



УДК 543.544

On-line концентрирование белков в условиях капиллярной электрохроматографии с использованием *PLOT*-колонок на основе сверхразветвленных полимеров

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

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 27.08.2013 г.

Аннотация

В работе исследованы возможности новых водорастворимых олигосахаридных производных сверхразветвленного полиэтиленimina с массой ядра 25 кДа и различной степенью функционализации мальтозой (PEI-Mal A – 77% модификации, PEI-Mal C – 32% модификации) в качестве стационарной фазы в капиллярной электрохроматографии (КЭХ) для разделения и концентрирования белков (альбумин, инсулин, миоглобин, лизоцим). Синтезированы колонки с нанесенным тонким пористым слоем сорбента на внутреннюю поверхность кварцевого капилляра (PLOT-колонки) на основе сверхразветвленного полимера. Выявлены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования для снижения пределов обнаружения аналитов. Получены сравнительные оценочные характеристики по пределам обнаружения, эффективности, селективности разделения. Показано, что сочетание электростэкинга со стэкингом с большим объемом вводимой пробы позволяет достигнуть значений факторов концентрирования до 1000. Проведена апробация установленных закономерностей на реальных объектах (моча, сыворотка крови).

Ключевые слова: капиллярная электрохроматография, PLOT-колонки, сверхразветвленные полимеры, белки, *on-line* концентрирование

In our study we have investigated the potential of using of new water-soluble oligosaccharide derivatives hyperbranched polyethylenimin with molecular weight 25 kDa and different degree of modification maltose (PEI-Mal A - 77% modified, PEI-Mal C - 32% modification), as the stationary phase in capillary electrochromatography (CEC) for the separation and concentration of proteins (albumin, insulin, myoglobin, lysozyme). It was synthesized columns with thin porous layer of sorbent on the inner surface of the fused silica capillary (PLOT-column) based on the hyperbranched polymer. We have investigated the possibility of different techniques of *on-line* preconcentration of analytes to reduce the detection limits of analytes in CEC. We have estimated comparative parameters such as detection limits, efficiency and separation selectivity. It was shown that the combination of sample stacking with electrokinetic injection (FESI) and large volume sample sacking allows achieving the concentration factors up to 1000. Established principles have been tested on real objects (urine, blood serum).

Keywords: capillary electrochromatography, PLOT-columns, hyperbranched polymers, proteins, *on-line* preconcentration

Введение

В последние годы метод капиллярного электрофореза (КЭ) благодаря высокой эффективности широко используется для разделения низко- и

высокомолекулярных биологически активных веществ. Основные проблемы, возникающие при анализе биологических объектов методом капиллярного электрофореза, заключаются в необратимой адсорбции биополимеров на стенках кварцевого капилляра и низкая концентрационная чувствительность УФ-детектирования. Это затрудняют активное использование КЭ в практике клинической медицины.

Одним из решений является использование полимерных материалов в качестве компонентов стационарных и псевдостационарных фаз при электрофоретическом разделении белков. В последние годы отмечается повышенный интерес к дендритным полимерам. Дендритные полимеры представляют собой высокоструктурированные и сверхразветвленные трехмерные макромолекулы с молекулярной массой $\sim 10 \cdot 10^3$ кДа. Они состоят из полифункционального ядра, радиально-симметричных слоев повторяющихся фрагментов и множества терминальных групп, определяющих физические и химические свойства полимера. Модификация терминальных групп дает возможность контролировать растворимость, реакционную способность, адгезию к поверхности, увеличивать биосовместимость [1]. Внутримолекулярные полости (гидрофильные или гидрофобные) обеспечивают им способность образовывать комплексы включения типа «гость-хозяин» с аналитами различной природы [2, 3].

Изучение взаимодействий дендримеров с белками способствовало применению их в различных областях. Так, дендритные полимеры используют в качестве наноконтейнеров для доставки лекарственных средств к органам и тканям [4]. Установлено, что дендримеры не разрушают вторичную структуру белков и способны образовывать стабильные комплексы за счет гидрофильных и гидрофобных взаимодействий [5, 6]. Это позволило использовать их для оптимизации разделения биополимеров в условиях капиллярного электрофореза [7-9]. Дендримеры могут выполнить роль ион-парного или комплексообразующего реагента, что позволяет, с одной стороны, влиять на эффективность и селективность разделения биополимеров, а с другой - блокировать остатки основных аминокислот в молекулах белков и, таким образом, предотвращать адсорбцию аналитов на стенках кварцевого капилляра. В [7] показана возможность применения катионных и анионных поли(амидоаминов) (PAMAM, *starburst*) в качестве псевдостационарных фаз при электрофоретическом разделении белков. В [8] изучены процессы комплексообразования дендритных полимеров этого типа с белками. Установлен факт увеличения селективности разделения и снижения пределов обнаружения аналитов. В [9] подобная тенденция обнаружена и при использовании углерод-кремниевых дендримеров в условиях электрокинетической хроматографии.

