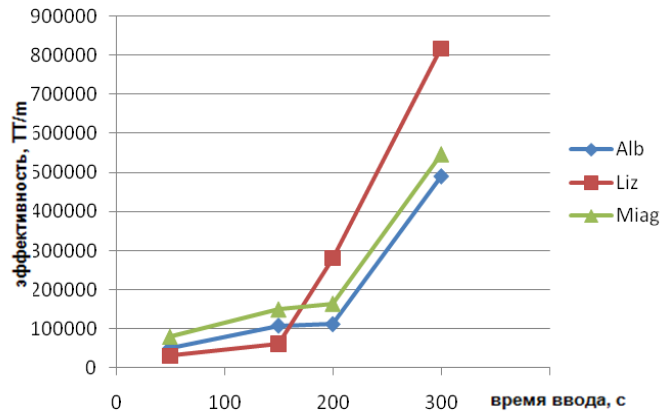


Рис. 73. Влияние времени ввода на эффективность.

Аналиты: смесь стандартов белки (25 мкг/мл)

Использование метода LVSS на PEI-Mal покрытых колонках привело к 50 - 79- кратному увеличению чувствительности и снижению пределов обнаружения до 1.0-2.5 мкг/мл (таблица 13). При этом следует отметить, что селективность разделения альбумина и миоглобина значительно снизилась при увеличении ввода выше 300 с (Рисунки 74, 75).

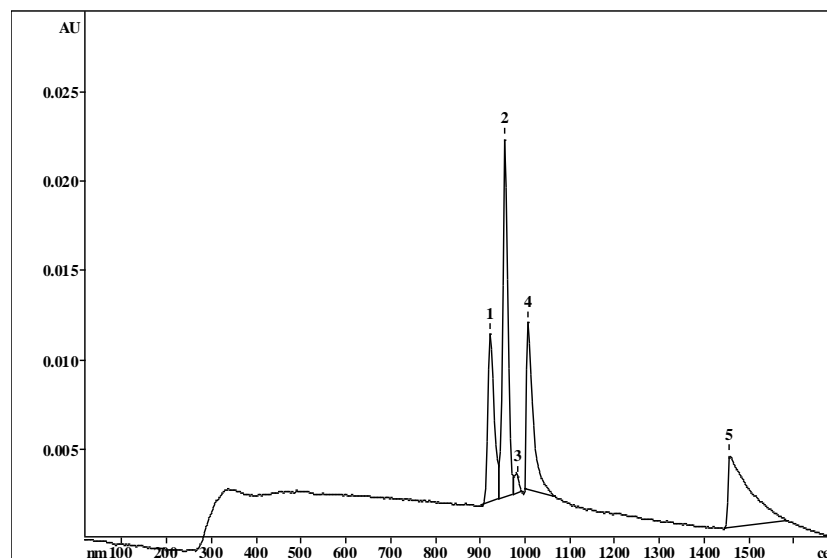


Рис. 74. Электрофореграмма смеси белков (25 мкг/мл) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25.

Условия: -20кВ, -84-97мкА. Рабочий электролит: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,2); ввод пробы: 300 с×30 мбар. УФ: 214 нм;

1 – альбумин, 2 – лизоцим, 3 – миоглобин, 4 – инсулин;

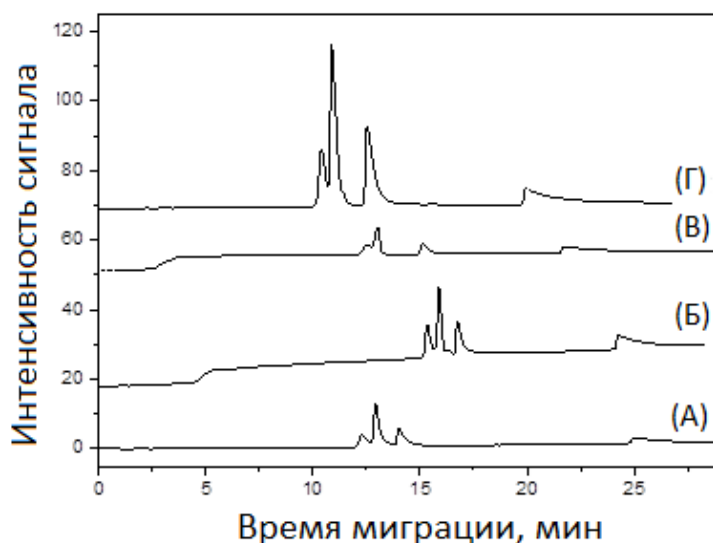


Рис. 75. Влияние *on-line* концентрирования на интенсивность аналитических сигналов белков.

Разделение четырех основных белков (рН=2,2) с использованием колонки модифицированной PEI-Mal A.

а) без концентрирования, ввод 2 с; концентрация белков 1 мг/мл;

б) LVSS, ввод: 300 с, концентрация белков: 25 мкг/мл;

с) LVSS с водной пробкой: ввод «водной пробки» (30 с); ввод образца 300 с; концентрация белков 10 мкг/мл;

г) LVSS с водной пробкой и электрокинетическим вводом образца; ввод 90 с × 10 кВ, концентрация белков 10 мкг/мл;

порядок миграции белков: альбумин, лизоцим, миоглобин, инсулин.

Условия: 77-93 мА; -20 кВ; капилляр, 45.5 см × 50 мкм (внутренний диаметр) (эффективная длина, 38 см); рабочий буфер, 100 мМ фосфатный буферный раствор, рН 2,2; детектирование при 214 нм.

7.2. Стэкинг с большим объемом образца с водной пробкой

Для увеличения эффективности концентрирования был испытан *стэкинг LVSS с использованием «водной пробки»*. Наличие водной пробки, предварительно введенной на вход колонки, создает дополнительную зону низкой проводимости и сильного электрического тока и облегчает миграцию и концентрирование заряженных аналитов на границе раздела фаз. Такой процесс концентрирования позволяет повысить чувствительность метода.

Для выбора оптимальных условий варьировали следующие параметры: время ввода «водной пробки» (10-30 с); время ввода анализируемой пробы (10 - 300 с).

Оптимальными для данного варианта стэкинга оказались следующие условия: 30 с «водная пробка», 300 с гидродинамический ввод пробы (Рисунок 76).

Предел детектирования устанавливался экспериментально (соотношение сигнал/шум=3): для белков с использованием стэкинга LVSS с водной пробкой он составил 1–2 мкг/мл (таблица 13). Использование гидродинамического ввода незначительно увеличило эффективность, что не позволило нам добиться значительного увеличения степени концентрирования.

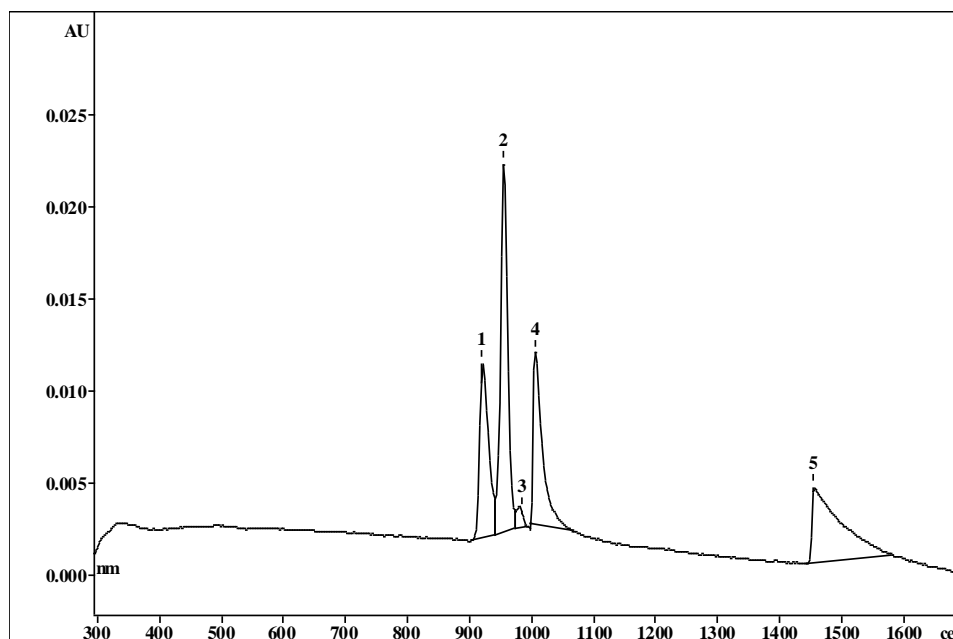


Рис. 76. Электрофореграмма смеси белков (25 мкг/мл) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25.

Ввод пробы: вода 30 с×30 мбар, проба 300 с×30 мбар.

Остальные условия см. Рисунок 74.

Наличие водной пробки непосредственно перед вводом образца в колонку также способствовало снижению пределов обнаружения до уровня 1.0-1.5 мкг/мл.

7.3. Стэкинг с большим объемом образца с электростэкингом

Концентрирование пробы в процессе электрокинетического ввода пробы называется *электростэкингом*. В этом варианте аналиты концентрируются на границе между низкопроводящей зоной и буферным электролитом: катионы концентрируются без переключения полярности; для стэкинга анионов используют отрицательную полярность.

Важно отметить, что с использованием электростэкинга можно эффективно сконцентрировать только катионные или анионные аналиты, и при этом в большей степени – ионы с высокой электрофоретической подвижностью. Достижимые степени концентрирования оказались больше по сравнению со значениями, полученными при гидродинамическом вводе пробы.

Для оптимизации условий стэкинга варьировали время электрокинетического ввода пробы (1-100 с), напряжение (10-20 кВ), состав раствора пробы (разбавленный буфер, вода).

Значительное снижение пределов обнаружения было достигнуто с применением метода FESI-LVSS. Так, пределы детектирования оказались в диапазоне значений 100 - 500 нг/мл, что давало 340 – 1320-кратное увеличение чувствительности и обеспечивало возможность проведения количественного анализа белков в биологических образцах (образцах мочи и крови человека).

Требуемые результаты получены с использованием следующих условий: ввод пробы 90с, напряжение 15 кВ (Рисунок 77, приложение 3).

