

Санкт-Петербургский государственный университет

МОРГАЧЕВА Виолетта Павловна

Выпускная квалификационная работа

Полислойные покрытия на основе наночастиц золота и полимеров при электрофоретическом разделении биологически активных соединений

Уровень образования: бакалавриат

Направление: 04.03.01 «Химия»

Основная образовательная программа: СВ.5014.2019 «Химия»

Научный руководитель:
старший преподаватель,
Институт химии
Санкт-Петербургского
государственного университета,
кандидат химических наук,
Макеева Дарья Валерьевна

Рецензент:
специалист по обеспечению
качества, ООО «ЦКП
«Аналитическая спектрометрия»,
кандидат химических наук,
Ярошенко Ирина Сергеевна

Санкт-Петербург
2023

Оглавление

Список используемых сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Метод капиллярного электрофореза.....	8
1.2 Покрытия стенок кварцевого капилляра	12
1.2.1 Покрытия капилляров на основе наночастиц золота	14
1.2.2 Формирование многослойных покрытий на основе наночастиц золота ...	19
1.3 Полимеры и наночастицы в качестве покрытий для хирального разделения в условиях капиллярного электрофореза	23
1.3.1 Покрытия стенок капилляра на основе полимеров для хирального разделения в КЭ	23
1.3.2 Применение альбумина в качестве хирального модификатора стенок капилляра.....	29
1.3.3 Покрытия капилляров на основе наночастиц для хирального разделения	32
1.3.4 Применение наночастиц золота как компонента покрытий для хирального разделения	34
1.4 Характеристика исследуемых в работе наночастиц и полимеров.....	39
1.5 Характеристика исследуемых в работе аналитов	42
1.5.1 Аминокислоты	42
1.5.2 β -блокаторы	43
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	46
2.1 Аппаратурное оформление.....	46
2.2 Реактивы и материалы	47
2.3 Синтез, концентрирование и очистка наночастиц золота.....	48
2.3.1 Цитрат-стабилизированные наночастицы золота (<i>цНЧЗ</i>)	48
2.3.2 Наночастицы золота, модифицированные бычьим сывороточным альбумином (<i>цНЧЗ-БСА</i>).....	49
2.4 Приготовление стандартных растворов аналитов	49
2.5 Приготовление буферных растворов для проведения электрофоретических экспериментов	50
2.6 Приготовление рабочих растворов модификаторов.....	51

2.7 Условия подготовки и модификации внутренней поверхности кварцевого капилляра	51
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	54
3.1 Синтез и характеристика наночастиц золота	56
3.1.1 Получение и характеристика <i>цНЧЗ</i>	56
3.1.2 Получение и характеристика <i>цНЧЗ-БСА</i>	58
3.2. Формирование многослойных покрытий на основе ПДАДМАХ, <i>цНЧЗ</i> и БСА..	59
3.2.1 Оптимизация условий формирования первого слоя покрытия на основе ПДАДМАХ и его характеристика.....	60
3.2.2 Получение и применение хиральных двухслойных покрытий на основе ПДАДМАХ и <i>цНЧЗ-БСА</i>	63
3.2.3 Получение и применение полислойных покрытий, полученных путем послойного нанесения ПДАДМАХ и <i>цНЧЗ</i> с последующей постфункционализацией альбумином.....	65
3.2.3.1 Трехслойные покрытия ПДАДМАХ- <i>цНЧЗ-БСА</i>	65
3.2.3.2 Пятислойные покрытия на основе ПДАДМАХ, <i>цНЧЗ</i> и БСА	72
3.3 Формирование пятислойных покрытий на основе ПЛЛ, <i>цНЧЗ</i> и БСА.....	77
ВЫВОДЫ	82
Благодарности	84
Список используемой литературы.....	85

Список используемых сокращений

3-АПТЭС – 3-аминопропилтриэтоксисилан

ББР – боратный буферный раствор

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид

ДМАП – диметиламинопиридин

ДМФА – N,N-диметилформамид

ДЭС – двойной электрический слой

ИЖ – ионные жидкости

КЭ – капиллярный электрофорез

КЭХ – капиллярная электрохроматография

КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

КЦ – кватернизированная аминоцеллюлоза

3-МПТМС – 3-меркаптопропилтриметоксисилан

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография

НЧ – наночастицы

НЧЗ – наночастицы золота

цНЧЗ – цитрат-стабилизированные наночастицы золота

цНЧЗ-БСА – цитрат-стабилизированные наночастицы золота, модифицированные бычьим сывороточным альбумином

НЧЗ-БСА – наночастицы золота, модифицированные бычьим сывороточным альбумином

ОГ – оксид графена

ОДА – октадециламин

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПВП – поливинилпирролидон

ПДА – полидофамин

ПДАДМАХ – поли(диаллилдиметиламмоний хлорид)

ПДМС – полидиметилсилоксан

ПЛЛ – поли-L-лизин

ПСС – поли(4-стиролсульфонат натрия)
ПЭО – полиэтиленоксид
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
СТ – стрептомицин
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
ФБР – фосфатный буферный раствор
ФЭ – фоновый электролит
ЦД – циклодекстрины
ЭОП – электроосмотический поток

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большинство лекарственных препаратов реализуется в виде рацематов, хотя зачастую только один энантиомер обладает требуемым терапевтическим действием. Неактивная форма может оказывать избыточную нагрузку на организм и приводить к нежелательным побочным эффектам, вплоть до летальных исходов.

Это делает актуальным создание и развитие методик разделения и определения индивидуальных энантиомеров оптически активных соединений в биологических жидкостях. Количественное определение отдельных энантиомеров возможно методами газовой, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭ).

Капиллярный электрофорез выгодно отличается от других методов разделения высокой эффективностью, простотой пробоподготовки и отсутствием необходимости использования дорогостоящего оборудования и сорбентов. Для осуществления энантиоселективного разделения в КЭ требуется применение хиральных селекторов в качестве модификаторов внутренней поверхности капилляра или фонового электролита (ФЭ): циклодекстринов (ЦД), полимерных ПАВ, ионных жидкостей, белков и т.д.

Активно использующийся хиральный модификатор – альбумин, представляет собой глобулярный, стабильный, водорастворимый белок, в структуре которого имеется 2 сайта связывания лекарств. Опубликованы данные о применении альбумина для формирования динамических покрытий путем добавления модификатора в фоновый электролит для разделения энантиомеров эфедрина, норэфедрина и D,L-триптофана. Главный недостаток таких покрытий – необходимость присутствия хирального селектора в ФЭ из-за недостаточного количества активных центров на поверхности капилляра.

Решение данной проблемы применения альбумина для энантиоселективного разделения в КЭ возможно путем увеличения удельной поверхности капилляра, модифицируемой альбумином. Для этого используют наночастицы (НЧ), среди которых наиболее востребованы наночастицы золота (НЧЗ), характеризующиеся способностью к специфическим взаимодействиям с аналитами. Кроме того, они могут быть легко модифицированы, что позволяет придавать им хиральные

свойства. Пришивка хирального селектора может проводиться путем замены лиганда на поверхности НЧЗ. Например, цитрат-стабилизированные наночастицы золота (*цНЧЗ*) могут использоваться как прекурсоры для дальнейшей модификации.

Таким образом, в данной работе предлагается объединить свойства НЧЗ и альбумина при создании хиральных стационарных фаз в капиллярной электрохроматографии. Это могло бы обеспечить высокую энантиоселективность покрытий стенок кварцевого капилляра за счет развитой поверхности и увеличения концентрации хирального селектора.

В работе предложены варианты формирования многослойных покрытий на основе *цНЧЗ* и альбумин-модифицированных наночастиц золота (*цНЧЗ-БСА*) с использованием поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) (ПДАДМАХ) в качестве связующего слоя, получаемых физической адсорбцией модификаторов на стенках кварцевого капилляра.

Полученные покрытия продемонстрировали стабильность в широком диапазоне рН (2-10), а также были опробованы при анализе модельных смесей энантиомеров аминокислот и β -блокаторов.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Метод капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез (КЭ) – метод разделения полярных и заряженных аналитов, использующийся для их определения в биологических, фармацевтических и природных объектах [1]. Разделение сложных смесей веществ проводят в кварцевом капилляре в потоке жидкости (фонового электролита (ФЭ)) при приложении высокой разности потенциалов к концам капилляра с последующим детектированием. Качественной характеристикой вещества является время миграции, рассчитываемое от момента ввода соответствующего иона в капилляр до достижения им детектора, а количественной – высота или площадь пика, пропорциональные концентрации аналита [2].

Разделение компонентов происходит за счет различия в электрофоретических подвижностях ионов, определяемых зарядом и радиусом ионов, а также подвижностью образующегося электроосмотического потока (ЭОП).

Внутри кварцевого капилляра при работе с водными растворами за счет гидролиза силоксановых групп с последующей диссоциацией силанольных формируется двойной электрический слой (ДЭС) (Рис. 1). Обкладками образующегося ДЭС являются отрицательно заряженные диссоциированные силанольные группы и примыкающие к ним катионы плотного слоя. Причиной возникновения ЭОП является образование избыточной концентрации катионов в диффузной части ДЭС, которые ускоряются по направлению к катоду и осуществляют перенос раствора фонового электролита [3].

Возникающий ЭОП движется в том же направлении, что и заряженные частицы и осуществляет пассивный перенос жидкости внутри капилляра. В случае положительной полярности входного конца капилляра (анод) катионы аналитов достигают детектора перед ЭОП, а анионы - после (Рис. 2) [2]. Таким образом, в режиме нормальной полярности могут быть определены катионы, а также те анионы, скорость миграции которых меньше, чем скорость ЭОП.

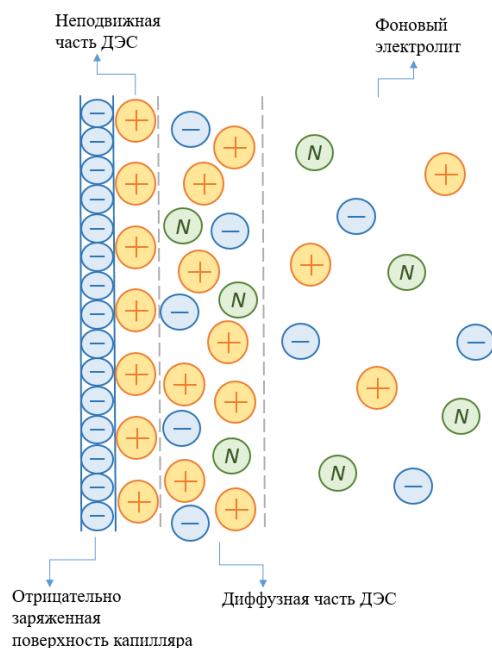


Рис. 1. Схема образования двойного электрического слоя в кварцевом капилляре. N - нейтральные аналиты.

Для разделения более подвижных анионных соединений полярность прикладываемого напряжения изменяют на отрицательную (входной конец капилляра – катод). Для идентификации ЭОП в пробу вводятся специальные вещества – маркеры ЭОП, являющиеся нейтральными соединениями и мигрирующие вместе с ЭОП.

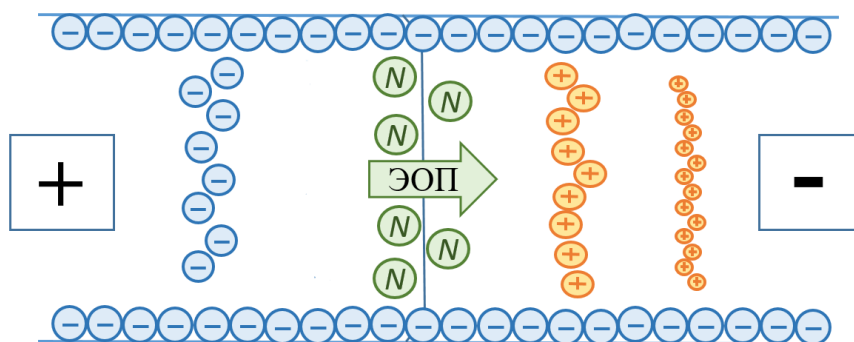


Рис. 2. Схема электрофоретического разделения смеси аналитов.

Описанный вариант метода КЭ носит название капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) [3].

К параметрам, влияющим на скорость ЭОП, относятся рН раствора и концентрация ФЭ. При увеличении рН скорость ЭОП растет, а в сильнокислых растворах (рН < 2,5) ЭОП отсутствует за счёт подавления диссоциации силанольных

групп. При увеличении концентрации ФЭ скорость ЭОП падает за счет увеличения доли катионов в неподвижной части ДЭС и, соответственно, уменьшения его толщины.

Общая электрофоретическая подвижность иона ($\mu_{\text{общ}}$) определяется его собственной электрофоретической подвижностью ($\mu_{\text{эфф}}$) и подвижностью электроосмотического потока ($\mu_{\text{ЭОП}}$) (1):

$$\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{эфф}} + \mu_{\text{ЭОП}} \quad (1)$$

где $\mu_{\text{эфф}}$ — электрофоретическая подвижность иона, $\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$,

$\mu_{\text{ЭОП}}$ — подвижность ЭОП, $\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$.

Общая электрофоретическая подвижность также может быть рассчитана из экспериментальных данных (2):

$$\mu_{\text{общ}} = \frac{L_{\text{общ}} \cdot L_{\text{эфф}}}{U \cdot t_{\text{мигр}}} \quad (2)$$

где $L_{\text{общ}}$ — общая длина капилляра (от входного до выходного конца), см ,

$L_{\text{эфф}}$ — эффективная длина капилляра (от входного конца до детектора), см ,

U — рабочее напряжение, В ,

$t_{\text{мигр}}$ — время миграции иона (маркера ЭОП для расчета $\mu_{\text{ЭОП}}$), с .

Для расчета собственной электрофоретической подвижности иона используется (3):

$$\mu_{\text{эфф}} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (3)$$

где q — заряд иона, r — радиус иона, η — вязкость раствора.

Для расчета подвижности ЭОП используется (4):

$$\mu_{\text{ЭОП}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (4)$$

где ε — диэлектрическая постоянная, ζ — дзета-потенциал, характеризующий заряд поверхности капилляра, В .

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью (до миллиона теоретических тарелок), значение которой для каждого конкретного пика можно рассчитать по (5):

$$N = \frac{L_{\text{эфф}} \cdot \mu_{\text{эфф}} \cdot U}{2 \cdot D \cdot L_{\text{общ}}} = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{\text{мигр}}}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (5)$$

где D — коэффициент диффузии вещества, $w_{0,5}$ — ширина пика на половине высоты, с.

Селективность разделения в капиллярном электрофорезе (α) определяется по (6):

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (6)$$

где μ_1 — электрофоретическая подвижность аналита с большим временем удерживания, см²/В·с,

μ_2 — электрофоретическая подвижность аналита с меньшим временем удерживания, см²/В·с,

К преимуществам метода капиллярного электрофореза относят экспрессность, высокая эффективность (аналиты разделяются в виде узких зон), малый объем вводимой пробы, необходимой для проведения анализа, простота оборудования и процедуры пробоподготовки, предшествующей анализу, возможность проведения *on-line* концентрирования [2].

Среди недостатков метода КЭ низкая селективность разделения аналитов с близкими электрофоретическими подвижностями и сорбция основных аналитов на отрицательно заряженных стенках капилляра, что может быть решено путем модификации стенок кварцевого капилляра нанесением различных покрытий. Прививка модификаторов может происходить за счет физической адсорбции или ковалентных взаимодействий с силанольными группами внутренней поверхности капилляра. При этом, в зависимости от природы функциональных групп модификатора, образующего покрытие, реализуются различные механизмы перераспределения определяемых веществ между поверхностью капилляра и

фоновым электролитом: электростатические и гидрофобные взаимодействия, водородные связи, аффинные взаимодействия и т.д [2, 3].

Модификация стенок капилляра также может приводить к изменению заряда поверхности, что способствует снижению сорбции веществ на стенках капилляра и открывает возможности для быстрого анализа анионов и основных соединений [4].

Еще одним значительным ограничением метода КЭ является низкая концентрационная чувствительность (10^{-6} М) при спектрофотометрическом детектировании аналитов. Причинами являются малый объем вводимого образца и короткая длина светового пути, ограниченная диаметром капилляра [2]. Основное решение – использование различных вариантов *on-line* концентрирования [5, 6], позволяющих существенно снизить пределы обнаружения аналитов. Также для определения следовых количеств аналитов в биологических образцах капиллярный электрофорез совмещают с более чувствительным детектированием (масс-спектрометрическое, флуориметрическое), что позволяет значительно повысить чувствительность метода.

Устранение перечисленных недостатков является основным направлением эволюции метода капиллярного электрофореза.

1.2 Покрyтия стенок кварцевого капилляра

Метод КЗЭ позволяет проводить экспрессное определение широкого спектра органических соединений в биологических образцах. Однако недостаток метода, связанный с адсорбцией основных компонентов пробы, приводящий к загрязнению внутренней поверхности кварцевого капилляра и невозможности площадей пиков и времен миграции аналитов, накладывает ограничения на определение аналитов в сложных биологических объектах [7].

Для решения данной проблемы стенки капилляра покрывают различными модификаторами, позволяющими снизить адсорбцию компонентов пробы и добиться большей эффективности и селективности разделения. Прививка модификаторов к стенкам кварцевого капилляра может осуществляться как за счет образования ковалентных связей с силанольными группами капилляра, так и за счет электростатических и специфических взаимодействий (водородные связи, гидрофобные взаимодействия).

В качестве модификаторов поверхности кварцевого капилляра используют низкомолекулярные соединения (амины, поверхностно-активные вещества (ПАВ)), полимеры (например, поли(диаллидиметиламмоний хлорид) (ПДАДМАХ)) и различные наночастицы (НЧ) (наночастицы углерода, кремнезема, металлов, оксидов металлов, полимерные наночастицы) [8]. В случае, когда модификация капилляра приводит к формированию неподвижной стационарной фазы, участвующей в разделении аналитов, реализуется вариант капиллярной электрохроматографии (КЭХ), сочетающей механизмы хроматографического и электрофоретического разделения. За счет формирования плоского профиля электроосмотического потока метод КЭХ демонстрирует большую эффективность при разделении аналитов по сравнению с ВЭЖХ, для которой характерен параболический профиль потока. При этом, достигаемая селективность разделения значительно превосходит КЗЭ, поскольку помимо различий в электрофоретических подвижностях ионов в КЭХ существенную роль играют специфические взаимодействия аналитов с неподвижной фазой [9].

Прививка стационарной фазы к внутренней поверхности капилляра в КЭХ может осуществляться как за счет ковалентных взаимодействий, так и за счет физической адсорбции модификатора на стенках капилляра. В случае формирования ковалентных покрытий модификатор химически пришивается к стенкам кварцевого капилляра, что позволяет получать высокостабильные покрытия. Для получения физически-адсорбированных покрытий применяются катионные и полимерные ПАВ, а также заряженные полимеры, обеспечивающие возможность электростатического взаимодействия между модификатором и стенкой капилляра. Такой подход к формированию покрытий отличается значительно меньшей трудоемкостью и воспроизводимостью.

Существует два типа физически-адсорбированных покрытий: статические и динамические. В случае статических покрытий модификацию капилляра проводят до анализа и дальнейшее использование модификаторов в ходе анализа не предусматривается. В случае динамических покрытий из-за низких констант адсорбции модификаторов на стенках капилляра стабильность получаемых покрытий необходимо поддерживать введением модификатора и в ФЭ [7].

Одной из наиболее перспективных областей развития КЭХ является использование наночастиц в качестве модификаторов стенок кварцевого капилляра, что способствует увеличению площади поверхности при разделении аналитов и стабильности получаемых покрытий в широком диапазоне pH [4, 8].

1.2.1 Покрытия капилляров на основе наночастиц золота

Наночастицы золота (НЧЗ) привлекают особое внимание для применения в КЭ ввиду легкости их химической модификации, способности к специфическим взаимодействиям с разделяемыми веществами, обеспечивая при этом повышение эффективности и селективности разделения аналитов, а также увеличение емкости покрытий за счет развитой поверхности [4, 8].

Ввиду нестабильности и быстрой агломерации немодифицированных НЧЗ для использования в капиллярном электрофорезе их покрывают стабилизаторами, в качестве которых используют низко- и высокомолекулярные соединения. НЧЗ могут быть стабилизированы как различными анионами (например, цитрат-анионы, связывающиеся с НЧЗ за счет электростатических и специфических взаимодействий), так и катионами (например, ПАВ и поликатион поли(диаллилдиметиламмоний хлорид)), использование которых в КЭ обеспечивает перезарядку поверхности капилляра и снижение сорбции органических соединений [10, 11].

В [12] НЧЗ, модифицированные дидодецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ-НЧЗ) (Рис. 3), использовали в качестве псевдостационарной фазы для разделения кислотных и основных белков (химотрипсиногена, рибонуклеаза, трипсиногена, цитохрома и др.) в слюне и крови. Предложена методика формирования стабильных динамических покрытий на основе ДДАБ-НЧЗ, обеспечивающих более высокую эффективность (до 1007000 теоретических тарелок) и воспроизводимость разделения белков в сравнении с капиллярами, модифицированными ДДАБ. Применение ДДАБ-НЧЗ генерирует быстрый обращенный электроосмотический поток (на 75% быстрее, чем для ДДАБ-модифицированных капилляров), что способствует увеличению скорости анализа. Для обеспечения более сильного взаимодействия наночастиц с белками ДДАБ-покрытые НЧЗ были модифицированы полиэтиленоксидом (ПЭО) посредством

нековалентных гидрофобных взаимодействий (Рис. 3), при этом гидрофильные группы ПЭО оставались доступными для взаимодействия с разделяемыми соединениями.

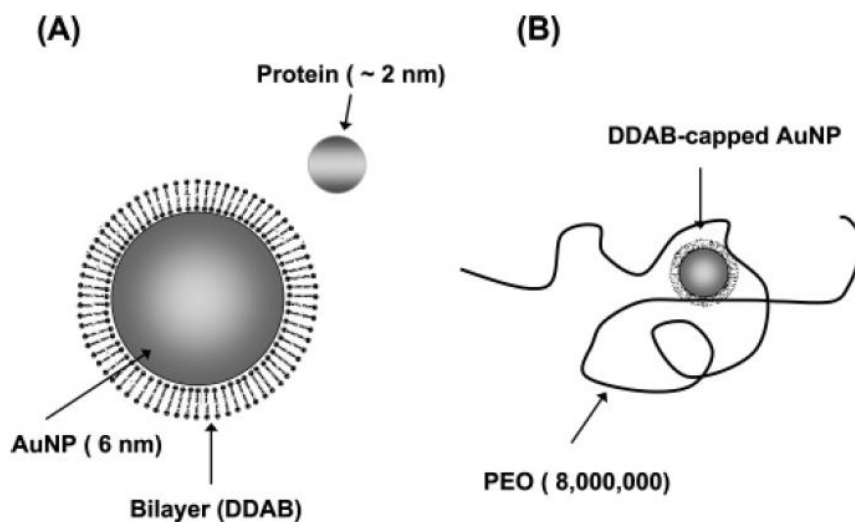


Рис. 3. Схематическое изображение НЧЗ, модифицированных ДДАБ (А) и ДДАБ и ПЭО (В) [12].

Полученные покрытия препятствуют сорбции белков на поверхности капилляра, способствуют повышению селективности разделения аналитов за счет гидрофильных взаимодействий, а также - увеличению скорости ЭОП и, соответственно, сокращению времени анализа по сравнению с покрытиями на основе ДДАБ (Рис. 4). Добавление в ФЭ полиэтиленоксида, модифицирующего наночастицы ДДАБ-НЧЗ внутри капилляра, позволило разделить кислые белки с низкими значениями pI , а также способствовало повышению эффективности при определении БСА в 8 раз (Рис. 4). Авторами показано, что увеличение концентрации ПЭО в ФЭ улучшает разделение аналитов до достижения его концентрации 0,07% (масс.) (т.н. *порога запутывания*), выше которой происходит агрегация наночастиц золота.

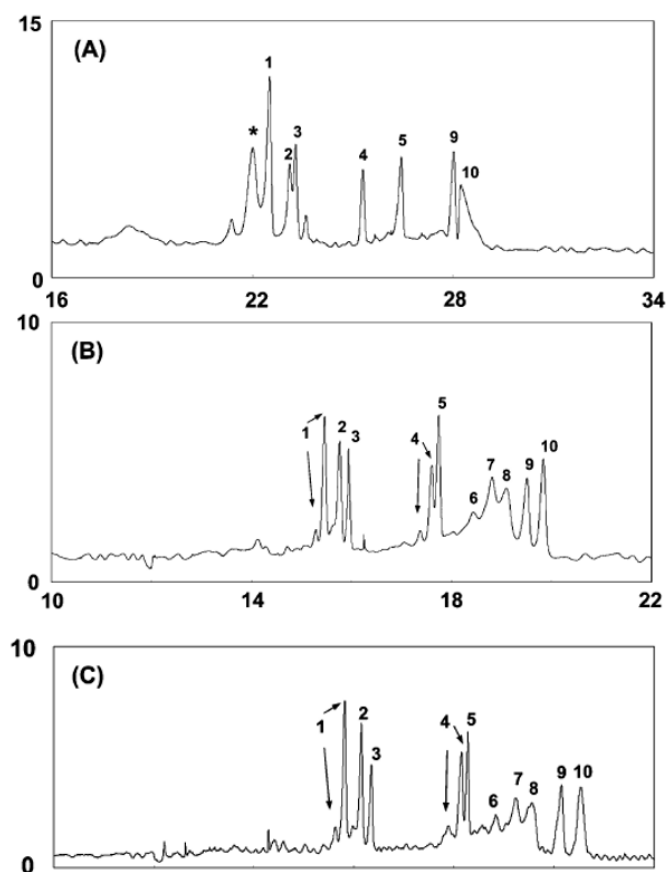


Рис. 4. Электрофореграммы кислотных и основных белков на капиллярах, покрытых (А) ДДАБ, (В) ДДАБ-НЧЗ (С) ДДАБ-НЧЗ с добавлением 0,07% (масс.) ПЭО. 1 - *R*-химотрипсиноген, 2 - рибонуклеаза А, 3 - трипсиноген, 4 - цитохром с, 5 - лизоцим, 6 - БСА, 7 - карбоангидраза, 8 - овальбумин, 9 - миоглобин, 10 - *R*-лактальбумин.