Благодаря уникальным свойствам дендритные полимеры являются хорошими агентами для формирования покрытий кварцевого капилляра. Так, в [10] получено полимерное покрытие на основе сверхразветвленного полиэтиленimina, обеспечившее стабильный электроосмотический поток (ЭОП). Возможности применения таких капилляров проиллюстрированы на примере разделения фенольных соединений, основных лекарственных препаратов, водорастворимых витаминов. Имеются публикации применения сверхразветвленных полимеров в качестве покрытий в КЭ и при анализе биополимеров [11, 12]. Использование модифицированных капилляров позволило уменьшить ЭОП в кислой среде и адсорбцию белков на стенках кварцевого капилляра, способствуя улучшению разделения аналитов и увеличению эффективности (до 10^5 т.т.).

В данной работе исследованы возможности водорастворимых олигосахаридных производных сверхразветвленного полиэтиленimina [13] в

качестве стационарных фаз в капиллярной электрохроматографии при разделении и *on-line* концентрировании белков.

Эксперимент

Реагенты. Для приготовления буферных растворов использовались: бидистиллированная вода, гидроксид натрия (ч.д.а. «Химреактив»), соляная кислота (х.ч.) («Реахим»); диметилсульфоксид (ч.д.а.) («Sigma»); дигидрофосфат натрия (х.ч.) («Реахим»); фосфорная кислота (х.ч.) («Реахим»); борная кислота (х.ч.) («Реахим»); лизоцим (куриный) (х.ч.) «Sigma-Aldrich»; миоглобин (конских скелетных мышц) (95-100%) «Sigma-Aldrich»; инсулин (свиной) «Sigma-Aldrich»; альбумин (человека) (96-99%) «Sigma-Aldrich». Водорастворимые сверхразветвленные полиэтиленимины с массой ядра 25 кДа модифицированные мальтозой PEI-Mal-A (77% модификации) и PEI-Mal-C (32% модификации).

Аппаратура. Электрофоретическое определение проводили с использованием системы высокоэффективного капиллярного электрофореза «Нанофор 01» (ИАНП РАН, Госреестр № 22828-02) со спектрофотометрическим детектором (рабочая длина волны 214 нм), рН-термомилливольтметр MFpH-03 (ООО «НП ЦЭЗ») с комбинированным рН - электродом «Вольта-рН-3014» (ООО «Потенциал»), в кварцевых капиллярах с внешним полиимидным покрытием. Общая длина капилляра – 45,5 см, эффективная длина капилляра – 38 см; внешний диаметр – 360 мкм, внутренний диаметр – 50 мкм. Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения «Мультихром для Windows, версия 1.5» (ООО «Амперсенд», г. Москва).

Условия электрофоретического анализа. Рабочее напряжение 20 кВ. Спектрофотометрическое детектирование осуществляли при $\lambda=214$ нм. Ввод пробы – гидродинамический (30 мбар) или электрокинетический. Воздушное термостатирование капилляра проводилось при +20°C. В качестве маркера ЭОП использовался 3%-ый раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в соответствующем рабочем электролите. Перед началом работы и между опытами капилляр промывали дистиллированной водой 5 мин и рабочим электролитом в течение 5 мин. По окончании работы проводилась промывка капилляра дистиллированной водой в течение 5 мин.

Синтез PLOT-PEI-Mal капиллярной колонки. *Подготовка кварцевого капилляра к работе.* Кварцевый капилляр промывали и заполняли 1М раствором NaOH. Заполненный капилляр герметизировали и нагревали в термостате при 100°C в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры капилляр промывали 0,1 М раствором HCl в течение 5 мин, деионизированной водой 10 мин и ацетоном 15 мин, сушили в термостате при 120°C в токе азота (2 атм) в течение 1 ч.

