

ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СОРБЦИИ БЕЛКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ PLOT-КОЛОНОК С ДЕНДРИТНОЙ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗОЙ

В.Е. Потолицына, Л.А. Карцова, Е.А. Бессонова

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет,
кафедра органической химии
198504, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Старый Петергоф,
Университетский просп., 26
potolitsynavera@gmail.com

Поступила в редакцию 10 февраля 2014 г.
после доработки – 26 февраля 2014 г.

Методом эллипсометрии изучена возможность сорбции белков (*альбумин, инсулин, лизоцим и миоглобин*) на поверхности сверхразветвленных полимеров (СРП) – водорастворимых олигосахаридных производных полиэтиленimina (PEI-Mal), используемых в качестве стационарной фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Известно, что многие белковые молекулы являются маркерами различных заболеваний, поэтому для успешной диагностики этих заболеваний необходимо их точное количественное определение, а необратимая адсорбция белков на стенках кварцевого капилляра в процессе разделения может исказить результаты анализа, поэтому знание особенностей процессов адсорбции белков на различных поверхностях весьма актуально.

В работе для исследования возможной адсорбции белков выбран метод эллипсометрии как высокочувствительный, быстросействующий и бесконтактный. Эллипсометрия неоднократно и успешно использовалась различными исследователями для изучения адсорбции различных веществ из газовой и из жидкой фаз. В работе проведены эллипсометрические измерения в режиме *in situ* на поверхности кремниевой пластины, покрытой тонкой пленкой сверхразветвленного полиэтиленimina, модифицированного мальтозой. Методом эллипсометрии установлено, что СРП препятствует адсорбции белков на стенках капиллярной колонки при их электрофоретическом разделении в условиях капиллярной электрохроматографии.

Ключевые слова: мальтозилированный сверхразветвленный полиэтиленимин, эллипсометрия, адсорбция белков, капиллярная электрохроматография, PLOT-колонки.

Потолицына Вера Евгеньевна – аспирант химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: капиллярный электрофорез, жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия.

Автор 20 публикаций.

Бессонова Елена Андреевна – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: капиллярный электрофорез, газовая и жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия.

Автор 70 публикаций.

Карцова Людмила Алексеевна – доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Область научных интересов: хроматографические и электрофоретические методы определения биологически активных соединений в сложных матрицах; *on- и off-line* концентрирование; организованные среды: мицеллы, краун-соединения, циклодекстрины, микроэмульсии.

Общее число публикаций – 560.

Введение

Необходимость определения состава сложных систем природного происхождения инициировала разработку новых аналитических технологий их разделения. Метод капиллярного электрофореза (КЭ) активно используется в биомедицинских исследованиях при определении низко- и высокомолекулярных аналитов [1-4]. Несмотря на его очевидные достоинства (высокая эффективность, экспрессность, минимальные требования к пробоподготовке) имеется ряд ограничений при определении биополимеров, основное из которых – необратимая адсорбция белков и пептидов на стенках кварцевого капилляра.

Предложены решения этой проблемы: модификация рабочего буфера и/или поверхности кварцевого капилляра с использованием ковалентного либо динамического покрытия, что влияет на электроосмотический поток (ЭОП) и, как следствие, электрофоретическую подвижность аналитов [1-6]. В последние годы отмечается повышенный интерес к использованию полимерных материалов в качестве таких модификаторов. К ним, в первую очередь, относятся уже зарекомендовавшие себя полиметакрилатные полимеры [7]. Однако длительный процесс получения колонок на их основе и трудности электрофоретического анализа из-за образующихся пузырьков воздуха внутри капилляра, приводящих к обрыву тока, потребовали поиска альтернативных полимерных покрытий.

Перспективными материалами в качестве стационарных и псевдостационарных фаз в КЭ оказались дендритные полимеры [8-12]. Они представляют собой высокоструктурированные, сверхразветвленные трехмерные макромолекулы с молекулярной массой ~10-10³ кДа, состоящие из полифункционального ядра, радиально-симметричных слоев повторяющихся фрагментов (или генераций) и множества терминальных групп, определяющих физические и химические свойства полимера [13].

На основе сверхразветвленного полиэтиленимина с массой ядра 5 и 25 кДа и различным содержанием мальтозных фрагментов в оболочке (структуры водорастворимых олигосахаридных