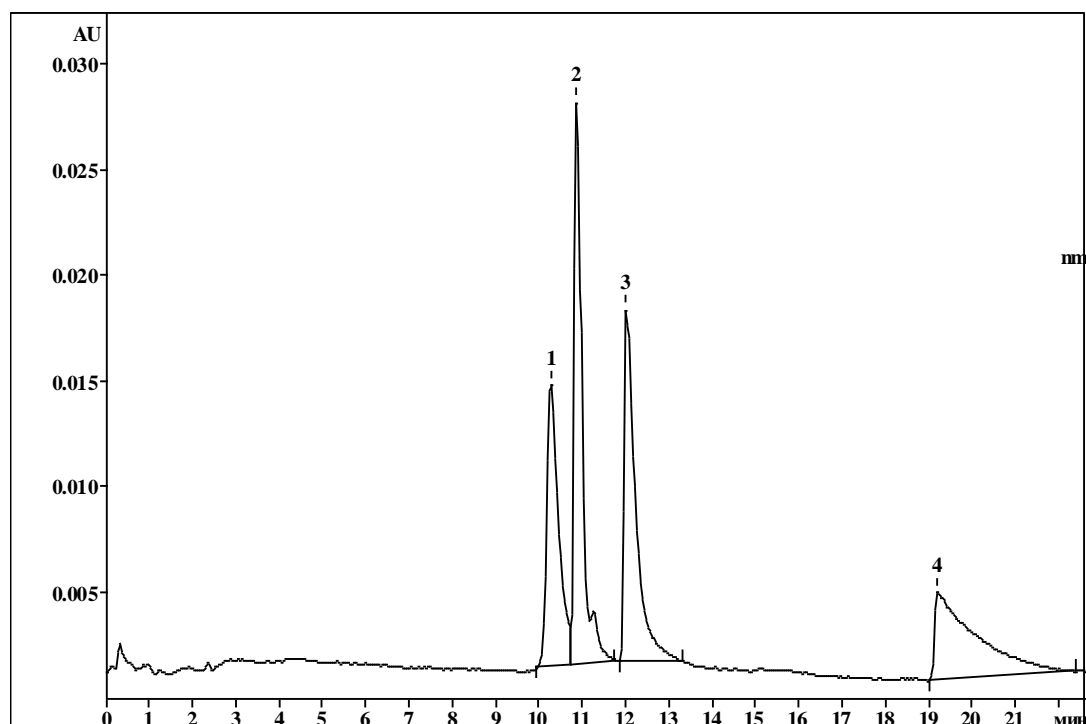


Рис. 77. Электрофореграмма смеси белков (**500 мкг/мл**) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25.

Ввод пробы: $2 \text{ с} \times 10 \text{ кВ}$. Остальные условия см. Рисунок 74.

Данный вариант стэкинга позволил уменьшить пределы обнаружения белков до 100 нг/мл (таблица 13).

Таблица 13. Результаты *on-line* концентрирования белков с использованием PLOT- колонок; стационарная фаза - сверхразветвленные полимеры на основе полиэтиленimina с олигосахаридной оболочкой.

Вариант концентрирования	Определяемые компоненты			
	Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
Стэкинг с большими объемом вводимой пробы (LVSS)	<i>SEF_S (SEF_H)</i>			
	79 (110)	50(63)	56 (76)	68 (90)
	Условия: матрица пробы – вода, Гидродинамический ввод пробы (30 мбар, 300 с)			
	<i>ПО, мкг/мл</i>			
	2,0	1,0	2,0	2,5

Стэкинг с большим объемом вводимой пробы с «водной пробкой»	$SEF_S (SEF_H)$			
	81 (83)	62 (63)	60 (61)	82 (93)
	Условия: матрица пробы – вода, Гидродинамический ввод воды (10 кВ, 25с), Гидродинамический ввод пробы (30 мбар, 300 с)			
	$ПО, \text{мкг/мл}$			
	1,0	1,0	1,5	1,0
Электростэкинг с LVSS	$SEF_S (SEF_H)$			
	1320 (770)	970 (420)	1040 (570)	340 (280)
	Условия: матрица пробы – вода, Электрокинетический ввод пробы (15 кВ, 90 с)			
	$ПО, \text{мкг/мл}$			
	0,2	0,1	0,2	0,5

Более эффективным оказался вариант внутрикапиллярного концентрирования - *стэкинг с электрокинетическим вводом пробы*.

Таким образом, сочетание стэкинга LVSS с электростэкингом позволило определять белки на уровне концентраций в реальных образцах (0,1 мкг/мл) (Рисунки 78, 81).

7.4. Анализ реальных объектов

В найденных условиях с использованием PLOT-колонок с дендримерным покрытием (PEI-Mal) проведен анализ реальных объектов (*сыворотка крови и мочи*).

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.

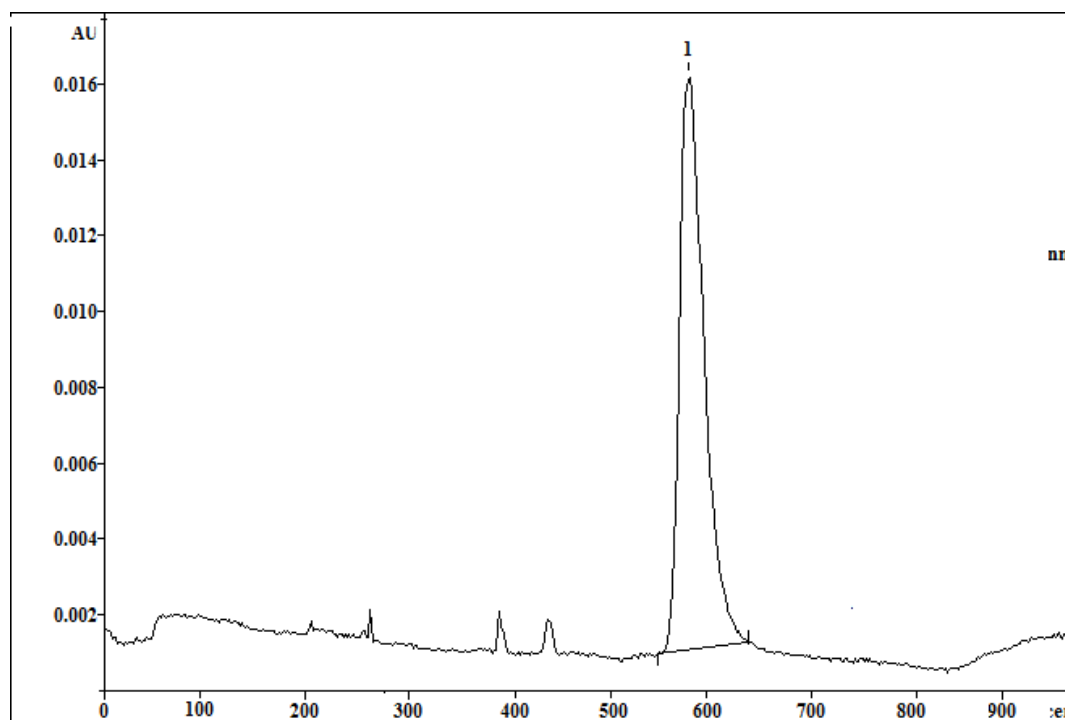


Рис. 78. Электрофореграмма сыворотки крови (разбавлена в 10 раз) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. Ввод пробы: 90 с×15 кВ.УФ: 214 нм. Условия анализа: -20кВ, -82-95мкА; рабочий электролит: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,2).

При анализе белков в моче задача осложняется тем, что в ней присутствуют низкомолекулярные компоненты самой разнообразной химической природы, включая пигменты, которые могут находиться в значительных концентрациях. Эти вещества поглощают при тех же длинах волн, что и белки (200-214 нм), влияя на их разделение, определение и воспроизводимость анализа. Поэтому перед электрофоретическим разделением белков необходима предварительная очистка биологического объекта (мочи): обессоливание и депигментация (Рисунок 35).

Указанные процедуры проводили на самопроточной мини колонке с гелем типа Sefadex G25 (с пределом исключения по белкам $M=10000$).

Электрофореграмма экстракта мочи представлена на Рисунок 79.

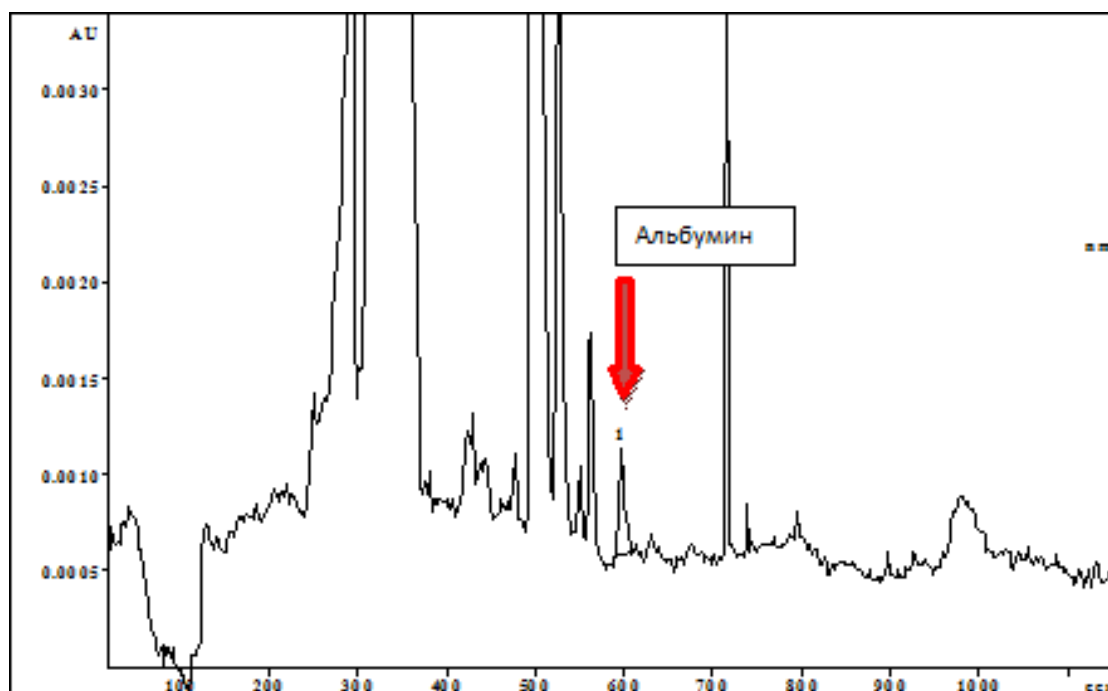


Рис. 79. Электрофореграмма обессоленной мочи (больной с синдромом Иценко-Кушинга) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. Объем пробы 2,5 мл. Остальные условия см. Рисунок 78.

1-альбумин.