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

Функционализация силанизированного капилляра. Силанизированный капилляр заполняли дегазированным в ультразвуковой бане (10 мин) раствором PEI-Mal (0.015 г/мл в воде), герметизировали концы и оставляли на 48 ч при комнатной температуре, затем промывали водой.

Пробоподготовка сыворотки крови и мочи к анализу альбумина. Пробу сыворотки крови фильтровали через стекловолоконный и мембранный (инертный к белкам) микрофильтр с размерами пор 1-2 мкм и 0.2 мкм, соответственно.

Обессоливание и депигментацию предварительно отфильтрованного образца мочи проводили с помощью самопроточной мини-колонки с гелем, типа Sephadex G50, который имеет предел исключения по белкам $M=10000$. В мини-колонку (с объемом слоя геля 7 мл) вносят 2,5 мл мочи, промывают водой, первые 2,5 мл элюата отбрасывают, а следующие 3,5 мл собирают. Собранный образец дегазируют под ультразвуком и проводят электрофоретический анализ на приборе КЭ.

Обсуждение результатов

Одним из направлений электрофоретического определения биологически активных соединений является метод капиллярной электрохроматографии (КЭХ), позволяющий с высокой разрешающей способностью разделять близкие по структуре компоненты в сложных матрицах и сочетающий особенности капиллярного электрофореза (высокая эффективность; электрокинетическое движение жидкости) и ВЭЖХ (наличие неподвижной фазы).

Полые капиллярные колонки (*open tubular column, ОТ колонки*) имеют ряд преимуществ по сравнению с насадочными: легкость приготовления (не требуется фриттов), высокая проницаемость, отсутствие пузырьков, более высокая совместимость с капиллярами малого размера, возможность миниатюризации в чип-формате. При этом они характеризуются малой площадью поверхности покрытия, невысокой емкостью и фазовым соотношением в отличие от капиллярных колонок с тонким пористым слоем.

Нами синтезированы капиллярные *PLOT*-колонки на основе сверхразветвленных полиэтилениминов, модифицированных мальтозой (PEI-Mal). Получение покрытия мальтозирванным сверхразветвленным полиэтиленимином проходило в три этапа: травление кварцевого капилляра, силанизация, функционализация силанизированного капилляра. Реакция силанизации необходима для увеличения смачиваемости поверхности капилляра раствором мономера с последующей иммобилизацией к ней полимера. Это позволяет избежать свободного пространства между стенками капилляра и покрытием, что может быть причиной низкой эффективности. Силанизированный капилляр заполняли дегазированным раствором сверхразветвленного полиэтиленимина, функционализированного мальтозой и оставляли на 48 ч. (рис. 1).

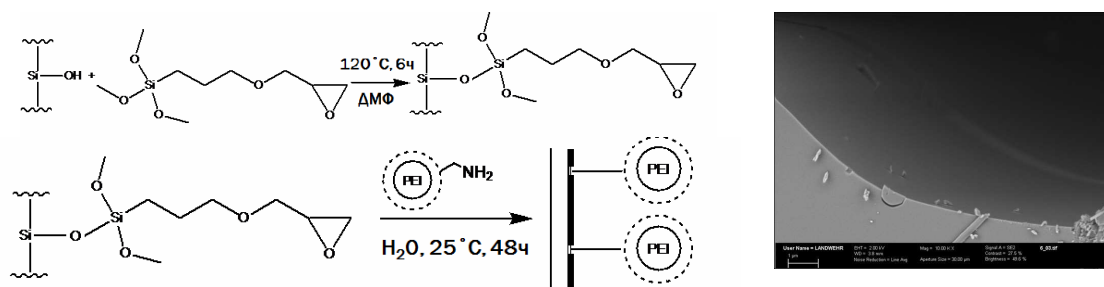


Рис. 1. Схема получения *PLOT*-колонок с PEI-Mal покрытием и фотография среза синтезированных колонок, полученная на электронном микроскопе

Проверку степени функционализации и стабильности покрытия проводили по воспроизводимости электроосмотического потока (ЭОП) в фосфатном буфере при pH 2,5. Синтезированные PLOT-колонки формируют стабильный анодный ЭОП, воспроизводимость (RSD %, n=5) составляет не меньше 1,8.

В качестве модельной системы выбраны белки – альбумин, инсулин, миоглобин, лизоцим, являющиеся диагностическими маркерами различных заболеваний.

Найденные условия разделения смеси белков в условиях КЭХ следующие: 0,1М фосфатный буфер (pH 2.2), напряжение -20кВ, детектирование при 214 нм (рис. 2).