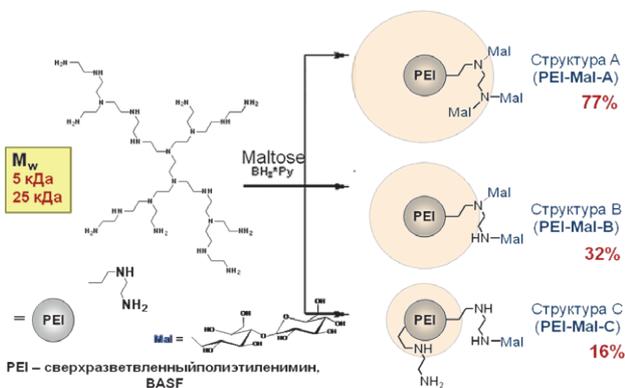


Рис. 1. Структуры сверхразветвленного полиэтиленимина с мальтозной оболочкой

производных полиэтиленимина **PEI-Mal-A**, **PEI-Mal-B** и **PEI-Mal-C** соответственно) нами синтезированы PLOT-колонок с тонким пористым слоем на внутренней поверхности кварцевого капилляра полимера (рис. 1) [14, 15]. С использованием этих PLOT-колонок изучено влияние состава и pH буферного электролита на миграционные характеристики белков в условиях капиллярной электрохроматографии [15]. Выбранные тестовые белки (миоглобин, инсулин, лизоцим и альбумин), являясь диагностическими маркерами различных заболеваний, имеют различные значения изоэлектрических точек (*pI*) и молекулярных масс (*Mr*), что необходимо для проверки работоспособности подготовленных колонок (табл. 1).

При этом оставался нерешенным вопрос: не происходит ли на модифицированной полимером поверхности капилляра сорбция белков, приводящая к потерям аналитов в процессе анализа? Для ответа на этот вопрос проведен ряд независимых экспериментов методом эллипсометрии [16].

Эллипсометрия – неdestructивный оптический метод, применяемый для характеристики поверхностей и тонких пленок, т. е. для определения таких параметров, как показатель преломления, коэффициент экстинкции, толщина пленок. Одно из главных достоинств метода – высокая чувствительность, позволяющая измерять толщину пленок на уровне нескольких нм [16]. Основы метода подробно изложены в [16, 17]. Принципиальная схема эллипсометра представлена на рис. 2. Пучок света, испускаемый источником, проходит через поляризатор и компенсатор, попадает на образец, проходит через анализатор и, в итоге, достигает детектора, который измеряет интенсивность света [17].

В основе метода эллипсометрии лежит изменение состояния поляризации световой волны при её отражении от поверхности. Экспериментально измеряемые эллипсометрические параметры Ψ и Δ описывают амплитудные и фазовые изменения

Таблица 1

Молекулярные массы и значения изоэлектрических точек определяемых белков.

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

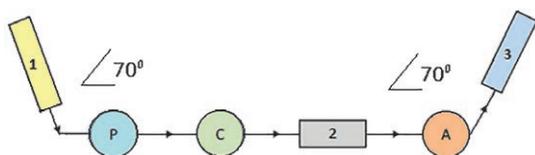


Рис. 2. Принципиальная схема эллипсометра, где 1 – источник света, P – поляризатор, C – компенсатор, 2 – образец, A – анализатор, 3 – детектор. [17]

волны. Эти параметры связаны с комплексными коэффициентами отражения для волн, поляризованных в плоскости падения R_p и перпендикулярно ей R_s следующим соотношением (1):

$$\operatorname{tg} \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s} \quad (1)$$

Коэффициенты отражения (R_p, R_s) зависят от показателя преломления внешней среды (n_0), оптических постоянных i -х слоёв исследуемой структуры (показатель преломления (n), коэффициент экстинкции (k), их толщин (d)), подложки (n_s, k_s), а также угла падения φ и длины волны λ света (1).

В методе эллипсометрии измеряется изменение в состоянии поляризации падающего (i) и отраженного (r) света посредством определения значения параметра $\tan \psi$ – отношения амплитуд световой волны до и после отражения в соответствии с уравнением (2); Δ – относительная разность фаз колебаний этой волны (3):

$$\tan \psi = \frac{E_p^r / E_p^i}{E_s^r / E_s^i} \quad (2)$$

$$\Delta = (\delta_p^r - \delta_s^r) - (\delta_p^i - \delta_s^i) \quad (3)$$

где E – амплитуда световой волны, δ – фаза колебаний волны. Таким образом, в основе метода эллипсометрии лежит измерение значений эллипсометрических углов (Ψ и Δ). Толщина измеряемой пленки (d) и оптические константы (показатель преломления и коэффициент экстинкции) оценивают-

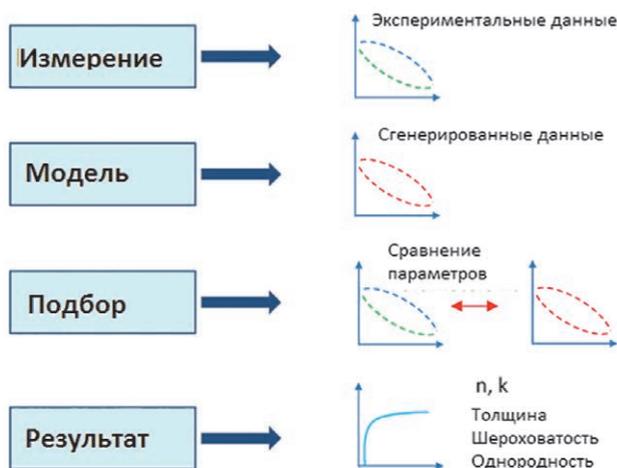


Рис. 3. Основные этапы анализа методом эллипсометрии [17]

ся путем сравнения измеренных величин Ψ и Δ с теми же величинами, заданными для модели оптического слоя. Логика такого подхода представлена на рис. 3.