Условия: (А): 25 мМ фосфатный буферный раствор (ФБР) с доб. 0,01 мМ ДДАБ, (В): 10 мМ ФБР с доб. 10% ДДАБ-НЧЗ; рН=3,5; (С) 25 мМ ФБР с доб. 10% ДДАБ-НЧЗ, модифицированные 0,07% ПЭО; ввод пробы 10 с, -8 кВ [12].

Другой вариант модификации стенок капилляров с образованием прочного гидрофобного покрытия описан в [13]. Используемые в эксперименте модифицированные октадециламином наночастицы золота (ОДА-НЧЗ) имеют положительный заряд и прикрепляются к отрицательно заряженной поверхности капилляра за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Покрытие продемонстрировало высокую стабильность и эффективность при анализе нейтральных стероидных гормонов (тестостерон, прогестерон и пропионат тестостерона) (Рис. 5).

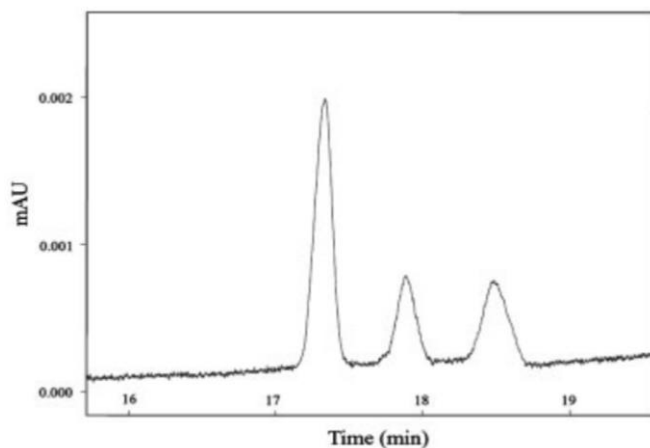


Рис. 5. Электрофореграмма стероидных гормонов (слева направо: тестостерон, прогестерон и пропионат тестостерона).

Условия: ФЭ: 45 мМ ФБР, 70% об./об. СН₃ОН, рН 7; ввод аналитов 3 с, 0,5 фунта, 25 кВ [13].

Полученные стационарные фазы на основе ОДА-НЧЗ характеризуются высокой стабильностью в широком диапазоне рН и содержания органического модификатора в ФЭ. В данном случае наночастицы золота обеспечивают прочное закрепление модификатора на стенках капилляра, большую площадь поверхности для адсорбции органических соединений и способствуют повышению селективности разделения аналитов за счет сильных взаимодействий наночастиц с биомолекулами.

Методика стабилизации НЧЗ кватернизированной целлюлозой (КЦ-НЧЗ) представлена в [14]. Использование данного модификатора способствует прочному закреплению НЧЗ на стенках капилляра за счет электростатических взаимодействий. Кроме того, КЦ препятствует сорбции белков и основных аналитов, что также приводит к повышению эффективности и селективности разделения белков (трансферрин, химотрипсиноген, рибонуклеаза А, цитохром, лизоцим). Покрытия на основе КЦ-НЧЗ обеспечивают повышение эффективности разделения в 2,9 раз по сравнению с капиллярами, модифицированными только КЦ.

Существует ряд методик использования НЧЗ, модифицированных поли(диаллилдиметиламмоний хлоридом) (ПДАДМАХ-НЧЗ) (Рис. 6) для анализа героина и его основных примесей (морфин, тебаин) [15], пептидов [16], аминокислот [16] и белков [16].

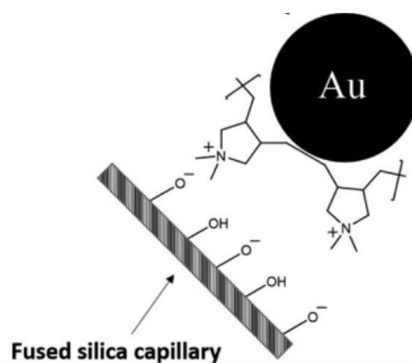


Рис. 6. Схема взаимодействия ПДАДМАХ-стабилизированных НЧЗ со стенкой кварцевого капилляра [16]

При использовании ПДАДМАХ закрепление НЧЗ на стенках капилляра происходит также за счет электростатических сил. Наличие положительного заряда ПДАДМАХ-НЧЗ препятствует сорбции белков и основных компонентов пробы на стенках капилляра, а также позволяет сократить время анализа за счет обращения и ускорения электроосмотического потока. В [16] обнаружено увеличение ЭОП на 20% по сравнению с капиллярами, модифицированными ПДАДМАХ, поскольку адсорбция ПДАДМАХ-НЧЗ увеличивает площадь модифицированной поверхности капилляра, создавая больший положительный заряд (Рис. 7). В данном случае, разделение с участием наночастиц золота происходит в режиме КЭХ. Хроматографический механизм разделения осуществляется за счет специфических взаимодействий аналитов с наночастицами золота, что также проявляется в улучшении разделения компонентов сложных смесей.

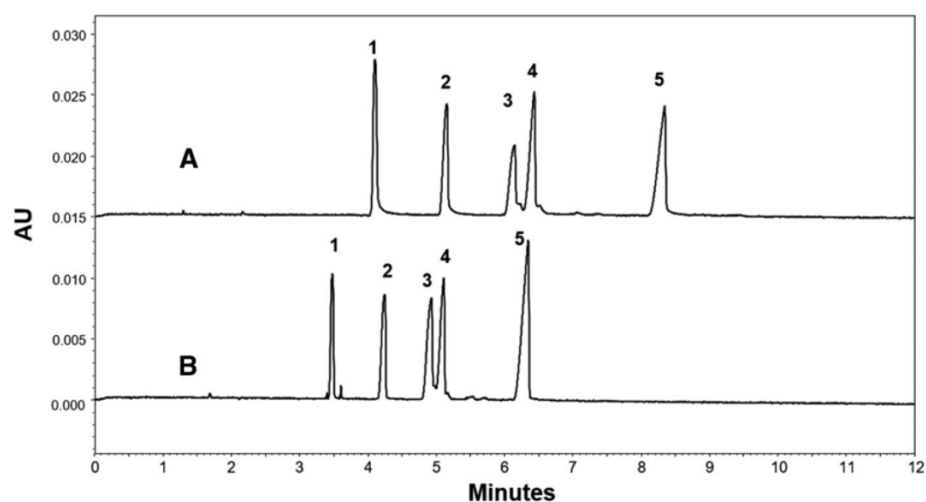


Рис. 7. Электрофореграммы смеси опиоидных пептидов на капиллярах, покрытых (А) ПДАДМАХ и (В) ПДАДМАХ-НЧЗ.

Условия: (А): ФЭ: 20 мМ ацетатный буферный раствор (АБР) с доб. 0,02% ПДАДМАХ, рН 5, (В): ФЭ: 20 мМ АБР с доб. 5% ПДАДМАХ-НЧЗ, рН 4; ввод аналитов 5 с, -15 кВ [16].

Таким образом, НЧЗ обеспечивают возможность формирования различных покрытий с высокой площадью поверхности и контролируемым размером и формой модификатора, что приводит к повышению эффективности и селективности разделения аналитов в режиме КЭХ. Хроматографический механизм разделения осуществляется за счет специфических взаимодействий аналитов с наночастицами золота, что также проявляется в улучшении разделения компонентов сложных смесей. Использование модифицированных НЧЗ позволяет преодолеть недостатки наночастиц, связанные с их неустойчивостью в растворах с высокой ионной силой и при низких значениях рН, и улучшить показатели разделения сложных смесей аналитов.

1.2.2 Формирование многослойных покрытий на основе наночастиц золота

Наиболее перспективным вариантом применения НЧЗ в качестве модификаторов стенок капилляров в КЭ является их совместное использование с полимерами при формировании многослойных покрытий, которые сочетают в себе как особые свойства наночастиц, связанные со способностью к специфическим взаимодействиям с аналитами и развитой поверхностью, так и высокую стабильность полимерных покрытий. Кроме того, данный подход открывает широкие возможности функционализации покрытий для анализа различных биологических объектов за счет варьирования природы функционального (внешнего) слоя.

В одной из первых работ по формированию двухслойных покрытий с участием наночастиц [17] первый слой был сформирован с использованием полимерного модификатора поливинилпирролидона (ПВП). В качестве функционального слоя наносились ПЭО-модифицированные НЧЗ. Сформированное двухслойное покрытие позволило провести экспрессное разделение двухцепочечных фрагментов ДНК и пар оснований в ДНК. Роль НЧЗ в данном исследовании

достоверно не установлена, авторы связывают улучшение в разделении фрагментов ДНК со специфическими взаимодействиями наночастиц золота с аналитами.

В [18] продемонстрировано формирование трехслойного покрытия на основе полимеров ПДАДМАХ и поли(4-стиролсульфонат натрия) (ПСС) совместно с положительно заряженными НЧЗ, модифицированными диметиламинопиридином (ДМАП) для разделения кислотных и основных белков в составе яичного белка (Рис. 8). Результаты показали, что сформированное трехслойное покрытие (ПДАДМАХ-ПСС-(ДМАП-НЧЗ)) отличается большей стабильностью и плотностью, а также препятствует сорбции аналитов на поверхности капилляров.

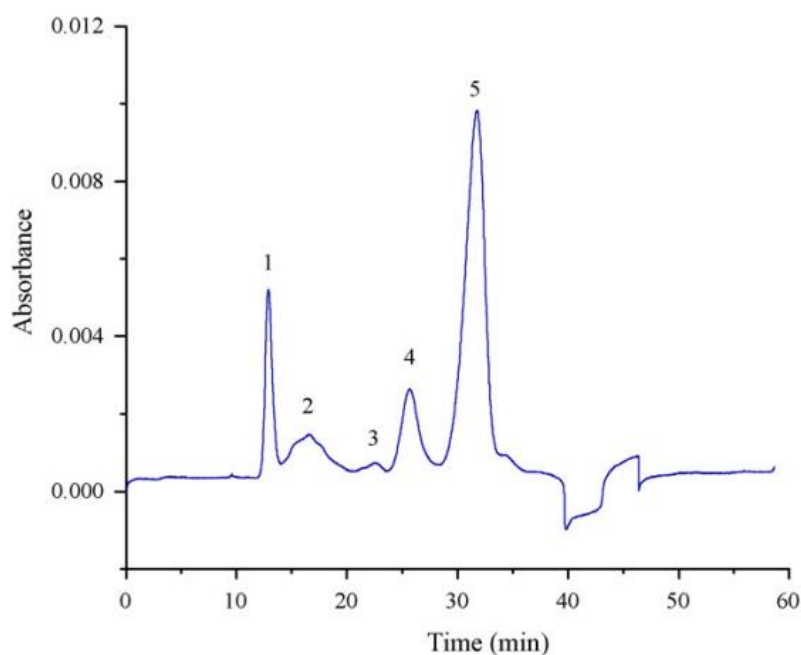


Рис. 8. Электрофореграмма компонентов яичного белка: 1 - овомукоид, 2 - лизоцим, 3 - авидин, 4 - овотрансферрин, 5 - овальбумин.

Условия: ФЭ: 10 мМ ФБР, рН 8,6; ввод аналитов 7 с, 20 мбар, 20 кВ [18].

В этой же работе на основе ПДАДМАХ и ПСС совместно с цитрат-стабилизированными наночастицами золота получают четырехслойное покрытие, последовательно покрывая капилляр полимерами ПДАДМАХ, ПСС, ПДАДМАХ и отрицательно заряженными ψ НЧЗ (Рис. 9).

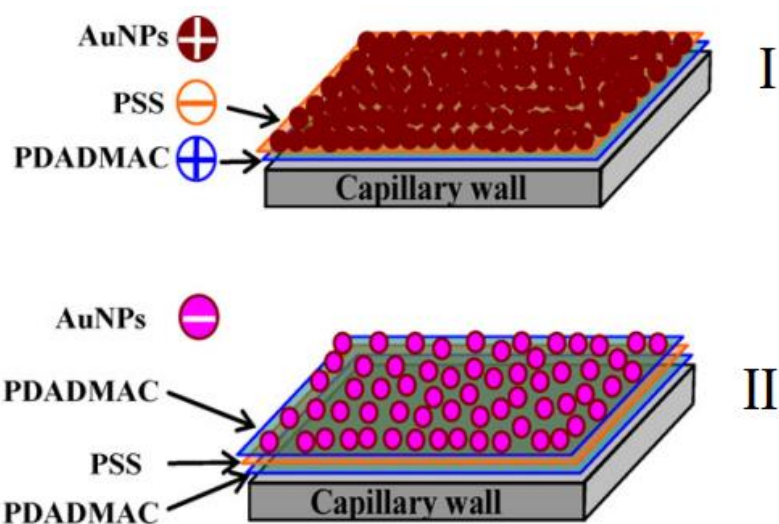


Рис. 9. Схема формирования трех- (I) и четырехслойного (II) покрытий. [18]

Сформированные покрытия использовали для разделения смеси нафталина, тиомочевины и бифенила (Рис. 10)

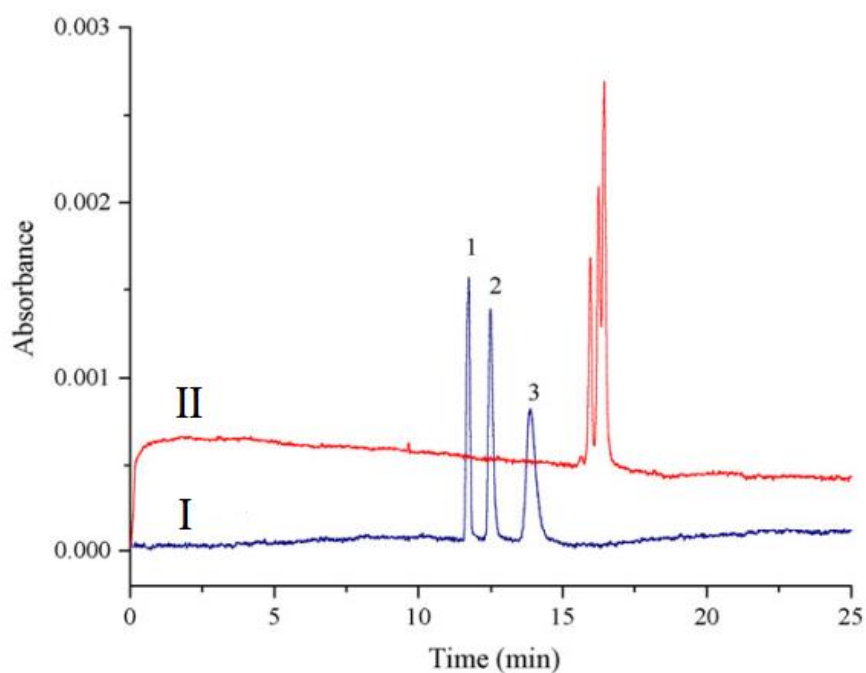


Рис. 10. Электрофореграммы анализируемой смеси на трех- (I) и четырехслойном (II) покрытиях. 1 - тиомочевина, 2 - нафталин, 3 - бифенил.

Условия: ФЭ: 10 мМ метанол, Na_2HPO_4 (45:55), pH 7; ввод пробы 2 с, 20 мбар, 20 кВ [18].

Лиганд ДМАП, в отличие от цитрата, характеризуется обратимо-связывающей природой. При создании покрытия ДМАП-модифицированными НЧЗ

нивелируется эффект кулоновского отталкивания между наночастицами и формируется более плотное покрытие по сравнению с цитрат-стабилизированными НЧЗ.

Другой полимер, активно используемый в сочетании с НЧЗ для создания полислоистых покрытий — полидопамин (ПДА). Особенностью таких систем является возможность получения ПДА и НЧЗ *in situ* внутри капилляра. В работе [19] сообщается о получении подобных покрытий в микрочипах для разделения смеси аминокислот (аргинин, валин, гистидин, пролин и треонин), где были сформированы стабильные, ковалентно связанные, статические покрытия за счет полимеризации допамина и роста ПДА-модифицированных НЧЗ непосредственно внутри капилляра.

В [20] обсуждается ковалентная иммобилизация цитрат-стабилизированных НЧЗ на капилляре, покрытом ПДА, с последующей постфункционализацией α -глюкозидазой. Полученное покрытие использовали для разделения аналитов (ингибиторов α -глюкозидазы) из экстрактов растений. Результаты показали увеличение селективности разделения и воспроизводимости по сравнению с двухслойным покрытием ПДА-НЧЗ.

Кроме того, ПДА в качестве покрытий стенок капилляра в сочетании с наночастицами позволяет проводить хиральное разделение [21, 22, 23], что будет подробнее освещено в разделе 1.3.

Таким образом, совместное использование полимеров и наночастиц в качестве модификаторов стенок капилляров открывает широкие возможности по созданию стабильных покрытий с развитой поверхностью и возможностью функционализации для разделения компонентов сложных смесей, в том числе энантиомеров. Это, в свою очередь, заметно расширяет аналитические возможности метода капиллярного электрофореза.

1.3 Полимеры и наночастицы в качестве покрытий для хирального разделения в условиях капиллярного электрофореза

Разделение энантиомеров представляет одну из наиболее сложных и актуальных задач современной химии. Капиллярный электрофорез является подходящим инструментальным методом для анализа и разделения смесей энантиомеров, что востребовано в таких областях науки, как медицина, фармацевтика, биохимия и биология [24].

Наиболее активно применяемыми хиральными селекторами в капиллярном электрофорезе являются циклодекстрины (ЦД) и их производные, полисахариды, макроциклические антибиотики, полимерные поверхностно-активные вещества (ПАВ) [25], краун-эфиры, ионные жидкости [26] и белки [27]. Применение полимеров и наночастиц позволяет формировать прочные покрытия капилляров, в том числе многослойные, с высокой удельной поверхностью, обладающие большим количеством активных центров связывания для разделения энантиомеров.

1.3.1 Покрытия стенок капилляра на основе полимеров для хирального разделения в КЭ

В хиральном разделении методом КЭ широко применяются полимерные модификаторы, которые могут выполнять как функцию связующего слоя, формируя плотные покрытия для последующей иммобилизации оптически активных модификаторов, так и выступать в качестве функциональных слоев, способных к разделению энантиомеров.

В качестве полимерных хиральных селекторов используют полимерные ионные жидкости, полициклодекстрины, сурфактанты, полисахариды, пептиды и др [9]. В данной главе обсуждаются основные аспекты применения этих модификаторов для хирального разделения биологически активных соединений.

Ионные жидкости (ИЖ) – соли, температура плавления которых ниже 100°C, в их состав входит, как правило, сложный органический катион и органический или неорганический анион. К преимуществам их использования в качестве модификаторов в КЭ относится возможность широкой функционализации и проведения анализа в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). Хиральные ионные жидкости представляют интерес, поскольку могут

одновременно выполнять функцию электролита и хирального селектора. Однако стационарные фазы на основе ИЖ склонны к агломерации. Для устранения данного недостатка и получения однородных покрытий кварцевого капилляра применяют полимерные ионные жидкости, объединяющие уникальные свойства ИЖ и полимеров [28]. Полимерные ионные жидкости могут быть использованы для получения как динамических [29], так и физически-адсорбированных и ковалентных покрытий [30] для разделения органических и неорганических соединений [31]. В [32] продемонстрировано использование полиундеценоксикарбонил-L-лейцинол бромид (Рис.11), катионного поверхностно-активного вещества, для разделения анионных аналитов, в частности, ((±)-2-(2-хлорфенокси)пропановой кислоты (Рис. 12).

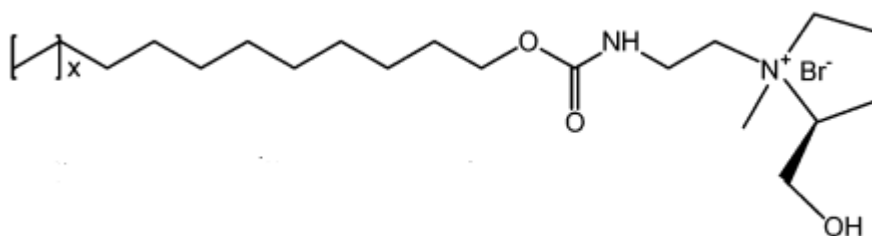


Рис. 11. Структурная формула полиундеценоксикарбонил-L-лейцинол бромида [32].

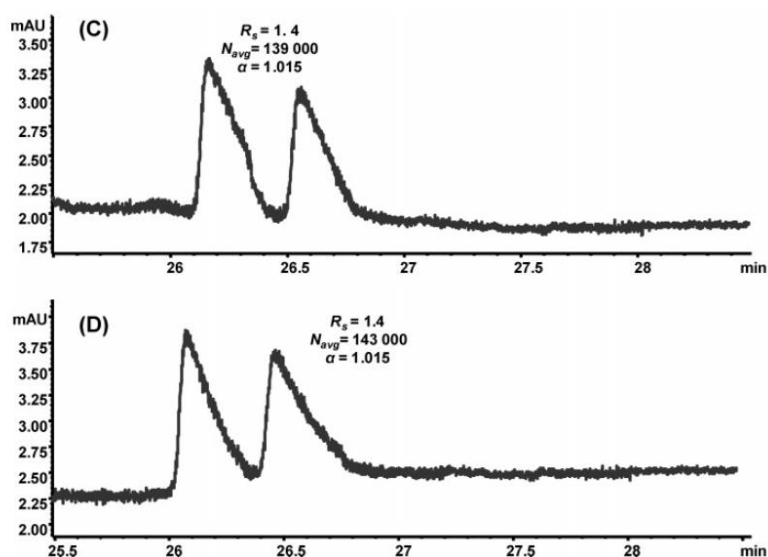


Рис. 12. Электрофореграмма энантимеров ((±)-2-(2-хлорфенокси)пропановой кислоты.

Условия: ФЭ: 50 мМ ФБР (pH=7,5), 25 мМ полиундеценоксикарбонил-L-лейцин бромида, -20 кВ, 214 нм [32]

Хиральное разделение в данном случае обеспечивает электростатическое взаимодействие кислотных аналитов с положительно заряженной ИЖ и специфические взаимодействия между селектором и аналитами с участием четвертичного атома азота ИЖ. Результаты демонстрируют улучшение селективности разделения при переходе от мономерной к полимеризованной ИЖ.

Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды усеченной цилиндрической формы и соответственно являются перспективными для энантиоразделения за счет образования комплексов-включений между циклодекстрином и аналитом. Применение полициклодекстрина для хирального разделения рассмотрено в [33]. Достигнуто разделение энантиомеров триметохинола и его родственных соединений при проведении анализа в фосфатном буферном растворе с 5%-ной добавкой полимеризованного β -циклодекстрина (Рис. 13).

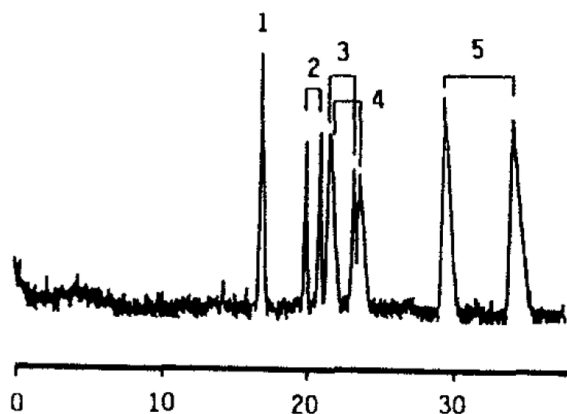


Рис. 13. Электрофореграмма смеси энантиомеров: 1- ауданозин, 2 - триметохинол, 3 - лауданозолин, 4 - норлауданозолин, 5 - изомер триметохинола. Условия: ФЭ: 25 мМ ФБР ($pH=2,7$); 2 М мочевины, 5% полимера β -циклодекстрина [33].

Однако в данном случае наблюдается существенное перекрытие пиков изомеров разных соединений. Для увеличения селективности разделения авторами предложено введение добавки поверхностно-активного вещества – додецилсульфата натрия (Рис. 14) в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ), что позволяет реализовать режим мицеллярной электрокинетической хроматографии.

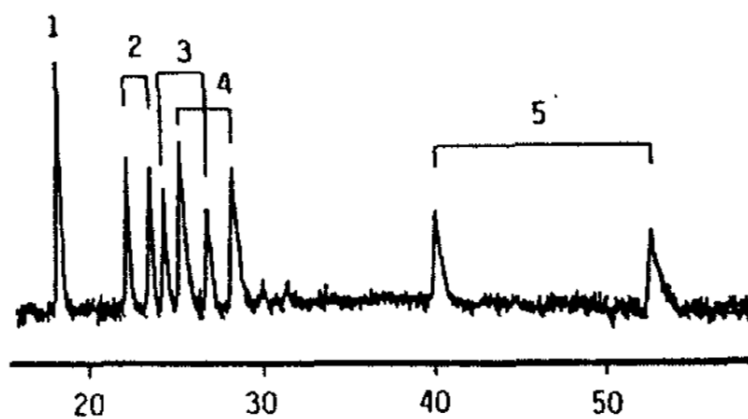


Рис. 14. Электрофореграмма смеси энантиомеров в режиме МЭКХ: 1- ауданозин, 2 - триметохинол, 3 - лауданозолин, 4 - норлауданозолин, 5 - изомер триметохинола.

Условия: ФЭ: 25 мМ ФБР (рН=2,7); 2 М мочевины, 5% полимера β -циклодекстрина, 10 мМ додецилсульфат натрия [33].

Таким образом, хиральному разделению могут способствовать и поверхностно-активные вещества, применяемые в МЭКХ. Преимуществом такого варианта проведения электрофоретического разделения является возможность определения нейтральных соединений. Использование высокомолекулярных ПАВ, таких как поли(N-ундециленил-L-лейцин-L-валинат натрия), поли(N-ундециленил-L-валин-L-валинат натрия), обеспечивает большую стабильность и жесткость образуемых мицелл, а также независимость их формы от концентрации, состава и рН ФЭ, что гарантирует воспроизводимость разделения и времен миграции аналитов [34]. В [35] для разделения энантиомеров 3,5-динитробензоилированных изопропиловых эфиров аминокислот выбран поли(N-ундециленил-L-валинат натрия), способный к образованию мицелл. Введение добавок данного ПАВ в состав фонового электролита обеспечило разделение энантиомеров производных аминокислот (Рис. 15).