Получены сравнительные аналитические характеристики разделения белков в условиях капиллярной электрохроматографии с использованием синтезированных *PLOT*-дендритных и *PLOT*-метакрилатных колонок, а также в условиях капиллярного зонного электрофореза (таблица 14).

В приложении 4 приведены соответствующие электрохроматограммы, полученные в условиях КЭХ и КЗЭ.

Таким образом, лучшие результаты (таблица 15) по эффективности и воспроизводимости параметров миграции для альбумина, лизоцима и миоглобина отмечены в режиме капиллярной электрохроматографии с использованием *PLOT*-колонок, модифицированных сверхразветвленными полимерами, для которых характерна и более простая процедура синтеза. При этом в случае инсулина наблюдается увеличение параметров миграции и уменьшение эффективности, что может быть вызвано возможными взаимодействиями с молекулами полимеров

PEI-Mal.

Таблица 14. Сравнительные оценочные характеристики методов КЗЭ и КЭХ при определении белков

Метод	КЗЭ	КЭХ	
		PLOT-PEI-Mal колонки	PLOT-метакрилатные колонки
Рабочий электролит	0,1М фосфатный буфер (рН 2,2)		0,1М Н ₃ РO ₄ (рН 2,2), 10% СH ₃ CN
Условия КЭ	-20кВ, ток -84-97мкА УФ: λ=214 нм		

Таблица 15. Сопоставление аналитических характеристик при электрофоретическом разделении белков методами КЭХ и КЗЭ.

Контролируемый параметр	КЗЭ	Полые колонки КЭХ		Монолитные колонки	МЭХХ
		Метакр.	PEI-Mal		
Эффективность разделения (т.т./м)	10-15 тыс.	56 тыс.	50÷70 тыс.	25÷35тыс.	А и В: 10÷30 тыс. С: до 10 ⁵ .
Предел обнаружения, мг/мл	1 – 0,5 (без конц.)	0,005-0,001 (с конц.)	0,0005 – 0,0001 (с конц.)	0,02÷0,06	А и В: 0,08÷0,10 С: 0,005
Время анализа, мин	10	25	20	10	А и В: 12 С: 30
Фактор селективности (α)	1,0-1,3	1,03	1,05÷1,10	1,5÷2,1	1,01÷1,04
Воспроизводимость параметров миграции (RSD, %)	2,8	1,8	1,0	1,5	0,8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. 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 мкг/мл, $N = 80000$ т.т./м).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

2DGE	–	двумерный	гель-электрофорез	(<i>two-dimensions</i>	<i>Gel</i>
<i>Electrophoresis</i>)					
AIBN	–	азо-бис-изобутиронитрил			
DPPH	–	1,1-дифенил-2-пикрилгидразил			
GMA	–	глицидилметакрилат			
FASI (<i>Field amplified sample injection</i>)	–	электростэкинг			
FASS (<i>field-amplified sample stacking</i>)	–	стэкинг с усилением поля			
HC-FASS (<i>head -column field-amplified sample stacking</i>)	–	стэкинг			с
усилением поля с водной пробкой					
LVSS (<i>large volume sample stacking</i>)	–	стэкинг с большим объемом образца			
MTS	–	(триметоксисил)пропиловый эфир метакриловой кислоты			
OT (<i>open-tubular</i>)	–	полая (колонка)			
Pamam-SBD	–	полиамидоаминный дендример			
PEI	–	полиэтиленимин			
PEI-Mal	–	сверхразветвленный полиэтиленимин, модифицированный мальтозой			
PEI-Mal A5	–	сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 5000 Да, M_n 3600 Да), степень функционализации мальтозой 90%			
PEI-Mal A25	–	сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 25000 Да, M_n 9600 Да), степень функционализации мальтозой 90%			

PEI-Mal B5 – сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 5000 Да, M_n 3600 Да), степень функционализации мальтозой 40%

PEI-Mal B25 – сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 25000 Да, M_n 9600 Да), степень функционализации мальтозой 40%

PEI-Mal C5 – сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 5000 Да, M_n 3600 Да), степень функционализации мальтозой 20%

PEI-Mal C25 – сверхразветвленный полиэтиленимин (M_w 25000 Да, M_n 9600 Да), степень функционализации мальтозой 20%

pH-mediated stacking – *стэкинг с изменением pH*

PLOT – колонки с иммобилизованным пористым слоем (*porous-layer open-tubular*)

PLOT-PEI-Mal – капиллярные колонки с иммобилизованным тонким слоем полиэтиленимина, модифицированного мальтозой

SEF (stacking efficiency factor) – фактор эффективности концентрирования

БМА – бутилметакрилат

БФАДМА – *бис*-фенолдиметакрилат

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

ДДСН – додецилсульфат натрия

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – N,N-диметилформаид

КЗЭ	–	капиллярный зонный электрофорез
КЭХ	–	капиллярная электрохроматография
МЭКХ	–	мицеллярная электрокинетическая хроматография
МЭС	–	моно-(2-(метакрилоилокси)-этилсукцината
ОТ-КЭХ	–	капиллярная электрохроматография на полых колонках
ПАУ	–	полициклические ароматические углеводороды
ПАВ	–	поверхностно-активные вещества
Поли-ε-НУЛ	–	поли- ε-натрий-ундеканойлизинат
СРП	–	сверхразветвленные полимеры
ЭДМА (EGDMA)	–	этиленгликольдиметакрилат
ЭОП	–	электроосмотический поток

On-line концентрирование: внутрикапиллярное концентрирование

Sweeping – свипинг: концентрирование аналитов *псевдостационарной* фазой (мицеллами или комплексообразующими веществами), которая проникает в зону образца, не содержащую мицелл.

Дендриграфты: разветвленная полимерная архитектура, промежуточная между дендримерами и СРП

Дендример: высокоорганизованные, трехмерные, монодисперсные полимеры с деревообразной, глобулярной структурой и большим числом функциональных групп

Микроальбуминурия: появление в моче небольшого уровня альбумина (более 20мг/л).

Протеомика: наука, основным предметом изучения которой являются белки, их функции и взаимодействия в живых организмах, в том числе — в человеческом.

Эллисометрия: высокочувствительный оптический метод исследования поверхностей и границ раздела различных сред (твердых, жидких, газообразных), основанный на изучении изменения состояния поляризации света после взаимодействия его с поверхностью границ раздела этих сред.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А., Карцова Л.А., Потолицына В.Е. Исследование возможностей новых сверхразветвленных полимеров в качестве *псевдостационарных* фаз в электрокинетической хроматографии при определении белков // Ж. Вестник СПбГУ. 2011. Сер. 4, вып. 1. С. 100-106.
2. Capillary electrochromatography of peptides and proteins. Review / Y. Li [et al.] // Electrophoresis. 2004. V. 25. P. 2242–2256.
3. Capillary Electrochromatography: A Review / M.M. Robson [et al.] // J. of Microcolumn Separations. 1997. V.9. P. 357-372.
4. Wen E., Asiaie R., Horvath Cs. Dynamics of capillary electrochromatography: II. Comparison of column efficiency parameters in microscale high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography // J. Chromatogr. A. 1999. V. 855. P. 349–366.
5. Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography / T. Jiang [et al.] // J. Chromatogr. A. 2001. V. 923. P. 215–227.
6. Xiang R., Horvath Cs. Fundamentals of capillary electrochromatography: migration behavior of ionized sample components // J. Anal. Chem. 2002. V. 74. P.762–770.
7. Rathore A.S., Horvath Cs. Separation parameters via virtual migration distances in high-performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and electrokinetic chromatography // J. Chromatogr. A. 1996. V. 743. P. 231–246.
8. Vissers J.P.C., Claessens H.A., Coufal P. Calculation of retention factors in capillary electrochromatography from chromatographic and electrophoretic data // J. High Resol. Chromatogr. 1995. V. 18. P. 540–544.

9. Bowser M.T., Chen D.D.Y. The effect of complexation additives on analyte migration behavior in capillary electrochromatography // *J. Electrophoresis*. 1998. V. 19. P. 1452–1460.
10. Zhang J., Zhang S., Horvath Cs. Capillary electrochromatography of peptides on a column packed with tentacular weak cation-exchanger particles // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 953. P. 239-249.
11. Zhang J., Zhang S., Horvath Cs. Rapid separation of peptides and proteins by isocratic capillary electrochromatography at elevated temperature // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 914. P. 189-200.
12. Xiang R., Horvath Cs. Fundamentals of capillary electrochromatography: migration behavior of ionized sample components // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 762-770.
13. Schweer C., Kenndler E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta potential // *J. Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 1801-1807.
14. Pretorius V., Hopkins B. J., Schieke J. D. Electroosmosis. New concept for high speed liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1974. V 99. P. 23–30.
15. Deyl Z., Svec F. *Capillary Electrochromatography* // Elsevier. Amsterdam 2001. V 62. 435 pp.
16. Tsuda T., Nomura K., Nakagawa G. Open-tubular microcapillary liquid chromatography with electro osmosis flow using a UV detector // *J. Chromatogr.* 1982. V. 248. P. 241–247.
17. de Zeeuw J., Luong J. Developments in stationary phase technology for gas chromatography // *J. Trends Anal. Chem.* 2002. V. 21. P. 594– 607.
18. Knox J. H., Gilbert M. T. Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1979. V. 186. P. 505
19. Guiochon G., Horváth C. S. *HPLC- Advances and Perspectives* // Academic Press. New York. 1980. P. 1–93.

20. Huang X., Zhang J., Horváth C. Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns // *J.Chromatogr.* 1999. V. 858. P. 91–101.
21. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography / E.C. Peters [et al.] // *J. Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 3646–3649.
22. Li Y., Xiang R., Wilkins J. A., Horváth C. Capillary electrochromatography of peptides and proteins // *J. Electrophoresis.* 2004. V. 25. P. 2242–2256.
23. Capillary electrophoresis-based separation techniques for the analysis of proteins / Y. F. Huang [et al.] // *J. Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 3503–3522.
24. Bandilla D., Skinner C. D. Capillary electrochromatography of peptides and protein // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 113–129.
25. Recent progress in polar stationary phases for CEC / J. J. Ou [et al.] // *J. Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 148–163.
26. Liu Z., Wu R. A., Zou H. F. Recent progress in adsorbed stationary phases for capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 3954–3972.
27. Hilder E. F., Svec F., Frechet J. J. Shielded Stationary Phases Based on Porous Polymer Monoliths for the Capillary Electrochromatography of Highly Basic Biomolecules // *J. Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 3887–3892.
28. Miller M. D., Baker G. L., Bruening M. L. Polymer-brush stationary phases for open-tubular capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 323–330.
29. Branched polyethyleneimine-bonded tentacle-type polymer stationary phase for peptides and proteins separations by opentubular capillary electrochromatography / X. Zhang [et al.] // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 3383–3391.
30. Kapnissi-Christodoulou C. P., Zhu X. F., Warner I. M. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography // *J. Electrophoresis.* 2003. V. 24. P. 3917–3934.