Задаются значения параметров d и n , если $k = 0$ (т. е. для пленок, не поглощающих свет), чтобы использовать их для дальнейших вычислений. С учетом введенных данных измеряются значения параметров Ψ и Δ и сравниваются с заданными для модели. Подбор продолжается до тех пор, пока не будут найдены значения, максимально удовлетворяющие экспериментальным данным (4).

Наименьшее значение функции ошибки соответствует наиболее вероятным значениям искомых параметров оптической модели:

$$\sigma^2 = \frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^m [(\Delta_{\text{эксп.}} - \Delta_{\text{мод.}})^2] \quad (4)$$

для всех m точек спектра. В случае тонких слоев ($d < 10\text{-}20$ нм) нецелесообразно определять одновременно толщину и показатель преломления пленки из-за имеющейся корреляции между ними. Поэтому рекомендовано использовать известные (справочные) постоянные показателя преломления и измерять только значение толщины пленки [16, 17].

В настоящей работе синтезирована пленка сверхразветвленного полимера на кварцевой пластине и оценена возможность сорбции белков на его поверхности. Ранее нами было изучено влияние ядра и мальтозной оболочки на разделение белков в условиях электрокинетической хроматографии (ЭКХ) [13]. Поскольку существенных различий в параметрах миграции аналитов при использовании полимеров различных генераций и различной массой ядра (A5 и A25) не было обнаружено, в данной работе в электрофоретических экспериментах по выявлению сорбции белков был взят только полимер PEI-Mal с массой ядра 25 кДа, содержащий большее число терминальных олигосахаридных групп [13].

Оборудование и реактивы

Реактивы. Деионизированная вода, спирт этиловый (99.5 %, VWR prolabo); гидроксид аммония (30 % водный раствор, Acros organic); перекись водорода (30 % раствор, ч.д.а, Merck); борная кислота (х.ч.) («Реахим»); дигидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, 99 %); фосфорная кислота (85 % раствор); лизоцим (куриный) (х.ч.) («Sigma-Aldrich»); миоглобин (человеческих скелетных мышц) (95-100 %) («Sigma-Aldrich»); инсулин (свиной) («Sigma-Aldrich»); альбумин (человека) (96-99 %) («Sigma-Aldrich»); сверхразветвленный полиэтиленимин PEI-25K (M_w 25000 г/мол, M_n 9600 Da г/мол, марка „Lupasol WF”) предоставлен компанией BASF; модифицированный мальтозой сверхразветвленный полиэтиленимин PEI-Mal-A25; лимонная кислота (Sigma-Aldrich, 99.5 %); гидроксид натрия (Sigma-Aldrich, 98 %).

Материалы и оборудование. Кремниевые пластины («Institut für Halbleiter- und Mikrosystemtechnik TU Dresden (Germany)»); спин-коутер («SPIN150-ТТ», POLOS™); эллипсомер («alpha-SE® Ellipsometer», J. A. Woollam Co., Inc.); рефрактометр (DSR-L, Schmidt + Haensch); магнитная мешалка с нагревательным элементом («RCT basic IKAMAG® safety control»); вакуумная печь (« Heraeus VT6025 Vacutherm Oven»); нейлоновый фильтр с диаметром пор 0.2 мкм.

Получение тонкой полимерной пленки PEI-Mal A25. Кремниевую пластину помещали в раствор этанола в ультразвуковую ванну (2×10 мин), промывали деионизированной водой. Затем проводили травление поверхности для обеспечения максимального количества гидроксильных групп.

Травление поверхности кремниевых пластин. Кремниевую пластину помещали в смесь, содержащую водный раствор аммиака (конц.), 30 %-й раствор H_2O_2 и $H_2O_{\text{деиониз}}$ в соотношении (1 : 1 : 1) на 30 мин при 65 °С. Далее пластину тщательно промывали деионизированной водой и высушивали в токе азота.

Приготовление раствора полимера PEI-Mal A25. Водный раствор (1.5 % мас.) полиэтиленimina, модифицированного мальтозой с массой ядра 25 кДа (PEI-Mal A25), содержащего 25 мг лимонной кислоты на каждые 100 мг. Раствор PEI-Mal A25 отфильтровывали через нейлоновый фильтр с размером пор 0.2 мкм.

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

Приготовление 1М фосфатного буферного раствора (pH = 2.2). В 40 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 50 мл растворяли 7.8 г дигидрофосфата натрия ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) и 0.25 мл 85 %-го раствора фосфорной кислоты. Объем буфера доводили до 50 мл.