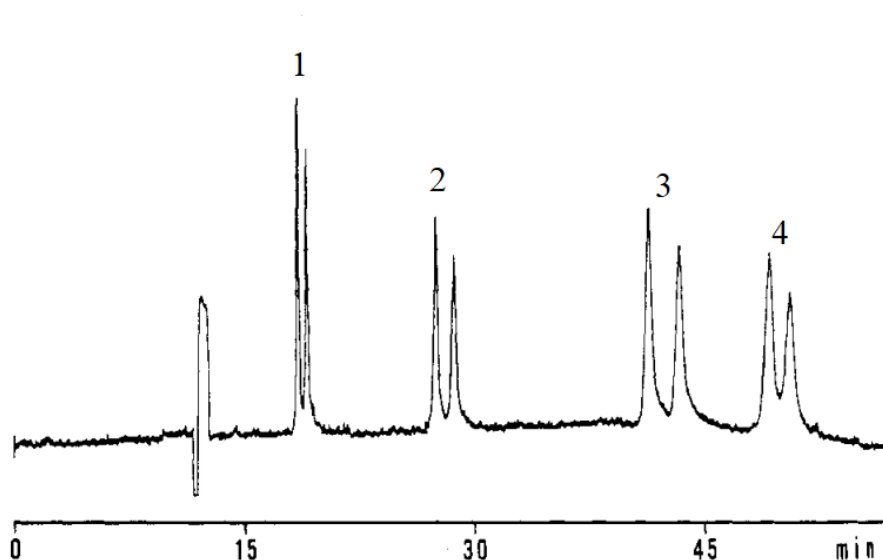


Рис. 15. Электрофореграмма смеси энантиомеров 3,5-динитробензоилированных изопропиловых эфиров аминокислот в режиме МЭКХ: 1- аланин, 2 - валин, 3 - лейцин, 4 - фенилаланин.

Условия: ФЭ: 12,5 мМ поли(N-ундециленил-L-валинат натрия) в 25 мМ боратном буферном растворе (ББР) (pH=7,0); 10% (об.) MeOH [35].

Для разделения оптически активных соединений также могут быть использованы полисахариды ввиду наличия нескольких стереогенных центров в структуре и спиральной закрутки основной цепи. Так, высокая растворимость и гибкая спиральная структура мальтодекстрина делает его подходящим в качестве хиральной добавки в ФЭ для разделения энантиомеров трамадола и метадона [36]. Отрицательный заряд высокосульфатированных гетерополисахаридов, таких как хондроитинсульфат D и геприн, способствует повышению их растворимости в воде и электрофоретической подвижности. В [37] их используют в качестве добавок в ФЭ в режиме электрокинетической хроматографии (ЭКХ). В этом случае, разделение энантиомеров осуществляется за счет гидрофобных и стерических взаимодействий между селектором и аналитами.

Олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты, представляющие собой гетерополимеры нуклеотидных оснований, также из-за их растворимости в воде могут быть использованы для хирального разделения в качестве добавок в ФЭ. В [38] авторами установлено, что лучшее разделение оптически активных соединений достигается при использовании длинных одноцепочечных олигонуклеотидов за счет

большого количества и высокой доступности активных центров связывания с аналитами.

Для электрофоретического разделения энантиомеров применяется и вариант формирования многослойных покрытий на основе полиэлектролитов, ионных жидкостей и др. При этом, необязательно чтобы каждый слой модификатора был хиральным [39]. В [40] авторами было сформировано многослойное покрытие на основе полипептида поли-L-лизина, выполняющего функцию катионного слоя, и полимерного дипептида поли(ундеcanoил-L-лейцилаланин натрия) (анионный слой). Полислойные покрытия с чередованием противоположно заряженных слоев модификаторов получались последовательной промывкой капилляра соответствующими растворами. Аналитические возможности сформированных покрытий, состоящих из четырех бислоев, были выявлены при анализе энантиомеров бинафтильных производных и двух β -блокаторов. На Рис. 16 представлена электрофореграмма, полученная для 1,1'-би-2-нафтил-2,2'-дигидрофосфата, хиральное разделение которого авторы объясняют специфическими взаимодействиями слабо гидрофобного аналита с гидрофобным ядром полимерного дипептида.

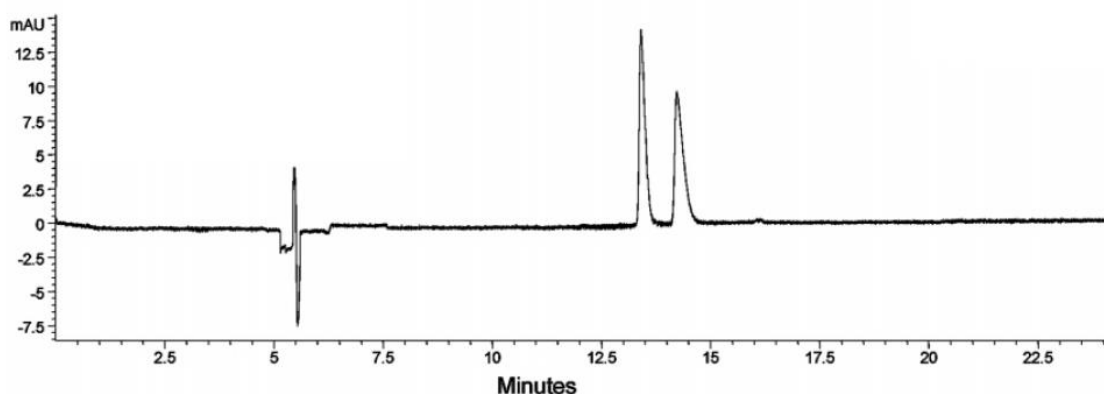


Рис. 16. Электрофореграмма энантиомеров 1,1'-би-2-нафтил-2,2'-дигидрофосфата.

Условия: 4 бислоя; 0,02% (масс./объем) поли-L-лизина в 0,5 М растворе NaCl и 0,25% (вес/объем) поли(ундеcanoил-L-лейцилаланин натрия). ФЭ: 10 мМ ББР (pH=10,2), 30 кВ, 15°C, 220 нм [40].

Полученные полислойные покрытия характеризуются высокой стабильностью (до 290 циклов анализа) за счет большей плотности слоев модификаторов и высокой

хиральной активностью, позволившей разделить энантимеры определяемых веществ.

Таким образом, использование хиральных полимерных модификаторов позволяет проводить электрофоретическое разделение в режиме КЭХ. В данном случае полимер выступает в качестве стационарной фазы и гарантирует прочную пришивку к внутренней поверхности кварцевого капилляра. Кроме того, за счет склонности высокомолекулярных соединений к мицеллообразованию, возможна реализация режима МЭКХ, что позволяет разделять нейтральные оптически активные соединения.

1.3.2 Применение альбумина в качестве хирального модификатора стенок капилляра

Бычий сывороточный альбумин (БСА) представляет собой глобулярный, стабильный, водорастворимый белок, активно используемый в качестве хирального селектора в КЭ при разделении энантимеров биологически активных соединений и лекарственных препаратов.

Сывороточный альбумин состоит из трех структурно-гомологичных α -спиральных доменов (I, II и III), каждый из которых подразделяется на субдомены A и B (Рис. 17) [41].

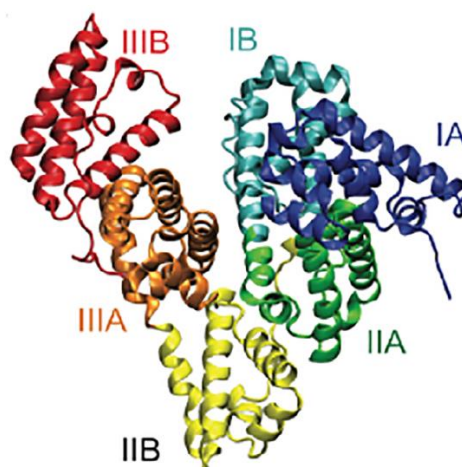


Рис. 17. Структура сывороточного альбумина с указанием субдоменов [41].

В составе белка имеются различные лиганды (центры связывания) и связывающая способность альбумина широко варьируется для разных лигандов. Так, существует до семи сайтов связывания длинноцепочечных жирных кислот. Эти

сайты имеют разную аффинность связывания и образованы остатками всех шести субдоменов. Для лекарственных средств, таких как дансированные аминокислоты, в составе сывороточного альбумина имеется два основных сайта связывания, называемые «сайты лекарств» 1 и 2, расположенные в субдоменах *IIA* и *IIIA* соответственно. Физико-химические свойства боковых цепей дансированных аминокислот определяют с каким сайтом лекарств будет происходить связывание. Например, дансил-L-фенилаланин и дансил-L-норвалин, имеющие гидрофобные боковые цепи специфичны для сайта лекарств 2, а дансированные аминокислоты с полярными или заряженными боковыми цепями, такие как дансил-L-аспаргин и дансил-L-аргинин, преимущественно связываются с сайтом 1 [42].

Один из возможных вариантов проведения хирального разделения с использованием альбумина – формирование динамического покрытия путем введения добавок БСА в фоновый электролит. В [43] рассмотрено хиральное разделение таких пар энантиомеров как эфедрин-псевдоэфедрин и норэфедрин-норпсевдоэфедрин (Рис. 18), с использованием добавок БСА. Кроме того, авторами изучено влияние органических растворителей (метанол, этанол, тетрагидрофуран, пропан-1-ол и пропан-2-ол) в составе ФЭ на хиральное разделение компонентов смеси. Показано, что в случае пропан-2-ола улучшилось разделение для указанных выше энантиомеров.

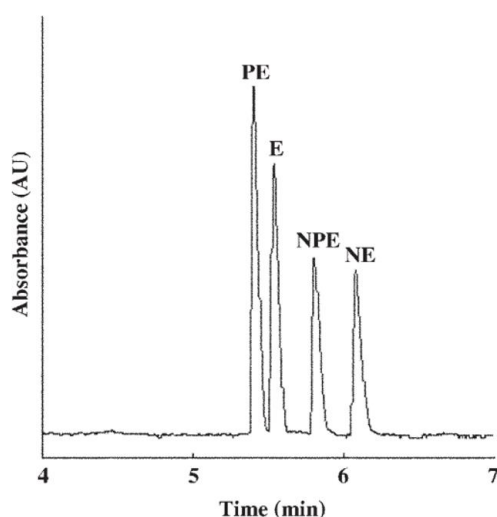


Рис. 18. Электрофореграмма смеси эфедрин (E), псевдоэфедрин (PE), норэфедрин (NE), норпсевдоэфедрин (NPE).

Условия: ФЭ: 10 mM БСА; 15% (объемн.) пропан-2-ол; ФБР pH 9,0; ввод пробы 4 с, 0,34 бар, 15 кВ [43].

В [44] белок альбумин применяется в качестве стереоселективного связывающего агента, способного взаимодействовать с широким спектром органических и неорганических соединений. В работе предложен вариант формирования однослойного покрытия кварцевого капилляра с использованием альбумина. БСА необратимо адсорбируется в отсутствие электрического поля (0,72 монослоя), однако при наложении напряжения отмечена его десорбция (на 20% в течение 1 ч). Для предотвращения разрушения покрытия в ходе анализа в ФЭ добавляли альбумин, что позволило существенно снизить десорбцию модификатора (<1% за 4 ч). В работе проводилось хиральное разделение D,L-триптофана и R,S-варфарина. Известно, что D- и L-триптофан взаимодействуют с двумя различными центрами связывания в структуре альбумина, при этом константы комплексообразования каждого из энантиомеров значительно отличаются друг от друга. (Рис. 19). R и S-варфарин взаимодействуют с альбумином через один центр связывания, силы связывания энантиомеров с активным центром белка отличаются незначительно, кроме того, аффинность варфарина к альбумину выше, чем в случае триптофана. Все это приводит к реализации различных механизмов разделения энантиомеров данных соединений. Разделение энантиомеров варфарина было достигнуто при использовании БСА-модифицированных капилляров. Введение БСА в фоновый электролит отрицательно сказывалось на энантиоселективности, поскольку высокое сродство обоих энантиомеров к БСА делает их электрофоретические подвижности фактически неразличимыми. Обратная ситуация наблюдалась в случае триптофана, для разделения энантиомеров которого концентрации активных центров на БСА-модифицированной поверхности капилляра оказалась недостаточной. Приведенные исследователями расчёты показали, что для разделения энантиомеров триптофана без добавок селектора в фоновый электролит необходимо 10-100 кратное увеличение концентрации БСА на поверхности капилляра. (Рис. 19).

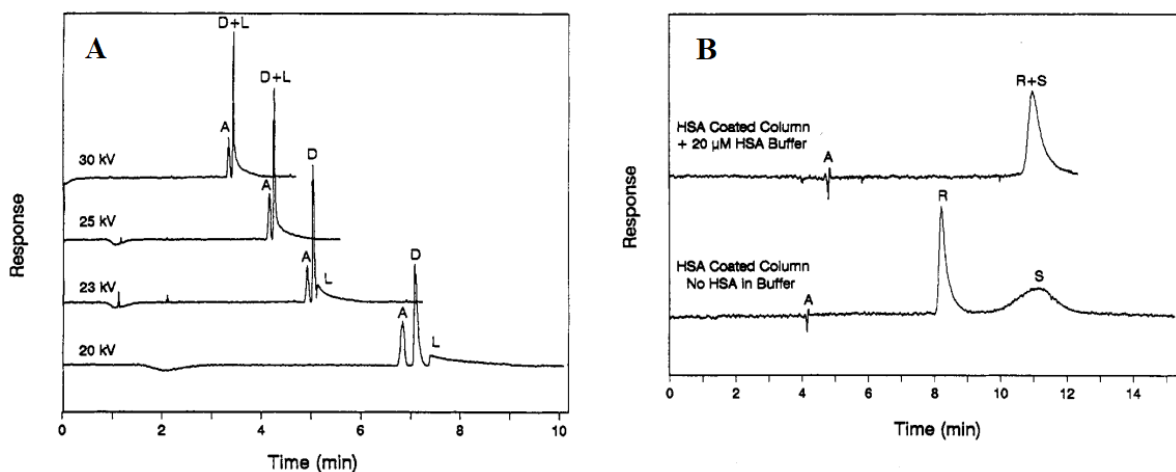


Рис. 19. Электрофореграммы: (А) — разделение D и L - триптофана (в присутствии БСА в ФЭ при разном напряжении); (В) — разделение стандартной смеси R и S - варфарина (при наличии БСА в ФЭ и в его отсутствии). А - ацетон (маркер ЭОП).

Условия: ФЭ: 25 мМ ФБР, рН 7,4. Добавка БСА 10 мкМ (анализ триптофана) и 0,05 мкМ (анализ варфарина); напряжение 20-30 кВ [44].

1.3.3 Покрывтия капилляров на основе наночастиц для хирального разделения

Для хирального разделения в качестве перспективных модификаторов стенок капилляра также успешно зарекомендовали себя наночастицы: полимерные и на неорганической основе. При этом наночастицы могут сами проявлять свойства хиральных селекторов, а также выступать в качестве носителей для других оптически активных соединений. К преимуществам использования наночастиц относится их развитая поверхность, приводящая к увеличению количества активных центров для специфических взаимодействий с аналитами, способствующее повышению эффективности и селективности разделения энантиомеров.

В [45] продемонстрировано формирование хиральной неподвижной фазы на основе природного полимера хитозана. Для получения покрытия в капилляр вводили раствор для полимеризации, содержащий хитозан в хлористом метиле, глицидилметакрилат, м-метилбензойную кислоту и ацетат калия. В результате *in situ* сополимеризации образуется нанохитозан, модифицированный глицидилметакрилатом, при этом нанохитозан оказывается ковалентно привитым к

стенкам капилляра. Полученное покрытие применяли для разделения энантиомеров α -токоферолов, катехинов и триптофана.

Пример использования наночастиц для увеличения энантиоселективности покрытий описан в [46]. Авторами предложен вариант формирования покрытий полистирольными наночастицами, модифицированными альбумином (БСА-ПС НЧ (размер наночастиц 70 и 150 нм)). Использование наночастиц позволило получать покрытия с развитой поверхностью и высоким содержанием хирального селектора на стенках капилляра, что в свою очередь способствовало полному разрешению энантиомеров модельных соединений по сравнению с монослойным покрытием на основе альбумина. Сформированные покрытия использовали для разделения смесей энантиомеров: D,L-триптофана (Рис. 20), D,L-тирозина и R,S-варфарина. Результаты анализов подтверждают увеличение селективности разделения по сравнению с однослойным покрытием, а также хорошую воспроизводимость времен миграции аналитов и стабильность покрытия БСА-ПС.

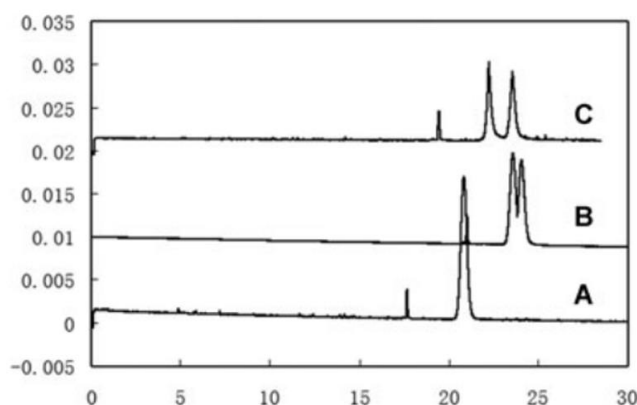


Рис. 20. Электрофореграмма энантиомеров D,L-триптофана: на однослойном покрытии БСА (А), на капилляре, покрытом БСА-ПС₁₅₀ НЧ (В), на капилляре, покрытом БСА-ПС₇₀ НЧ (С).

Условия: ФЭ: 20 мМ Трис-НСl, рН 7,4; ввод пробы 3 с, 0,4 фунта на кв. дюйм, 20 кВ [46].

В [47] описан вариант энантиоселективного покрытия на основе композита полидофамина, оксида графена и альбумина (ПДА-ОГ-БСА), используемого в качестве хирального селектора в микрофлюидном варианте КЭХ. Покрытие формировалось *in situ* после заполнения микрочипа полидиметилсилоксановым (ПДМС) раствором, содержащим дофамин и оксид графена. В результате на

внутренней стенке микроканала формировалось прочное покрытие ПДА-ОГ, обладающее высокой биосовместимостью. Включения оксида графена обеспечивают шероховатую морфологию поверхности, что увеличивает емкость образующихся покрытий. Полученные композиты на основе ПДА-ОГ были модифицированы БСА. С помощью сформированного покрытия авторам удалось провести хиральное разделение смеси энантимеров триптофана, треонина и хирального дипептида (глицил-D-фенилаланина и глицил-L-фенилаланина) (Рис. 21).

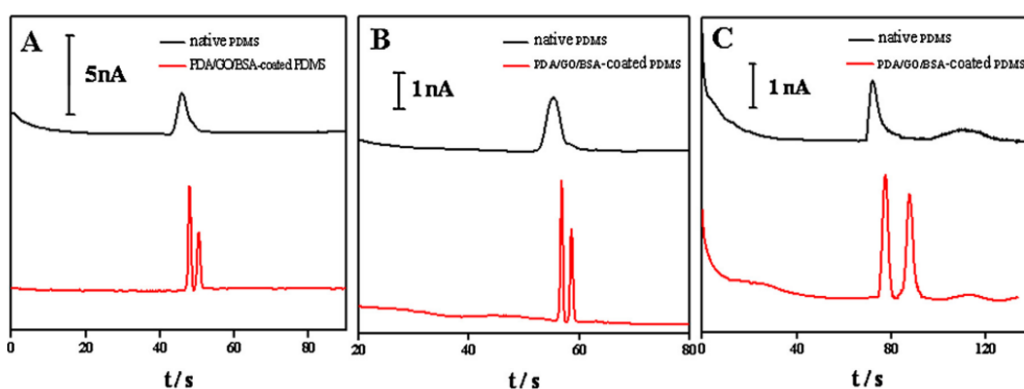


Рис. 21. Электрофореграмма энантимеров: триптофана (А), треонина (В) и хирального дипептида (С) на микрочипе ПДМС, покрытом ПДА-ОГ-БСА.

Условия: ФЭ: 20 мМ PBS, pH 7,17; ввод аналитов 5 с, 1,3 кВ [47].

1.3.4 Применение наночастиц золота как компонента покрытий для хирального разделения

Перспективными модификаторами стенок капилляров для хирального разделения аналитов в капиллярном электрофорезе являются наночастицы золота. К преимуществам их использования относится стабильность, развитая поверхность и легкость химической модификации, что открывает широкие возможности для создания модификаторов, придающих наночастицам золота свойства хиральных селекторов.

Существует два возможных варианта применения НЧЗ для разделения оптически активных компонентов смеси: покрытие капилляров модифицированными наночастицами золота, способными к хиральному разделению, и формирование многослойных покрытий на основе НЧЗ и хиральных селекторов.

В [48] авторами проведено разделение адренергических соединений (адреналина, норадреналина и изопреналина) на кварцевых капиллярах с добавлением в фоновый электролит НЧЗ, модифицированных стрептомицином (СТ-НЧЗ) (Рис. 22). Наночастицы хорошо диспергируются в буферном растворе за счет наличия amino- и гидрокси- групп в стрептомицине.

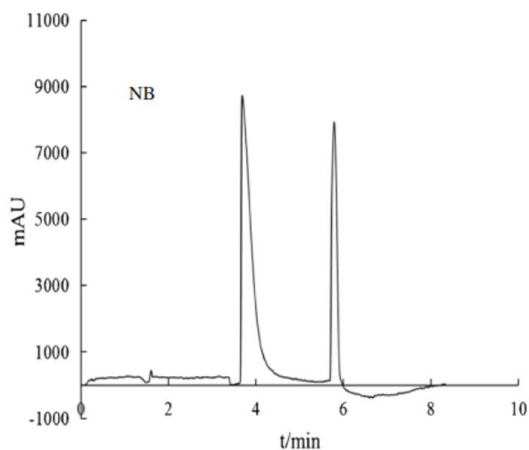


Рис. 22. Электрофореграмма энантиомеров норадреналин битартрата на кварцевом капилляре с введением в ФЭ СТ-НЧЗ.

Условия: ФЭ: 20 mM ФБР, pH 5,0, 50 mM СТ-НЧЗ; ввод пробы 5 с, 35 мбар, 27 кВ [48].

Как отмечалось ранее, в качестве полимера для создания полислойных покрытий в сочетании с НЧЗ часто применяется полидофамин. В случае модификации двухслойного покрытия (ПДА-НЧЗ) хиральным селектором возможно получение стационарных фаз, пригодных для разделения энантиомеров. В [22] авторами предложена методика разделения D,L-триптофана, и определения глутатиона в бактериях и клетках, на двухслойных покрытиях на основе ПДА и *цНЧЗ* с постфункционализацией тиолированной ДНК. Покрытие формируется *in situ* в капилляре путем полимеризации ПДА и образования НЧЗ при заполнении микроканала растворами дофамина и HAuCl_4 с последующей промывкой раствором тиолированной ДНК (Рис. 23). В результате образуется ковалентно привитый монослой тиолированной ДНК на поверхности НЧЗ, позволяющий проводить хиральное разделение аналитов.

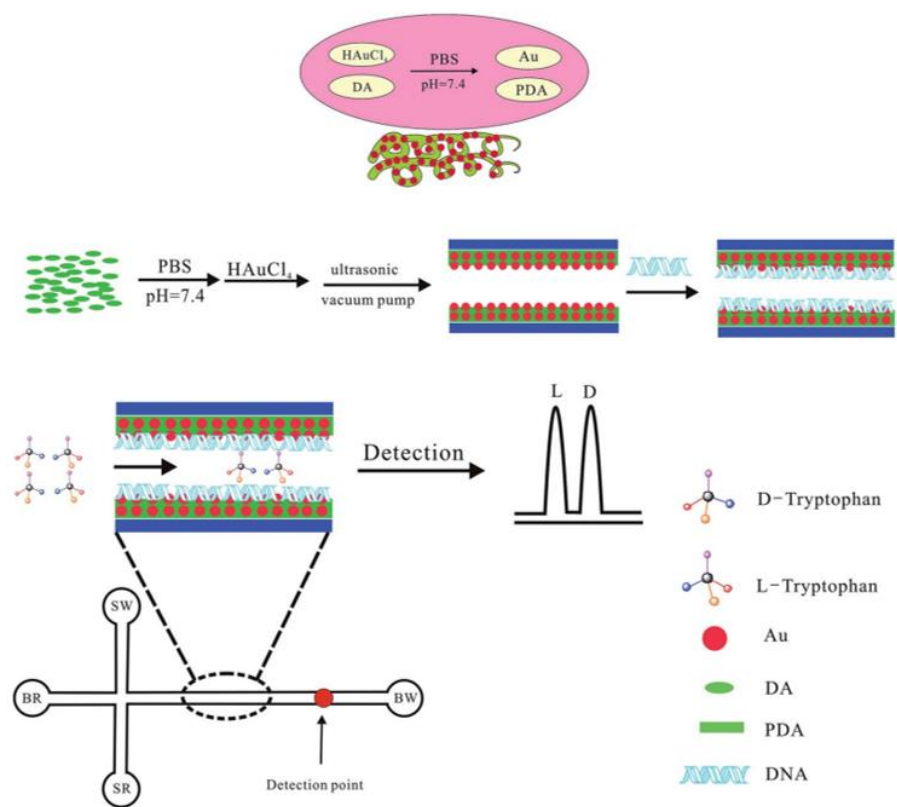


Рис. 23. Схематичное изображения механизма иммобилизации тиолированной ДНК на капилляре, покрытом ПДА-НЧЗ, и хирального разделения D, L-триптофана [22].

Подобная методика описана в [21], где было сформировано стабильное покрытие ПДА-НЧЗ с постфункционализацией тиолзамещенным β -циклодекстрином, показавшее высокую эффективность при хиральном разделении триптофана, фенилаланина, гистидина, фексофенадина, прометазина, тропикамида и тербуталина.

Таким образом, наночастицы золота находят широкое применение в качестве покрытий для электрофоретического разделения сложных смесей аналитов, а при их сочетании с хиральными агентами обеспечивают разделение энантиомеров. Перспективным развитием в данной области является формирование покрытий на основе НЧЗ в сочетании с белками, например, альбумином.