31. Recent progress of polar stationary phases in CEC and capillary liquid chromatography / X. L. Dong [et al.] // *J. Electrophoresis*. 2009. V. 30. P. 141–154.
32. Bhattacharya A., Misra B. N. Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications // *J. Prog. Polym. Sci.* 2004. V. 29. P. 767–814.
33. Rohr, T. Surface functionalization of thermoplastic polymer for the fabrication of microfluidic devices by photoinitiated grafting / T. Rohr, D.F. Ogeltree, F. Svec, J.M.J. Frechet // *Adv. Funct. Mater.* - 2003. V. 13. P. 264-270.
34. Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths / T. Rohr, E.F. Hilder, J.J. Donovan, F. Svec, J.M.J. Frechet // *Macromolecules*. 2003. V. 36. P. 1677-1684.
35. Svec. F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation // *J. Chromatogr. A*. 2010. V. 1217. P. 902-924.
36. Xu L., Sun Y. Fabrication and characterization of open-tubular CEC modified with tentacle-type metal-chelating polymer chains // *J. Electrophoresis*. 2007. V. 28. P. 1658–1667.
37. Xu L., Sun Y. Novel open tubular CEC with tentacle-type polymer stationary phase functionalized by phenylalanine // *J. Electrophoresis*. 2008. V. 29. P. 880–888.
38. Xu L., Sun Y. Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1183. P. 129–134.
39. Rogeberg M., Wilson S., Greibrokk T., Lundanes E. Separation of intact proteins on porous layer open tubular (PLOT) columns // *J. Chromatography A*. 2010. V.1217. P. 2782–2786.
40. Chen J., Lin Y-C. Succinyl methacrylate polymerized in porous-layered phases for open-tubular capillary electrochromatography: comparison with silica hydride monolayered phases // *J. Chromatography A*. 2010. V. 1217. P. 4328–4336.

41. Ou J., Gibson G., Oleschuk R. Fast preparation of photopolymerized poly(benzyl methacrylate-co-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography // *J. Chromatography A*. 2010. V. 1217. P. 3628–3634.
42. Lysine-Based Zwitterionic Molecular Micelle for Simultaneous Separation of Acidic and Basic Proteins Using Open Tubular Capillary Electrochromatography / L. Moore [et al.] // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 3997–4005.
43. Zaidi S.A., Cheong W. Preparation of an open-tubular capillary column with a monolithic layer of S-ketoprofen imprinted and 4-styrenesulfonic acid incorporated polymer and its enhanced chiral separation performance in capillary electrochromatography // *J. Chromatography A*. 2009. V. 1216. P. 2947–2952.
44. Xu L., Sun Y. Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows // *J. Chromatography A*. 2008. V. 1183. P. 129–134.
45. Fréchet J.M.J., Tomalia D.A. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers* // John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, UK. 2001. 647 pp.
46. Voit B. New developments in hyperbranched polymers // *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 2000. V.38. P. 2505–2525.
47. Voit B. Hyperbranched polymers-all problems solved after 15 years of research // *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 2005. V. 43. P. 2679–2699.
48. Hult A., Johansson M., Malmstrom E. Hyperbranched polymers // *J. Adv. Polym. Sci.* 1999. V. 143. P. 1–34.
49. Seiler. Review: Hyperbranched polymers: Phase behavior and new applications in the field of chemical engineering // *J. Elsevier*. 2006. V. 241. P. 155-174.
50. Unique behavior of dendritic macromolecules: intrinsic viscosity of polyether dendrimers / T.H. Mourey [et al.] // *J. Macromolecules* 1992. V. 25. P. 2401–2406.
51. Solid-state structure and properties of hyperbranched polyols / M. Rogunova [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, V. 77, P. 1207–1217.

52. Methods in Molecular Biology, vol. 276: Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides Edited by: M. A. Strege and A. L. Lagu © Humana Press Inc., Totowa, NJ. P.77-120.
53. Handbook of capillary electrophoresis applications / Edited by H. Shintani, Tokyo. Japan and J. Polonsky Slovakia Bratislava. Blackie academic and professional. P. 697/ (from 149)
54. Starburst dendrimers as carriers in electrokinetic chromatography / S. Terabe [et al.] // J. Chem. Lett. 1992. P. 959-962.
55. Chao, Hensen. Dendritic polymers as bonded stationary phases in capillary electrochromatography // J. Sep. Sci. 2002. V. 25. P. 345-350.
56. Pfeffer W. D., Yeung E. S. Electroosmotically driven electrochromatography of anions having similar electrophoretic mobilities by ion pairing // J. Chromatogr. 1991, V. 557. P. 125.
57. Analytical Separations Using Molecular Micelles in Open-Tubular Capillary Electrochromatography / C. Kapnissi [et al.] // J. Anal. Chem. 2002. V. 74. P. 2328.
58. Suresh B., Chung B. Capillary electrophoretic competitive immunoassay with laser-induced fluorescence detection for methionine-enkephalin // J. Chrom. A. 2006. V. 1111. P.133-138.
59. Маршалл В. Клиническая биохимия. // С.-Петербург. Бином. 1999. С.142-144.
60. Евгеньев М.И. Тест-методы и экология // Соросовский образовательный журнал. 1999. №11. С. 35-38.
61. Naldi M., Andrisano V. Histone proteins determined in a human colon cancer by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry // J. Chrom.A. 2006. V.1129. P. 73-81.
62. Huang Ch., Wang C. In vivo protein sampling using capillary ultrafiltration semi-permeable hollow fiber and protein identification via mass-spectrometry-based proteomics // J. Chrom. A. 2006. V. 1109. P. 144-151.

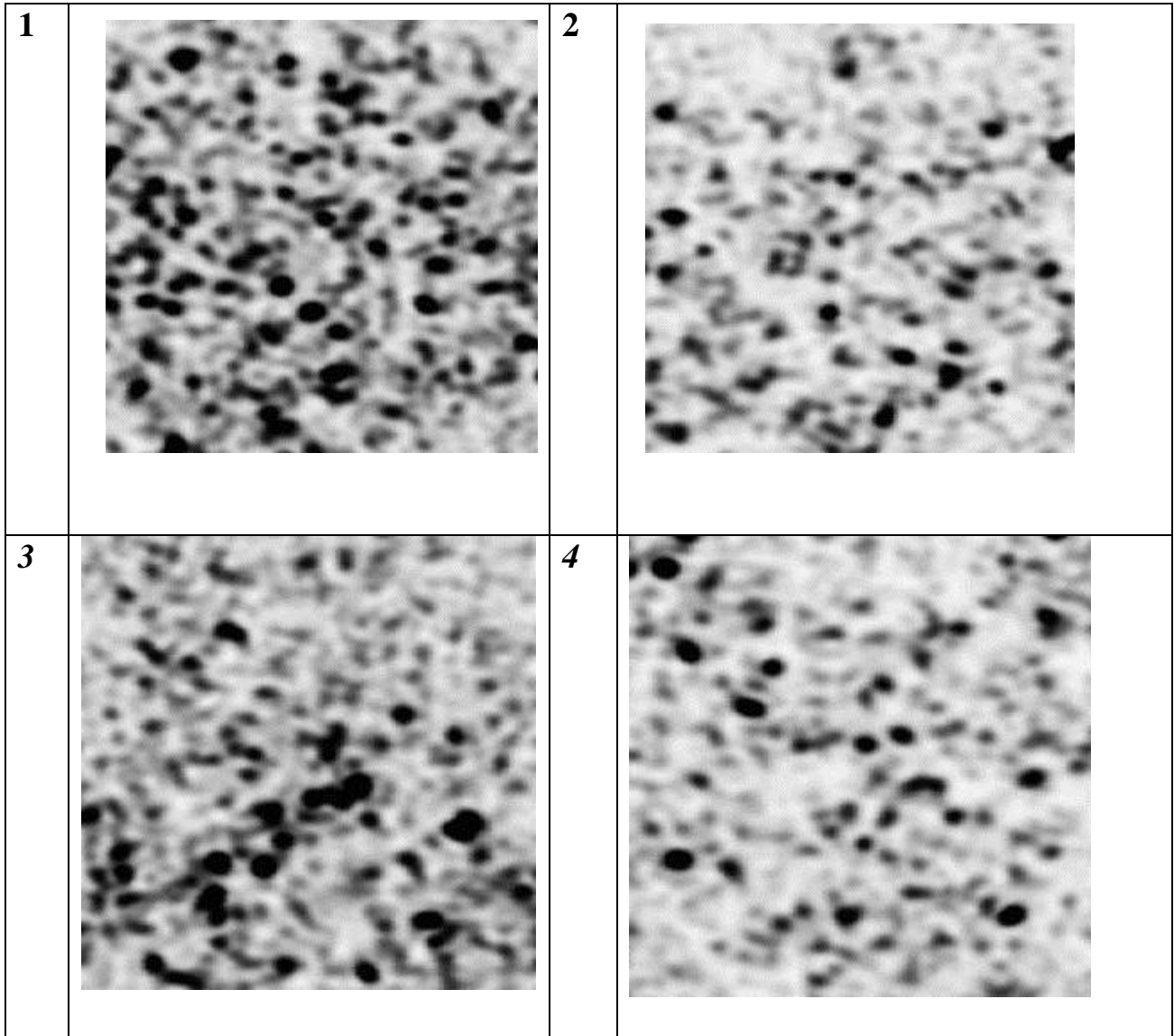
63. Georgiou H.M., Rice G.E., Baker M.S. Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins // *Proteomics*. 2001. V. 1. P. 1503-1506.
64. Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis / A. Butt [et al.] // *Proteomics*. 2001. V.1. P.42-53.
65. Albarghouthi M.N., Stein T.M., Barron A.E. Poly-N-hydroxyethylacrylamide as a novel, absorbed coating for protein separation by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. P.1166-1175.
66. Development of two-dimensional protein-peptide separation protocol for comprehensive proteome measurements / H.J. Issaq [et al.] // *J. Chromatogr. B*. 2003. V.787. P.43-51.
67. Davankov V.A., Sychov C.S., Ilyin M.M., Sochilina K.O. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material. Mechanisms of retention // *J. Chromatogr. A*. 2003. V.987. P.67-75.
68. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides / H.J. Issaq [et al.] // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P.3048-3061.
69. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum / N. Ahmed [et al.] // *Proteomics*. 2003. V.3. P.1980-1987.
70. Dolnik V., Hutterer K.M. Capillary Electrophoresis of proteins 1999-2001 // *J. Electrophoresis*. 2001. V.22. P.4163-4178.
71. Quigley W.W.C., Dovichi N.J. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers // *J. Anal. Chem*. 2004. V.76. P.4645-4658.
72. Quigley W.W.C., Dovichi N.J. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Biopolymers // *J. Anal. Chem*. 2004. V.76. P.4645-4658.
73. Tompkins H., Irene E. *Handbook of Ellipsometry*. NY: William Andrew Inc. 2005. 870 pp.

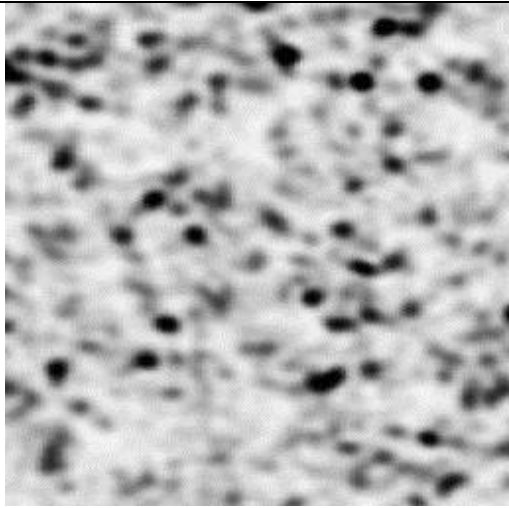
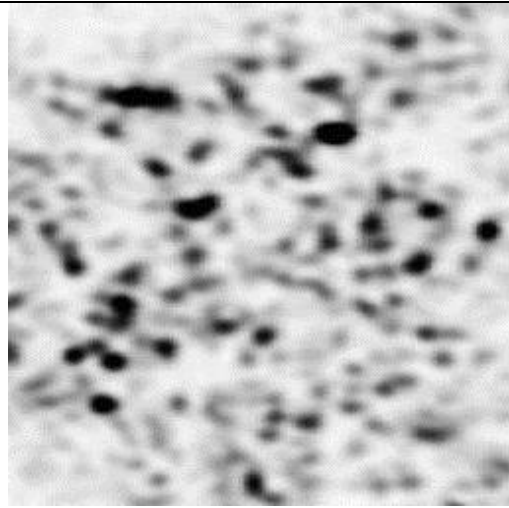
74. Woollam J.A. Tutorial // University of Nebraska, Lincoln [Электронный ресурс]: http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html (дата обращения 15.11.2013).
75. Woollam J.A. User Manual VASE and M-44 Ellipsometers, WVASE 32 TM // University of Nebraska, Lincoln [Электронный ресурс]: <http://www.jawoollam.com/products.html> (дата обращения 20.11.2013).
76. Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Методы *on-line* концентрирования в капиллярном электрофорезе // Журнал аналитической химии. 2009. том 64. № 4. С. 340–351.
77. Shihabi Z.K., Friedberg M. Insulin stacking for capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 1998. V. 807. P. 129.
78. Quirino J.P., Terabe S. Sample stacking of fast-moving anions in capillary zone electrophoresis with pH-suppressed electroosmotic flow // J. Chromatogr. A. 1999. V. 850. P. 339.
79. Chien R.L., Burgi D.S. Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis // Anal. Chem. 1992. V. 64. P. 1046.
80. Wey A.B., Zhang C.-X., Thormann W. Head-column Field-amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis: Preparation of Extracts for Determination of Opioids in Microliter Amounts of Body Fluids // J. Chromatogr. A. 1999. V. 853. P. 95
81. Effect of on-capillary large volume sample stacking on limits of detection in the capillary zone electrophoretic determination of selected drugs, dyes and metal chelates / W.F. Smyth [et al.] // J. Chromatogr. A. 1997. V. 772. P. 161.
82. Palmarsdottir S., Edholm L.-E. Enhancement of selectivity and concentration sensitivity in capillary zone electrophoresis by on-line coupling with column liquid chromatography and utilizing a double stacking procedure allowing for microliter injections // J. Chromatogr. A. 1995. V. 693. P. 131.
83. Quirino J.P., Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography. 5. Field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles // Anal. Chem. 1998. V. 70. P. 1893.

84. Quirino J.P., Terabe S. On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography I. Normal stacking mode // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 781. P. 119.
85. Baidoo E.E.K., Clench M.R., Smith R.F., Tetler L.W. Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B*. 2003. V. 796. P. 303.
86. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А. Синтез метакрилатного монолитного сорбента для капиллярной электрохроматографии // *Ж. Сорбционные и хроматографические процессы*. 2008. Т.8. Вып.5. С.724 — 731.
87. Peptide functionalized poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma / S. Tosatti [et al.] // *J. Biomaterials*. 2003. V. 24. P. 4949-4958.
88. S. Karenga, Z. El Rassi. Trends in nonpolar polymer-based monolithic columns for reversed-phase capillary electrochromatography // *Electrophoresis*. 2011. V. 32. P. 90–104.
89. Klajnert B., Appelhans D. et al. The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly(propylene imine) dendrimers: new effects dependent on hydrogen bonding // *J. Chem. Eur. J*. 2008. Vol. 14. P. 7036-7041.
90. Boye S., Polikarpov N., Appelhans D., Lederer A. An alternative route for dye-polymer complexation study via asymmetrical flow field-flow fractionation // *J. Chrom. A*. 2010. Vol. 1217. P. 4841.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Фотографии срезов монолитных колонок, полученные на лазерном микроскопе Leica TCS SL.

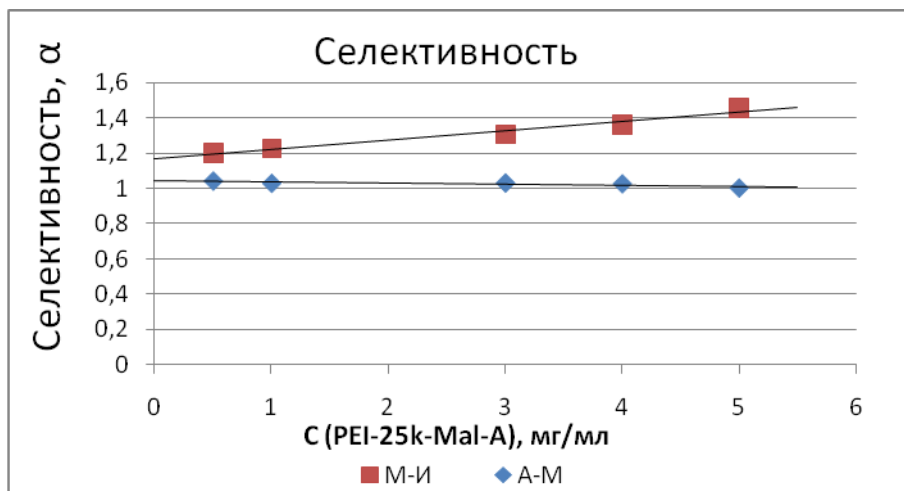
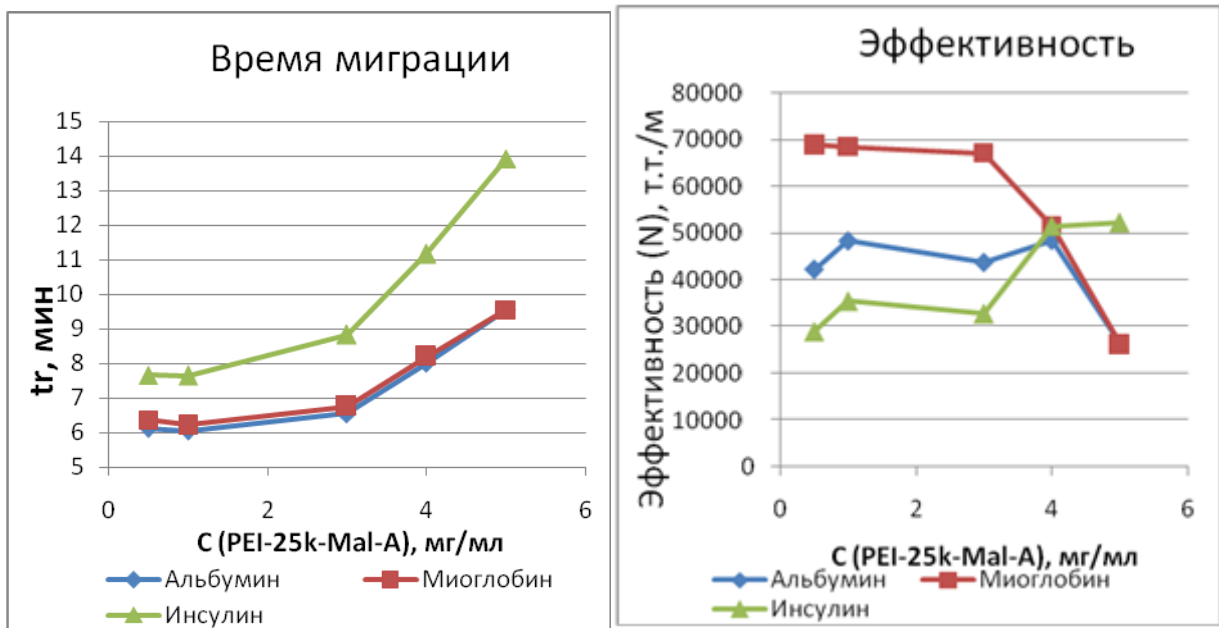