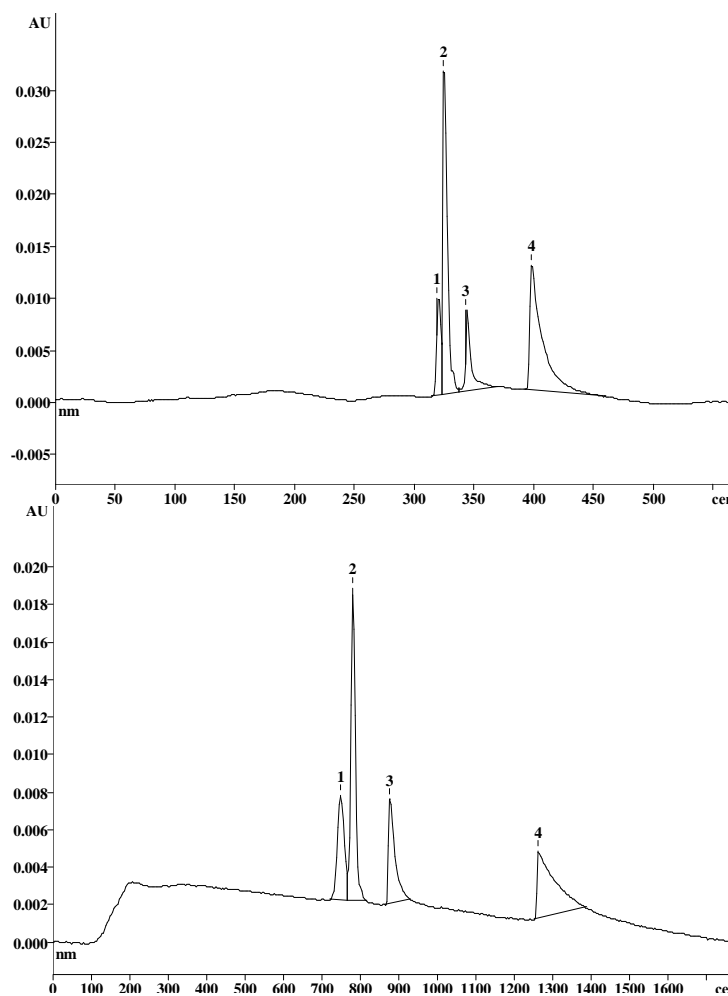


Рис. 2. Электрофореграмма смеси белков (1 мг/мл) на немодифицированном капилляре (А) и на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25 (Б).

Условия анализа: -20кВ, -82-95 мкА. Рабочий буфер: 0,1 М фосфатный буфер (pH 2,2). Ввод пробы: 2 с×30 мбар. УФ: 214 нм. Пики: 1 – альбумин, 2- миоглобин, 3 – лизоцим, 4 – инсулин.

Однако, полученные значения пределов обнаружения (1 мг/мл) оказались весьма высокими, что не позволяет проводить количественное определение белков в биологических жидкостях. Для снижения пределов обнаружения изучены возможности различных вариантов *on-line* концентрирования (*стэкинг с большим объемом вводимой пробы (large volume sample stacking, LVSS), стэкинг с водной пробкой и большим вводом пробы, электростэкинг (field amplified sample injection, FASI), сочетание электростэкинга и стэкинга с большим объемом вводимой пробы*

(FASI-LVSS)) с использованием дендритных PLOT-колонок. Полученные факторы концентрирования представлены в табл. 1.

В кислой среде в дендритных PLOT-колонках генерируется отрицательный ЭОП, а белки, заряженные положительно, мигрируют в противоположном направлении (схема 1)

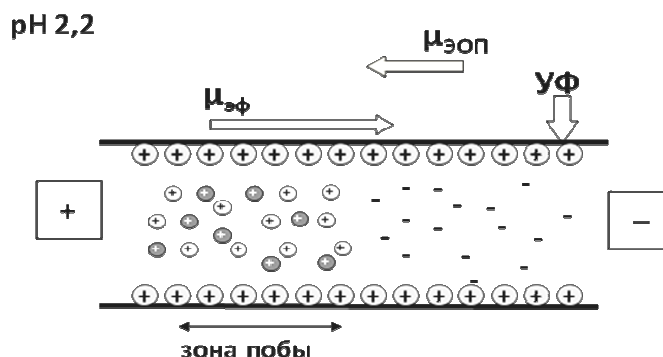


Схема 1. Схема процесс электрофоретического разделения белков в кислой среде. $\mu_{\text{ЭОП}}$ – подвижность ЭОП, $\mu_{\text{эф}}$ – электрофоретическая подвижность аналита