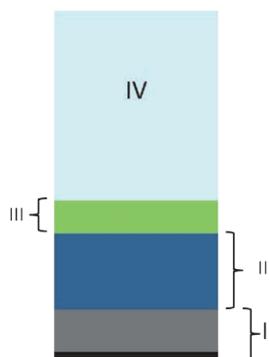


Рис. 4. Модель оптического слоя, использованная при получении эллипсометрических данных. Слои: I – Si/SiO₂ – подложка; II – слой набухшего полимера (n , d – фиксированы); III – слой белка ($n = 1.375$, $d_{\text{пл,эфф}}$ – варьируется); IV – буферный раствор

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

Приготовление боратного буферного раствора для КЭ. В 800 мл дистиллированной воды растворяли 1.85 г борной кислоты, по откалиброванному рН-метру доводили рН до 10.5 добавлением 2М раствора NaOH. Затем объем буфера доводили до 1000 мл и достигали требуемого значения рН тем же раствором щелочи. Буфер имел молярность по борной кислоте 0.15 М. Готовый буферный раствор фильтровали через бумажный фильтр, помещали в чистую стеклянную емкость объемом 1000 мл, дегазировали на ультразвуковой бане и хранили в холодильнике при температуре +4 °С. Растворы меньшей концентрации получали разбавлением исходного раствора.

Условия эллипсометрического определения адсорбции белков. Определение толщины полимерной пленки PEI-Mal A25 (d) и показателя преломления (n) в сухом и набухшем состоянии осуществляли с помощью многоволнового эллипсометра в спектральном диапазоне 380-900 нм и углом падения 70°[18]. Все значения показателей преломления даны для $\lambda = 632.8$ нм. Оптическая модель для оценки оптических параметров (эффективной толщины и показателя преломления) полимерной пленки и белкового слоя представлена на рис. 4.

Количество адсорбированного белка m (мг/м²) устанавливали в соответствии с уравнением (3) [19]:

$$m = d_{\text{пл,эфф}} \frac{n_{\text{пл}} - n_{\text{ам}}}{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{\text{пл}}} \quad (5)$$

где $d_{\text{пл,эфф}}$ – эффективная толщина слоя адсорбированного белка (нм), $n_{\text{пл}}$ – показатель преломления слоя белка, $n_{\text{ам}}$ – показатель преломления внешней среды (буфер) и $(dn/dc)_{\text{пл}}$ – инкремент показателя преломления белков: 0.187 см³/г для альбумина; 0.188 см³/г для лизоцима; 0.185 см³/г для миоглобина и инсулина (лит. данные [20]).

Обсуждение результатов

В качестве модели внутренней поверхности кварцевого капилляра использовали кремниевую пластину. Поскольку кварц и биоорганические среды имеют весьма близкие значения показателя преломления (n , значит, и низкий оптический контраст), выбранным модельным объектом стала кремниевая поверхность. Поверхность кремния в реальных условиях всегда покрыта оксидной пленкой (2-3 нм) и может рассматриваться в первом приближении как аналог кварцевой поверхности. Кремний же в качестве подложки дает хороший контраст с биоорганическими покрытиями и позволяет измерять толщину последних до нескольких нм. Перед измерением адсорбции белков на поверхности сверх-

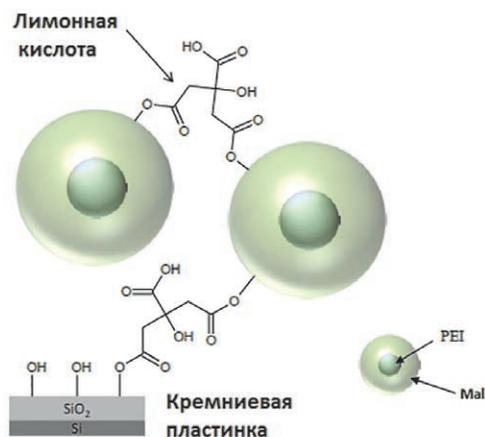


Рис. 5. Структура полимерной пленки на поверхности кварцевой пластины. PEI – сверхразветвленный полиэтиленимин, Mal – мальтозные фрагменты

разветвленного полиэтиленимина, модифицированного мальтозой, проводили процедуру синтеза пленки этого полимера на поверхности кремниевой пластинки, а именно: после травления на поверхность пластинки с помощью спин-коатера наносили смесь, содержащую полимер с максимальным содержанием олигосахаридных фрагментов (структура А, рис. 1) и лимонную кислоту в качестве сшивающего агента (рис. 5). В результате по данным эллипсометрического анализа формировался слой полимера толщиной ~ 20 нм.

Возможность адсорбции белков (альбумин, инсулин, миоглобин и лизоцим) на поверхности (PEI-Mal A25)-полимерной пленки изучали при различных значениях pH рабочего буфера (2.2 и 8.5). Для этого кремниевую пластинку со слоем полимера помещали в буферные растворы: фосфатный (pH = 2.2) или боратный (pH = 8.5), и *in situ* эллипсометр регистрировал изменение толщины пленки в течение 10 ч (рис. 6А и 6Б; табл. 2 и 3) до достижения постоянного значения.

Из табл. 2 и 3 видно, что полимерный слой стабилен, т.е. изменение толщины слоя незначительно и составляет не более 2 нм за 10 ч. При этом изменение толщины слоя в течение одного экспе-

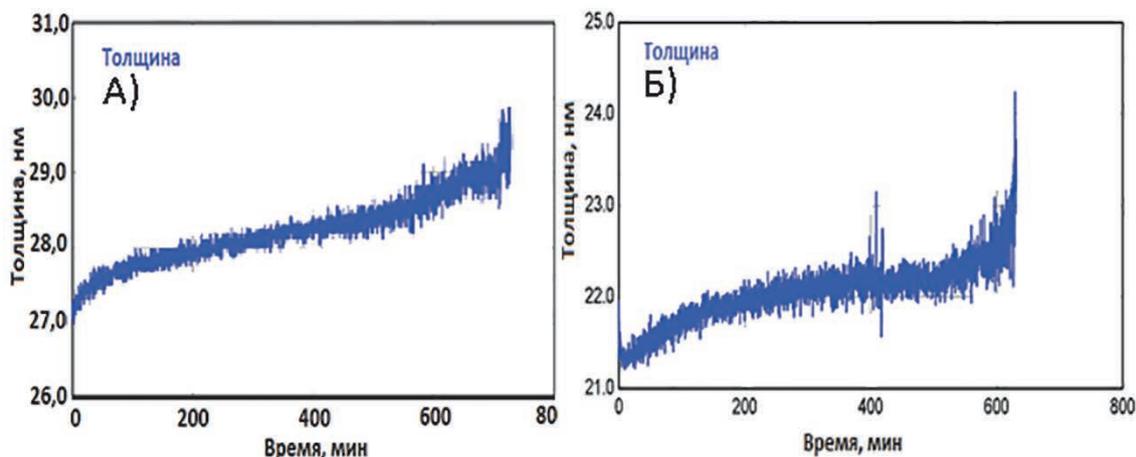


Рис. 6. Типичное набухание *in situ* полимерной пленки в: А – фосфатном буферном растворе (pH = 2.2); Б – в боратном буферном растворе (pH = 8.5) при 25 °С

Таблица 2

Значение толщины ($d_{эфф}$) и показателя преломления (n) сухого и набухшего полимерного слоя в 0.1 М фосфатном буфере (pH = 2.2) при толщине полимерной пленки*, 0.1М ФБР

№	Перед набуханием (высушенная пластинка), нм	После набухания (высушенная пластинка), нм	Δd , нм	d набухшего (в буферном растворе), нм	n набухшего
1	20.64	20.15	0.49	28.93	1.486
2	21.56	20.72	0.84	29.44	1.480
3	21.03	20.85	0.18	28.01	1.486

Примечание: * – погрешность измерения толщины пленки составляет 0.5 нм (по паспорту прибора).

Таблица 3

Толщина ($d_{эфф}$) и показатель преломления (n) сухого и набухшего полимерного слоя в 0.1 М боратном буфере (pH = 8.5)

№	Перед набуханием (высушенная пластинка), нм	После набухания (высушенная пластинка), нм	Δd , нм	d набухшего (в буферном растворе), нм	n набухшего
1	20.64	19.08	1.56	29.17	1.498
2	19.38	17.95	1.43	28.27	1.498
3	20.59	20.25	0.34	30.34	1.493

Примечание: * – погрешность измерения толщины пленки составляет 0.5 нм (по паспорту прибора).

римента (2 ч) находится в пределах погрешности (0.5 нм). Это позволило нам измерять адсорбцию белков после 30-минутного процесса набухания и получать результаты в пределах погрешности эксперимента.

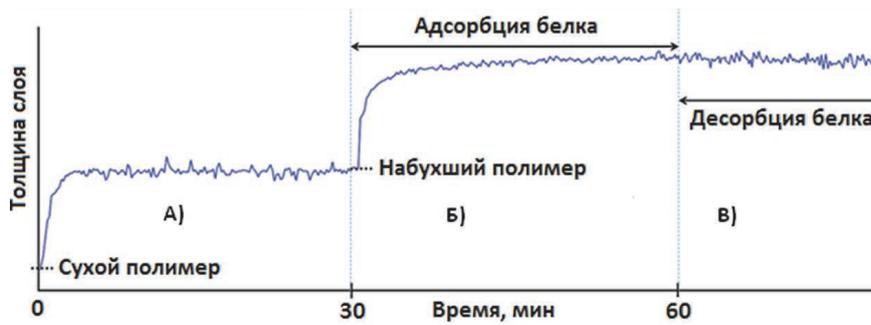


Рис. 7. Типичный результат эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка методом эллипсометрии: А – первый этап: набухание полимерной пленки; Б – второй этап: процесс адсорбции белка; В – третий этап: процесс десорбции белка

В кювету объемом 3 мл, содержащую исследуемую пластину с уже набухшим полимером и буферный электролит (2970 мкл), добавляли раствора белка (30 мкл) с концентрацией 10 мг/мл ($C_{\text{белка}} = 0.1$ мг/мл в кювете). Адсорбцию белка на полимерной пленке *in situ* исследовали эллипсометрически в течение 30 мин. Затем, раствор, содержащий белок, удаляли из кюветы пипеткой. К пластине с набухшим полимером и адсорбированным белком в той же кювете добавляли чистый буферный раствор для выявления возможной десорбции белка *in situ* методом эллипсометрии. Пример результатов эксперимента по выявлению возможной адсорбции/десорбции белка представлен на рис. 7.

В экспериментах с использованием фосфатного буферного электролита ($\text{pH} = 2.2$) молекулы белка и полимера находятся в катионной форме (рис. 8) за счет протонирования аминогрупп. Это приводит к электростатическому отталкиванию между ними.

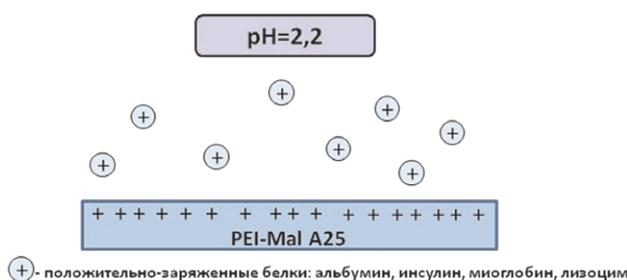


Рис. 8. Адсорбция белков на поверхности полимерной пленки при $\text{pH} = 2.2$

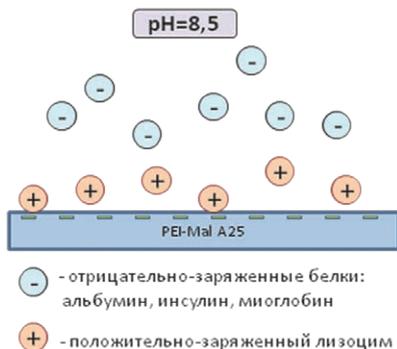


Рис. 9. Адсорбция белков на поверхности полимерной пленки при $\text{pH} = 8.5$

Из табл. 4 видно, что количество адсорбированного белка не превышает 1 мг/м^2 , что соответствует менее 0.1 % от общего содержания белка в растворе. Таким образом, в этих условиях количественных потерь белков при их электрохроматографическом определении практически не происходит.

Во втором случае, при $\text{pH} = 8.5$, только один белок (лизоцим) имеет противоположный полимеру заряд. Полимер, альбумин, миоглобин и инсулин заряжены отрицательно, а лизоцим – положительно (рис. 9). В данном варианте толщина слоя адсорбированного лизоцима оказалась равной ~ 18

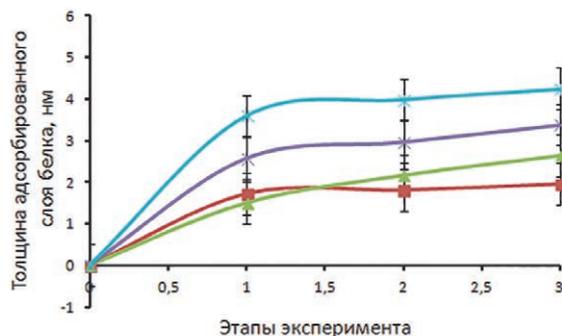


Рис. 10. Изменение толщины белкового слоя на поверхности полимера при $\text{pH} = 2.2$: □ – инсулин, \diamond – миоглобин, \times – альбумин, Δ – лизоцим. Этапы: 0 – набухший слой полимера, 1 – адсорбция белков, 2 – десорбция, 3 – повторная десорбция. А – инсулин, Б – лизоцим, В – альбумин, Г – миоглобин.

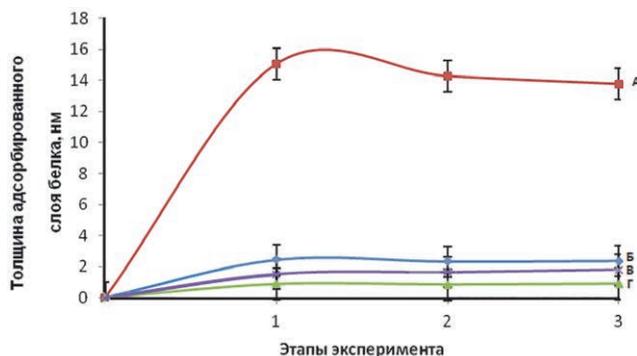


Рис. 11. Изменение толщины белкового слоя на поверхности полимера при $\text{pH} = 8.5$: □ – лизоцим, \diamond – альбумин, \times – инсулин, Δ – миоглобин. Этапы: 0 – набухший слой полимера, 1 – адсорбция белков, 2 – десорбция, 3 – повторная десорбция. А – альбумин, Б – лизоцим, В – миоглобин, Г – инсулин.

Таблица 4

Исследование адсорбции белков на поверхности полимерной пленки при pH буферного раствора 2.2 и 8.5

Белок	№	pH = 2.2			pH = 2.2		
		$d_{эфф.}$, нм	m , мг/м ²	СКО, %	$d_{эфф.}$, нм	m , мг/м ²	СКО, %
Альбумин	1	2.8	0.7	22.1	2.1	0.5	13.4
	2	3.1	0.7		2.3	0.5	
	3	3.1	0.7		3.0	0.7	
	4	1.9	0.5		2.3	0.6	
	5	2.1	0.5		2.5	0.6	
	6	2.0	0.5		-	-	
	7	1.9	0.5		-	-	
Лизоцим	1	1.9	0.5	13.5	17.9	4.3	15.0
	2	1.6	0.4		12.1	2.9	
	3	1.5	0.4		13.9	3.3	
	4	1.7	0.4		16.4	3.9	
	5	1.6	0.4		-	-	
	6	1.8	0.4		-	-	
	7	1.2	0.3		-	-	
Инсулин	1	2.0	0.5	10.8	1.0	0.3	26.2
	2	1.8	0.4		1.5	0.4	
	3	1.6	0.4		2.0	0.5	
	4	1.5	0.4		-	-	
Миоглобин	1	5.0	1.2	14.2	1.0	0.2	34.2
	2	4.0	1.0		0.4	0.1	
	3	3.6	0.9		0.9	0.2	

нм (это соответствует 4 мг/м², или 0.4 % от общего содержания белка в растворе).

Процесс адсорбции протекает достаточно быстро (менее 1 мин), после чего график зависимости толщины пленки от времени практически выходит на плато. Наблюдаемая адсорбция практически необратима: десорбция белков с поверхности полимера при замене раствора белка на чистый буферный электролит не наблюдалась.

На рис. 10 и 11 приведены графические зависимости толщины белкового слоя на поверхности полимера после адсорбции, а также первичной и вторичной замены буферного электролита (измерение десорбции), содержащего белок на чистый буферный электролит при pH = 2.2 и 8.5 соответственно.

Заключение

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Petersen J.R., Mohammad A.A. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. NY.: Humana Press, 2012. 456 p.

2. Ahuja S., Jimidar M. *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis (Separation Science and Technology)*. Waltham.: Academic Press, 2008. 546 p.
3. Scriba G.K.E. *Capillary electrophoresis: Pharmaceutical applications // Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Encyclopedia of Analytical Science. Second Edition. 2005. P. 343-354.*
4. Беленький Б.Г. *Высокоэффективный капиллярный электрофорез*. М.: Наука, 2009. 314 с.
5. El Rassi Z. *CE and CEC. Reviews*. NY.: Wiley, 2001. 606 p.
6. Ozkan S.A. *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. NY.: HNB Publishing, 2012. 350 p.
7. Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А. *Синтез метакрилатного монолитного сорбента для капиллярной электрохроматографии // Журн. Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8, № 5. С. 724-731.*
8. Use of a new diaminobutane dendrimer in electrokinetic capillary chromatography / J.L. Haynes [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 1998. V. 21. P. 611-624.
9. Preparation and evaluation of non-bonded hyperbranched polymer-coated columns for capillary electrophoresis / C.Q. Shou [et al.] // *Talanta*. 2004. V. 63. P. 887-891.
10. Chen M.L., Chen X.W., Wang J.H. *Functionalization of MWNTs with Hyperbranched PEI for Highly Selective Isolation of BSA // Macromolecular Bioscience*. V. 10. P. 906-915.
11. Synthesis of dendritic stationary phases with surface-bonded L-phenylalanine derivate as chiral selector and their evaluation in HPLC resolution of racemic compounds / C.Q. Yin [et al.] // *Chirality*. 2008. V. 20. P. 846-855.
12. Evaluation of novel dendrimer chiral stationary phases using HPLC / B.T. Mathews [et al.] // *Chromatographia*. 2001. V. 53. P. 147-155.
13. Исследование возможностей новых сверхразветвленных полимеров в качестве псевдостационарных

фаз в электрокинетической хроматографии при определении белков / Е.А. Бессонова [и др.] // Вестник СПбГУ. Сер. 4, № 1. 2011. С. 100-106.

14. Hyperbranched PEI with Various Oligosaccharide Architectures: Synthesis, Characterization, ATP Complexation, and Cellular Uptake Properties / D. Appelhans [et al.] // *Biomacromolecules*. 2009. V. 10. P. 1114-1124.

15. Потолицына В. Е., Карцова Л. А., Бессонова Е. А. Синтез и изучение свойств PLOT-колонок на основе новых дендритных полимеров для разделения белков методом капиллярной электрохроматографии // *Журн. Аналитической химии*. 2013. Т. 68, № 11. С. 1096-1100.

16. H. Tompkins, E. Irene. *Handbook of Ellipsometry*. NY: William Andrew Inc., 2005. 870 p.

17. Woollam J.A. Tutorial // University of Nebraska, Lincoln [Электронный ресурс]: http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html (дата обращения 15.11.2013).

18. Woollam J.A. User Manual VASE and M-44 Ellipsometers, WVASE 32 TM // University of Nebraska, Lincoln [Электронный ресурс]: <http://www.jawoollam.com/products.html> (дата обращения 20.11.2013).

19. De Feijter J.A., Benjamins J., Veer F.A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface // *Biopolymers*. 1978. V. 17. P. 1759-1772.

20. Tosatti S., Paul S.M.D., Askendal A., VandeVondele S., Hubbell J.A., Tengvall P., Textor M. Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, pp. 4949-4958.