5		6	
---	---	---	--

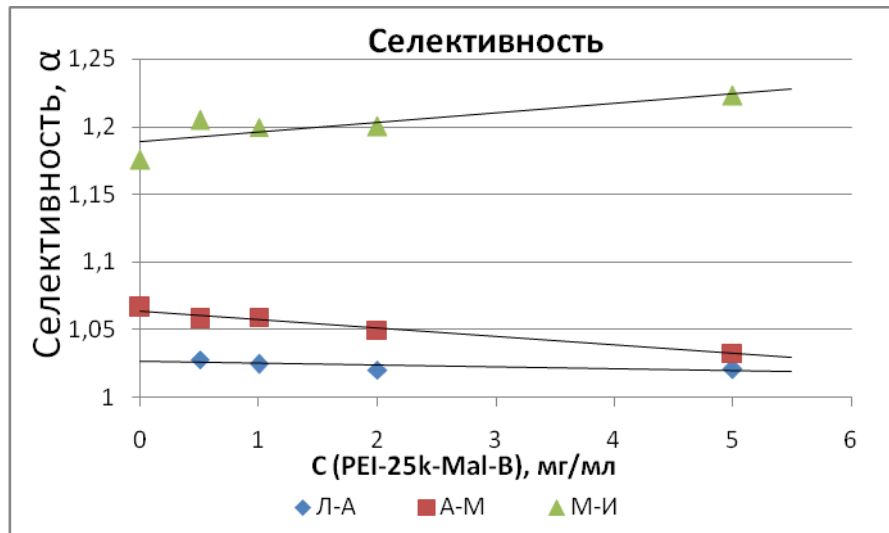
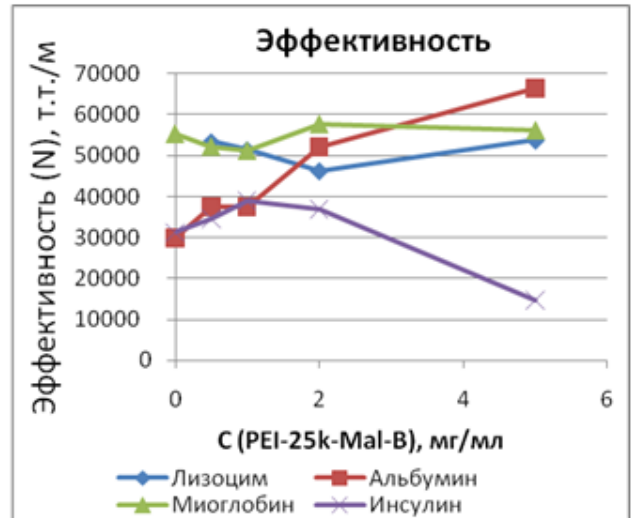
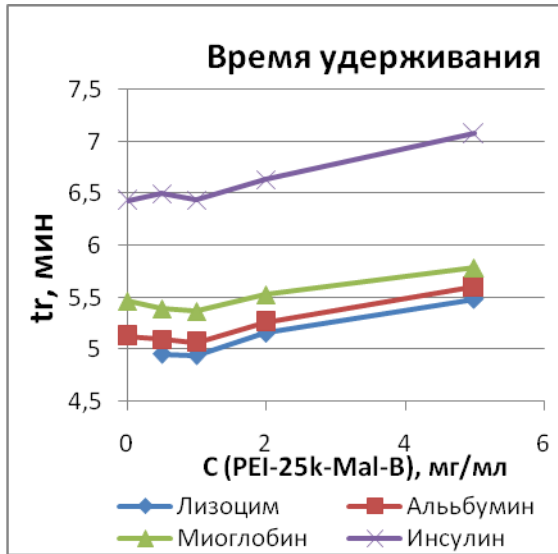
ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Электрокинетическая хроматография. Фосфатный буферный раствор
(pH=2,2)

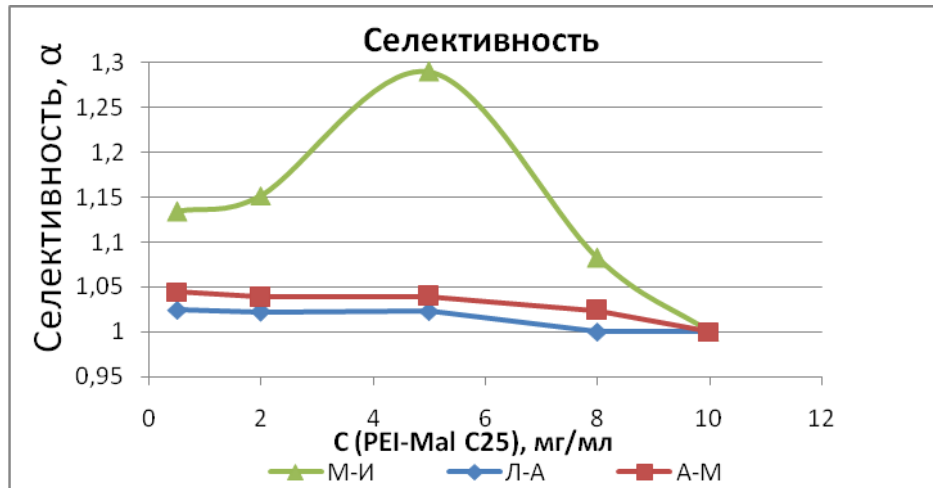
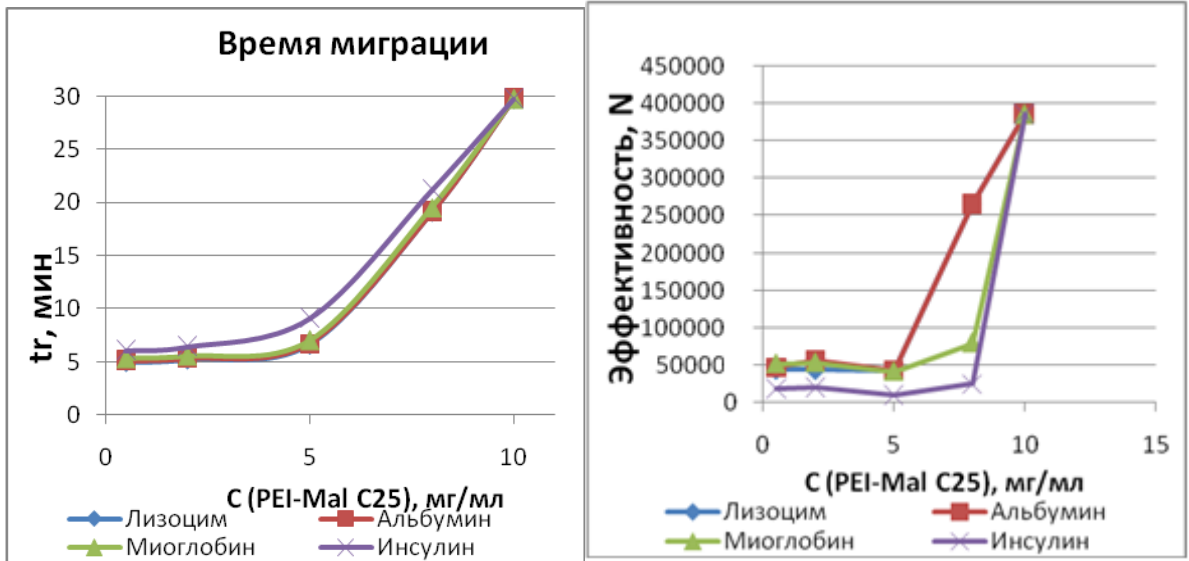
PEI-Mal A 25



PEI-Mal B 25

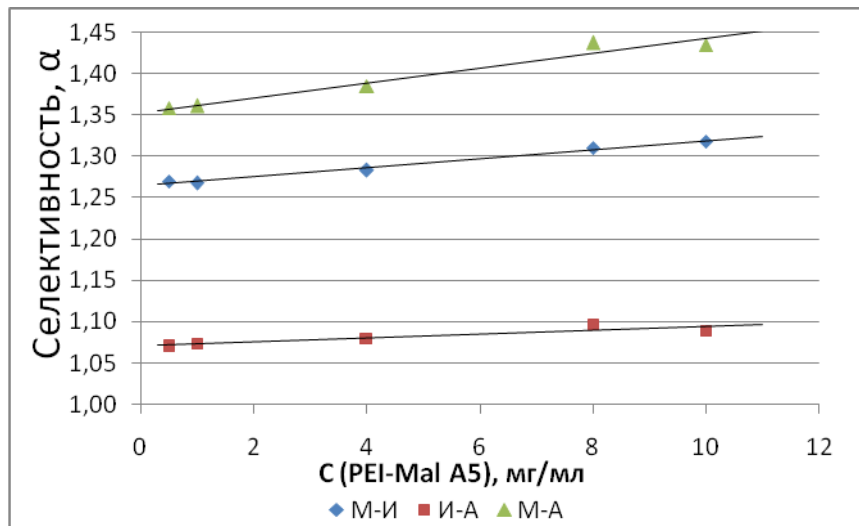
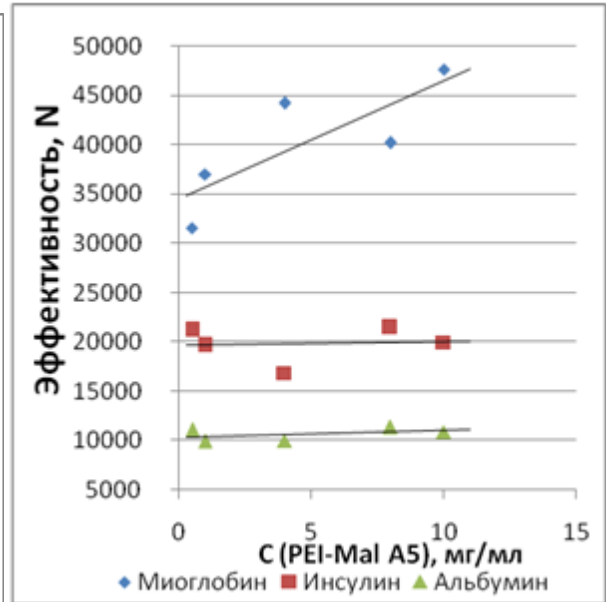
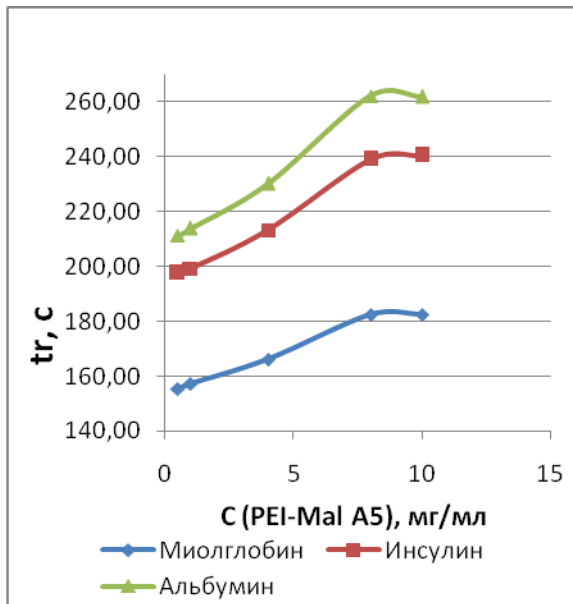


PEI-Mal C 25

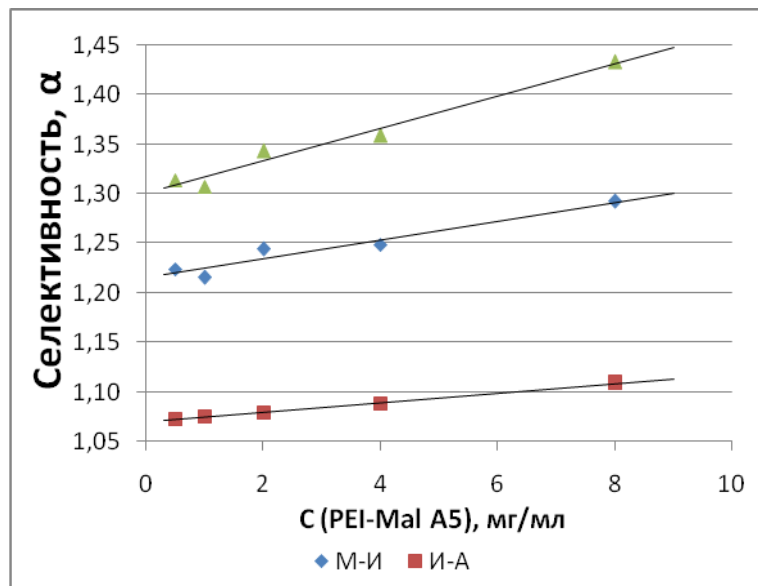
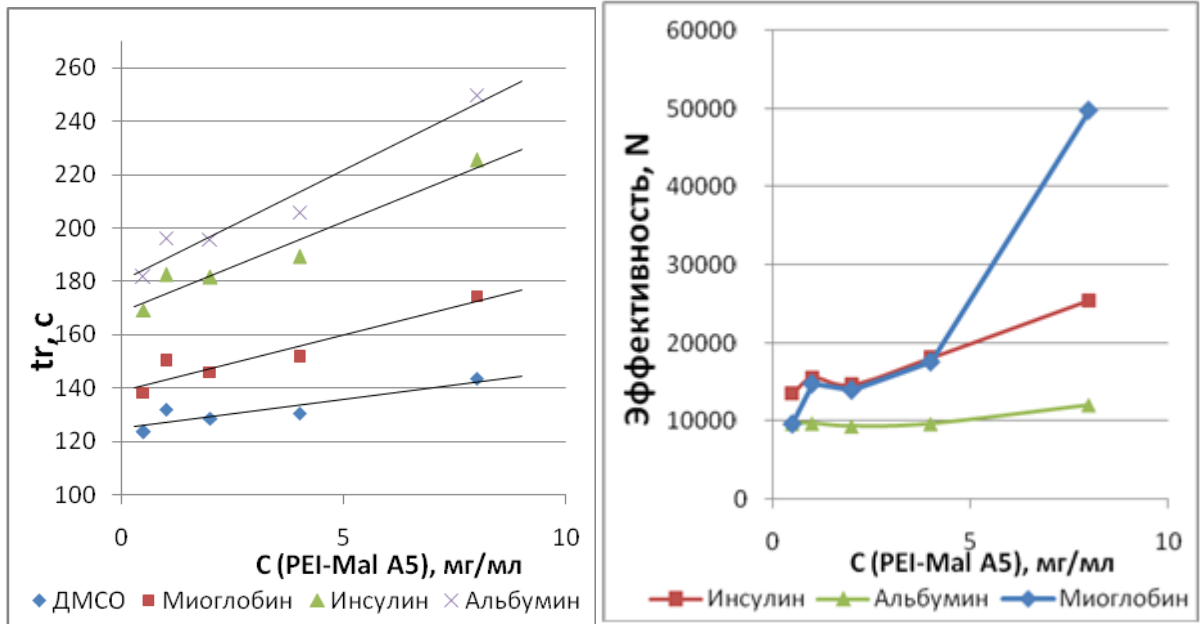


Электрокинетическая хроматография. Боратный буферный раствор (pH=8,5)

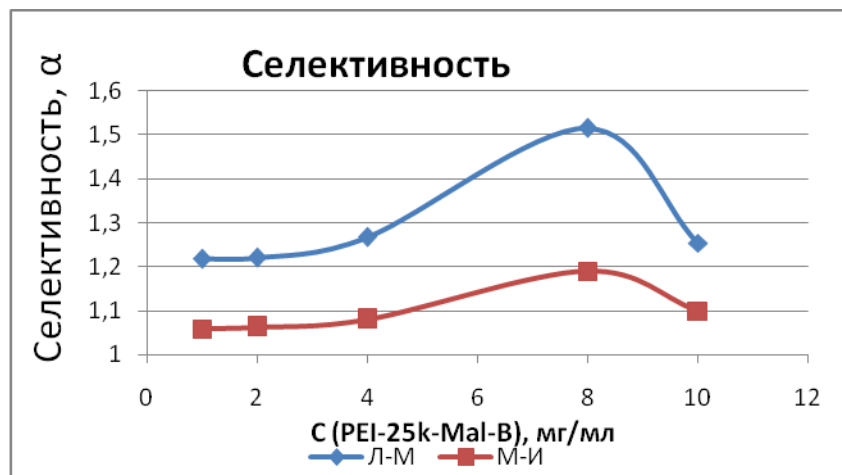
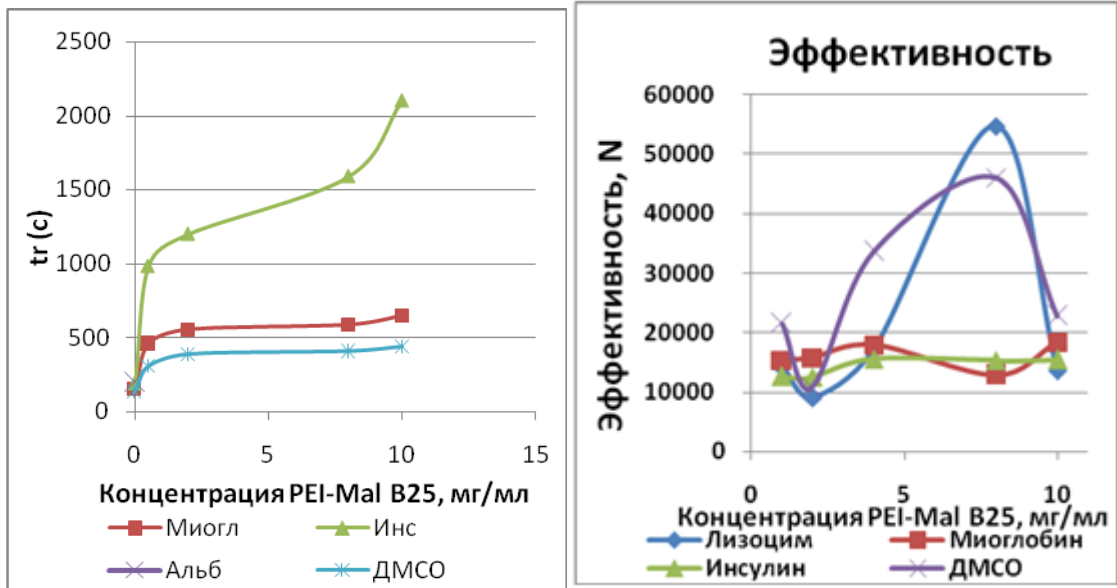
PEI-Mal A 5



PEI-Mal A 25

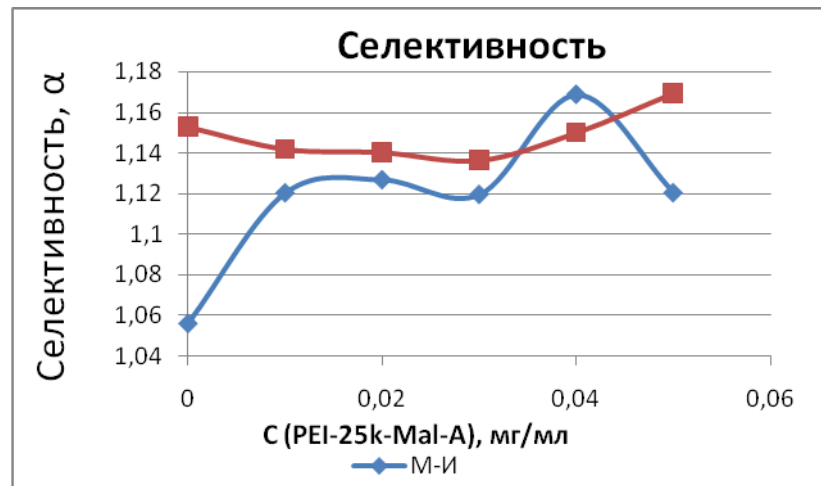
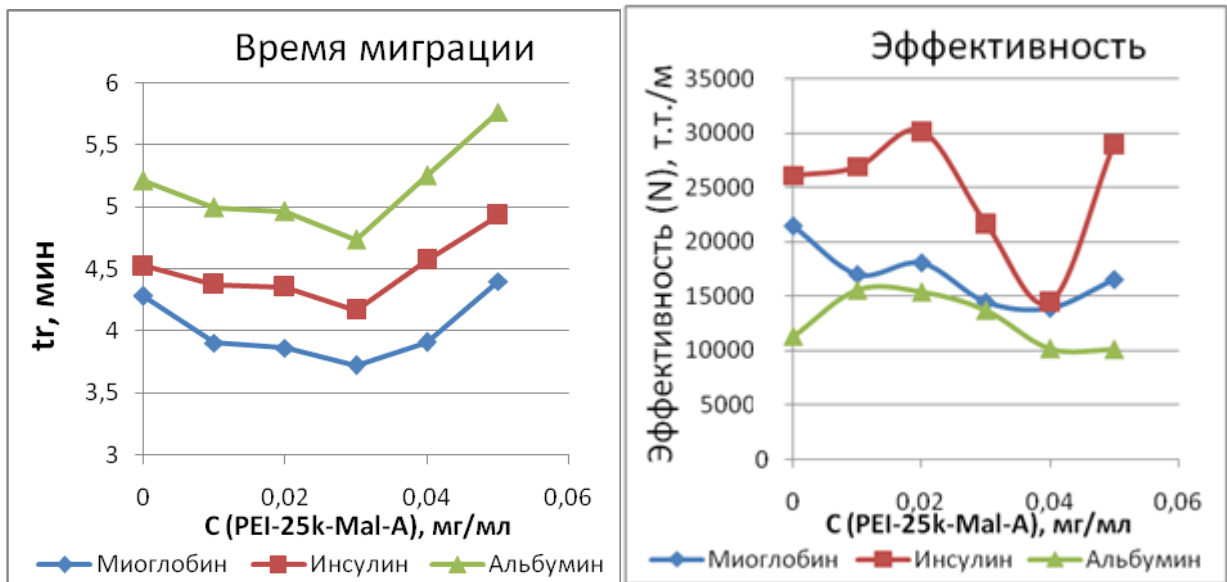