В [49] авторами проведена послойная ковалентная прививка цитрат-стабилизированных НЧЗ и альбумина на химически модифицированный 3-меркаптопропилтриметоксисиланом (3-МПТМС) капилляр (Рис. 24).

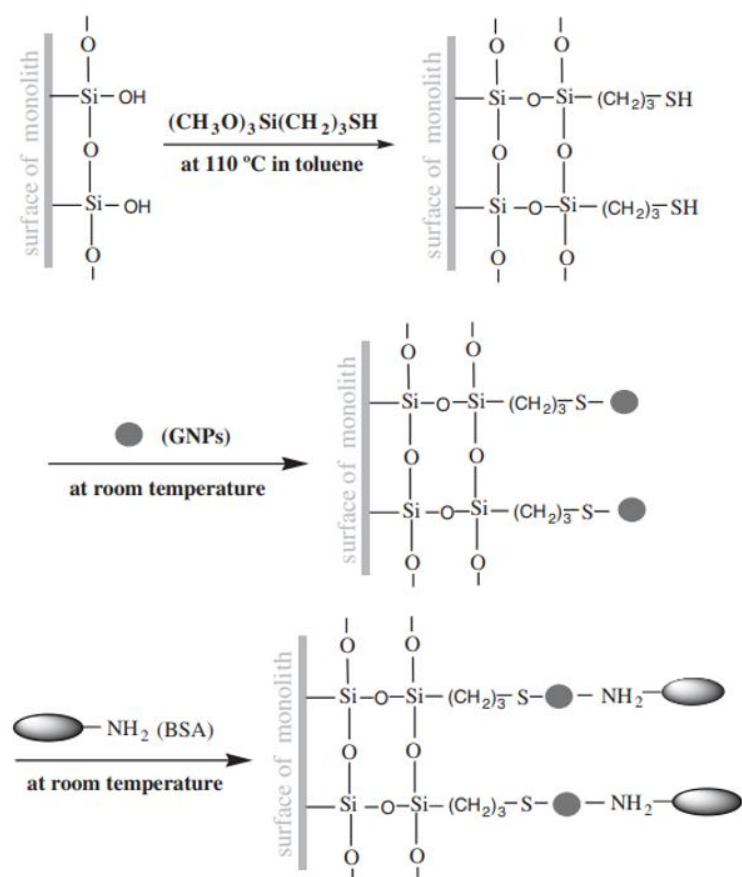


Рис. 24. Схема механизма формирования хирального покрытия 3-МПТМС-НЧЗ-БСА [49].

В результате получена хиральная стационарная фаза, позволяющая проводить разделение смеси аминокислот (*триптофана, тирозина, лейцина, серина, фенилаланина, аспаргиновой кислоты, аланина, треонина, аргинина*), дериватизированных фенилизотиоцианатом. Снимки со сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) полученного покрытия представлены на Рис. 25.

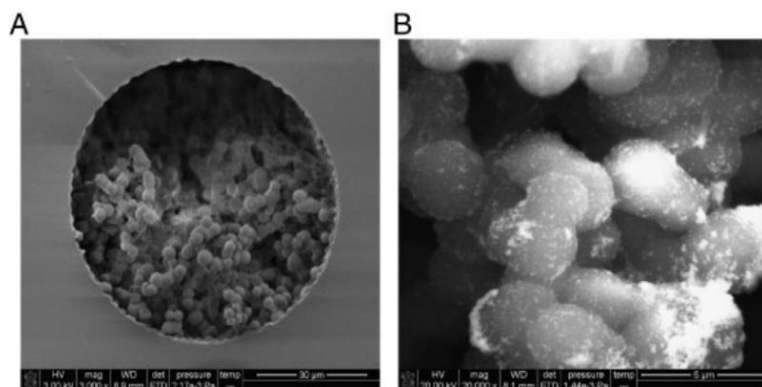


Рис. 25. СЭМ-снимки хирального покрытия 3-МПТМС-НЧЗ-БСА при 3000-кратном (А) и 20000-кратном (В) увеличении [49].

В [50] авторами также предложено формирование послойных покрытий на основе НЧЗ и БСА, однако в качестве подложки вместо 3-МПТМС создавалось покрытие 3-аминопропилтриэтоксисиланом (3-АПТЭС). Полученное 3-АПТЭС-НЧЗ-БСА покрытие использовали для разделения энантиомеров триптофана, эфедрина и атенолола.

Таким образом, применение наночастиц золота в капиллярном электрофорезе обеспечивает высокую емкость покрытий за счет развитой поверхности и увеличения количества активных центров на поверхности капилляра. Сочетание наночастиц золота с хиральными модификаторами приводит к формированию хиральных стационарных фаз, которые могут быть использованы для энантиоселективного разделения энантиомеров биологически активных соединений. Однако существующие в литературе подходы для формирования такого типа покрытий основываются на ковалентной модификации капилляров и являются трудоемкими и времязатратными. Разработка полислойных покрытий, основной механизм формирования которых – физическая адсорбция, позволила бы значительно сократить время модификации и увеличить воспроизводимость получаемых покрытий.

1.4 Характеристика исследуемых в работе наночастиц и полимеров

В данной работе выявлялась возможность совместного применения наночастиц золота и альбумина при создании физически-адсорбированных полислоистых покрытий для хирального разделения аналитов методом капиллярного электрофореза.

В литературе описаны различные методики синтеза наночастиц золота [51, 52]. Необходимым условием является использование стабилизаторов, препятствующих агрегации и осаждению частиц. Изменение соотношения стабилизатор – Au (III) позволяет получать наночастицы различного размера (5-150 нм) и состава. В качестве стабилизаторов могут быть использованы анионы (цитрат-анионы [4, 10, 53] (Рис. 26)) или полимеры (ПДАДМАХ) [15].

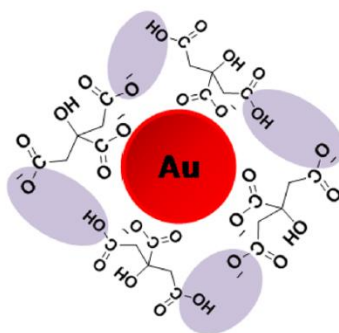


Рис. 26. Схематичное изображение НЧЗ, стабилизированных цитрат-анионами [53]

Методики синтеза наночастиц золота включают восстановление Au(III) до Au(I) и стабилизацию образующихся наночастиц. Наиболее распространенным методом является использование цитрат-анионов (цитрата натрия) для восстановления золота из тетрахлораурата (III) водорода (HAuCl₄) и стабилизации образующихся наночастиц золота (1).



Координация лиганда цитрата к наночастице золота происходит с участием центральной карбоксильной группой за счет электростатических (небольшого положительного заряда золота и отрицательно заряженного цитрат-иона) и специфических нековалентных взаимодействий. При этом при нейтральном значении pH возможно образование водородных связей между цитрат-анионами в

цитратной оболочке (Рис. 26). В щелочной среде из-за полной диссоциации ионов лимонной кислоты водородные связи разрываются и возможно электростатическое отталкивание между цитрат-анионами.

В данной работе использовали наночастицы золота синтезированные по методу Фримана [54]. Методика позволила получить цитрат-стабилизированные НЧЗ размером 11-13 нм и дзета-потенциалом – 45 мВ.

Для получения наночастиц пригодных для хирального разделения аналитов НЧЗ должны быть модифицированы специфическими хиральными лигандами, например, белками и пептидами (альбумин [55] и глутатион [56], соответственно). Модификация цитрат-стабилизированных наночастиц золота бычьим сывороточным альбумином проводилась, как описано в [54], с варьированием концентраций БСА. Подробнее условия синтеза описаны в разделе 2.3.

Наночастицы получены совместно с лабораторией «Плазмонно усиленной спектроскопии и биоимиджинга» на базе института химии СПбГУ и охарактеризованы методами спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и методом динамического светорассеяния. Подробная информация представлена в разделе 3.

Поскольку полученные цитрат-стабилизированные и альбумин-модифицированные наночастицы золота заряжены отрицательно, покрытие немодифицированного кварцевого капилляра ими напрямую невозможно и требуется предварительная модификация поверхности положительно заряженным модификатором-полимером. Данный модификатор, выполняя роль связующего слоя, мог бы обеспечить электростатическое связывание НЧЗ с поверхностью капилляра и формирование прочного покрытия капилляра с чередованием противоположно заряженных слоев модификаторов. В работе, в качестве такого модификатора используется поли(диаллилдиметиламмоний хлорид) (Рис. 27) [15, 16, 57].

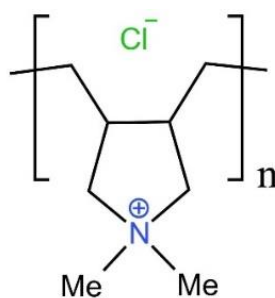


Рис. 27. Структурная формула поли(диаллилдиметиламмоний хлорида).

ПДАДМАХ характеризуется высокой молекулярной массой и независимым от рН положительным зарядом, позволяющим получать стабильные полислойные покрытия кварцевых капилляров [58]. В [57] продемонстрирована возможность формирования прочных покрытий капилляров ПДАДМАХ, устойчивых в диапазоне рН 2-6.

Помимо ПДАДМАХ в качестве связующего слоя в работе предложено использование другого катионного полиэлектролита – поли-L-лизина (ПЛЛ) (Рис. 28), который является оптически активным и, соответственно, может в формируемых покрытиях наряду с альбумином выполнять роль хирального селектора.

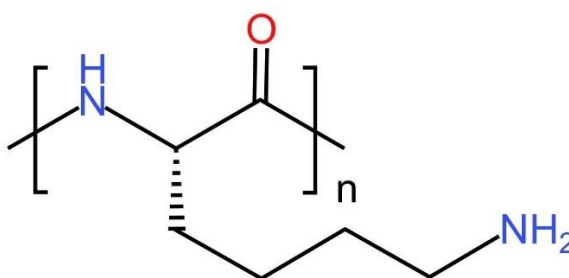


Рис. 28. Структурная формула поли-L-лизина.

В [59] авторами показано увеличение селективности и эффективности разделения энантиомеров β -блокаторов при замене связующего слоя ПДАДМАХ на PLL в исследуемых полиэлектролитных многослойных покрытиях.

Таким образом, данное исследование посвящено выявлению возможностей формирования полислойных покрытий, на основе ПДАДМАХ или PLL, БСА и НЧЗ, объединяющих свойства полимеров, наночастиц золота и альбумина, как хирального селектора. Последовательное нанесение противоположно заряженных слоев на стенки капилляра позволит получать плотную структуру, блокирующую силанольные группы на поверхности капилляра. Предполагается, что полученные покрытия могут оказаться новым и перспективным вариантом решения проблемы разделения оптически активных соединений методом капиллярного электрофореза.

1.5 Характеристика исследуемых в работе аналитов

Энантиомеры представляют собой пару стереоизомеров, являющихся зеркальными отображениями друг друга, не совмещаемыми в пространстве. Поскольку живая система хиральна по своей природе, оптически активные молекулы (аминокислоты, белки, ферменты и др.), могут по-разному действовать на хиральные рецепторы в живых организмах.

В хиральной среде молекулы энантиомеров проявляют разные физические, химические и биологические свойства. Исследования в области стереоспецифического биоанализа позволили различить сравнительный вклад отдельного энантиомера в общее клиническое действие. Как правило, только один из оптических изомеров проявляет желаемое терапевтическое действие, в то время как другой может быть менее активным, или наоборот оказывать негативное влияние на живой организм. Это связано с различной скоростью метаболизма биологической системы: энантиомеры могут по-разному связываться с сайтами рецепторов. Неактивная форма соединения оказывает избыточную нагрузку на организм и может приводить к нежелательным побочным эффектам, вплоть до летальных исходов. В настоящее время, широкий спектр лекарственных средств по-прежнему реализуется в виде рацематов, хотя только один энантиомер обладает требуемым действием [60].

Современные нехроматографические методы энантиомерного анализа включают поляризацию, ядерный магнитный резонанс, изотопное разбавление, калориметрию и др. [61]. Отличительной особенностью хроматографических методов является возможность определения индивидуальных энантиомеров в сложных смесях за счет отделения сопутствующих компонентов образца от пиков исследуемых аналитов. На данный момент существуют методики количественного определения энантиомеров методами газовой, высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза [25, 27].

1.5.1 Аминокислоты

Аминокислоты, встречающиеся в живых организмах, относятся преимущественно к L-ряду. D-энантиомеры аминокислот встречаются в пептидных антибиотиках и бактериальных средах, где синтезируются для поддержания

жизнедеятельности микроорганизмов с помощью аминокислотных рацемаз *аспартама, серина, лизина, аргинина, гистидина и др.* [62]. D-аминокислоты являются важнейшими компонентами клеточных стенок бактерий и могут высвобождаться в свободном виде, воздействуя на микробиоту хозяина [63].

Таким образом, присутствие D-аминокислот в организме человека может свидетельствовать о нарушениях функционирования организма и наличии бактериальных инфекций.

1.5.2 β -блокаторы

β -адренергические антагонисты (β -блокаторы) относятся к классу препаратов, действие которых основано на блокировании связывания норэпинефрина и адреналина с рецепторами. Данные лекарственные препараты используются при лечении гипертонии, стенокардии, сердечной аритмии, глаукомы и для снижения риска мигренозных головных болей. Аптечные β -блокаторы представляют собой рацемические смеси и с каждым годом их применение растет, а значит разработка энантиомерно чистых препаратов является важной задачей для клинической терапии [60].

Структура всех β -блокаторов содержит ароматическое кольцо, аминогруппу и гидроксильную группу, которые и связываются с рецепторными участками за счет водородных связей и π - π -взаимодействий. Различия в фармакодинамическом и фармакокинетическом поведении энантиомеров определяются их способностью связываться с сайтами хиральных рецепторов, например, белками плазмы крови и ферментами. Причем такое связывание чрезвычайно стереоспецифично и возможно лишь при строго определенной стереохимической ориентации [60].

β -блокаторы всасываются из желудочно-кишечного тракта путем пассивной диффузии, то есть их поглощение не стереоселективно. Выводятся же из организма они посредством метаболизма в печени или посредством почечной секреции, причем процесс метаболизма может быть стереоселективным: неактивный энантиомер накапливается, а активный - подвергается быстрой элиминации или наоборот.

В данной работе выявляются аналитические возможности разделения энантиомеров карведилола и пропранолола.

Карведилол представляет собой неселективный β -адреноблокатор, имеющий в составе карбазольную и этоксифенилметоксигруппу (Рис. 29). Он применяется при лечении застойной сердечной недостаточности в качестве антигипертензивного средства. (S)-карведилол способен блокировать α - и β -адренорецепторы, в то время как (R)-энантиомер выступает только в качестве α_1 -антагониста. Применение в качестве лекарственного препарата рацемической смеси карведилола не вызывает заметного снижения частоты сердечных сокращений, тогда как (R)-карведилол вызывает ее увеличение [60].

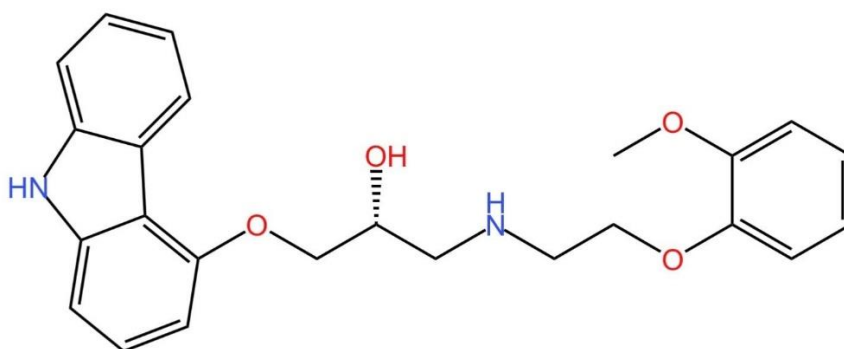


Рис. 29. Структурная формула (S)-карведилола.

Пропранолол (Рис. 30) представляет собой неселективный агонист β -адренорецепторов, также применяемый в клинической практике в виде рацемата. Однако (R)-форма не имеет фармакологического значения, тогда как (S)-пропранолол отвечает за сердечную β -блокирующую активность. (S)-пропранолол подвергается в процессе метаболизма глюкуронированию, гидроксированию ароматической системы и окислению боковой цепи [60].

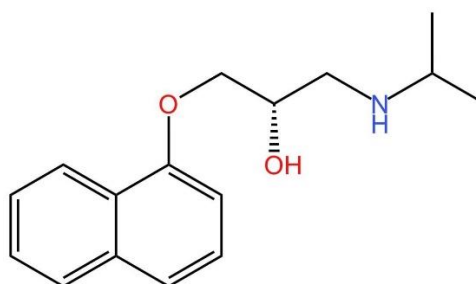


Рис. 30. Структурная формула (S)-пропранолола.

Ферменты, контролирующие специфический путь метаболизма, проявляют склонность только к одному энантиомеру β -блокаторов. Понимание стереохимии этих соединений помогает контролировать их фармакодинамическое и

фармакокинетическое поведение, что необходимо для достижения желаемых эффектов от проводимой лекарственной терапии.

Таким образом, развитие методик определения индивидуальных энантиомеров биологически активных соединения и контроль энантиочастоты является чрезвычайно актуальной задачей. Для ее решения перспективным является применения стабильного, водорастворимого белка – альбумина в качестве универсального хирального модификатора в методе капиллярного электрофореза. Для увеличения удельной поверхности стенок кварцевого капилляра могут использоваться ζ НЧЗ, способные также к специфическим взаимодействиям с аналитами. Объединение свойств ζ НЧЗ и БСА путем формирования многослойных стационарных покрытий должно обеспечить высокую энантиоселективность, обеспечивающую отсутствие необходимости внесения хирального селектора в состав фонового электролита или снижение его концентрации.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Аппаратурное оформление

Электрофоретические эксперименты проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург) (Рис. 31). В функционал прибора входят кассеты с кварцевым капилляром общей длиной 60 см и эффективной - 50 см с внутренним диаметром 50 мкм и внешним полиимидным покрытием. В приборе предусмотрено два варианта ввода пробы: гидродинамический (под давлением) и электрокинетический (под напряжением). Эксперименты проводятся при постоянной температуре с помощью системы жидкостного термостатирования (диапазон от +10°C до +50°C). Промывка капилляра проводится автоматически под давлением 1000 мбар. Блок высокого напряжения обеспечивает регулируемую подачу разности потенциалов от -25 до +25 кВ, переключение полярности осуществляется автоматически. Прибор оснащен системой спектрофотометрического детектирования (дейтериевая лампа и диспергирующий элемент), спектральный диапазон от 190 до 380 нм. Обработка результатов электрофоретических экспериментов проводится с использованием программного обеспечения «Эльфран» («Люмэкс», КЭ).

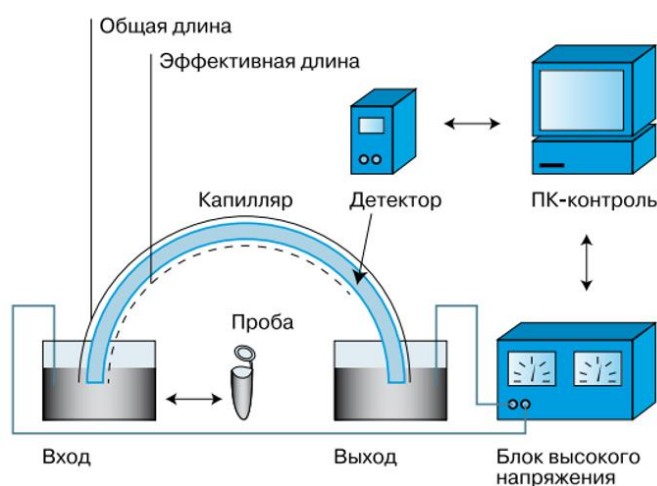


Рис. 31. Схема системы капиллярного электрофореза [64].

Регистрация спектров поглощения проводилась с помощью спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм при средней скорости сканирования.

СЭМ-снимки внутренней поверхности капилляров получены с помощью сканирующего электронного микроскопа *Zeiss Merlin* (Carl Zeiss AG, Германия).

Изображения просвечивающей электронной микроскопии были получены при помощи электронного микроскопа *Libra 200FE* (Carl Zeiss SMT, Германия) с ускоряющим напряжением 200 кВ.

Измерение дзета-потенциала проводилось с помощью лазерного анализатора *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) с лазерной линией с длиной волны 633 нм. Значение показателя преломления для золота – 0,27. Вязкость растворителя (воды) принимали равной $8.87 \cdot 10^{-4}$ Па·с, а показатель преломления – 1,33.

Средства измерений и дополнительное оборудование:

- микродозаторы вместимостью 1-20, 20-100 и 100-1000, 500-5000 мкл (Sartorius, Германия);
- лабораторный pH-метр pH 211 (Hanna Instruments, США)
- аналитические весы (Sartorius, Германия) ($d = 0,1$ мг);
- ультразвуковая ванна (Сапфир, Россия) 4Л/1 ТТЦ РМД;
- центрифуга с максимальной скоростью 14000 оборотов/мин (Eppendorf 5430, Германия);
- деионизатор Д-301 (Аквилон, Россия).
- микропробирки центрифужные полипропиленовые объемом 1,5, 2 и 4 мл (МиниМед, Россия), (Eppendorf, Германия);
- эппендорфы объемом 1,5 и 2 мл (МиниМед, Россия), (Eppendorf, Германия);
- конические полипропиленовые пробирки типа Falcon объемом 10 и 50 мл (MicroMed, Германия).

2.2 Реактивы и материалы

Список реактивов, используемых в работе, с соответствующей квалификацией, маркой и страной производителя:

- Ацетон ч.д.а., концентрированная соляная кислота х.ч. (Вектон, Россия).

- Ацетонитрил х.ч., борная кислота х.ч., дигидрофосфат натрия двухводный х.ч., гидрофосфат натрия двухводный х.ч., диметилформамид (ДМФА) х.ч., метанол х.ч., концентрированная фосфорная кислота ч., лимонная кислота одноводная х.ч. (Реахим, Россия).

- Гидроксид натрия ч.д.а. (Химреактив, Россия).

- Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис) х.ч., борная х.ч. (Sigma, Германия).

Список стандартов, использованных для приготовления модельных смесей:

- *Аминокислоты:* D,L-триптофан (Trp) (>98% ВЭЖХ), L-триптофан (99% ВЭЖХ) производитель (Sigma, Германия).

- *β-блокаторы:* (±)-пропранолол (98%), S-пропранолол (98%) производитель (Sigma, Германия).

Модификация внутренней поверхности капилляров осуществлялась с использованием:

- Поли(диаллилдиметиламмония хлорида) (ПДАДМАХ) $M_w=200000-350000$, 0,2 % мас. в воде, (Sigma, Германия).

- Поли-L-лизина (99,06%) $M_w=30000-70000$, (BLDpharm, Китай)

2.3 Синтез, концентрирование и очистка наночастиц золота

2.3.1 Цитрат-стабилизированные наночастицы золота (цНЧЗ)

цНЧЗ получали по методу Фримана. Все растворы готовили в деионизированной воде. В плоскодонной колбе объемом 100 мл, снабженной обратным холодильником, доводили до кипения 50 мл 1 мМ раствора HAuCl_4 при постоянном интенсивном перемешивании. В кипящий раствор резко вливали 5 мл 38,8 мМ раствора цитрата натрия (восстановителя) и оставляли на 10 мин при кипячении и перемешивании. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры при слабом перемешивании. Раствор наночастиц приобретал бордовую окраску, не изменяющуюся спустя длительное время. Полученные растворы хранили закрытыми фольгой в холодильнике при температуре +4 ... +6°C.

2.3.2 Наночастицы золота, модифицированные бычьим сывороточным альбумином (*цНЧЗ-БСА*)

Наночастицы золота, полученные по методу Фримана (п. 2.3.1), модифицировали бычьим сывороточным альбумином. Использовали три различные концентрации исходных растворов альбумина (1,5, 15 и 150 мг/мл). В виале на 6 мл нагревали до 40 °С 5,94 мл исходного раствора *цНЧЗ*. В нагретый раствор наночастиц вливали 0,06 мл раствора БСА (1,5, 15 или 150 мг/мл) и оставляли при нагревании на 12 ч. Полученные суспензии хранили закрытыми фольгой в холодильнике при температуре +4 ... +6°С.

Для применения синтезированных наночастиц в электрофоретических экспериментах проводили очистку от избытка альбумина и концентрирование суспензий. Для этого 1,5 мл суспензии *цНЧЗ* центрифугировали при 18000 об/мин в течение 30 мин, супернатант отбрасывали, а сконцентрированный осадок ресуспензировали деионизованной водой до 0,5 мл. *цНЧЗ-БСА* с концентрацией БСА 1,5 и 0,015 мг/мл после концентрирования ресуспензируются без осадка. *цНЧЗ-БСА* с концентрацией БСА 0,15 мг/мл ресуспензировались с появлением синеватого осадка на стенках пробирки.

2.4 Приготовление стандартных растворов аналитов

Приготовление стандартных растворов и модельных смесей аминокислот

1. Стандартные растворы рацемических смесей и индивидуальных энантиомеров аминокислот (Trp) с концентрацией 2 мг/мл готовили путем растворения точной навески 0,008 г, отобранной на аналитических весах, в 4 мл смеси растворителей метанол-вода (1:1, объемн.). Полученные растворы до использования хранили в холодильнике при температуре +4 ... +6°С.

2. Модельные смеси аминокислот с концентрациями 10-1000 мкг/мл готовили непосредственно перед анализом путем отбора аликвот исходных стандартных растворов (2 мг/мл п.1) каждой аминокислоты с помощью автоматического микродозатора и разбавлением деионизованной водой до 1 мл в эппендорфах объемом 1,5 мл.

Приготовление стандартных растворов и модельных смесей β -блокаторов

1. Стандартные растворы рацемических смесей и индивидуальных энантиомеров β -блокаторов (пропранолол) с концентрацией 2 мг/мл готовили путем растворения точной навески 0,008 г, отобранной на аналитических весах, в 4 мл смеси растворителей метанол-вода (1:3, объемн.). Полученные растворы до использования хранили в холодильнике при температуре +4 ... +6°C.

2. Модельные смеси β -блокаторов с концентрациями 40-1000 мкг/мл готовили непосредственно перед анализом путем отбора аликвот исходных стандартных растворов (2 мг/мл п.1) каждого аналита с помощью автоматического микродозатора и разбавлением деионизированной водой до 1 мл в эппендорфах объемом 1,5 мл.

2.5 Приготовление буферных растворов для проведения электрофоретических экспериментов

Для проведения электрофоретических экспериментов использовали фоновые электролиты различного состава и значения *pH*.

Боратный буферный раствор (0,2 М, pH=9, ББР)

Раствор готовили в мерной колбе объемом 50 мл путем растворения навески борной кислоты (0,6180 г) в 30 мл воды и доведения 0,2 М раствором NaOH до pH=9. Полученный раствор доводили до метки деионизированной водой.

Фосфатный буферный раствор (0,1 М, pH=2,5, ФБР)

Раствор готовили в мерной колбе объемом 50 мл путем растворения навески дигидрофосфата натрия (0,6000 г) в 30 мл воды и доведения 0,1 М раствором HCl до pH=2,5. Полученный раствор доводили до метки деионизированной водой.

Фосфатный буферный раствор (0,5 М, pH=7,2)

Раствор готовили в мерной колбе объемом 50 мл путем растворения навески гидрофосфата натрия (3,5490 г) в 30 мл воды и доведения 0,1 М раствором HCl до pH=7,2. Полученный раствор доводили до метки деионизированной водой.

Фосфатные буферные растворы (0,1 М, pH=7,2-8,0)

Растворы готовили путем смешения 0,2 М растворов NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 в соответствии с табл. 1 и разбавления водой до 10 мл.

Таблица 1. Схема приготовления фосфатных буферных растворов с рН=7,2-8,0.

рН ФБР	V (NaH ₂ PO ₄), мкл	V (Na ₂ HPO ₄), мкл
7,2	1400	3600
7,4	950	4050
7,8	420	4580
8,0	260	4740

Трис-НСl буферный раствор

Для электрофоретического разделения аминокислот и β-блокаторов использовали 20-40 мМ *Трис-НСl* буферный раствор (рН=7,4). Исходный 0,05 М раствор *Трис-НСl* готовили в пластиковых пробирках на 14 мл путем смешения 3,5 мл 0,2 М трис(гидроксиметил)аминометана, 5,6 мл 0,1 М раствора НСl и 4,9 мл деионизированной воды.

Все буферные растворы непосредственно перед электрофоретическими экспериментами разбавляли до нужной концентрации деионизированной водой и центрифугировали на скорости 7000 оборотов/мин в течение 3 мин.

2.6 Приготовление рабочих растворов модификаторов

Раствор для модифицирования на основе ПДАДМАХ с концентрацией 2 г/л готовили в мерной колбе на 5 мл путем разбавления точных навесок компонентов: 0,0500 г 20% раствора ПДАДМАХ, 0,0121 г Трис, 0,0434 г NaCl в 0,5 мл 0,1М раствора НСl. Полученный раствор доводили до метки деионизированной водой.

Раствор для модифицирования на основе ПЛЛ с концентрацией 0,02 % в 0,5 М NaCl готовили в эппендорфе на 4 мл путем растворения 0,0008 г ПЛЛ в 4 мл 0,5 М раствора NaCl.

Синтезированные *цНЧЗ* и *цНЧЗ-БСА* (п. 2.3.1 и п.2.3.2), использовали в виде концентрированных суспензий.

2.7 Условия подготовки и модификации внутренней поверхности кварцевого капилляра

Условия подготовки капилляров, модифицирующих растворов и формирования покрытий на основе ПДАДМАХ, ПЛЛ, БСА, *цНЧЗ* и *цНЧЗ-БСА*

обобщены в Табл. 2. При поиске условий модифицирования капилляра варьировали время и условия промывки раствором модификатора (под давлением или при приложении напряжения).

Таблица 2. Условия подготовки модификаторов и формирования покрытий

Покрытие	Подготовка поверхности капилляра	Подготовка модифицирующего раствора	Условия формирования покрытия	Стабилизация покрытия / проверка мЭОП после модификации
На основе ПДАДМАХ (связующий слой)	Последовательная промывка капилляра (травление): ацетонитрил (10 мин), H ₂ O деион. (5 мин), 0,1 М HCl (10 мин), H ₂ O деион. (5 мин), 0,1 М NaOH (60 мин), H ₂ O деион. (10 мин)	Раствор ПДАДМАХ (2 г/л) выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 30, 45, 60 , 80 мин при 1000 , 2000 мбар	10 мМ ФБР pH = 2,5, 10 кВ, 10 мин / 10 мМ ФБР pH 2,5, -20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
На основе ПЛЛ (связующий слой)	Последовательная промывка капилляра (травление): 1М NaOH (30 мин), H ₂ O деион. (15 мин)	Раствор ПЛЛ (0,02 %) в 0,5 М NaCl выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 10 мин при 1000 мбар	- / 10 мМ ФБР pH 2,5, 20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
На основе БСА (второй слой)	Капилляр с покрытием ПДАДМАХ промывали деион. водой в течение 10 мин при 1000 мбар	Раствор БСА (30 мг/мл в 25 мМ ФБР) pH 7,4 выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр заполняли раствором БСА и оставляли на 12 ч	- / 10 мМ ФБР pH 7,4, 20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
На основе цНЧЗ-БСА (второй слой)	Капилляр с покрытием ПДАДМАХ промывали деион. водой в течение 10 мин при 1000 мбар	Суспензию <i>цНЧЗ-БСА</i> выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 30, 45, 60 , 80 мин при 1000 , 2000 мбар	10 мМ ФБР pH 7,4, -10 кВ / 10 мМ ФБР pH 7,4, 20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
На основе цНЧЗ (второй слой)	Капилляр с покрытием ПДАДМАХ или ПЛЛ промывали деион. водой в течение 10 мин при 1000 мбар	Суспензию <i>цНЧЗ</i> выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 30, 45, 60 , 80 мин при 1000 , 2000 мбар или при напряжении +25 кВ и -25 кВ	10 мМ ЦБР pH 4,6, -10 кВ 10 мин / 10 мМ ЦБР pH 4,6, 20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.

Постфункционализация НЧЗ с использованием БСА	Капилляр с двухслойным или четырехслойным покрытием ПДАДМАХ-цНЧЗ или PLL-цНЧЗ промывали деион. водой в течение 10 мин при 1000 мбар	0,1 мг/мл водный раствор БСА или 10, 30 мг/мл раствор БСА в 25 мМ ФБР рН 7,4 выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр заполняли раствором БСА и оставляли на 10, 12, 14 ч	- / 10 мМ ФБР рН 7,4, 20 кВ, маркер ЭОП – 0,05% ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
--	---	---	--	--

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из наиболее сложных и актуальных задач аналитической химии является разделение и определение индивидуальных энантиомеров в биологических жидкостях ввиду их различного воздействия на функционирование живых организмов.

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью, простотой пробоподготовки и экспрессностью. В области хирального разделения метод КЭ в настоящее время развивается наиболее бурно. Этому способствуют широкие возможности использования модификаторов стенок кварцевого капилляра и фонового электролита.

Так, для осуществления энантиоселективного разделения в КЭ в качестве хирального модификатора может быть использован белок – альбумин. В его структуре имеются гидрофобные карманы, способные к селективному связыванию с аналитами. До настоящего времени применение альбумина в качестве хирального селектора в КЭ было ограничено исключительно введением белка в состав фонового электролита с созданием динамических покрытий. Однако такой подход приводил к снижению чувствительности метода и ограничивал выбор детекторов, совместимых с составом фонового электролита. Решением данной проблемы может быть реализация хирального разделения с формированием на основе альбумина стационарных покрытий стенок кварцевого капилляра, позволяющих снизить или вовсе исключить введение модификатора в фоновый электролит. Это возможно путем увеличения удельной поверхности капилляра, модифицируемой альбумином. Для этого могут быть использованы цитрат-стабилизированные наночастицы золота, характеризующиеся легкостью модификации и способностью к специфическим взаимодействиям с аналитами. Пришивка хирального селектора может быть осуществлена за счет замены лиганда на поверхности НЧЗ.

Данное исследование посвящено разработке подходов к формированию многослойных хиральных покрытий стенок кварцевого капилляра на основе *цНЧЗ* и БСА с использованием ПДАДМАХ в качестве связующего слоя для электрофоретического разделения энантиомеров биологически активных соединений. В качестве модельных аналитов выбраны D,L-триптофан и R,S-пропранолол.

В работе предложены и сопоставлены два варианта формирования многослойных покрытий на основе БСА с использованием *цНЧЗ* для увеличения удельной поверхности покрытий. Первый подход заключался в нанесении на ПДАДМАХ-покрытый капилляр предварительно синтезированных наночастиц золота, покрытых альбумином (*цНЧЗ-БСА*). Второй подход подразумевал последовательное нанесение слоев модификаторов (ПДАДМАХ и *цНЧЗ*) с последующей прививкой БСА к поверхности наночастиц непосредственно внутри капилляра за счет лигандного обмена цитрат-анионов и молекул БСА. Оба подхода характеризуются простотой осуществления и экспрессностью, при этом слоистая структура покрытий формируется преимущественно за счет электростатических взаимодействий при чередовании противоположно заряженных слоев модификаторов. Наличие плотного функционального слоя БСА, выполняющего роль хирального селектора, обеспечивает возможность применения модифицированных капилляров для разделения энантиомеров оптически активных соединений. Увеличение удельной поверхности и концентрации хирального селектора на внутренней поверхности капилляра могло бы обеспечить увеличение энантиоселективности, либо уменьшение количества хирального селектора, добавляемого в фоновый электролит.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Получение *цНЧЗ* заданного размера, проведение их поверхностной модификации альбумином; оценка размера, концентрации суспензии и поверхностного заряда полученных наночастиц.

2. Оптимизация условий формирования первого слоя покрытия капилляра на основе ПДАДМАХ. Оценка стабильности покрытия при различных значениях рН.

3. Проведение модификации ПДАДМАХ-капилляра БСА, *цНЧЗ-БСА*, *цНЧЗ* с последующей постфункционализацией альбумином на поверхности капилляра. Формирование полислойных покрытий с использованием ПЛЛ в качестве связующего слоя.

4. Оценка рабочих характеристик сформированных покрытий: величина и направление ЭОП, стабильность, зависимость ЭОП от рН фонового электролита. Получение СЭМ снимков внутренней поверхности капилляра.

5. Анализ модельных смесей энантиомеров аминокислот (D,L-триптофан) и β -блокаторов (R,S-пропранолол). Определение оптимальных условий проведения анализа.

3.1 Синтез и характеристика наночастиц золота

3.1.1 Получение и характеристика ζ НЧЗ

ζ НЧЗ были синтезированы по методу Фримана (п. 2.3.1) и охарактеризованы методами спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и методом динамического светорассеяния в целях определения размера, формы, концентрации и дзета-потенциала НЧЗ.

Спектр поглощения синтезированных растворов ζ НЧЗ имеет полосу поглощения на длине волны 519 нм (Рис. 32), что согласуется с литературными данными [55].

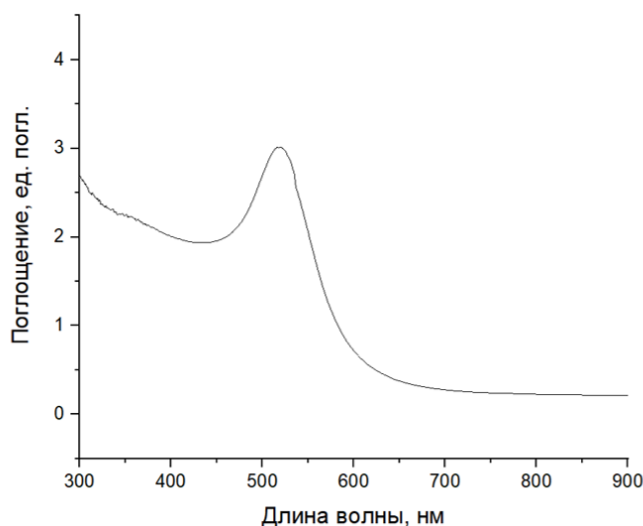


Рис. 32. Спектр поглощения ζ НЧЗ, синтезированных по методу Фримана.

Дзета-потенциал поверхности цитрат-стабилизированных наночастиц золота, синтезированных по методу Фримана, равен – 45 мВ.

Изображение просвечивающей электронной микроскопии ζ НЧЗ представлено на Рис. 33. Диаметр полученных наночастиц составляет 10-15 нм.

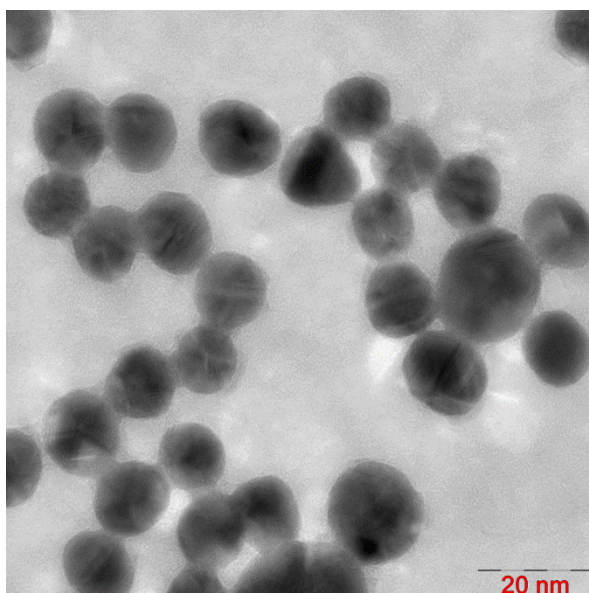


Рис. 33. ПЭМ-изображение *цНЧЗ*.

Полученные *цНЧЗ* стабильны, однако, обнаружено, что синтезированные суспензии чувствительны к материалу пластика, из которого изготовлены эппендорфы, используемые для хранения и работы с наночастицами. При выдерживании суспензий *цНЧЗ* в эппендорфах фирмы «МикроМед» (Россия) наблюдалась агломерация наночастиц и изменение окраски раствора с бордового на синевато-фиолетовый в течение часа. В результате работы с такими наночастицами капилляр забивался и не был пригоден для дальнейшего использования. При использовании эппендорфов фирмы «Eppendorf» (Германия) наночастицы хранили больше суток без заметного изменения окраски суспензии (Рис. 34).

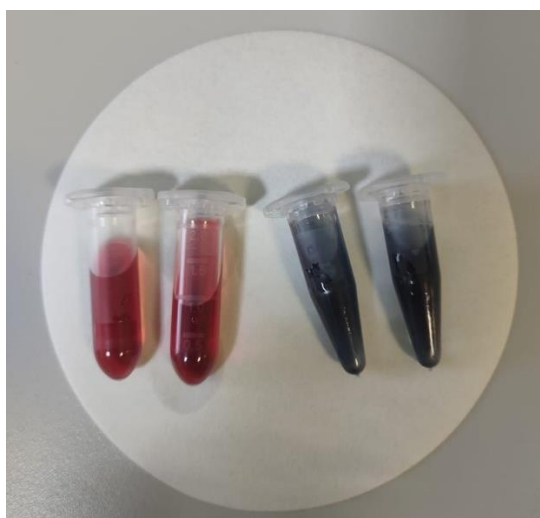
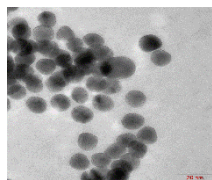

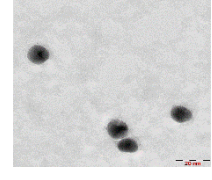


Рис. 34. *цНЧЗ* после 30 минут выдержки на УЗИ в эппендорфах фирмы «Eppendorf» (слева) и в эппендорфах фирмы «МикроМед» (справа).

3.1.2 Получение и характеристика ζ НЧЗ-БСА

Альбумин-модифицированные наночастицы золота готовились из цитрат-стабилизированных путем смешения растворов ζ НЧЗ и альбумина и выдерживания при перемешивании в течение 12 ч (п. 2.3.2). Опробованы три различные концентрации БСА в реакционной смеси: 0,015 мг/мл (ζ НЧЗ-БСА-1), 0,15 мг/мл (ζ НЧЗ-БСА-2) и 1,5 мг/мл (ζ НЧЗ-БСА-3) в целях выявления влияния концентрации БСА на характеристики получаемых частиц и покрытий на их основе. Концентрирование и очистку полученных ζ НЧЗ-БСА от избытка альбумина проводили при помощи центрифугирования. Полученные наночастицы были охарактеризованы методами спектрофотометрии, ПЭМ и методом динамического светорассеяния. Основные характеристики синтезированных ζ НЧЗ-БСА представлены в табл. 3.

Таблица 3. Сравнительные характеристики синтезированных ζ НЧЗ-БСА.

Наночастицы	λ_{\max} , нм	ПЭМ	Размер, нм	Дзета, мВ
ζ НЧЗ-БСА-1	524		13±3	-25
ζ НЧЗ-БСА-2	530		125±5	-25
ζ НЧЗ-БСА-3	527		13±3	-32

Полученные характеристики ζ НЧЗ-БСА отличны от характеристик ζ НЧЗ: наблюдается смещение полосы поглощения в более длинноволновую область, снижение дзета-потенциала и увеличение размера в случае ζ НЧЗ-БСА-2, что является подтверждением прошедшей модификации. Длины волн максимумов поглощения полученных ζ НЧЗ-БСА соответствуют литературным данным [55].

Наибольшее смещение полосы поглощения и изменение размера наблюдается для *цНЧЗ-БСА-2*, синтезированных с исходной концентрацией альбумина 15 мг/мл. Увеличение размера полученных наночастиц может происходить за счет образования слоя альбумина на поверхности, а также за счет частичной агломерации наночастиц.

Более низкие значения дзета-потенциала *цНЧЗ-БСА* по сравнению с *цНЧЗ* объясняются прошедшей реакцией лигандного обмена цитрат-аниона на БСА, формирующего меньший отрицательный заряд на поверхности НЧЗ по сравнению с цитрат-анионами. Альбумин-модифицированные наночастицы золота оказались стабильны при центрифугировании и хранении. Кроме того, в отличие от *цНЧЗ*, стабильность суспензий *цНЧЗ-БСА* не зависела от материала посуды, используемой для хранения и работы с наночастицами.

3.2. Формирование многослойных покрытий на основе ПДАДМАХ, *цНЧЗ* и БСА

Известные в литературе способы нанесения НЧЗ на поверхность капилляра включают ковалентную иммобилизацию за счет взаимодействия с азот- и серосодержащими линкерами, предварительно нанесенными на стенки капилляра [20, 65]. Недостатками такого подхода являются трудоемкость, многостадийность и, как следствие, плохая воспроизводимость. Альтернативный способ формирования покрытий – физическая адсорбция, где модификация осуществляется за счет неспецифических взаимодействий (в основном – электростатических). Использование многослойности при формировании таких покрытий позволяет наносить на поверхность капилляра модификаторы любого заряда. Так, для нанесения отрицательно заряженных *цНЧЗ* возможно использование ПДАДМАХ в качестве связующего слоя. Он обладает высокой молекулярной массой и не зависящим от значения pH положительным зарядом [58]. Таким образом, на предварительной стадии экспериментов необходимо было оптимизировать условия формирования первого связующего слоя положительно-заряженного модификатора ПДАДМАХ.

Для формирования физически-адсорбированных покрытий на основе *цНЧЗ* и БСА в работе предложены два варианта (Рис. 35): 1. Синтез альбумин-

модифицированных наночастиц золота и нанесение их на ПДАДМАХ-покрытый капилляр (п. 3.2.2); 2. Послойное покрытие стенок капилляра полимером, цитрат-стабилизированными НЧЗ и альбумином (п. 3.2.3). В последнем случае реакция лигандного обмена цитрат-аниона на альбумин на поверхности НЧЗ проводится непосредственно в капилляре.

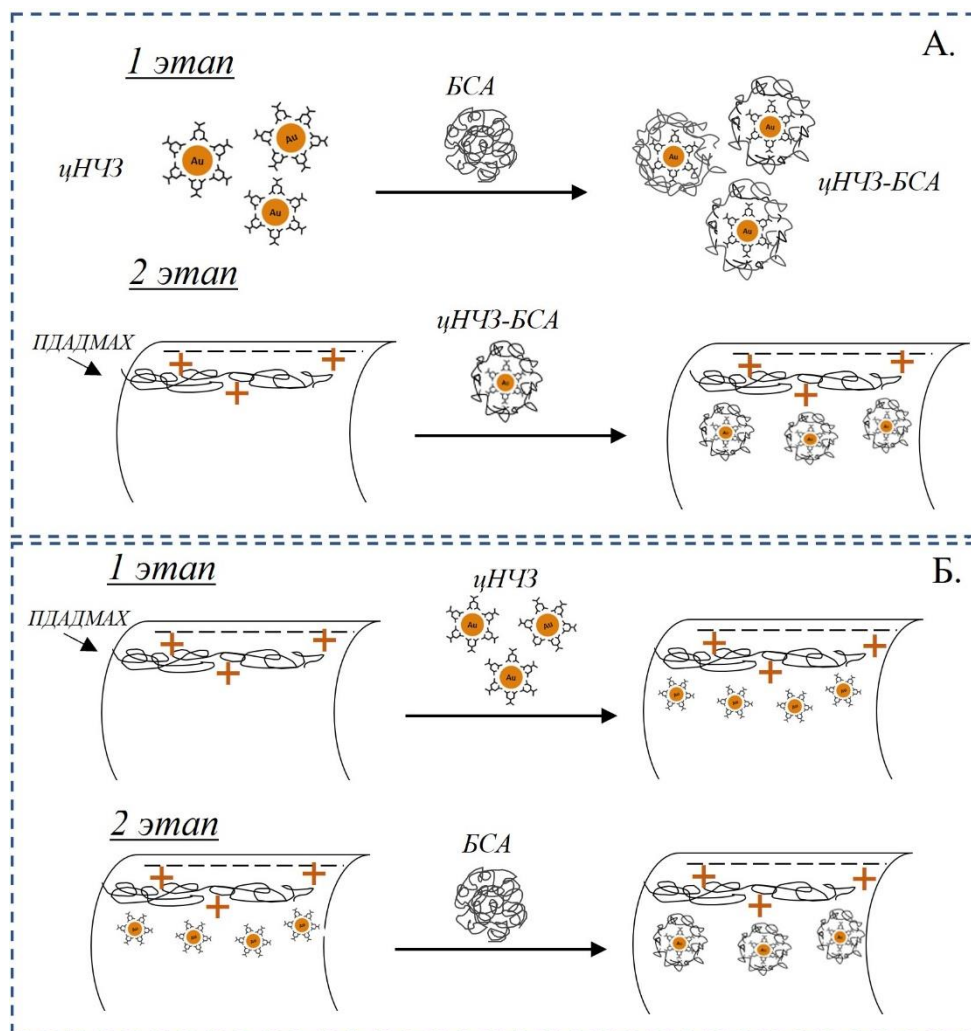


Рис. 35. Схематическое изображение двух подходов к формированию покрытия стенок капилляра на основе: А. цНЧЗ-БСА с предварительным получением модифицированных наночастиц, Б. цНЧЗ с проведением внутрикапиллярной постфункционализации БСА.

3.2.1 Оптимизация условий формирования первого слоя покрытия на основе ПДАДМАХ и его характеристика

Для формирования первого полимерного слоя предварительно протравленный кварцевый капилляр промывали раствором ПДАДМАХ (2 г/л) в течение 60 мин [56].

В качестве критериев оценки стабильности сформированного покрытия выбраны направление и скорость ЭОП.

После промывки капилляра положительно заряженным полимерным модификатором происходило обращение ЭОП ($\mu_{\text{ЭОП}} = -3,57 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$), что свидетельствовало о перезарядке поверхности капилляра. Для оценки стабильности сформированного монослойного покрытия при различных значениях рН получена зависимость скорости электроосмотического потока от рН фонового электролита (Рис. 36). Величина ЭОП в диапазоне рН от 2 до 6 практически не изменяется, что указывает на формирование плотного слоя ПДАДМАХ на поверхности капилляра. При более высоких значениях рН происходит значительное снижение скорости миграции обращенного ЭОП, свидетельствующее о смыве покрытия с поверхности капилляра.

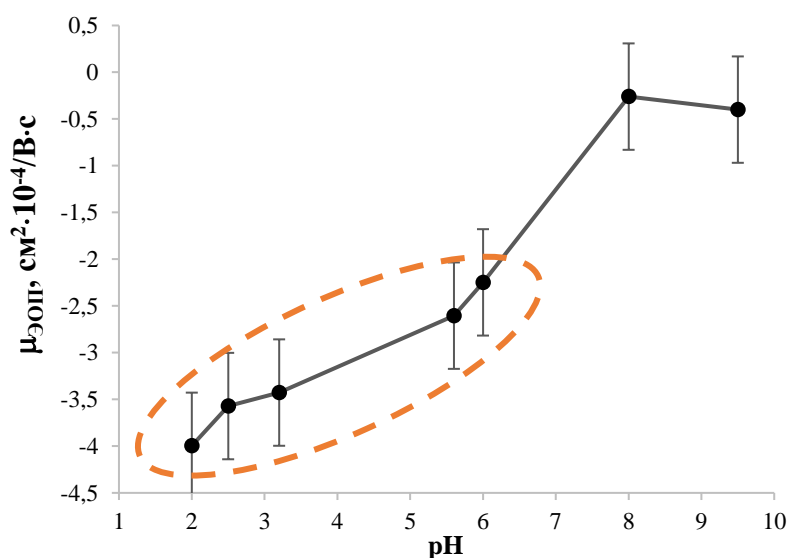


Рис. 36. Зависимость скорости электроосмотического потока ($\mu_{\text{ЭОП}}$) от значения рН фонового электролита.

Условия: маркер ЭОП – ДМФА (0,05% об.), фосфатные буферные растворы (рН 2-8) и боратные буферные растворы рН (9 – 10). Ввод пробы 2с 30 мбар, $U = -20 \text{ кВ}$, $\lambda = 210 \text{ нм}$.

Для сформированного покрытия получены СЭМ-снимки внутренней поверхности капилляра (Рис. 37 Б), на которых видно наличие плотного равномерного слоя ПДАДМАХ, по сравнению с немодифицированным капилляром (Рис 37 А).