ELLIPSOMETRIC CONTROL OF PROTEIN SORPTION ON PLOT-COLUMNS WITH DENDRITIC STATIONARY PHASE

V. Potolitsyna, L. Kartsova, E. Bessonova

Saint-Petersburg State University (SPbU)
University Ave. 26, St. Petersburg, 198504, Russian Federation
potolitsynavera@gmail.com

The article is related to the investigation of adsorption potential of proteins (albumin, insulin, lysozyme and myoglobin) on the surface of hyperbranched polymers, specifically, water-soluble oligosaccharide derivatives of polyethyleneimine, which are used as a stationary phase in capillary electrochromatography (CEC). Various protein molecules are known to be markers of different diseases. Detection and quantification of these proteins are of the highest importance for a successful disease diagnostics. However, irreversible adsorption of proteins onto the walls of the silica-fused capillary during the separation process may distort the results of the analysis. A method of ellipsometry is proposed to solve the problem. In the research we suggest to carry out the ellipsometric measurement mode in situ on the surface of a silicon wafer coated with a thin film of hyperbranched polyethyleneimine modified with maltose. According to the data of ellipsometric investigation, hyperbranched polymers are revealed to prevent protein adsorption during their electrophoretic separation.

Key words: hyperbranched polyethyleneimine, ellipsometry, protein adsorption, capillary electrochromatography, PLOT-column.

REFERENCES

1. Petersen J.R., Mohammad A.A. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. New York: Humana Press, 2012, 456 p.

2. Ahuja S., Jimidar M. *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis (Separation Science and Technology)*. Waltham: Academic Press, 2008. 546 p.

3. Scriba G.K.E. *Capillary electrophoresis: Pharmaceutical applications*. [Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from Encyclopedia of Analytical Science. Second Edition], 2005, pp. 343-354.

4. Belen'kii B.G. *Vysokoeffektivnyi kapilliarnyi elektroforez* [High efficient capillary electrophoresis]. Moscow, Nauka Publ., 2009, 314 p. (in Russian).

5. El Rassi Z. *CE and CEC. Reviews*. New York: Wiley, 2001. 606 p.

6. Ozkan S.A. *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. New York: HNB Publishing, 2012, 350 p.

7. Kartsova L., Bessonova E., Polikarpov N. [Synthesis of methacrylate monolithic phase for capillary electrochromatography]. *J. Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption

and chromatographic processes]. 2008. vol. 8. no. 5. pp. 724-731 (in Russian).

8. Haynes J.L., Shamsi S.A., Dey J., Warner I.M. Use of a new diaminobutane dendrimer in electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1998, vol. 21, pp. 611-624.

9. Shou C.Q., Zhou C.L., Zhao C.B., Zhang Z.L., Li G.B., Chen L.R. Preparation and evaluation of non-bonded hyperbranched polymer-coated columns for capillary electrophoresis. *Talanta*, 2004, vol. 63, pp. 887-891.

10. Chen M.L., Chen X.W., Wang J.H. Functionalization of MWNTs with Hyperbranched PEI for Highly Selective Isolation of BSA. *Macromolecular Bioscience*, vol. 10, pp. 906-915.

11. Yin C.Q., He B.J., Huang S.H., Zhang J.Y., Bai Z.W., Li Z.Y. Synthesis of dendritic stationary phases with surface-bonded L-phenylalanine derivative as chiral selector and their evaluation in HPLC resolution of racemic compounds. *Chirality*, 2008, vol. 20, pp. 846-855.

12. Mathews B.T., Beezer A.E., Snowden M.J., Hardy M.J., Mitchell J.C. Evaluation of novel dendrimer chiral stationary phases using. *Chromatographia*, 2001, vol. 53, pp. 147-155.

13. Bessonova E., Polikarpov N., Kartsova L., Potolitsyna V. [Investigation of the potential of new hyperbranched poly-

mers as the pseudo-stationary phases in electrokinetic chromatography in determining protein]. *Vestnik SPbU* [St. Petersburg State University Gazette], vol. 4, 2011, no. 1, pp. 100-106 (in Russian)

14. Appelhans D., Komber H., Quadir M.A., Richter S., Schwarz S., van der Vlist J., Aigner A., Muller M., Loos K., Seidel J., Arndt K.F., Haag R., Voit B. Hyperbranched PEI with Various Oligosaccharide Architectures: Synthesis, Characterization, ATP Complexation, and Cellular Uptake Properties. *Biomacromolecules*, 2009, vol. 10, pp. 1114-1124.

15. Potolitsyna V., Kartsova L., Bessonova E. [Synthesis and studying of properties of PLOT-columns on the basis of new dendritic polymers for the separation of proteins by capillary electrochromatography]. *Zhurnal analiticheskoi khimii* [Journal of analytical chemistry], 2013, vol. 68, no. 11, pp. 1096-1100 (in Russian).

16. Tompkins H., Irene E. *Handbook of Ellipsometry*. New York: William Andrew Inc., 2005. 870 p.

17. Woollam J.A. Tutorial Available at: http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html (Accessed 15.11.2013).

18. Woollam J.A. User Manual VASE and M-44 Ellipsometers, WVASE 32 TM Available at: <http://www.jawoollam.com/products.html> (Accessed 20.11.2013).

19. De Feijter J.A., Benjamins J., Veer F.A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers*, 1978, vol. 17, pp. 1759-1772.

20. Tosatti S., Paul S.M.D., Askendal A., VandeVondele S., Hubbell J.A., Tengvall P., Textor M. Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, pp. 4949-4958.