Таким образом, выполняются условия для стэкинга с большим объемом вводимой пробы без переключения полярности [14]. Гидродинамически вводится большой объем пробы растворенной в воде. Белки, заряженные положительно, электрофоретически мигрируют к катоду, т.е. в противоположном направлении по отношению к ЭОП, который «выталкивает» матрицу из капилляра, способствуя концентрированию аналитов и значительному росту эффективности (рис. 3)

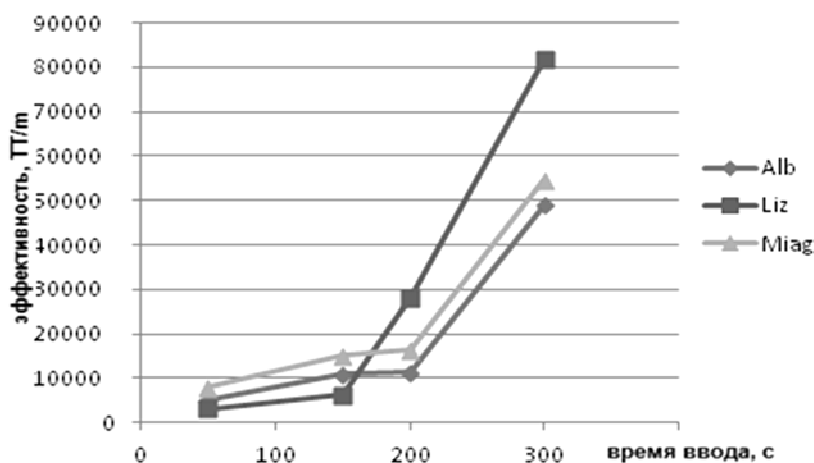


Рис. 3. Зависимость эффективности от времени ввода белков при LVSS. Смесь стандартов белки (25 мкг/мл)

Нами оптимизированы условия стэкинга; удалось сконцентрировать определяемые аналиты в 50-80 раз (табл. 1). Эффективность концентрирования оценивают на основании т.н. факторов концентрирования (SEFs):

$$\text{SEFs} = \frac{S_2}{S_1} \cdot \Delta$$

где S_1 – площадь пика, полученного при обычных условиях ввода пробы (2 с), S_2 – площадь пика, полученного при концентрировании, Δ – доля разбавления.

Пределы обнаружения белков – 2,5 мкг/мл (сигнал/шум = 3).

Для увеличения эффективности концентрирования испытан вариант *стэкинга* с большим объемом вводимой пробы с «водяной пробкой». В данном случае в качестве альтернативы раствору пробы с высоким сопротивлением непосредственно перед вводом пробы в капилляр вводилась «водяная пробка». В результате на входном конце капилляра создавалась зона высокого поля, что позволило сконцентрировать аналиты в большей степени.

Для выбора оптимальных условий варьировали время ввода «водяной пробки» (10-30 с); время ввода анализируемой пробы (от 10 до 300 с). Лучшие результаты достигнуты при следующих условиях: 30 с «водная пробка», 300 с гидродинамический ввод пробы.

Получено незначительное увеличение факторов концентрирования ($SEF_s = 60-80$). Предел детектирования белков (соотношение сигнал/шум=3) составил 1–2 мкг/мл (табл.1).

Таблица 1. Результаты *on-line* концентрирования белков с использованием PLOT колонок с сверхразветвленными полимерами в КЭХ

Вариант концентрирования	Определяемые компоненты			
	Альбумин	Лизоцим	Миоглобин	Инсулин
Стэкинг с большими объемом вводимой пробы (LVSS)	SEF_s			
	79 ± 1	50 ± 2	56 ± 2	68 ± 1
	Условия: матрица пробы – вода, Гидродинамический ввод пробы (30 мбар, 300 с)			
	$ПО, мкг/мл$			
	2.0	1.0	2.0	2.5
Стэкинг с большим объемом вводимой пробы с «водной пробкой»	SEF_s			
	81 ± 1	62 ± 2	60 ± 2	82 ± 1
	Условия: матрица пробы – вода, Гидродинамический ввод воды (10 кВ, 25с), Гидродинамический ввод пробы (30 мбар, 300 с)			
	$ПО, мкг/мл$			
	1.0	1.0	1.5	1.0
Электростэкинг с LVSS	SEF_s			
	1320 ± 1	970 ± 1	1040 ± 1	340 ± 2
	Условия: матрица пробы – вода, Электрокинетический ввод пробы (15 кВ, 90 с)			
	$ПО, мкг/мл$			
	0.2	0.1	0.2	0.5