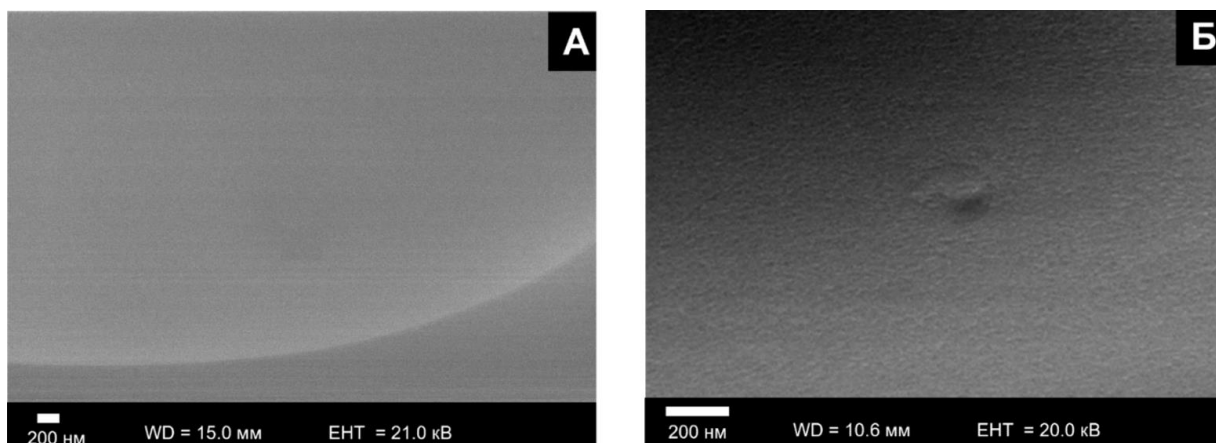


Рис. 37. СЭМ-снимки внутренней поверхности немодифицированного (А) и ПДАДМАХ-покрытого (Б) капилляров.

Таким образом, сформировано плотное положительно заряженное однослойное покрытие, которое может служить связующим слоем для последующего нанесения БСА и отрицательно заряженных *цНЧЗ* (п. 3.1.1) и *цНЧЗ-БСА* (п. 3.1.2) на поверхность капилляра.

На предварительном этапе работы также проверена возможность применения БСА для формирования статических покрытий стенок кварцевого капилляра без использования НЧЗ. С этой целью капилляр, модифицированный связующим слоем ПДАДМАХ ($\mu_{ЭОП} = -3,57 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$), заполняли 30 мг/мл раствором БСА в 10 мМ фосфатном буферном растворе (рН=7,4) и оставляли на одну ночь.

В результате модификации наблюдали обращение и регистрацию катодного ЭОП ($\mu_{ЭОП} = 2,3 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$), значение которого не менялось при последующей промывке капилляра раствором БСА (рН фоновых электролитов > рI (БСА)). Это свидетельствует о насыщении поверхности капилляра модификатором.

Модифицированные капилляры (ПДАДМАХ-БСА) не обеспечили разделения энантиомеров аминокислот и β -блокаторов, что объясняется недостаточным количеством активных центров на поверхности капилляра. Разделение также не было достигнуто и при введении альбумина (30 мкМ) в состав фонового электролита. Полученные результаты подтвердили необходимость применения НЧЗ для увеличения удельной поверхности капилляра, модифицируемого альбумином.

3.2.2 Получение и применение хиральных двухслойных покрытий на основе ПДАДМАХ и ζ НЧЗ-БСА

Синтезированные ζ НЧЗ-БСА с разным соотношением наночастиц и БСА (табл. 3) наносили на ПДАДМАХ-покрытый капилляр. При оптимизации условий формирования покрытия варьировали концентрацию наночастиц в суспензии. В экспериментах с ζ НЧЗ-БСА-3 показано, что при промывке капилляра как разбавленными суспензиями (25,2, 33,6 нМ), так и концентрированной суспензией (50,4 нМ) происходит обращение ЭОП, однако, максимально достигаемая скорость ЭОП ($\mu_{\text{ЭОП}}=1,85 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$) была довольно низкой, что может свидетельствовать о формировании неплотного слоя.

В результате модификации к поверхности капилляра прививаются молекулы БСА, отвечающие за формирование заряда и генерирование ЭОП. Являясь амфолитом, альбумин способствует генерации анодного ЭОП при pH ниже изоэлектрической точки БСА ($pI_{\text{БСА}} = 4,7-5,0$) и катодного ЭОП при $\text{pH} > pI$. Таким образом, регистрация ЭОП на прямой полярности (+20 кВ) в 10 мМ ФБР pH 7,2 явилась доказательством наличия наночастиц на поверхности капилляра, а значение ЭОП указывает на плотность сформированного покрытия (чем быстрее ЭОП, тем больше концентрация активных групп на поверхности капилляра).

Значения $\mu_{\text{ЭОП}}$ для полученных капилляров приведены в табл. 4.

Таблица 4. Скорости ЭОП для покрытий на основе различных ζ НЧЗ-БСА.

Условия: 10 мМ ФБР (pH=7,2)

	ζ НЧЗ-БСА-1	ζ НЧЗ-БСА-2	ζ НЧЗ-БСА-3
$\mu_{\text{ЭОП}} \cdot 10^{-4}, \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$	1,92	0,83	1,85

Видно, что для капилляров, модифицированных ζ НЧЗ-БСА-1 и ζ НЧЗ-БСА-3 наблюдаются близкие значения катодного ЭОП, в то время как в случае ζ НЧЗ-БСА-2 скорость миграции ЭОП оказалась минимальной: большой размер и склонность к агрегации данных частиц приводят к формированию неплотного слоя БСА на поверхности, и, как следствие, низкого заряда внутренних стенок капилляра.

Для капилляра с максимальным наблюдаемым значением ЭОП (ζ НЧЗ-БСА-1) получены СЭМ-снимки внутренней поверхности капилляра (Рис. 38).



Рис. 38. СЭМ-снимок внутренней поверхности ПДАДМАХ-(*uH3Z-BSA-1*) модифицированного капилляра.

На снимке (Рис. 38) видно наличие неплотного слоя наночастиц золота. Низкая плотность модификатора на поверхности капилляра может быть объяснена низким значением дзета-потенциала синтезированных наночастиц, и как следствие их плохой адгезией к положительно-заряженной поверхности ПДАДМАХ-покрытого капилляра, склонностью к агломерации и недостаточной подвижностью для формирования плотного слоя.

Использование полученных покрытий для разделения энантиомеров триптофана

Полученные капилляры с последовательно нанесенными ПДАДМАХ и *uH3Z-BSA* не обеспечили ожидаемого разделения энантиомеров, что может быть связано с недостаточным количеством хирального селектора на поверхности капилляра. Добавка альбумина в состав фонового электролита (30 мкМ БСА) привела к полному разделению энантиомеров триптофана, что является подтверждением высказанного предположения (Рис. 39).

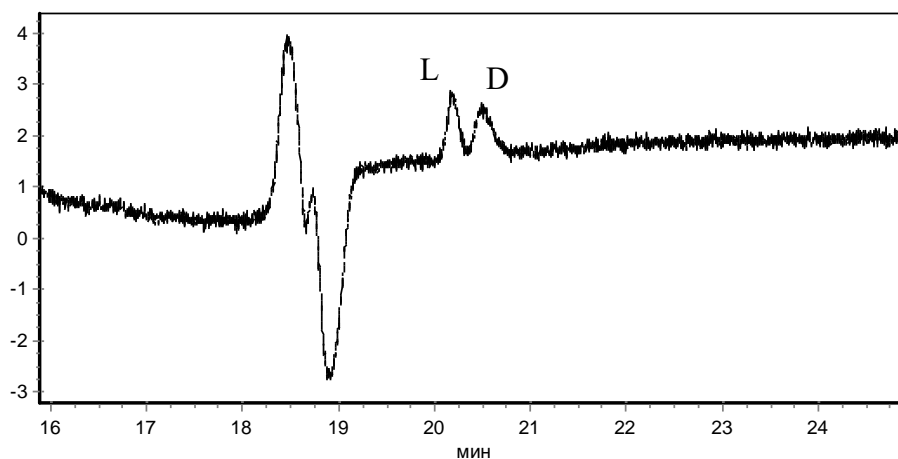


Рис. 39. Электрофореграмма D,L-триптофана, полученная с использованием ПДАДМАХ-(*цНЧЗ-БСА-1*) покрытия.

Условия: ФЭ: 25 мМ ФБР (рН=7,4), 30 мкМ БСА. Ввод пробы 10 с, 20 кВ, 220 нм, +20 кВ.

Модификация ПДАДМАХ-покрытого капилляра альбумин-модифицированными наночастицами золота не позволила получить плотные хиральные покрытия. Таким образом, более перспективным является второй путь модификации: послойное нанесение на стенки капилляра ПДАДМАХ, *цНЧЗ* и БСА с проведением реакции лигандного обмена цитрат-аниона на альбумин на поверхности наночастиц непосредственно в капилляре.

3.2.3 Получение и применение полислойных покрытий, полученных путем послойного нанесения ПДАДМАХ и *цНЧЗ* с последующей постфункционализацией альбумином

3.2.3.1 Трехслойные покрытия ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА

Другой исследуемый вариант формирования хиральных стационарных фаз на основе БСА и наночастиц золота заключается в прививке *цНЧЗ* к ПДАДМАХ-покрытой поверхности капилляра с последующей постфункционализацией наночастиц альбумином внутри капилляра.

При нанесении отрицательно-заряженных *цНЧЗ* на поверхность капилляра, покрытого положительно заряженным ПДАДМАХ, происходит перезарядка поверхности и обращение ЭОП. Наибольший катодный ЭОП наблюдается при промывке капилляров, модифицированных ПДАДМАХ, концентрированной

суспензией *цНЧЗ* (14,4 нМ) в течение 1 ч ($\mu_{ЭОП}=3,0 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с). Сформированное двухслойное покрытие стабильно в диапазоне рН от 2 до 10. Ограничением такого покрытия является чувствительность к природе фонового электролита вследствие замены цитрат-аниона на ацетат при работе с ацетатными буферными растворами [57].

Для последующей постфункционализации альбумином полученных двухслойных покрытий испытано несколько вариантов модификации: динамический (длительная промывка раствором БСА) и статический (заполнение капилляра модифицирующим раствором и оставление на длительный срок (12-14 ч)).

В рамках динамического подхода осуществляли промывку капилляра водным раствором БСА (10 мг/мл) в течение 4-12 ч. Изменение скорости миграции ЭОП после промывки раствором модификатора не происходило, что свидетельствовало об отсутствии БСА на поверхности.

В рамках второго статического подхода изучены варианты: заполнение капилляра водным раствором БСА или раствором БСА в 25 мМ фосфатном буферном растворе (рН=7,4) в различных концентрациях.

В случае промывки капилляра водным раствором БСА выявлены аналитические возможности двух различных концентраций БСА в модифицирующем растворе: 0,15 мг/мл, моделирующих условия синтеза альбумин-модифицированных наночастиц из *цНЧЗ* (см. п. 2.3.2), и заведомый избыток БСА в модифицирующем растворе (30 мг/мл), аналогично описанному в [49]. Капилляр промывали модифицирующим раствором в течение 1 ч при 1000 мбар и выдерживали заполненным в течение 12 ч. О прошедшей модификации судили по величине и направлению ЭОП при различных значениях рН.

В результате использования водного раствора БСА с концентрацией 0,15 мг/мл в качестве модификатора наблюдали замедление ЭОП ($1,9 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с) по сравнению с двухслойным ПДАДМАХ-*цНЧЗ* покрытием ($3,0 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с) при рН 7,4 (10 мМ ФБР) за счет того, что БСА обеспечивает меньший заряд поверхности капилляра по сравнению с цитрат-анионами. Также обнаружено обращение электроосмотического потока ($-2,1 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с) при использовании ФЭ с рН =2 (10 мМ ФБР), происходящее за счет положительного заряда БСА в этих условиях.

При использовании для постмодификации водного раствора БСА с концентрацией 30 мг/мл также происходит замедление ЭОП ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$) в 10 мМ ФБР (рН=7,4) по сравнению с двухслойным покрытием и обращение ЭОП ($-2,2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$) в 10 мМ ФБР (рН=2). Таким образом, при использовании 30 мг/мл водного раствора БСА наблюдается лишь незначительное увеличение скорости миграции ЭОП по сравнению с постмодификацией 0,15 мг/мл водным раствором БСА.

Еще один вариант статического режима постмодификации альбумином включал заполнение капилляра 30 мг/мл раствором БСА в 25 мМ ФБР рН=7,4 и выдерживание в течение 12 ч. В этом случае скорость миграции ЭОП возрастала ($2,6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$) по сравнению с постмодификацией водными растворами БСА, что может быть связано с адсорбцией на поверхности альбумина фосфат-анионов буферного раствора.

Проведенные электрофоретические эксперименты позволили прийти к заключению, что природа растворителя и концентрация БСА в модифицирующем растворе фактически не влияют на величины и направления ЭОП в подготовленных капиллярах (Табл. 5). Однако различия в условиях формирования оказались принципиальными при проведении хирального разделения, что подробнее обсуждается далее.

Таблица 5. Значения скоростей ЭОП для покрытий ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА, полученные с использованием различных по составу растворов БСА при постфункционализации.

Раствор для постфункционализации	$\mu_{\text{ЭОП}} \cdot 10^{-4}, \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$	
	10 мМ ФБР рН=2	10 мМ ФБР рН=7,4
<i>0,15 мг/мл БСА водный</i>	-2,14	1,92
<i>30 мг/мл БСА водный</i>	-2,17	1,95
<i>30 мг/мл БСА в 25 мМ ФБР рН=7,4</i>	-2,21	2,58

На Рис. 40 представлены СЭМ-снимки капилляра, полученного последовательным нанесением ПДАДМАХ, цНЧЗ и постфункционализацией с использованием 30 мг/мл раствора БСА в 25 мМ ФБР (рН=7,4).

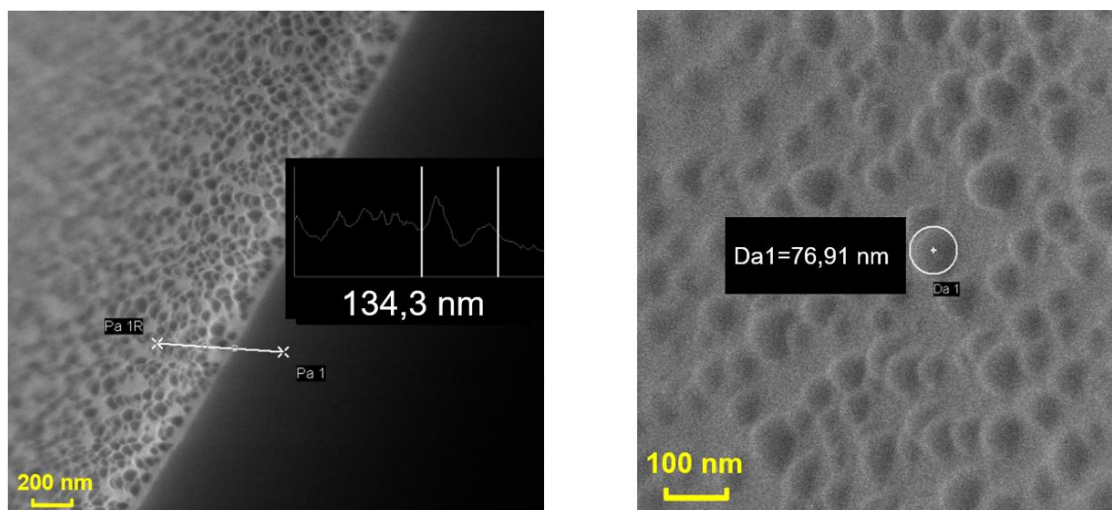


Рис. 40. СЭМ-снимки внутренней поверхности капилляра с покрытием ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА.

На снимках (Рис. 40) видно наличие плотного равномерного покрытия капилляра наночастицами. Толщина покрытия составила 134 нм, размер наночастиц – 77 нм. Увеличение размера наночастиц (по сравнению с исходными 13 нм) связано с формированием слоя альбумина на их поверхности и, возможно, частичной агломерацией наночастиц в капилляре.

Для оценки стабильности покрытия, сформированного с использованием 30 мг/мл раствора БСА в 25 мМ ФБР (рН=7,4) исследована зависимость $\mu_{ЭОП}$ от значения рН фонового электролита (Рис. 41).

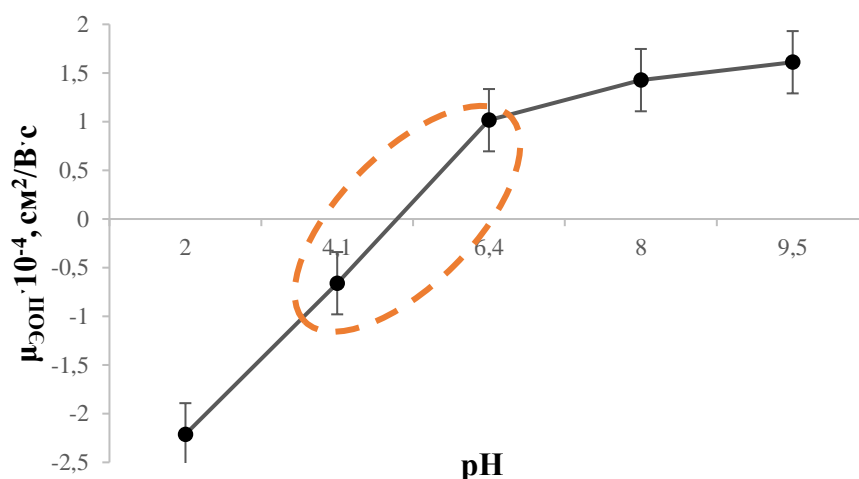


Рис. 41. График зависимости скорости ЭОП ($\mu_{ЭОП}$) от значения рН фонового электролита для покрытия ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА.

Условия: маркер ЭОП – 0,05%-ный раствор ДМФА, фосфатные буферные растворы (рН 2-9,5). Ввод пробы 2с 30 мбар, $U = -20, +20$ кВ, $\lambda = 210$ нм.

В области $pH < pI$ $\mu_{ЭОП}$ принимают отрицательные значения, что свидетельствует о положительном заряде поверхности капилляра из-за протонирования амино-групп белка. В то же время при $pH > pI$ наблюдается катодный ЭОП, формирующийся при диссоциации карбоксильных групп альбумина. При этом, нулевое значение $\mu_{ЭОП}$ наблюдалось при $pH = pI$ БСА, что подтверждает наличие плотного слоя альбумина на поверхности капилляра. Покрытие стабильно во всем исследуемом диапазоне pH (2-10).

Использование полученных покрытий для разделения энантиомеров триптофана и пропранолола

Различия в условиях проведения постфункционализации покрытия с использованием БСА сказались на результатах хирального разделения D,L-триптофана и R,S-пропранолола. Применение капилляров, постмодификацию которых проводили с использованием 30 мг/мл раствора БСА в 25 мМ ФБР $pH=7,4$, позволило существенно снизить количество БСА, вводимого в ФЭ для достижения разделения энантиомеров триптофана: разрешение энантиомеров начинает фиксироваться при введении 5 мкМ БСА (Рис. 42). Для оценки селективности разделения рассчитывали факторы энантиоселективности (α) по следующей формуле: $\alpha = \mu_1/\mu_2$, где μ_1 – электрофоретическая подвижность наиболее удерживаемого энантиомера, а μ_2 – электрофоретическая подвижность наименее удерживаемого энантиомера. При этом, максимальная энантиоселективность достигается при использовании 10 мкМ БСА ($\alpha=1,02$). При дальнейшем увеличении концентрации модификатора селективность падает ($\alpha=1,009-1,010$). Известно, что D- и L-триптофан взаимодействуют с двумя различными центрами связывания в структуре альбумина, при этом константы комплексообразования каждого из энантиомеров значительно отличаются друг от друга. В предыдущих исследованиях [44], где БСА использовали в качестве модификатора электрофоретических систем для разделения энантиомеров триптофана, концентрации активных центров на БСА-модифицированной поверхности капилляра оказалась недостаточно: необходимо было наличие и в фоновом электролите более 10 мкМ БСА. Без добавок хирального селектора в ФЭ требовалось 10-100 кратное увеличение концентрации БСА на поверхности капилляра. Достигнутое снижение концентрации БСА указывает на

повышение количества активных центров на поверхности капилляра за счет использования НЧЗ и получения покрытий с высокой удельной поверхностью.

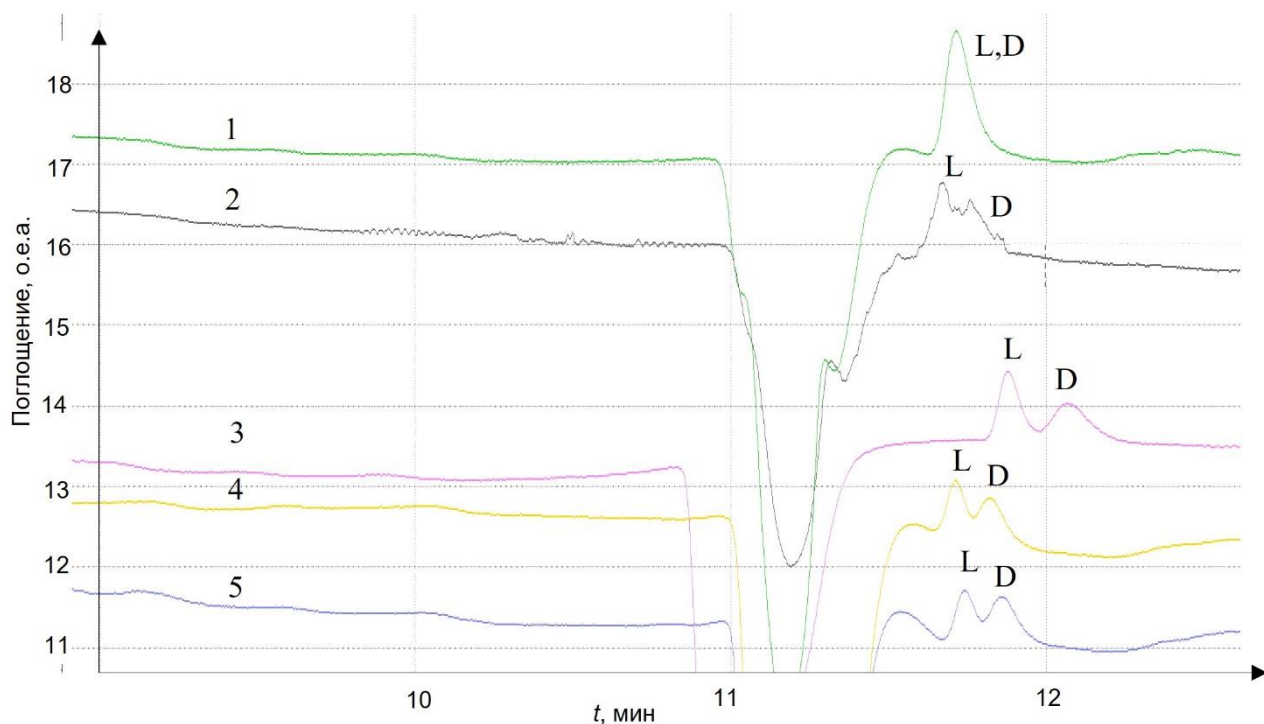


Рис. 42. Электрофореграммы D,L-триптофана (20 мкг/мл), полученные на полислойном покрытии ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА с различными добавками БСА в фоновый электролит: 1 – без добавок, 2 – 5 мкМ БСА, 3 – 10 мкМ БСА, 4 – 15 мкМ БСА, 5 – 20 мкМ БСА.

Условия: 10мМ ФБР рН 8, +20 кВ, 210 нм, ввод пробы гидродинамический 5 с 30 мбар.

При этом, на данном покрытии без использования добавок БСА в ФЭ хиральное разделение D,L-триптофана не наблюдалось. Кроме того, в опробованных экспериментальных условиях (5-20 мкМ добавки альбумина в буферный раствор) отсутствует разделение энантиомеров пропранолола. Это указывает на необходимость дальнейшей разработки подходов к увеличению плотности покрытий и концентрации хирального селектора на поверхности капилляра, что обеспечило бы разделение энантиомеров без введения добавок альбумина в ФЭ.

Капилляры, постмодифицированные 0,15 мг/мл водным раствором БСА также не обеспечили ожидаемого разделения энантиомеров без введения хирального

селектора в ФЭ. Хиральное разделение D,L-триптофана и R,S-пропранолола (Рис. 43) фиксировалось только при добавлении в состав ФЭ 20 мкМ БСА.

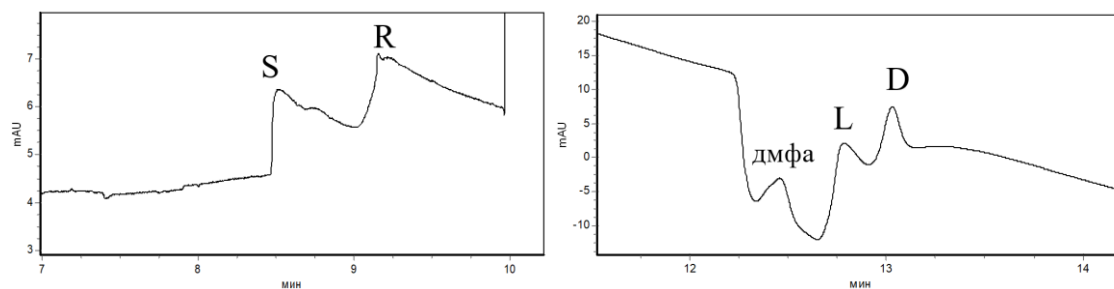


Рис. 43. Электрофореграммы R,S-пропранолола (слева) и D,L-триптофана (справа), полученные с использованием ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА покрытия.

Условия: ФЭ: 10 mM ФБР (pH=7,4), доб. 20 мкМ БСА. Ввод 10 с, 20 кВ, 220 нМ.

Также отмечено сильное снижение чувствительности при увеличении концентрации альбумина в буферном растворе, что связано с собственным поглощением модификатора в УФ-области спектра и подтверждает перспективность формирования именно стационарных покрытий, не требующих добавления белка в ФЭ для реализации разделения.

Для ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА покрытий, полученных с использованием 30 мг/мл водного раствора БСА для постмодификации, достигнуты результаты, аналогичные капиллярам с 0,15 мг/мл водным раствором БСА: разделение энантиомеров наблюдается только при введении добавки альбумина в фоновый электролит (≥ 20 мкМ БСА).

Таким образом, несмотря на то, что природа растворителя и концентрация БСА в модифицирующем растворе не оказывали значительного влияния на скорость и направление ЭОП, хиральное разделение с использованием полученных разным образом покрытий отличалось. При модификации в ФБР добавка БСА, необходимая для разделения энантиомеров триптофана была снижена до 5 мкМ. Однако разделения R,S-пропранолола не наблюдалось. Модификация же водным раствором БСА позволяла создавать покрытия, обеспечивающие разделение энантиомеров как пропранолола, так и триптофана, но концентрация необходимой добавки БСА в фоновый электролит была выше. Для дальнейших экспериментов выбран вариант постмодификации с использованием водных растворов БСА.

3.2.3.2 Пятислойные покрытия на основе ПДАДМАХ, ζ НЧЗ и БСА

В целях увеличения плотности и емкости покрытий, предложено формирование пятислойных покрытий на основе ПДАДМАХ и ζ НЧЗ с чередованием противоположно заряженных слоев модификаторов (ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-БСА). В этом случае ожидалось получение капилляров с более развитой поверхностью, что в свою очередь позволило бы увеличить концентрацию БСА на стенках капилляра.

При нанесении каждого из слоев ПДАДМАХ и ζ НЧЗ происходит перезарядка поверхности и изменение направления ЭОП. Наблюдаемые величины ЭОП для первого и третьего слоев покрытия на основе ПДАДМАХ оказались одинаковы и составляли $\mu_{\text{ЭОП}} = -3,6 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$. Для второго и четвертого ζ НЧЗ-слоев величины ЭОП также одинаковы и составляли $\mu_{\text{ЭОП}} = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$. Постфункционализацию полученного четырехслойного покрытия (ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-ПДАДМАХ- ζ НЧЗ) проводили путем заполнения капилляра 0,15 мг/мл водным раствором БСА и выдерживания в течение 12 ч.

На Рис. 44 представлены СЭМ-снимки капилляра с пятислойным покрытием ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-БСА, демонстрирующие наличие максимально плотного слоя модификатора на стенках капилляра.

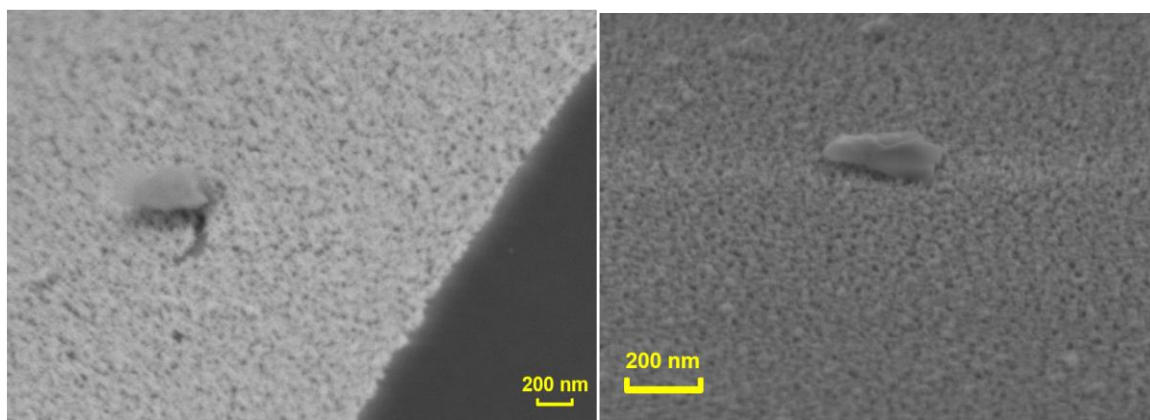


Рис. 44. СЭМ-снимки внутренней поверхности капилляра с покрытием ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-ПДАДМАХ- ζ НЧЗ-БСА.

Покрытие оказалось равномерным по всей длине капилляра. Толщина его в среднем составляет 52 нм, что позволяет сделать вывод о механизме образования

пятислойного покрытия. Вероятно, каждый последующий слой модификатора заполняет свободные места предыдущих слоев.

Для оценки стабильности сформированного покрытия и подтверждения присутствия БСА на стенках капилляра получена зависимость скорости миграции ЭОП от значения рН фонового электролита (Рис. 45).

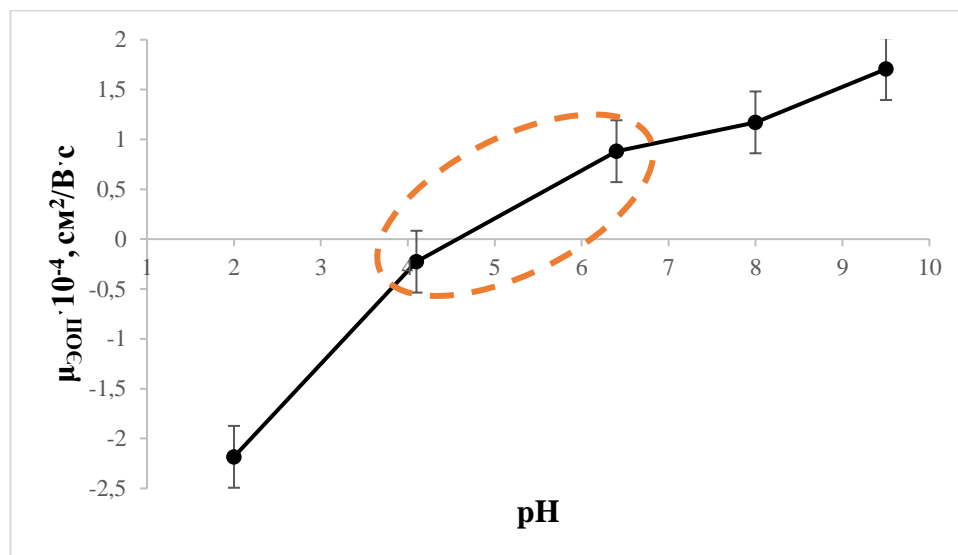


Рис. 45. График зависимости скорости ЭОП ($\mu_{\text{ЭОП}}$) от значения рН фонового электролита для покрытия ПДАДМАХ-цНЧЗ-ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА.

Условия: маркер ЭОП – 0,05%-ный раствор ДМФА, фосфатные буферные растворы (рН 2-9,5). Ввод пробы 2с 30 мбар, $U = -20, +20$ кВ, $\lambda = 210$ нм.

Смена знака $\mu_{\text{ЭОП}}$ при переходе от рН 2 до 10, а также отсутствие ЭОП при рН = рI альбумина подтверждают наличие плотного слоя БСА на поверхности капилляра. Конформация альбумина при различных рН меняется обратимо. При значениях рН 3,4-7,4 белок существует в виде нормальной конформации (N-альбумин) и при снижении рН постепенно разворачивается. В развернутой E-конформации БСА находится при рН ниже 2. Таким образом, в рабочем диапазоне рН форма альбумина меняется незначительно и обратимо [66].

По стабильности и воспроизводимости значения скорости миграции ЭОП возможна оценка стабильности сформированного покрытия. Полученное пятислойное ПДАДМАХ-цНЧЗ-ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА покрытие стабильно до 120 аналитических циклов. СКО ($\mu_{\text{ЭОП}}$) = 3,8 % (n=120, P = 0.95).

Использование полученных покрытий для разделения энантиомеров триптофана и пропранолола

Полученные модифицированные капилляры обеспечивают полное разделение энантиомеров триптофана без введения БСА в фоновый электролит (Рис. 46).

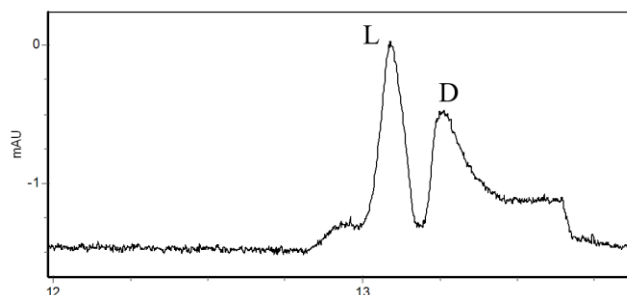


Рис. 46. Электрофореграмма D,L-триптофана, полученная с использованием ПДАДМАХ-*ц*НЧЗ-ПДАДМАХ-*ц*НЧЗ-БСА покрытия.

Условия: ФЭ: 10 мМ Трис-буфер (pH=8). Ввод 4 с, 20 кВ, 280 нм.

Кроме того, наблюдается частичное разделение энантиомеров пропранолола без введения добавок альбумина в фоновый электролит.

Для достижения полного разделения энантиомеров пропранолола вводились добавки БСА в фоновый электролит (Рис. 47). При увеличении концентрации хирального селектора в ФЭ улучшается разрешение пиков отдельных энантиомеров.

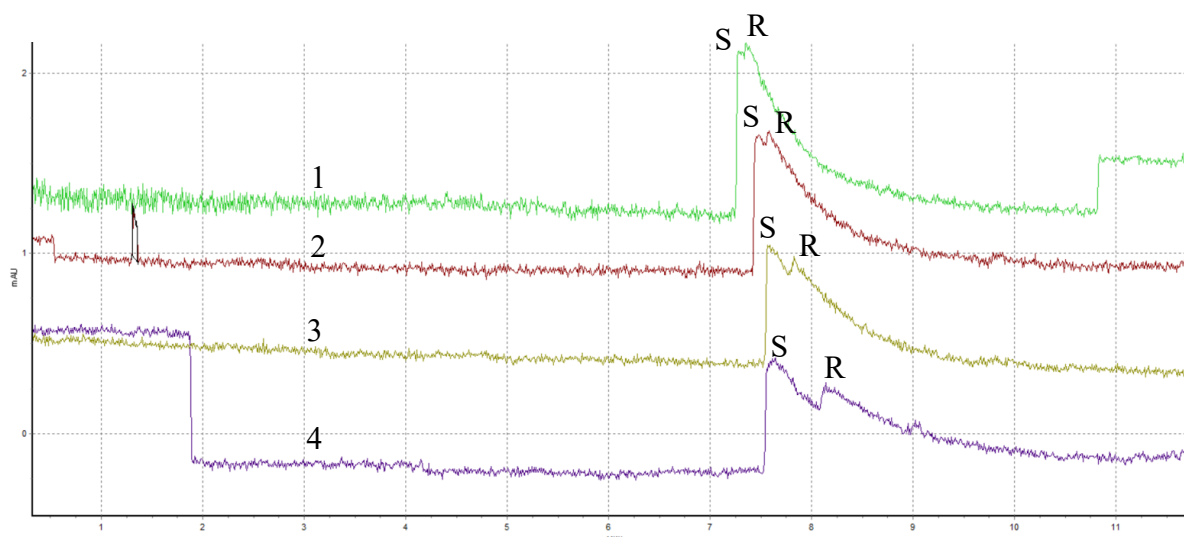


Рис. 47. Электрофореграммы R,S-пропранолола, полученные на полислойном покрытии ПДАДМАХ-*ц*НЧЗ-ПДАДМАХ-*ц*НЧЗ-БСА с различными добавками БСА

в фоновый электролит: 1 – 1 мкМ БСА, 2 – 2,5 мкМ БСА, 3 – 5 мкМ БСА, 4 – 10 мкМ БСА.

Условия: 10 мМ Трис-буфер рН 8, +20 кВ, 280 нм, ввод пробы гидродинамический 20 с 30 мбар.

Также испытан вариант постмодификации ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-покрытий водным раствором БСА с концентрацией 30 мг/мл. Однако, в данном случае разделения энантиомеров пропранолола и триптофана без введения добавок и при введении 5-20 мкМ БСА в фоновый электролит не наблюдалось. Поэтому оптимальным подходом к постмодификации выбрано заполнение 0,15 мг/мл водным раствором БСА и выдерживание в течение 12 ч.

Таким образом, наращивание числа слоев приводит не к увеличению толщины покрытия, а к его уплотнению и, соответственно, увеличению количества активных центров, участвующих во взаимодействии с аналитами. Это и объясняет возможность энантиоселективного разделения на таких покрытиях без необходимости введения хирального селектора в фоновый электролит.

Для сравнения различных подходов к формированию хиральных покрытий на основе ПДАДМАХ, БСА и *цНЧЗ* (п. 3.2.2, п. 3.2.3.1, п. 3.2.3.2) на Рис. 48 и 49 приведены электрофореграммы рацемических смесей пропранолола и триптофана, полученные с использованием ПДАДМАХ-БСА, ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА и ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА покрытий без введения добавок БСА в фоновый электролит. Показано, что при работе с капиллярами с ПДАДМАХ-БСА и ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА покрытиями отсутствует хиральное разделение, в то время как капилляры с пятислойным покрытием ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА обеспечивают частичное разделение энантиомеров пропранолола и полное разделение триптофана.

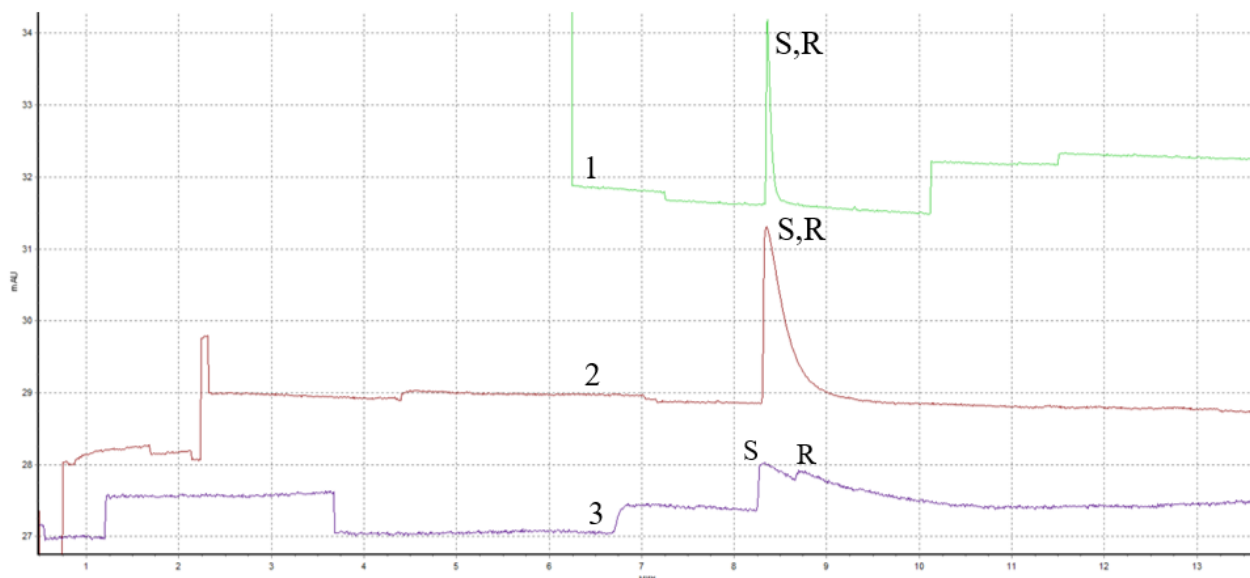


Рис. 48. Электрофореграммы R,S-пропранолола, полученные с использованием покрытий: 1 – ПДАДМАХ-БСА, 2 – ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА, 3 – ПДАДМАХ-цНЧЗ- ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА.

Условия: (1, 2) 10 мМ ФБР рН 7,4, (3) 10 мМ Трис рН 8, +20 кВ, 280 нм, ввод пробы гидродинамический 4 с 30 мбар.

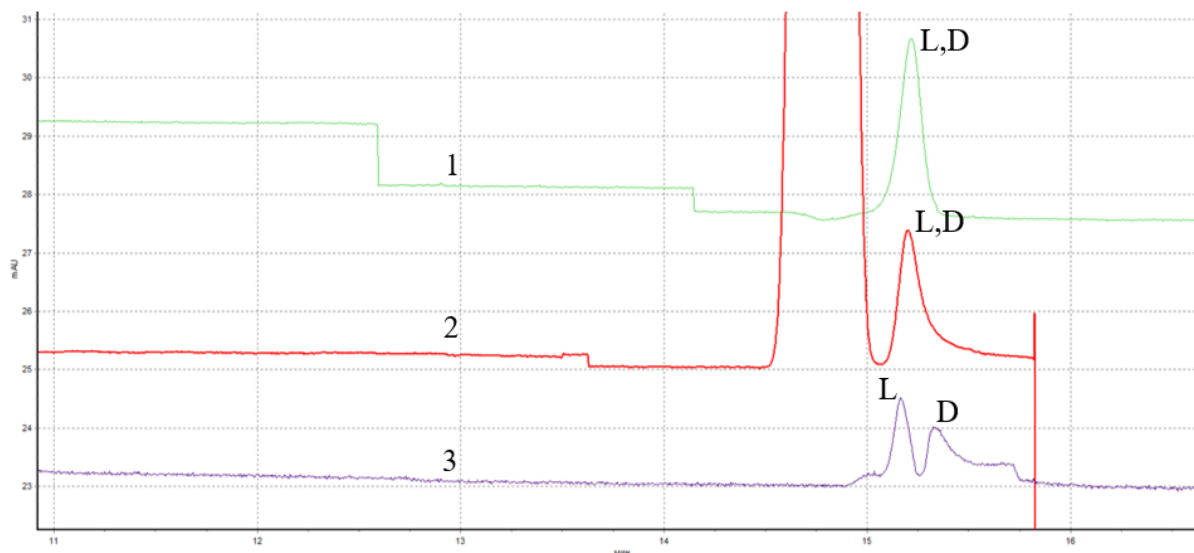


Рис. 49. Электрофореграммы D,L-триптофана, полученные с использованием покрытий: 1 – ПДАДМАХ-БСА, 2 – ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА, 3 – ПДАДМАХ-цНЧЗ- ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА.

Условия: (1, 2) 10 мМ ФБР рН 7,4, (3) 10 мМ Трис рН 8, +20 кВ, 280 нм, ввод пробы гидродинамический 4 с 30 мбар.

3.3 Формирование пятислойных покрытий на основе PLL, *цНЧЗ* и БСА

Оптическая активность и способность наращивать более толстые полимерные слои на поверхности капилляра [59] делают перспективным использованием поли-L-лизина (PLL) в качестве связующего слоя при создании мультислойных покрытий для осуществления хирального разделения. При этом, важным является не только концентрация PLL в модифицирующем растворе, но и его состав. Так, высокая концентрация соли способствует увеличению толщины пленки PLL на поверхности капилляра. Таким образом, замена ПДАДМАХ на PLL могла бы обеспечить увеличение толщины многослойных покрытий, формируемых совместно с *цНЧЗ* и БСА, что в свою очередь может положительно сказаться на селективности разделения энантиомеров биологически активных соединений с использованием создаваемых покрытий.

Формирование связующего слоя PLL на поверхности капилляра включало следующие этапы: 1. Травление капилляра (немодифицированный капилляр промывался 30 минут 1 М раствором NaOH и 15 минут деионизированной водой), 2. Промывка капилляра 0,02 % раствором PLL в 0,5 М NaCl в течение 10 минут, как описано в [59].

Далее для получения пятислойного покрытия PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*-БСА капилляр последовательно промывался растворами соответствующих модификаторов. Нанесение каждого из слоев PLL и *цНЧЗ* сопровождалось перезарядкой поверхности и изменением направления миграции ЭОП. Значения $\mu_{\text{ЭОП}}$ для первого и третьего слоев на основе PLL в 10 мМ фосфатном буферном растворе pH 2,5 составили $-2,4 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с и $-2,3 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с, соответственно. Значения $\mu_{\text{ЭОП}}$ для второго и четвертого слоев на основе *цНЧЗ* составили $2,6 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с и $2,8 \cdot 10^{-4}$ см²/В·с, соответственно. Для последующей постфункционализации полученных четырехслойных покрытий (PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*) альбумином капилляр заполняли 0,15 мг/мл водным раствором БСА и оставляли на 12 ч.

Полученное пятислойное PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*-БСА покрытие стабильно до 10 аналитических циклов, затем требуется обновление внешнего функционального слоя БСА путем заполнения капилляра 0,15 мг/мл водным раствором БСА и выдерживания в течение 12 ч.

На Рис. 50 представлен СЭМ-снимок капилляра с пятислойным покрытием PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*-БСА, демонстрирующий развитую поверхность с высокой плотностью модификатора. Покрытие равномерно по всей длине капилляра. Предполагаемый механизм формирования покрытия аналогичен покрытиям на основе ПДАДМАХ – каждый последующий слой модификатора заполняет свободные места предыдущих слоев.

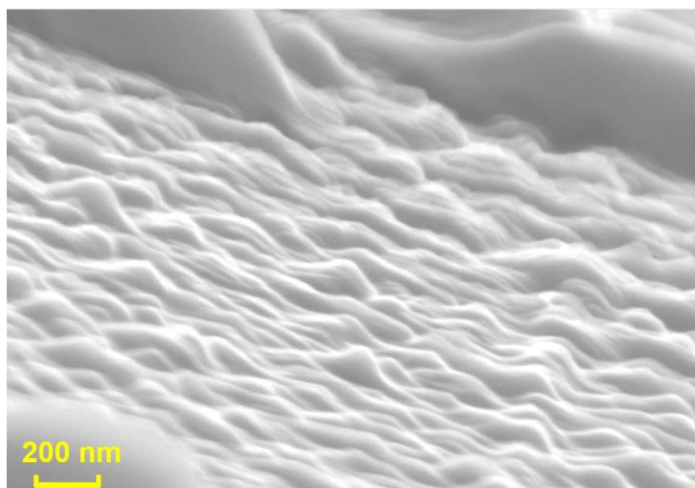


Рис. 50. СЭМ-снимок внутренней поверхности капилляра с покрытием PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*-БСА.

Для подтверждения присутствия наночастиц золота на поверхности капилляра получены СЭМ-снимки в режиме NTS BSD (Рис. 51). В данном режиме чем тяжелее элемент, тем светлее он выглядит на получаемом снимке.

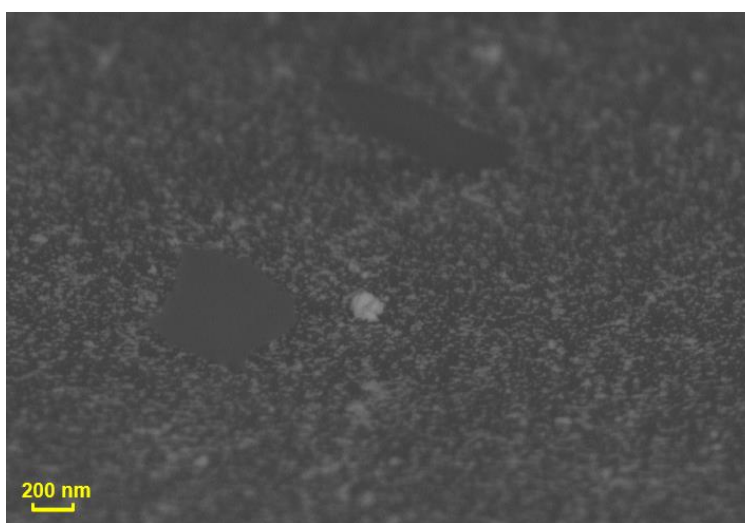


Рис. 51. СЭМ-снимок внутренней поверхности капилляра с покрытием PLL-*цНЧЗ*-PLL-*цНЧЗ*-БСА в режиме NTS BSD.

На Рис. 51 видно наличие наночастиц золота в виде светлых вкраплений на общем темном фоне органических соединений, состоящих из легких элементов. Это подтверждает наличие равномерного плотного слоя *цНЧЗ* на стенках капилляра, а также отсутствие агломерации наночастиц при нанесении их на поверхность.

Для оценки стабильности сформированного пятислойного покрытия и подтверждения присутствия БСА на стенках капилляра получена зависимость скорости миграции ЭОП от рН фонового электролита (Рис. 52). Полученное покрытие обеспечивает генерирование более быстрого анодного ЭОП при $\text{pH} < \text{pI}$ БСА и более быстрого катодного ЭОП при $\text{pH} > \text{pI}$ БСА по сравнению с пятислойным покрытием с использованием ПДАДМАХ в качестве связующего слоя (ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА). Это может служить косвенным доказательством большей концентрации БСА на стенках капилляра в случае использования поли-L-лизина в качестве связующего слоя по сравнению с ПДАДМАХ.

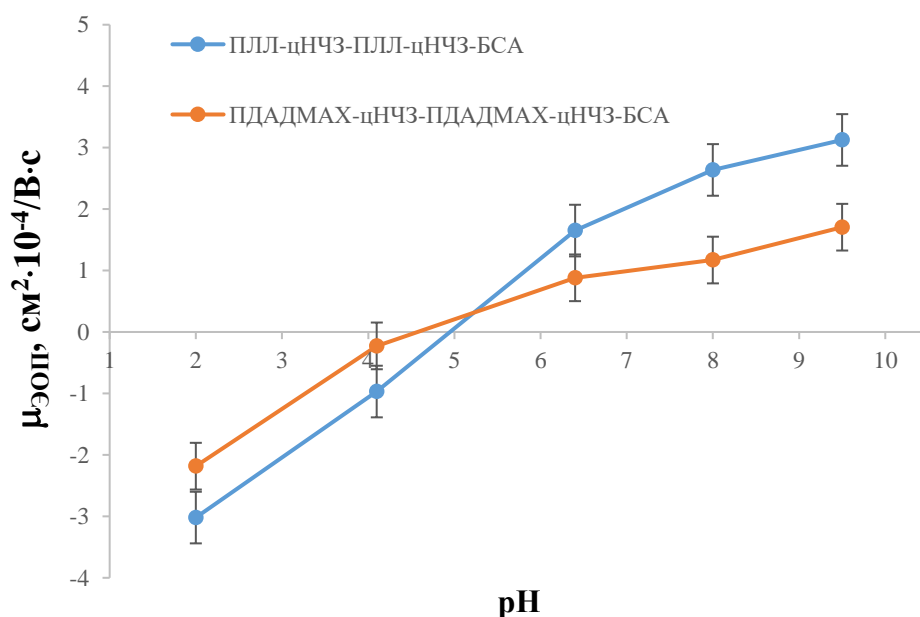


Рис. 52. Сравнение зависимостей скорости ЭОП ($\mu_{\text{Эоп}}$) от значения рН фонового электролита для покрытий ПЛЛ-*цНЧЗ*-ПЛЛ-*цНЧЗ*-БСА и ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА.