PEI-Mal B 25

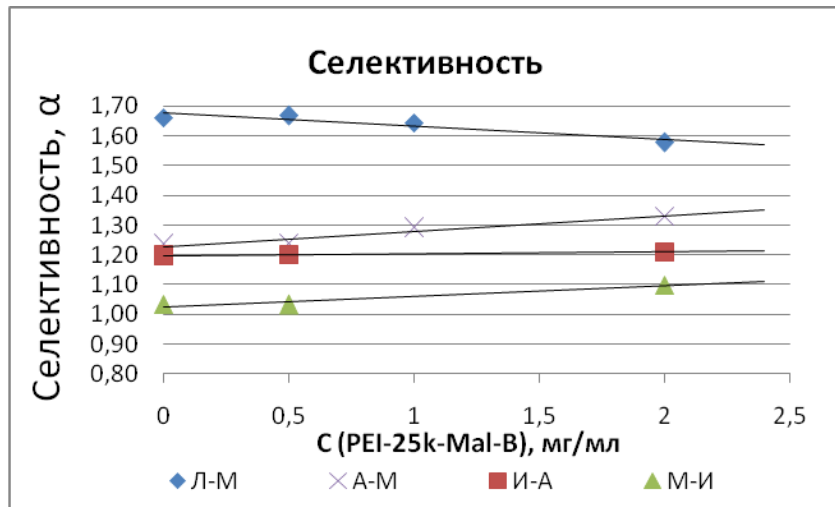
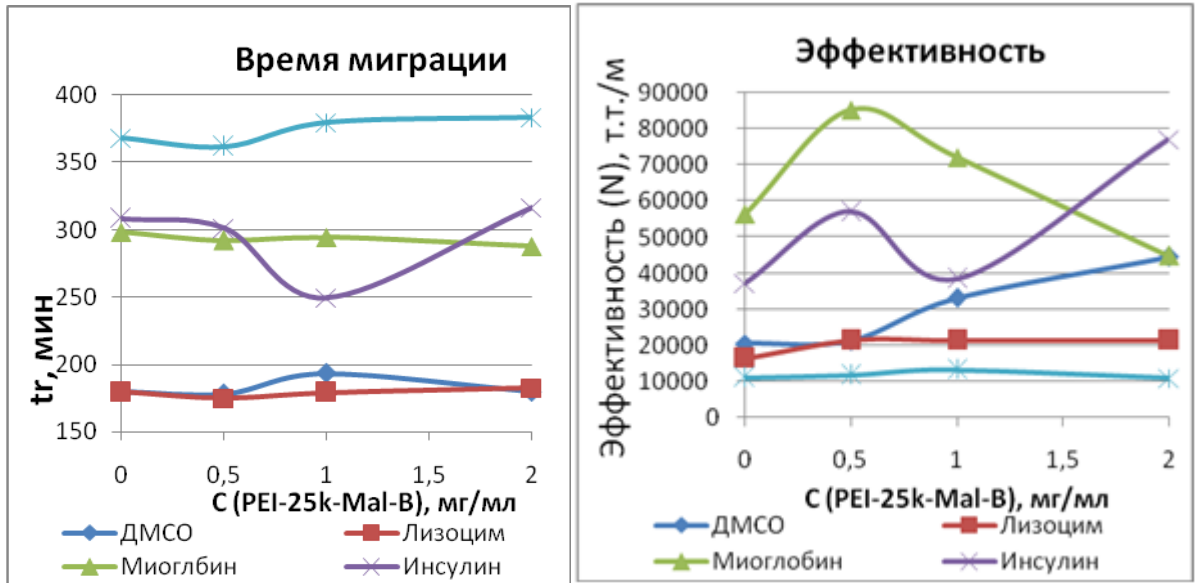


Электрокинетическая хроматография. Боратный буферный раствор
(pH=10,2)

PEI-Mal A 25



PEI-Mal B 25



ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Лучшие результаты с использованием метода концентрирования FESI-LVSS.

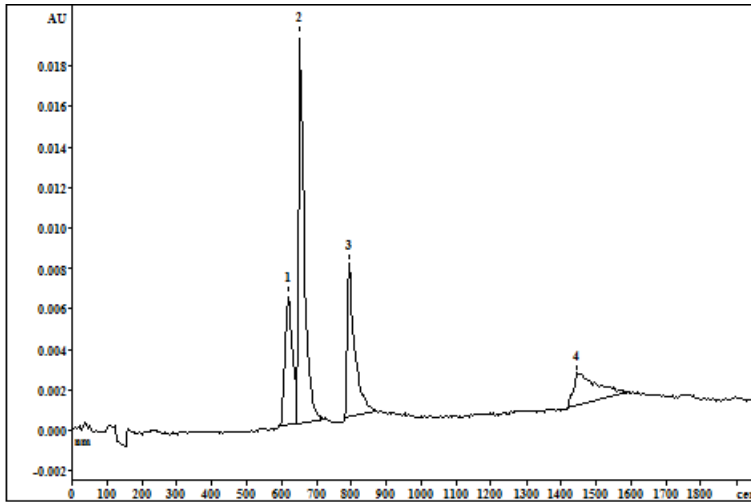


Рис. ПЗ-1. Электрофореграмма смеси белков (**40 мкг/мл**) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25.

Ввод пробы: 90 с × 15кВ. Остальные условия см. рисунок 74.

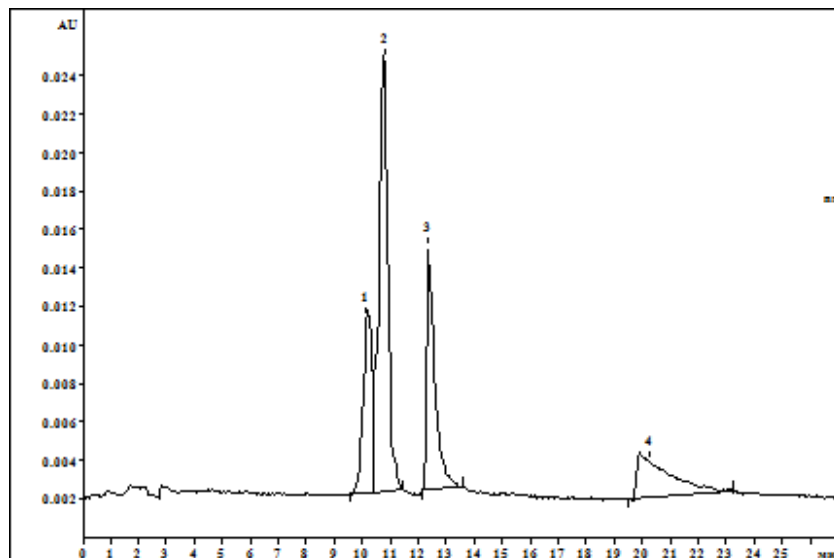
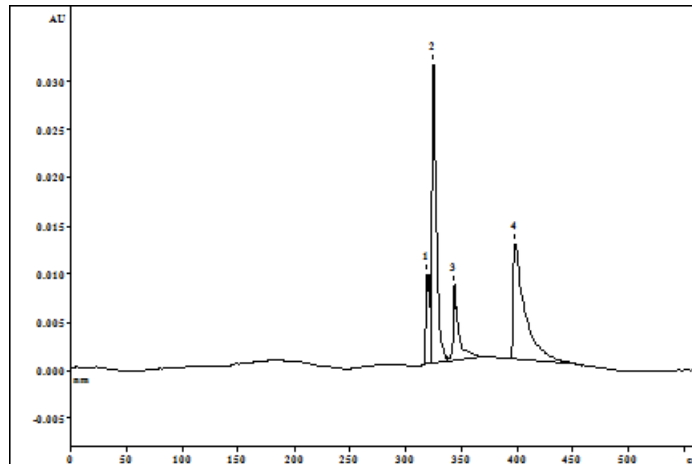


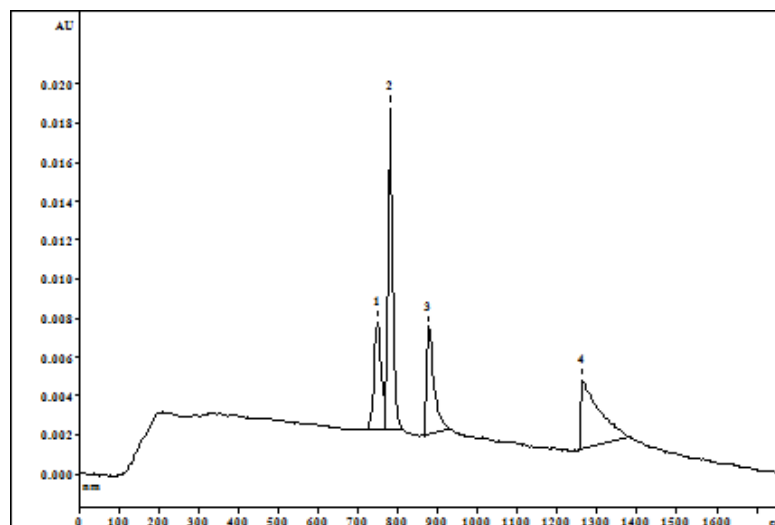
Рис. ПЗ-2. Электрофореграмма смеси белков (**2,5 мкг/мл**) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. электростэкинг Ввод пробы: 60 с × 15. Остальные условия см. рисунок 74.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

Электрофореграммы разделения смеси белков в условиях КЗЭ и КЭХ.



КЗЭ: электрофореграмма смеси белков (1 мг/мл) на немодифицированном капилляре. Условия КЭ: -20кВ, -84-97мкА. Рабочий буфер: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,2). Ввод пробы: 2 с×30 мбар. УФ: 214 нм.



КЭХ: электрофореграмма смеси белков (1 мг/мл) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25.

Условия анализа: -20кВ, -82-95мкА. Рабочий буфер: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,2). Ввод пробы: 2 с×30 мбар. УФ: 214 нм.