Выявлены возможности *электростэкинга*, т. е. концентрирования в процессе электрокинетического ввода пробы. В этом случае аналиты концентрируются на границе между низкопроводящей зоной и буферным электролитом: катионы концентрируются без переключения полярности; для стэкинга анионов используют отрицательную полярность (т.е. ввод пробы с катодного конца капилляра).

С использованием электростэкинга возможно эффективно сконцентрировать только катионные либо анионные аналиты, и при этом в большей степени – ионы с высокой электрофоретической подвижностью. Достижимые степени концентрирования больше по сравнению с гидродинамическим вводом.

При поиске условий стэкинга варьировали время электрокинетического ввода пробы (1-100 с), напряжение (10-20 кВ), состав раствора пробы (разбавленный

буфер, вода). Свой выбор остановили на следующих условиях: время ввода пробы 90 с, напряжение 15 кВ.

Сочетание двух вариантов концентрирования *стэкинга* с большим объемом вводимой пробы с *электростэкингом*, позволило сконцентрировать аналиты в 1000 раз и снизить пределы обнаружения (ПО) до 500-100 нг/мл (рис. 4, табл. 1).

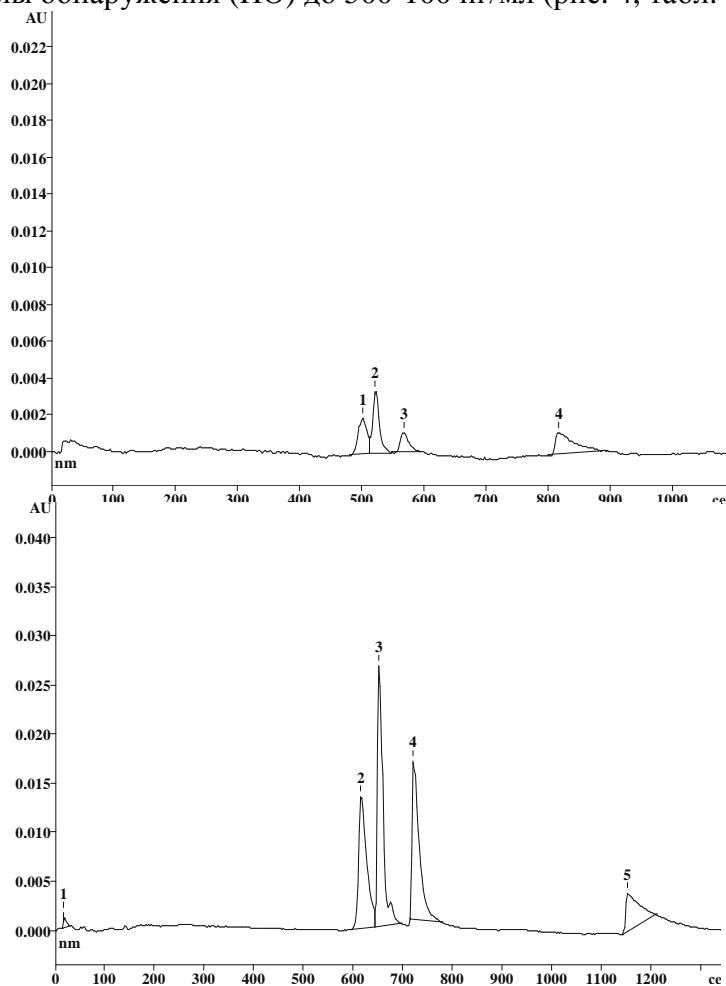


Рис. 4. Электрофореграммы (а) смеси белков (1 мг/мл) без стэкинга и (б) смеси белков (10 мкг/мл) с использованием электростэкинга–LVSS.
Ввод пробы: А) 2сек×30 бар; Б) 15 кВ 90 с

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

Получены сравнительные характеристики разделения белков в условиях КЭХ с использованием синтезированных *PLOT*-дендритных и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с введенными в состав рабочего буфера дендритными полимерами в концентрации 2 мг/мл (табл. 2).