Условия: маркер ЭОП – 0,05%-ный раствор ДМФА, фосфатные буферные растворы (pH 2-9,5). Ввод пробы 2с 30 мбар, U = -20, +20 кВ, $\lambda = 210$ нм.

Использование полученных покрытий для разделения энантиомеров триптофана и пропранолола

Полученные модифицированные капилляры с пятислойным покрытием (ПЛЛ- α НЧЗ-ПЛЛ- α НЧЗ-БСА) обеспечивают полное разделение энантиомеров триптофана без введения БСА в фоновый электролит (Рис. 53).

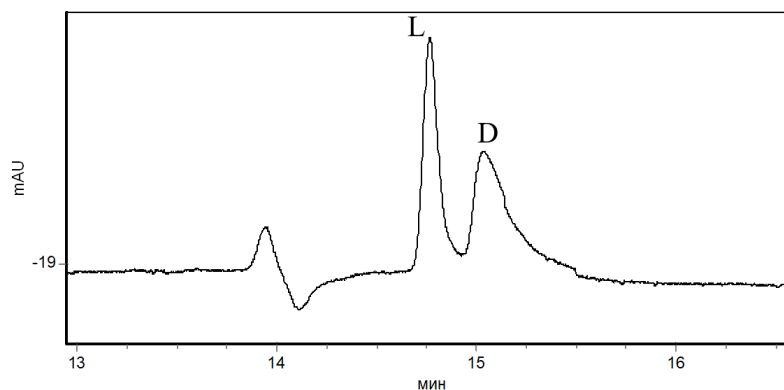


Рис. 53. Электрофореграмма D,L-триптофана, полученная с использованием PLL- α НЧЗ-PLL- α НЧЗ-БСА покрытия.

Условия: ФЭ: 10 мМ ФБР (pH=8). Ввод 2 с, 20 кВ, 280 нм.

Кроме того, применение данных многослойных хиральных покрытий привело к частичному разделению энантиомеров пропранолола без введения добавок альбумина в фоновый электролит (Рис. 54).

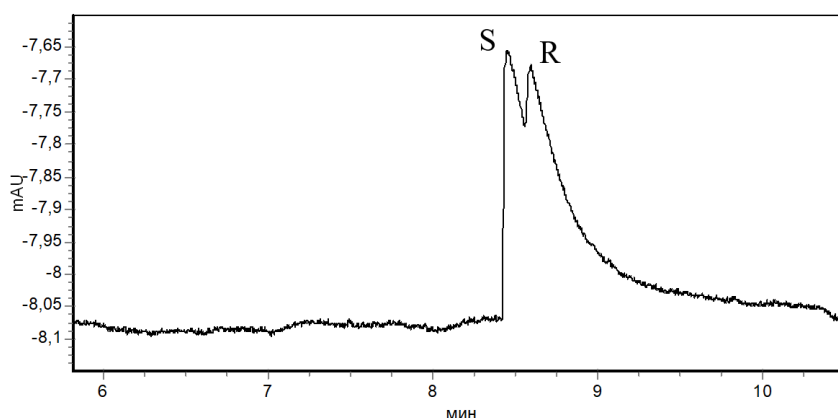


Рис. 54. Электрофореграмма R,S-пропранолола, полученная с использованием PLL- α НЧЗ-PLL- α НЧЗ-БСА покрытия.

Условия: ФЭ: 10 мМ ФБР (pH=8). Ввод 2 с, 20 кВ, 220 нм.

Сравнение основных характеристик пятислойных покрытий ПДАДМАХ- α НЧЗ-ПДАДМАХ- α НЧЗ-БСА и PLL- α НЧЗ-PLL- α НЧЗ-БСА, обеспечивающих

разделение энантиомеров пропранолола и триптофана без введения добавок БСА в фоновый электролит представлены в табл. 6. Замена ПДАДМАХ на ПЛЛ в пятислойных покрытиях позволила уменьшить время модификации, увеличить чувствительность метода, улучшить разрешение энантиомеров и уменьшить концентрацию добавки БСА, необходимой для полного разделения энантиомеров пропранолола, в 2 раза.

Таблица 6. Оптимизированные условия постмодификации в пятислойных покрытиях и их характеристики.

Покрытие	Условия постмодификации	Эффективность (N), т.т.	Rs	α	ПО, мкг/мл	Стабильность
ПДАДМАХ- <i>цНЧЗ</i> - ПДАДМАХ- <i>цНЧЗ</i> -БСА	Заполнение 0,15 мг/мл водн. БСА и выдерживание 12 ч.	Триптофан L – 142300, D – 73700 Пропранолол S – 2650, R – 27900	Триптофан – 0,8 Пропранолол – 0,5	Триптофан (1,013) Пропранолол (1,06)	Триптофан L – 300, D - 550	120 циклов
ПЛЛ- <i>цНЧЗ</i> - ПЛЛ- <i>цНЧЗ</i> - БСА		Триптофан L – 197000, D – 52100 Пропранолол S – 24600, R – 72700	Триптофан – 1,4 Пропранолол – 0,6	Триптофан (1,010) Пропранолол (1,02)	Триптофан L – 30, D - 40	Обновление слоя БСА каждые 10 циклов

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы цитрат-стабилизированные наночастицы золота по методу Фримана заданного размера (13 ± 3 нм), а также проведена их поверхностная модификация альбумином. Полученные *цНЧЗ* и *цНЧЗ-БСА* охарактеризованы методами спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии и методом динамического светорассеяния. Проведена оценка размера, концентрации суспензии и поверхностного заряда полученных наночастиц. Смещение максимума поглощения и изменение дзета-потенциала *цНЧЗ-БСА* по сравнению с *цНЧЗ* косвенно свидетельствовали о прошедшей модификации.

2. Оптимизированы условия формирования первого слоя покрытия капилляра на основе ПДАДМАХ. Показано, что полученное покрытие стабильно во всем исследуемом диапазоне рН (2-10).

3. Проведена модификация капилляра, покрытого ПДАДМАХ, с использованием БСА, *цНЧЗ-БСА* и *цНЧЗ* с последующей постфункционализацией наночастиц альбумином на поверхности капилляра. Покрытия охарактеризованы с точки зрения стабильности в различных средах, оценен рабочий диапазон рН (2-10) и получены СЭМ-снимки внутренней поверхности модифицированных капилляров.

4. Показано, что последовательное нанесение слоев модификаторов приводит к формированию более плотных покрытий, обеспечивающих возможность снижения концентрации БСА в ФЭ, необходимой для разделения энантиомеров триптофана (до 5 мкМ) и пропранолола (до 20 мкМ).

5. Оптимизированы условия внутрикапиллярной постмодификации *цНЧЗ* альбумином. Показано, что при проведении постмодификации 0,15 мг/мл раствором БСА в воде, образованные покрытия обеспечивают полное разделение энантиомеров пропранолола и триптофана при введении 20 мкМ добавки БСА в ФЭ.

6. Показано, что использование пятислойных покрытий ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-ПДАДМАХ-*цНЧЗ*-БСА позволяют проводить разделение энантиомеров выбранных аналитов без введения добавки хирального селектора в ФЭ за счет формирования максимально плотных покрытий с развитой поверхностью и, следовательно, высокой концентрации хирального селектора на стенках капилляра.

7. Сформированы пятислойные покрытия ПЛЛ-*цНЧЗ*-ПЛЛ-*цНЧЗ*-БСА. Проведена оценка стабильности покрытия при различных значениях рН, получены

СЭМ-снимки внутренней поверхности модифицированного капилляра. Показано, что стационарные многослойные покрытия также обеспечивают разделение энантиомеров триптофана и пропранолола без введения добавки альбумина в ФЭ.

8. Проведено сравнение пятислойных покрытий, полученных с использованием ПДАДМАХ и поли-L-лизина в качестве связующих слоев. Первые оказываются более стабильными (до 120 аналитических циклов против 10 в случае использования ПЛЛ), вторые – обеспечивают существенно более низкие пределы обнаружения отдельных энантиомеров (до 30 мкг/мл) и большую эффективность и разрешение при разделении энантиомеров триптофана и пропранолола.

Результаты работы представлены в публикациях:

1. *Д. В. Макеева, К. С. Антипова, Е. В. Соловьева, В. П. Моргачева, Е. А. Колобова, Л. А. Карцова.* Полислойные покрытия на основе стабилизированных цитратом наночастиц золота и полидиаллилдиметиламмоний хлорида для электрофоретического разделения карбоновых кислот // Журнал аналитической химии. 2023, 78(3), 241-252.

2. *В.П. Моргачева, Д.В. Макеева, Е.В. Соловьева, Е.А. Колобова, Л.А. Карцова.* Новые подходы к формированию покрытий на основе альбумина и наночастиц золота для хирального разделения методом капиллярного электрофореза // Аналитика и контроль. 2023, 27 (№ 1).

Доклады по результатам исследований представлены на конференциях:

1. Школа-конференция молодых ученых в рамках симпозиума «Кинетика и динамика сорбционных процессов», приуроченного к 150-летию со дня рождения М.С. Цвета. Тема доклада: Трехслойное покрытие на основе цитрат-стабилизированных наночастиц золота и поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) для электрофоретического определения карбоновых кислот (диплом II степени).

2. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2023». Тема доклада: Разработка подходов к формированию покрытий стенок кварцевого капилляра на основе альбумина и наночастиц золота для хирального разделения методом капиллярного электрофореза (диплом I степени).

Благодарности

Автор ВКР выражает благодарность Междисциплинарному ресурсному центру по направлению «Нанотехнологии» (Научный парк СПбГУ) за выполнение исследований методом сканирующей электронной микроскопии, а также к.х.н., доценту кафедры физической химии Соловьевой Елене Викторовне (лаборатория «Плазмонно усиленной спектроскопии и биоимиджинга») за помощь в проведении синтеза наночастиц золота.

Отдельную признательность автор выражает д.х.н, профессору Института химии СПбГУ Карцовой Анне Алексеевне за всестороннюю помощь и консультации при выполнении ВКР.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-73-00211, [https:// rscf.ru/project/21-73-00211](https://rscf.ru/project/21-73-00211).

Список используемой литературы

1. Л. А. Карцова, Д. В. Макеева, Е. А. Бессонова. Современное состояние метода капиллярного электрофореза // Журнал аналитической химии. 2020 75(12) 1059–1079.
2. Л.А.Карцова, Е.А. Бессонова. Методы on-line концентрирования в капиллярном электрофорезе. Учебно-методическое пособие. СПб.: Изд-во ВВМ, 2018. 68 с.
3. Shallan, A., Guijt, R. & Breadmore, M. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition (Elsevier Ltd., 2013).
4. Bela Neiman, Eli Grushka and Ovadia Lev. Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis // Anal. Chem. 2001 (73) 5220-5227.
5. Kitagawa, F., Otsuka, K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 2014 (1335) 43–60.
6. Д.В.Макеева, К.С. Антипова, Л.А. Карцова. Электрофоретическое определение карбоновых кислот в сыворотке крови с внутрикапиллярным концентрированием // Аналитика и контроль. 2022 (26) 13-20.
7. Nehmé, R. & Perrin, C. Highly charged polyelectrolyte coatings to prevent adsorption during protein and peptide analysis in capillary electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 984, 191–206 (2013).
8. L.A. Kartsova, D.V. Makeeva, V.A. Davankov. Nano-sized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations // Trends in Analytical Chemistry. 2019 (120) 115656.
9. Капиллярный электрофорез / Под ред. Карцовой Л.А. / Проблемы аналитической химии. Т. 18. М.: Наука, 2014. 444 с.
10. Hu, W., Hong, T., Gao, X. & Ji, Y. Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography // Trends in Analytical Chemistry. 2014 (61) 29–39.
11. Sýkora, D. *et al.* Application of gold nanoparticles in separation sciences // Journal of Separation Science. 2010 (33) 372–387.
12. C.J. Yu, C.L. Su, W.L. Tseng. Separation of acidic and basic proteins by nanoparticle-filled capillary electrophoresis // Anal. Chem. 2006 (78) 8004-8010.

13. *Qu, Q., Zhang, X., Shen, M., Liu, Y.* Open-tubular capillary electrochromatography using a capillary coated with octadecylamine capped gold nanoparticles // *Electrophoresis*. 2008 **(29)** 901–909.
14. *J. You, L. Zhao, G. Wang, H. Zhou, J. Zhou, L. Zhang,* Quaternized cellulosesupported gold nanoparticles as capillary coatings to enhance protein separation by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2014 **(1343)** 160-166.
15. *Z. Zhang, B. Yan, K. Liu, Y. Liao, H. Liu.* CE-MS analysis of heroin and its basic impurities using a charged polymer protected gold nanoparticle-coated capillary // *Electrophoresis*. 2009 **(30)** 379-387.
16. *A.M. Al-Hossaini, L. Suntornsuk, S.M. Lunte.* Separation of dynorphin peptides by capillary electrochromatography using a polydiallyl dimethyl ammonium chloride gold nanoparticle-modified capillary // *Electrophoresis*. 2016 **(37)** 2297-2304.
17. *Chiou, S. H., Huang, M. F. & Chang, H. T.* Separation of double-stranded DNA fragments by capillary electrophoresis: Impacts of poly(ethylene oxide), gold nanoparticles, ethidium bromide, and pH // *Electrophoresis*. 2004 **(25)** 2186–2192.
18. *Q. Qu, D. Liu, D. Mangelings, C. Yang, X. Hu.* Permanent gold nanoparticle coatings on polyelectrolyte multilayer modified capillaries for open-tubular capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A*. 2010 **(1217)** 6588-6594.
19. *R.P. Liang, X.Y. Meng, C.M. Liu, J.D. Qiu.* PDMS microchip coated with polydopamine/gold nanoparticles hybrid for efficient electrophoresis separation of amino acids // *Electrophoresis*. 2011 **(32)** 3331-3340.
20. *A. Zhang, F. Ye, J. Lu, S. Zhao.* Screening a-glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles // *Food Chem*. 2013 **(141)** 1854-1859.
21. *L. Zhou, B. Zhang, S. Li, J. Yu, X. Guo.* Enantioselective opentubular capillary electrochromatography using a b-cyclodextrinegold nanoparticlesepolydopamine coating as a stationary phase // *New J. Chem*. 2018 **(42)** 17250-17258.
22. *Y. Zhang, Y. Zhang, W. Chen, Y. Zhang, L. Zhu, P. He, Q. Wang.* Enantiomeric separation of tryptophan by open tubular microchip capillary electrophoresis using polydopamine/gold nanoparticles conjugated DNA as stationary phase // *Anal. Methods*. 2017 **(9)** 3561-3568.

23. *Y. Zhang, Y. Zhang, S. Yu, Y. Zhang, L. Zhu, P. He, Q. Wang.* Sensitive analysis of glutathione in bacteria and HaCaT cells by polydopamine/gold nanoparticle-coated microchip electrophoresis via online pre-concentration of field-amplified sample stacking, *Microfluid Nanofluid.* 2017 **(21)** 97.
24. *Radim Vespalec and Petr Bocek.* Chiral Separations in Capillary Electrophoresis // *Chem. Rev.* 2000 (100) 3715-3753.
25. *Gübitz G., Schmid M.G.* Chiral separation by capillary electromigration techniques // *J. Chromatogr. A.* 2008 **(1204)** 140-156.
26. *Колобова Е.А., Карцова Л.А., Алопина Е.В., Смирнова Н.А.* Разделение энантиомеров тирозина, триптофана и β -блокаторов методом капиллярного электрофореза с участием аминокислотной ионной жидкости 1-бутил-3-метилимидазолий L-пролинат [C₄MIm][L-Pro] в качестве хирального селектора // *Аналитика и контроль.* 2018 **(22(1))** 51-60.
27. *Gerald Gubitz, Martin G. Schmid.* Chiral separation principles in capillary electrophoresis // *Journal of Chromatography A.* 1997 **(792)** 179–225.
28. *Sheng Tang, Shujuan Liu, Yong Guo, Xia Liu, Shengxiang Jiang.* Recent advances of ionic liquids and polymeric ionic liquids in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // *Journal of Chromatography A.* 2014 **(1357)** 147-57.
29. *J. Li, H. Han, Q. Wang, X. Liu, S. Jiang.* Polymeric ionic liquid as a dynamic coating additive for separation of basic proteins by capillary electrophoresis // *Anal. Chim. Acta.* 2010 **(674)** 243-248.
30. *J. Li, H. Han, Q. Wang, X. Liu, S. Jiang.* Poly(N-vinylimidazole)-grafted capillary for electrophoresis prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization // *J Sep. Sci.* 2010 **(33)** 2804-2810.
31. *Y. Zhou, J. Li, H. Han, X. Liu, S. Jian.* Polymeric ionic liquid as a background electrolyte modifier enhancing the separation of inorganic anions by capillary electrophoresis // *Chem. Pap.* 2011 **(65)** 267-272.
32. *Syed Asad Ali Rizvi and Shahab A. Shamsi.* Synthesis, Characterization, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography // *Anal. Chem.* 2006 **(78)** 7061-7069.

33. *Hiroyuki Nishi, Kouji Nakamura, Hideo Nakai, Tadashi Sato.* Chiral separation of drugs by capillary electrophoresis β -cyclodextrin polymer // Journal of Chromatography A. 1994 (**678**) 333-342.
34. *Koji Otsuka, Shigeru Terabe.* Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants // Journal of Chromatography A. 2000 (**875**) 163–178.
35. *Akira Dobashi, Tamami Ono, Shoji Hara.* Optical Resolution of Enantiomers with Chiral Mixed Micelles by Electrokinetic Chromatography // American Chemical Society. 1989 (**61**) 1986-1988.
36. *Naghdi E., Fakhari A.R.* Simultaneous chiral separation of tramadol and methadone in tablets, human urine, and plasma by capillary electrophoresis using maltodextrin as the chiral selector // Chirality. 2018 1-8.
37. *Zhang, Q., Du, Y., Chen, J., Xu, G., Yu, T., Hua, X., Zhang, J.* Investigation of chondroitin sulfate D and chondroitin sulfate E as novel chiral selectors in capillary electrophoresis // Anal. Bioanal. Chem. 2014 (**406**) 1557–1566.
38. *Tohala, L., Oukacine, F., Ravelet, C., Peyrin, E.* Sequence requirements of oligonucleotide chiral selectors for the capillary electrophoresis resolution of low-affinity DNA binders // Electrophoresis. 2017 (**38**) 1383–1390.
39. *Rmaile, H. H., Schlenoff, J. B.* Optically Active Polyelectrolyte Multilayers as Membranes for Chiral Separations // J. Am. Chem. Soc. 2003 (**125**) 6602–6603.
40. *Mary W. Kamande, Xiaofeng Zhu, Constantina Kapnissi-Christodoulou, Isiah M. Warner.* Chiral Separations Using a Polypeptide and Polymeric Dipeptide Surfactant Polyelectrolyte Multilayer Coating in Open-Tubular Capillary Electrochromatography // Analytical Chemistry. 2004 **76** (**22**) 6681-6692.
41. *Nattapon Kuntip, Deanpen Japrun, Prapasiri Pongprayoon.* How human serum albumin-selective DNA aptamer binds to bovine and canine serum albumins // Biopolymers. 2021 (**112**) 23421.
42. *Ali J. Ryan, Jamie Ghuman, Patricia A. Zunszain, Chun-wa Chung, Stephen Curry.* Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin // Journal of Structural Biology. 2011 (**174**) 84–91.

43. *Nengsheng Ye, Xuexin Gu, and Guoan Luo.* Chiral Separation of Ephedrine Isomers by Capillary Electrophoresis Using Bovine Serum Albumin as a Buffer Additive // *Journal of Chromatographic Science.* 2007 (5) 246-250.

44. *Ju Yang and Davld S. Hage.* Chiral Separations in Capillary Electrophoresis Using Human Serum Albumin as a Buffer Additive // *Anal. Chem.* 1994 (66) 2719-2725.

45. *J.L. Chen, K.H. Hsieh.* Nanochitosan crosslinked with polyacrylamide as the chiral stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2011 (32) 398-407.

46. *Dongmei Wang, Xiaojiao Song, Yin Duan, Liang Xu, Jing Zhou, Hongquan Duan.* Preparation and characterization of a polystyrene/bovine serum albumin nanoparticle-coated capillary for chiral separation using open-tubular capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2013 (34) 1339–1342.

47. *Liang RP, Wang XN, Liu CM, Meng XY, Qiu JD.* Facile preparation of protein stationary phase based on polydopamine/ graphene oxide platform for chip-based open tubular capillary electrochromatography enantioseparation // *J Chromatogr A.* 2014 (1323) 135-142.

48. *Chunye Liu, Jingshu Zhang, Xuejiao Zhang, Lingzhi Zhao, Shuang Li.* Enantiomeric separation of adrenaline, noradrenaline, and isoprenaline by capillary electrophoresis using streptomycin-modified gold nanoparticles // *Mikrochim Acta.* 2018 (185(4)): 227.

49. *Junyu Lu, Fanggui Ye, Aizhu Zhang, Zong Wei, Yan Peng, Shulin Zhao.* Preparation and characterization of silica monolith modified with bovine serum albumin-gold nanoparticles conjugates and its use as chiral stationary phases for capillary electrochromatography // *J. Sep. Sci.* 2011 (34) 2329–2336.

50. *Lele Xiong, Ruijun Li, Yibing Ji.* Preparation and performance characterization of gold nanoparticles modified chiral capillary electrochromatography stationary phase // *Se Pu.* 2017 (35(7)) 712-718.

51. *Jordi Piella, Neus G. Bastúsa and Victor Puntès.* Size-controlled Synthesis of sub-10 nm Citrate-stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties // *Chem. Mater.* 2016 24 c.

52. *Rebeka Rudolf, PeterMajeriI, Sergej Tomi, Mohammed Shariq, Urban Feriec, Bojan BudiI, Bernd Friedrich, Dragana VuIevi andMiodrag Holi.* Morphology,

Aggregation Properties, Cytocompatibility, and Anti-Inflammatory Potential of Citrate-Stabilized AuNPs Prepared by Modular Ultrasonic Spray Pyrolysis // *Journal of Nanomaterials*. 2017 17 c.

53. *Manish Bajaj, Nishima Wangoo, D. V. S. Jain, Rohit K. Sharma*. Quantification of adsorbed and dangling citrate ions on gold nanoparticle surface using thermogravimetric analysis // *Scientific Reports*. 2020 (10) 8213.

54. *Katherine C. Grabar, R. GrWith Freeman, Michael B. Hommer, and Michael J. Natan*. Preparation and characterization of Au Colloid Monolayers // *Anal. Chem*. 1995 (67) 735-743.

55. *Selma M.H. AL-Jawada, Ali A. Taha, Mohammad M.F. Al-Halbosiy, Lamyaa F.A. AL-Barram*. Synthesis and characterization of small-sized gold nanoparticles coated by bovine serum albumin (BSA) for cancer photothermal therapy // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018 (21) 201–210.

56. *Qianqian Zhang, Junhua Wang, Zhao Meng, Rui Ling, Hang Ren, Weidong Qin, Zhenglong Wu, Na Shao*. Glutathione Disulfide as a Reducing, Capping, and Mass-Separating Agent for the Synthesis and Enrichment of Gold Nanoclusters // *Nanomaterials*. 2021 (11) 2258.

57. *Д. В. Makeeva, К. С. Антипова, Е. В. Соловьева, В. П. Моргачева, Е. А. Колобова, Л. А. Карцова*. Полислойные покрытия на основе стабилизированных цитратом наночастиц золота и полидиаллилдиметиламмоний хлорида для электрофоретического разделения карбоновых кислот // *Журнал аналитической химии*. 2023 (78(3)) 241-252.

58. *Liu, Q., Lin, F., Hartwick, R. A*. Poly(diallyldimethylammonium chloride) as a Coating for Capillary Electrophoresis // *Journal of Chromatographic Science*. 1997 (36) 126-130.

59. *Mary W. Kamande, Xiaofeng Zhu, Constantina Kapnissi-Christodoulou, Isiah M. Warner*. Chiral Separations Using a Polypeptide and Polymeric Dipeptide Surfactant Polyelectrolyte Multilayer Coating in Open-Tubular Capillary Electrochromatography // *Anal. Chem*. 2004 (76) 6681-6692.

60. *Vinod Kumar Vashistha, Anuj Kumar*. Stereochemical facets of clinical β -blockers: An overview // *Chirality*. 2020 1–14.

61. *Purushoth Prabhu, Shinesudev, Manju kurian, Manjushsa, Minnu, Mohamed Hisham, Sapna Shrikumar.* Pharmaceutical review and its importance of chiral chromatography // International journal of research in pharmacy and chemistry. 2016 **6(3)** 476-484.

62. *Tetsuya Miyamoto, Hiroshi Homma.* D-Amino acid metabolism in bacteria // J. Biochem. 2021 **170(1)** 5–13.

63. *Jumpei Sasabe, Yurika Miyoshi, Seth Rakoff-Nahoum, Ting Zhang, MasashiMita, Brigid M. Davis, Kenji Hamase, Matthew K. Waldor.* Interplay between microbial D-amino acids and host D-amino acid oxidase modifies murinemucosal defence and gut microbiota // Nat Microbiol. 2016 **1(10)** 16125.

64. *Комарова Н. В., Каменцев Я. С.* Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» — СПб.: ООО «Веда», 2006. — 212 с.

65. *Bai Q., Zhang C., Zhao Y., Wang C., Maihemuti M., Sun C., Qi Y., Peng J., Guo X., Zhang Z., Fang L.* Evaluation of chiral separation based on bovine serum albumin-conjugated carbon nanotubes as stationary phase in capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2020 **(41)** 1-19.

66. *De-Hao Tsai, Frank W. DelRio, Athena M. Keene, Katherine M. Tyner, Robert I. MacCuspie, Tae Joon Cho, Michael R. Zachariah and Vincent A. Hackley.* Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods // Langmuir. 2011 **(27)** 2464–2477.