Таким образом, лучшие результаты по селективности и воспроизводимости параметров миграции для альбумина, лизоцима и миоглобина отмечены в условиях КЭХ с использованием *PLOT*-колонок, модифицированных сверхразветвленными полимерами.

Однако в случае инсулина наблюдается увеличение параметров миграции и снижение эффективности, что может быть вызвано образованием комплексов включения с PEI-Mal из-за меньших размеров молекулы белка.

Таблица. 2. Сравнительные характеристики методов КЗЭ и КЭХ для определения белков

Метод	КЗЭ	КЭХ
	2 мг/мл PEI-Mal C25	PLOT-PEI-Mal колонки
Рабочий электролит	0.1М фосфатный буфер (pH 2.2)	
Условия КЭ	-20кВ, ток -84-97мкА УФ: $\lambda=214$ нм	
Разрешение	1.5 ÷ 2.0	1.3 ÷ 2.4
Время анализа	6 мин	20 мин
ПО, мг/мл	1–0.5 (без конц.)	0.0005–0.0001 (с конц.)
Воспроизводимость параметров миграции (RSD, %)	2.8	0.5

В оптимизированных условиях с использованием PLOT-колонок с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal проведен анализ реальных объектов (сыворотка крови и моча) (рис. 5).

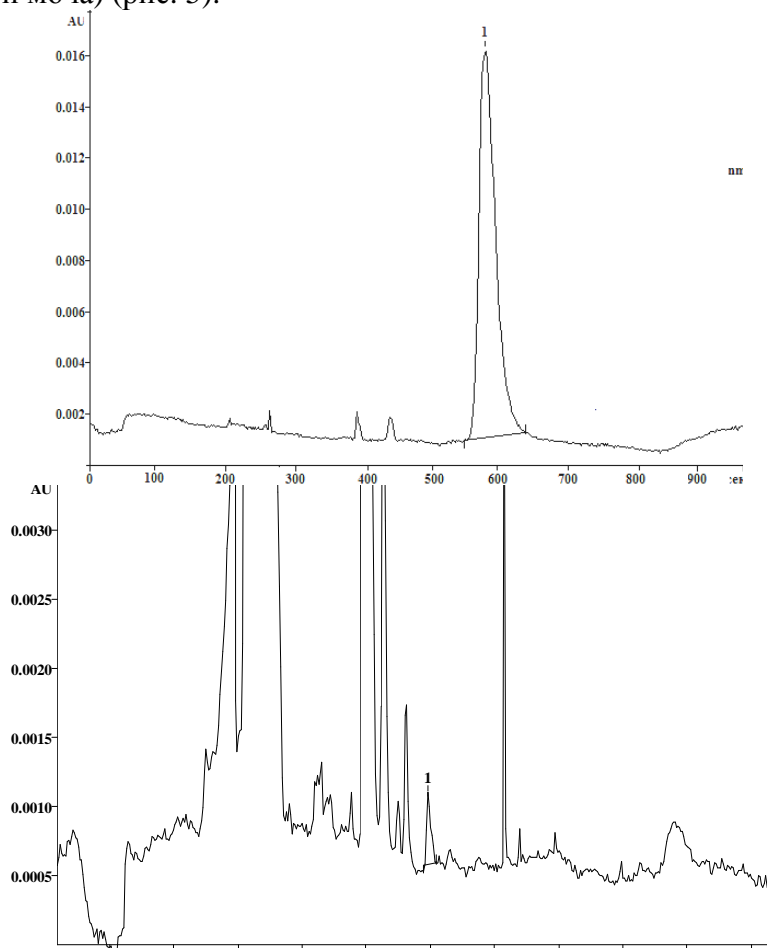


Рис. 5. Электрофореграмма (А) сыворотки крови (разбавленной в 10раз) и мочи (больной с синдромом Иценко-Кушинга) на PLOT-колонке с покрытием сверхразветвленным полимером PEI-Mal A25. Ввод пробы: 90 с×15 кВ. УФ: 214 нм. Условия анализа: -20кВ. Рабочий буфер: 0,1 М фосфатный буфер (pH 2,2). Пики: 1 - альбумин.

Задача осложняется тем, что в моче присутствуют низкомолекулярные компоненты самой разнообразной химической природы, включая пигменты, которые могут находиться в достаточно больших концентрациях. Эти вещества поглощают

при тех же длинах волн, что и белки (200-214 нм) и влияет на селективность разделения и воспроизводимость анализа. Поэтому перед электрофоретическим разделением белков необходима была предварительная очистка биологического объекта (мочи). Обессоливание и депигментация мочи проводилась на самопроточной миниколонке с гелем типа Sefadex G25 (с пределом исключения по белкам $M=10000$).

Заключение

Показано, что использование PLOT-колонок на основе водорастворимых олигосахаридных производных сверхразветвленного полиэтиленimina с применением стэкинга с большим объемом вводимой пробы в сочетании с электростэкингом позволяет снизить пределы обнаружения белков по сравнению с традиционным капиллярным зонным электрофорезом в 1000 раз, что обеспечивает возможность их определения в реальных биологических объектах.

Список литературы

1. Seiler M. Hyperbranched polymers: phase behavior and new applications in the field of chemical engineering // *Fluid Phase Equilibria*. 2006. V. 241. P. 155-174.
2. Kolhe P., Misra E., Kannan R.M. et al. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers // *International J. of Pharmaceutics*. 2003. V. 259. P. 143-160.
3. Klajnert B., Appelhans D. et al. The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly(propylene imine) dendrimers: new effects dependent on hydrogen bonding // *Chem. Eur. J.* 2008. V. 14. P. 7036-7041.
4. Azagarsamy M. A., Yesilyurt V., Thayumanavan S. Disassembly of dendritic micellar containers due to protein binding // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. P. 4550-4551.
5. Pedziwiatr E., Shcharbin D., Chonco L. et al. Binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers // *J. Fluoresc.* 2009. V. 19. P. 267-275.
6. Shcharbin D., Janicka M., Wasiake M. et al. Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1774. P. 946-951.
7. Stathakis C., Arriaga E.A., Dovichi N.J. Cationic and anionic polymeric additives for wall deactivation and selectivity control in the capillary electrophoretic separation of proteins in food samples // *J. Chromatogr. A*. 1998. V. 817. P. 227-232.
8. Liu Q., Tian J., Zhang C., Yang H. et al. Cationic poly(amidoamine) dendrimers as additives for capillary electroseparation and detection of proteins // *Electrophoresis*. 2011. V. 32. P. 1302-1308.
9. Montealegre C., Rasines B., Gomez R. et al. Characterization of carboxylate-terminated carbosilane dendrimers and their evaluation as nanoadditives in capillary electrophoresis for vegetable protein profiling // *J. Chromatogr. A*. 2012. V. 1234. P. 16-21.
10. Boonyakong C., Tucker S.A. Capillary electrophoresis using core-based hyperbranched polyethyleneimine (CHPEI) static-coated capillaries // *J. Sep. Sci.* 2009. V. 32. P. 3489-3496.
11. Shou C., Zhang Z. Preparation and characterization of hyperbranched polyester capillary columns used for the separation of basic proteins // *J. of Applied Polymer Science*. 2009. V. 111. P. 2141-2147.

12. Shou C., Song N., Zhang Z. Synthesis of hyperbranched poly(3-methyl-3-hydroxymethyloxetane) and their application to separate basic proteins by adsorption coated column // J. of Applied Polymer Science. 2010. V. 116. P. 2473-2479.

13. Appelhans D., Komber H., Abdul Quadir M. et al. Hyperbranched PEI with various oligosaccharide architectures: Synthesis, characterization, ATP complexation and cellular uptake // J. Biomacromolecules 2009. V. 10. P. 1114-1124.

14. Burgi D.S., Chien R.L. Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis // Analytical Biochemistry. 1992. V. 202. P. 306-309.

15. Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А., Карцова Л.А. и др. Исследование возможностей новых сверхразветвленных полимеров в качестве псевдостационарных фаз в электрокинетической хроматографии при определении белков // Ж. Вестник СПбГУ. Сер. 4. 2011. Вып. 1. С. 100-106.

Бессонова Елена Андреевна – доцент кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел. (812) 428-40-44

Королева Влада Юрьевна – магистрант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Карцова Людмила Алексеевна – д.х.н., профессор кафедры органической химии, Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Потолицына Вера Евгеньевна – аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Bessonova Elena A. – the docent of organic chemistry department of Chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: bessonova.Elena.a@gmail.com

Koroleva Vlada U. – the student of analytic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg

Kartsova Lyudmila A. – Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of Chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg

Potolitsyna Vera E. – the post-graduate student of analytic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg