

УДК 543.544: 577.112

© Б. Г. Беленький

ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МИКРОБИОСЕПАРАЦИИ (по материалам обзора ж. "Electrophoresis", 2004 г.)

Настоящая статья является авторизованным переводом с англ. яз. обзора [1] Yan Li с соавторами "Капиллярная электрохроматография пептидов и белков" (Electrophoresis, 2004). В статье дается обзор последних достижений в биоанализе с использованием капиллярной электрохроматографии (КЭХ) в разделении белков и пептидов. Кратко рассмотрены основные принципы КЭХ. Большое внимание уделяется разработке новых стационарных фаз и новых конструкций колонок, указываются их достоинства и недостатки. Рассмотрены появившиеся в последнее время новые технологии изготовления колонок для КЭХ, прежде всего монолитных, которые должны обеспечить высокую скорость и эффективность разделения. Представлены различные аналитические платформы КЭХ: КЭХ с использованием давления, высокоэффективная микрожидкостная хроматография (микро-ВЭЖХ) с использованием электрического напряжения, на микрочипах и многомерная электрохроматография. Рассматриваются различные методы детектирования, в первую очередь масс-спектрометрия (гибридные приборы с встроенным микрофлюидным чипом).

Сокращения:

AMPS — poly(2-acrylamid-2-methyl-1-propane-sulfonic acid) — поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропан-сульфоукислота);

COMOSS — C18-modified collocate monolith support structure — модифицированная с помощью C18 коллокационная структура носителя монолита;

EGDMY — ethyleneglycol dimethacrylate — этиленгликоль диметакрилат;

ODS — octadecyl silica — октадециловый кремнезем;

OT — open tubular — полый;

P-CEC — pressure assisted CEC — КЭХ с использованием давления;

PDMS — polydimethyl siloxane — полидиметилсилоксан;

PLOT — porous layer open tubular — полый с пористым слоем;

SAX — strong anion exchanger — сильный анионообменник;

SCX — strong cation exchanger — сильный катионообменник;

SEM — scanning electron micrograph — электронная микрофотография, полученная на растровом электронном микроскопе;

TIC — total ion electrochromatogram — электрохроматограмма для полного ионного тока;

VBC — vinylbenzyl chloride — винилбензилхлорид;

V-CEC — voltage-assisted CEC — КЭХ с использованием напряжения;

WAX — weak anion exchanger — слабый анионообменник;

WCX — weak cation exchanger — слабый катионообменник.

ВВЕДЕНИЕ

Высокие технологии в современной микробиосепарации представлены капиллярной электрохроматографией (КЭХ) пептидов и белков, монолитными стационарными фазами для хроматографии, в частности последним достижением в этой области — монолитными КЭХ-колонок, созданием новых аналитических платформ для разделения пептидов и белков методом КЭХ: на микрочиповых платформах, многомерной КЭХ, новыми методами детектирования в КЭХ, прежде всего с использованием времяпролетного масс-спектрометра (МС) с устройством электроспрей-ионизации (ЭСИ). Развитием в КЭХ пептидов и белков сегодня является создание гибридного жидкостного хромато-масс-спектрометра для протеомики на основе гибридной конструкции: высокоинформативного МС-МС с установленным микрофлюидным чипом, интегрирующим устройство ввода пробы, колонки для монолитной КЭХ с устройством ЭСИ.

Капиллярная электрохроматография появилась в последние годы как микроколоночный электрокинетический метод разделения, сочетающий в себе две хорошо известные аналитические технологии — микровысокоэффективную жидкостную хроматографию (μ -ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ).

Программа исследования генома человека близка к завершению. Однако она представляет

собой лишь первый шаг в изучении клеточных функций и функций более высоких порядков. Для достижения их полного понимания необходим системный анализ белков. Исследование полного комплемента клеточных белков — протеомика, зависит от разработки усовершенствованных методов биосепарации и других аналитических методов. Поскольку КЭХ сочетает в себе высокую эффективность, ультрачувствительность, минимальный расход реагентов и пробы и хорошую совместимость с высокоинформативной суперчувствительной масс-спектрометрией, она хорошо подходит для применения в протеомике.

Течение жидкости через колонку в КЭХ происходит под действием электрического поля. В появившихся к настоящему времени нескольких обзорах по КЭХ внимание концентрировалось на теории и механизмах КЭХ [2–4], аппаратуре [5] и ряде впечатляющих применений [6–8]. Однако в немногих работах рассматривалась КЭХ для анализа пептидов и белков. Колонки для КЭХ классифицируются в обзоре по режимам разделения и механизмам генерации электроосмотического потока (ЭОП), а не по материалам насадки. В обзоре представлены основные принципы КЭХ и развития КЭХ на базе высоких технологий, даются примеры применения современной КЭХ в анализе пептидов и белков.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КЭХ

Транспортные функции в КЭХ осуществляются за счет т. н. электроосмотического потока (ЭОП). Его особенности определяются свойствами электролита: вязкостью и диэлектрической постоянной, дзета-потенциалом ζ на поверхности внутренних стенок капилляра или насадки. Линейная скорость ЭОП u описывается уравнением Смолуховского:

$$u = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta E}{\eta}, \quad (1)$$

где ε_0 , ε_r — диэлектрическая проницаемость в вакууме, относительная проницаемость среды; η — ее вязкость и E — напряженность электрического поля. Это выражение относится к движению жидкости вблизи плоской поверхности с равномерно распределенным зарядом при приложении электрического поля, параллельного этой поверхности.

Для пористых сред, обычно используемых в КЭХ, возможны и другие модели ЭОП. Выражение для средней линейной скорости ЭОП u_r в насадочных колонках записывается следующим образом [9]:

$$u_r = u_p \left[1 + \left(\frac{d_p}{r} \right) \left(\frac{2}{\beta} \right) \left(\frac{\zeta_w}{\zeta_p} - 1 \right) \right] \quad (2)$$

где u_r — средняя скорость; u_p — скорость электроосмотического потока, генерируемого на поверхности насадки колонки, определяемая выражением (3); d_p — диаметр частиц насадки; r — радиус капиллярной колонки; ζ_w — дзета-потенциал на стенке капилляра; ζ_p — дзета-потенциал материала насадки; β — безразмерный параметр, определяемый выражением (4).

$$u_p = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta_p E}{\eta} \left(\frac{\sigma^*}{\sigma_b} \right), \quad (3)$$

где $\frac{\sigma^*}{\sigma_b}$ — отношение электропроводностей насадочной (σ^*) и пористой (σ_b) колонок.

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

где ε_c — общая пористость колонки; α — безразмерный параметр, зависящий от структуры насадки и формы частиц.

Электроосмотическая движущая сила дает плоский профиль потока с пониженным размыванием зон по сравнению с ВЭЖХ, в которой пуазейлевский поток имеет параболический профиль. Считается, что плоский профиль (так называемая "пробка") частично объясняет более высокую эффективность КЭХ по сравнению с μ -ВЭЖХ. Недавно получены оценки для размывания зон в КЭХ и μ -ВЭЖХ [10] по упрощенному уравнению Ван-Димтера:

$$H = A + \frac{B}{U} + Cu. \quad (5)$$

Член A в выражении (5) характеризует "вихревую диффузию" (размывание за счет профиля скорости). Найдено, что из-за плоского профиля ЭОП в КЭХ член C , описывающий дисперсию зон, связанную с сопротивлением межфазному массопереносу, меньше, чем в μ -ВЭЖХ. Уменьшение членов A и C в уравнении Ван-Димтера приводит к уменьшению высоты теоретической тарелки, т. е. в некоторой степени увеличению эффективности колонок в КЭХ. Кроме того, из-за отсутствия перепада давления в КЭХ-колонке ее длину можно увеличить, а размер частиц уменьшить до субмикронного уровня.

Обычно считается, что разделение пептидов и белков в КЭХ осуществляется в результате наложения хроматографического удерживания и электрофоретической миграции. В действительности

чаще всего разделение связано только с одним из указанных факторов. Описанные процессы могут проходить и последовательно, поэтому может осуществляться двухмерное разделение в одной колонке.

Недавно в работе [4] на основании модели случайных блужданий моделирован механизм разделения заряженных пептидов и белков в КЭХ. Предполагается, что в достаточно сильных электрических полях ионизированные компоненты пробы могут мигрировать не только в объемном растворе, но в адсорбированном состоянии на ионизированной поверхности стационарной фазы. Для описания этого явления были введены три безразмерных параметра, связанных следующей зависимостью:

$$\beta_{cec} = \frac{\beta_{lc}}{1 + \alpha(\gamma\beta_{lc} + (1 - \gamma))}, \quad (6)$$

где β_{cec} — коэффициент удерживания в КЭХ (определяется выражением (7)); α — приведенная подвижность компонента пробы (скорость электрофоретической миграции, отнесенная к электроосмотической подвижности, U_{em}/U_p); β_{lc} — коэффициент удерживания в изократической μ -ВЭЖХ, который определяется выражением (8); γ — отношение скорости поверхностной электродиффузии U_{ec} к скорости электрофоретической миграции U_{em} .

Коэффициенты удерживания определяются:

$$\beta_{cec} = t_{cec}/t_0 = 1 + k_{cec}, \quad (7)$$

$$\beta_{lc} = t_{lc}/t_0 = 1 + k_{lc}. \quad (8)$$

Миграционное поведение заряженных компонентов пробы, например пептидов и белков, описывается с помощью вышеприведенных выражений в трех разных режимах разделения:

- "в одном направлении", когда электрофоретическая миграция компонентов пробы происходит в направлении ЭОП;
- "встречных направлениях", когда электрофоретическая миграция пробы проходит в направлении, противоположном направлению ЭОП;
- комбинированном одно- встречнонаправленном режиме, когда проба включает компоненты, мигрирующие как в направлении ЭОП, так и противоположном направлении.

Согласно этой модели, в колонке КЭХ создается [4] внутренний градиент, который способствует фокусировке пиков и повышению эффективности этого метода.

Таким образом, сочетание электрофоретической миграции в подвижной фазе с поверхностной электродиффузией в стационарной фазе делает

КЭХ уникальным высокоселективным инструментом разделения пептидов и белков.

КОЛОНОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЭХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Если классифицировать КЭХ стационарной фазы, все равно в круглых или прямоугольных капиллярах (микрофлюидных чип-анализаторах), то можно выделить два типа колонок: полые (ОТ-СЕС) [11] и насадочные (РС-СУС) [12].

Обзор прежде всего касается цилиндрических колонок для КЭХ, которыми комплектуются приборы высокоэффективного капиллярного электрофореза (превращая их в капиллярные электрохроматографы). Это происходит прежде всего потому, что цилиндрические колонки изучены гораздо лучше (о них известно гораздо больше), чем новые прямоугольные колонки для микрофлюидных чип-анализаторов. С другой стороны, особенности цилиндрических колонок позволяют лучше понять технологические и аналитические возможности прямоугольных колонок микрофлюидных чипов.

Для разделения пептидов и белков рекомендуется использовать полые колонки с пористым слоем (PLOT). Насадочные колонки (НК) набиваются либо гранулированным (сферическим) сорбентом, заключенным между двумя фриттами (НК с гранулированным наполнителем), либо сплошным (монолитным) материалом, и тогда использование фритты уже не требуется (монолитная колонка).

Стационарная фаза в КЭХ выполняет две функции: во-первых, содержит центры удерживания компонентов пробы, а во-вторых, обеспечивает размещение фиксированных зарядов для генерации ЭОП. Хотя разрабатывались новые стационарные фазы для КЭХ-биоанализа [7], их использование для разделения пептидов и белков было ограниченным. Основные препятствия для применения КЭХ в протеомике заключались в необратимой адсорбции пептидов и белков на стенках капилляров из кварцевого стекла без покрытия и/или на поверхности материала насадки колонок и в электростатическом взаимодействии заряженных функциональных групп пептидов и белков с необходимыми для создания ЭОП заряженными материалами насадки. Эти особенности колонок приводят к появлению хвостов у пиков, снижающих эффективность колонок и воспроизводимость времени удерживания.

Полые колонки с пористым слоем

В полую колонку с пористым слоем (PLOT) для КЭХ тонкий пористый слой стационарной фазы связывается (ковалентными связями, либо нековалентными взаимодействиями) с внутренней стен-

кой капилляра из кварцевого стекла. Поэтому для КЭХ получили признание PLOT-колонок [11], у которых на внутренней стенке кварцевого капилляра содержится большое количество силанольных групп, которые депротонируются в широком диапазоне pH фонового электролита. Последнее может привести к необратимой адсорбции пептидов и белков на стенках капилляров. Для исключения этого явления ведутся работы, направленные на снижение силанольных эффектов и тем самым на улучшение характеристик колонок для КЭХ пептидов и белков [13–16]. Для этого на внутренних стенках капилляров ковалентно связываются или адсорбируются полимерные модификаторы с пространственно большими группами, такие как полиакриламид, полиэфир, поливиниловый спирт и т. п., чтобы воспрепятствовать контакту между отрицательно заряженными силанолами и положительно заряженными пептидами.

Недавно появился новый вид PLOT-колонок [14] для КЭХ пептидов и белков с увеличенной площадью хроматографической поверхности благодаря формированию на внутренних стенках кварцевого капилляра толстого шероховатого полимерного слоя путем полимеризации *in situ* дивинилбензола и винилбензилхлорида в 2-октанольном растворителе. Поверхностные хлорометильные группы этого полимера обрабатываются алкиламинами для получения длинных алкильных цепочек в качестве центров гидрофобного удерживания и образования четвертичных аммониевых групп для создания стабильного ЭОП. Механизм разделения у этого вида PLOT-колонок основан на сочетании хроматографического и электрофоретического процессов.

На рис. 1 приведена полученная на растровом электронном микроскопе микрофотография цилиндрической полый колонки с пористым слоем. На подобных колонках с полиаспарагиновой кислотой (РАА) [15] ряд белков разделялись в изократическом режиме с эффективностью в 10–100 раз выше, чем в ВЭЖХ, и разрешением, сравнимым с разрешением градиентной ВЭЖХ. Для уменьшения влияния силанолов на стенках капилляров на разделение белков в качестве привитых полимерных пористых слоев использовалось множество синтетических полимерных покрытий, например полисахарид-декстран [16], полиакриламид [17], гидроксильированный полиэфир [18], поливинилметилсилоксандиолполиакриламид [19], полиакрилоиламиноэтокситанол [20], поливиниловый спирт [21], полиаргинин [22], ацетат целлюлозы [23] и полиэтилен-пропиленгликоль [24]. После подобной обработки в капилляре все-таки еще остаются свободные силанольные группы. Таким образом, улучшение стабильности покрытий и снижения влияния силанольных групп — вот пути дальнейшего развития технологии PLOT-

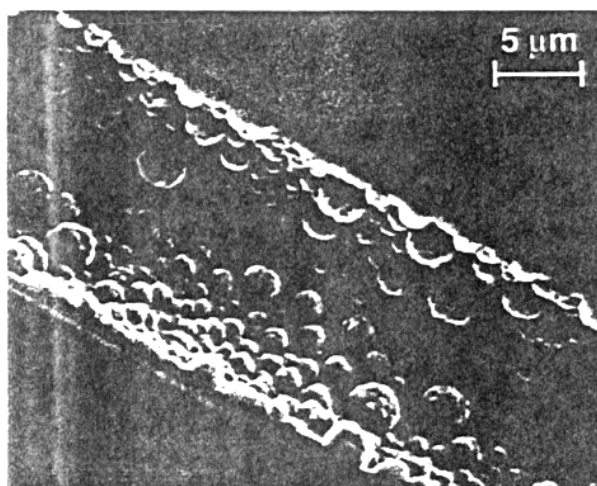


Рис. 1. Электронная микрофотография полый колонки с пористым слоем, полученная на растровом электронном микроскопе. Воспроизводится по работе [14]

колонок для КЭХ. Хотя структура подобных PLOT-колонок характеризуется высокой проницаемостью, их низкое фазовое отношение приводит в этом виде КЭХ к низкой емкости и, таким образом, к снижению чувствительности детектирования.

Насадочные колонки с гранулированной насадкой

Большинство использовавшихся до настоящего времени колонок для КЭХ заполняются в качестве стационарной фазы гранулированными материалами и называются набивными колонками с гранулированной насадкой. В этих колонках используется удерживающий слой сорбента фритта, которую обычно формируют путем сплавления материала насадки. Насадочные колонки обеспечивают лучшее удерживание и более высокую эффективность, чем PLOT-колонок, причем гранулированные материалы насадки, используемые во многих колонках КЭХ, — это те же материалы, что и обычно применяемые в ВЭЖХ-колонках, например, для обращенно-фазной (О-Ф) и ионообменной хроматографии. Хотя при разделении синтетических полимеров, например полистиролов [25], в КЭХ используется вытеснительная электрохроматография, для разделения пептидов и белков она еще не применялась. В КЭХ использовались также сегментированные насадочные колонки с гранулированной насадкой и стационарные фазы смешанного типа, например сильный катионообменник (SCX) в комбинации с обращенно-фазным сорбентом.

Обращенно-фазная электрохроматография

Чаще всего колонки КЭХ заполняются обращенно-фазными материалами. В большинстве работ по О-Ф КЭХ используются частицы кремнезема диаметром 3–5 мкм, модифицированные C18 и гораздо реже C8. Наиболее широко используемые промышленно выпускаемые сорбенты перечислены в табл. 1. Характеристики удерживания линейных и циклических пептидов в КЭХ на колонках с применением C8 и C18 гранулированных сорбентов исследовались в работах [26–28]. Величины удерживания и избирательность КЭХ значительно отличаются от соответствующих величин как при капиллярном зонном электрофорезе (КЗЭ), так и О-Ф ВЭЖХ. Можно считать, что подобная КЭХ представляет собой метод разделения, ортогональный обоим указанным методам.

Ионообменная электрохроматография

Хроматографическая поверхность в ионообменной КЭХ покрыта фиксированными зарядами, которые создают ЭОП и связывают противоположно заряженные компоненты. Основным недостатком ионообменных материалов на основе кремнезема состоит в зависимости ЭОП от pH подвижной фазы. Чтобы избежать этого в ионообменной КЭХ для увеличения поверхностного заряда используются сильные и слабые анионо- и катионообменники: SCX, SAX, WCX, WAX [29–31], которые широко применялись при разделении электрически заряженных пептидов и белков в ионообменных насадочных колонках с гранулированной насадкой. При этом кремнийсодержащая основа сначала покрывается слоем "мягких" гидрофильных полимеров, уже на которые прививаются ионогенные группы. Поэтому белковые вещества взаимодействуют с заряженными функциональ-

ными группами на гибких полимерных цепочках, отделяясь от "твердой" поверхности кварца слоем полимера, предотвращающего их необратимую адсорбцию. При использовании ионообменных материалов в качестве стационарной фазы в КЭХ удается управлять соотношением вкладов в КЭХ ионообменной хроматографии и капиллярного электрофореза. Избирательность КЭХ регулируется выбором стационарной фазы.

Описано использование SCX [29] для разделения небольших пептидов типа (Gly)_n, (Glu)_n и (Ala)_n на уровне базовой линии при эффективности КЭХ на уровне 460 000 тарелок/м, при этом высокая скорость ЭОП сохранялась в широком диапазоне pH. Подобная эффективность объясняется электрофоретическим концентрированием (стэкингом) и хроматографической фокусировкой во время инъекции и разделения пептидов с положительным зарядом, как это показано на рис. 2. Разделение десяти пептидов в этой колонке требовало менее 3.5 мин.

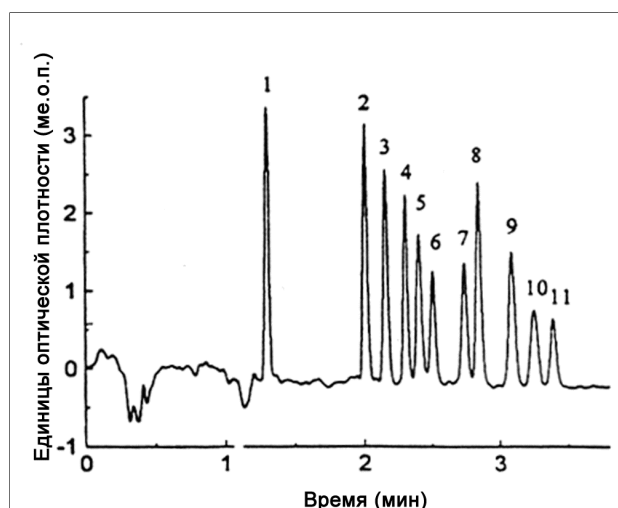


Рис. 2. Хроматограмма смеси, содержащей десять пептидов. Ионообменная колонка для капиллярной электрохроматографии с внутренним диаметром 75 мкм и внешним диаметром 375 мкм, заполненная Spherisorb(ом) — сильным катионообменником; длина заполненной части и общая длина 10 см и 31 см соответственно. Условия эксперимента: подвижная фаза — 60 % ацетонитрила в 30 мМ буфере KH_2PO_4 (pH 3.0); приложенное напряжение 25 кВ; электрокинетическая инъекция при напряжении 5 кВ в течение 10 с; УФ-детектирование на длине волны 200 нм. Пики: 1 — бензиловый спирт; 2 — Gly-Gly; 3 — Gly-Tyr; 4 — Ala-Ala-Ala; 5 — Gly-Gly-Gly; 6 — Ala-Ala-Ala-Ala; 7 — Gly-Gly-Gly-Gly; 8 — Gly-Gly-Asn-Ala; 9 — Gly-Gly-Gly-Gly-Gly; 10 — Glu-Glu-Glu-; 11 — Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly. Воспроизводится по работе [29]

Табл. 1. Наиболее широко используемые выпускаемые промышленностью обращенно-фазные материалы насадок для КЭХ

Материалы набивок	Размер частиц (мкм)
Hypersil C18	3, 5
Spherisorb C18	3
Nucleosil C18	3, 5
Zorbax C18	6, 7
Gromsil C18	3, 5, 7
Vydax C18	3, 5

Для разделения кислых белков разработан новый сильный гранулированный анионообменник на основе кремнезема [30]. Для этого стационарная фаза и внутренние стенки капилляра вначале силанизировались, а затем дериватизировались с использованием 3-(метакрилоилоламино)-пропил-триметил-аммоний хлорида для присоединения групп с сильными анионообменными свойствами

к гидрофильному слою на хроматографической поверхности (см. рис. 3). Для ионообменной КЭХ белков в изократическом режиме получено выражение, определяющее разрешение электрохроматографического процесса. Применение этой фазы в КЭХ на основе SAX расширено на разделение разновидностей гликоформ белков и триптических гидролизатов белков.

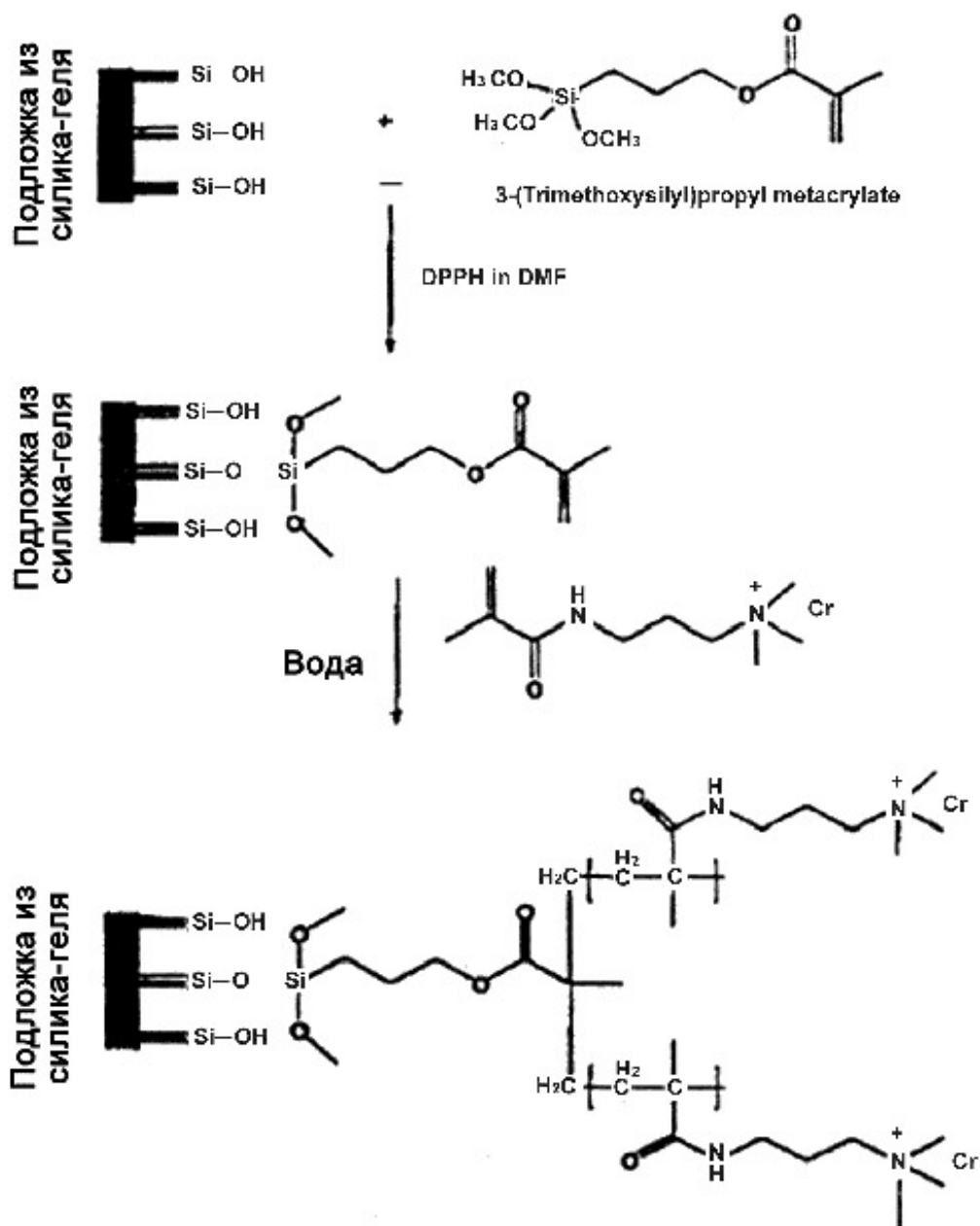


Рис. 3. Схема химических реакций для подготовки хроматографической колонки с гранулированной набивкой. Воспроизводится по работе [30]

Помимо ионообменных материалов на основе SCX и SAX использовались сорбенты на основе WCX и WAX, которые связывались с поверхностью кварца. Для уменьшения сильного электростатического взаимодействия основных пептидов и белков с анионными группами на поверхности кремнеземной стационарной фазы разработана на основе слабого катионообменника новая стационарная фаза для разделения основных пептидов и белков. Используя эту фазу экспериментально изучен механизм удерживания основных пептидов в КЭХ [31]. Эти ионообменные КЭХ-колонок обеспечивали постоянный сильный стабильный ЭОП в широком диапазоне pH.

При КЭХ выделяется создаваемое в результате повышенной ионной силы буфера джоулево тепло. Этот возмущающий эффект накладывается на электростатические взаимодействия. Последнее может препятствовать применению ионообменной КЭХ для разделения пептидов и белков.

Сегментированные колонки и стационарные фазы смешанного типа

Недавно предложен подход, позволяющий увеличить скорость ЭОП [32]. Для этого капилляры для КЭХ составлялись из двух частей (сегментов), которые заполнялись разными стационарными фазами для управления и регулировки ЭОП. Колонки такого типа называются сегментированными капиллярами [32] или сегментированными колонками, в которых один сегмент заполняется одним видом стационарной фазы для разделения, а другой, вспомогательный сегмент, — другим видом стационарной фазы, например ионообменником для генерации ЭОП. Так как при изготовлении колонок с гранулированной насадкой предусматривается полая часть в качестве окна детектирования, она может служить и в качестве отдельного участка для ускорения ЭОП. Схематическое изображение сегментированных колонок показано на рис. 4. В сегментированных колонках может быть точно отрегулирована избирательность КЭХ для пептидов и белков путем изменения длины различных сегментов насадочных колонок КЭХ.

Предложены колонки и со стационарными фазами смешанного типа, сочетающими О-Ф и ионообменные сорбенты [26, 28]. Поскольку стационарные фазы смешанного типа всегда содержат обращенную фазу, например алкильные цепочки, взаимодействующие с гидрофобной частью пептидов и белков, и ионообменник, поддерживающий стабильный ЭОП в широком диапазоне pH, они позволяют разделять анализируемые вещества с помощью двух видов хроматографии и электрофоретической миграции. Недавно исследовались процессы удерживания линейных и циклических пептидов в КЭХ на фазах смешанного типа, содержащих сильный катионообменник (сульфоки-

лоту) и n-алкильные группы [26, 28]. Подобные колонки Spherisorb смешанного типа (C18 О-Ф/SCX) использовались для разделения пептидов на основе гидрофобных и ионообменных взаимодействий и электрофоретической миграции.

Монолитные колонки

Надежность и воспроизводимость колонок сильно зависят от технологии их изготовления. Однако изготовление узкофракционированных микрочастиц и набивка ими капиллярных колонок требует высокой квалификации оператора и специализированного оборудования. Кроме того, фритта, используемая для удерживания насадки, способствует появлению центров зарождения пузырьков воздуха, приводящих к нестабильности базовой линии, прерыванию тока в системе и уменьшению ЭОП. Для преодоления этих проблем, часто встречающихся при использовании насадочных колонок с гранулированной насадкой, к счастью, разработано новое поколение колонок для КЭХ — на основе пористых полимерных монолитных стационарных фаз (монолитов).

Монолиты или сплошные слои для хроматографии стали наиболее многообещающим видом стационарных фаз в КЭХ для разделения пептидов и белков главным образом из-за их высокой сепарационной эффективности и простоты изготовления "in situ". Здесь удерживающая фритта больше не нужна, обеспечивается хорошая проницаемость колонок благодаря макропористой структуре монолита, а химический состав поверхности монолита хорошо контролируется. Монолитные стационарные фазы (МСФ) были разработаны как сорбенты для ВЭЖХ с пониженным в 3–5 раз рабочим давлением для фракционирования биополимеров (см. Приложение "Развитие монолитных

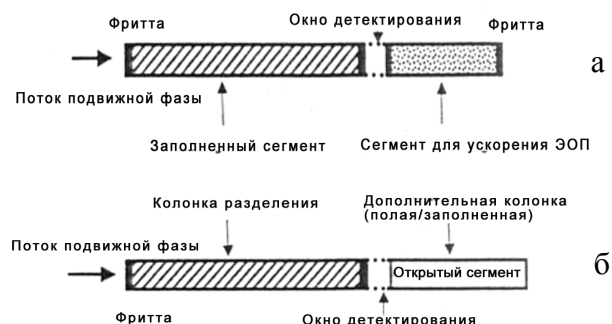


Рис. 4. Схематическое изображение сегментированных колонок: а — колонка, заполненная двумя разными набивками; б — частично заполненная колонка

стационарных фаз для быстрой ВЭЖХ биополимеров"). Разработаны три поколения МСФ: первое поколение — в дисковом формате; второе — в формате колонок и капилляров для ВЭЖХ; третье поколение — для КЭХ пептидов и белков. Недавно опубликовано несколько превосходных обзоров по МСФ третьего поколения, предназначенных для КЭХ [34–37]. В большинстве из них монолитные колонки для капиллярной электрохроматографии (КЭХ) классифицируются по типу применяемых монолитных материалов, например монолитные колонки на основе золь-гелей, акриламидов, полистиролов, полиметилакрилатов, кремнезёмов. Подробнее о монолитных колонках, представленных в каждой из этих групп, можно прочитать в этих обзорах [34–37].

Как отмечалось выше, важным фактором колонок КЭХ является формирование электроосмотического потока (ЭОП). Ниже будут рассмотрены последние разработки в области монолитных стационарных фаз для КЭХ пептидов и белков в соответствии с классификацией монолитных колонок на основе механизма формирования ЭОП, а не типов мономеров и агентов поперечного сшивания.

Монолиты, формируемые путем включения заряженных мономеров

Интенсивный ЭОП получают в монолитных колонках с высоким содержанием заряженных частиц.

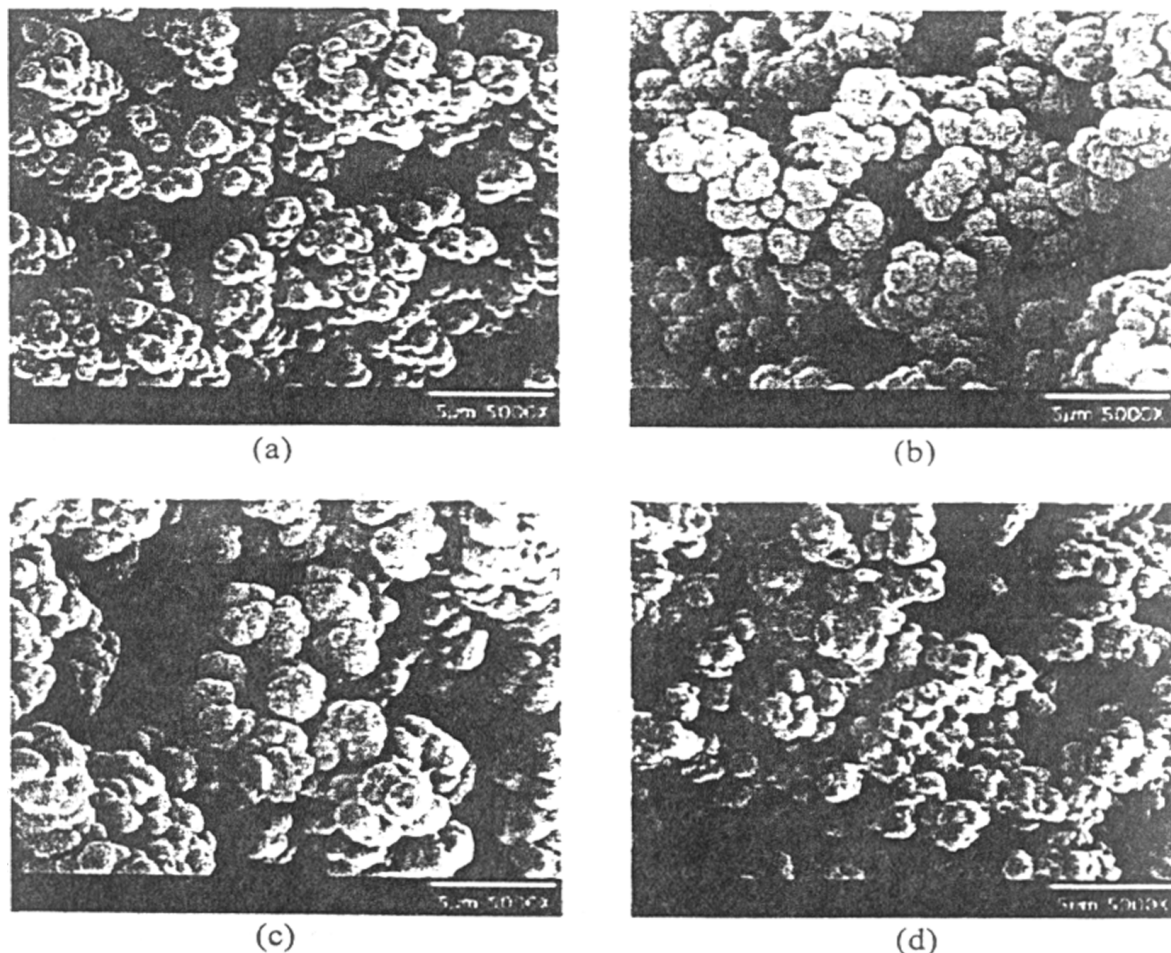


Рис. 5. Микроизображения проб (полученные на растровом электронном микроскопе), экстрагированных с помощью метанола: отрицательно заряженного лаурилакрилатного монолита (а); положительно заряженного бутилакрилатного монолита (b); положительно заряженного бутилакрилатного монолита с удвоенным процентным содержанием (1%) заряженного мономера (с) и положительно заряженного бутилакрилатного монолита с 1% целлюлозы (d). Воспроизводится по работе [41]

Для этого заряженные мономеры добавляют в смесь мономеров, чтобы включить в монолит либо катионные, либо анионные группы. Недавно сообщалось об успешном изготовлении заряженного монолита путем полимеризации пористой матрицы из акриламида, метиленабисакриламида, акриловой кислоты, додецилакрилата и полиоксидиэтилена, на котором разделялись четыре тирозинсодержащих пептида [38]. Разработаны МСФ для КЭХ с сульфокислотными группами, вводимыми путем добавления в качестве мономеров винилсульфокислоты (VSA) или 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфокислоты (AMPS) [39, 40]. Здесь алкильные цепи монолитных стационарных фаз действуют как хроматографические центры, а сульфокислотная часть обеспечивает заряд, необходимый для формирования и поддержания сильного ЭОП. В работе [41] описано разделение нейтральных, катионных и анионных аминокислот и пептидов с помощью КЭХ с использованием гидрофобной пористой МСФ на основе акрилата, получаемой с помощью УФ-инициируемых процессов. Здесь в зависимости от pH подвижной фазы и природы анализируемого вещества для усиления ЭОП в монолиты включались четвертичные аминные или сульфокислотные группы. Избирательность и ЭОП легко регулировались подбором степени гидрофобности и заряда монолита. Структуры этих заряженных монолитов иллюстрируются рис. 5.

Постфункционализация нейтральной поверхности монолитной стационарной фазы

Поскольку для формирования ЭОП необходимы поверхностные заряды, предложен метод, в котором на поверхность монолитов после полимеризации вводятся заряженные группы. Этот процесс называется "постфункционализацией" нейтрального пористого монолитного носителя. Применению органополимерных монолитных колонок с постфункционализацией для КЭХ пептидов и белков посвящены работы [44–48]. Обычно анализ выполнялся в режиме движения компонентов пробы навстречу ЭОП. Монолитные колонки, изготавливавшиеся путем *in situ* сополимеризации глицидилметакрилата (GMA), метилметакрилата (MMA), этиленгликоль диметилметакрилата (EGDMA), функционализировались с помощью N-бутиламина, в результате чего получались функциональные группы фиксированных третичных аминов с этильными и бутильными цепями. Эти колонки использовались для разделения белковых смесей и ангиотензинов [44]. Монолитные колонки на основе полистирола, изготавливавшиеся путем сополимеризации винилбензолхлорида (VBC) и дивинилбензола (DVB) функционализировались с помощью реакции поверхностных бензилхлоридных групп с N,N-диметилоктиламином

[45]. На этом пористом стирольном монолите с четвертичноаммониевыми группами и октиловыми цепями на поверхности разделены четыре полипептида. Недавно монолит из поли(VBC-EGDMA), функционализированный с помощью N,N-диметилбутиламина, был успешно применен для разделения синтетических пептидов, белков и триптического гидролизата цитохрома C, как показано на рис. 6 [46]. В процедуре постфункционализации при изготовлении монолитных колонок применяются и другие реагенты, которые обычно служат для функционализации монолитных микросфер для насадочных колонок для КЭХ пептидов и белков [47, 48].

Чтобы исключить трудоемкий этап подбора порогов для оптимизации монолитной среды разделения был разработан метод изготовления пористых полимерных монолитов для КЭХ с использованием технологий привитой сополимеризации [36, 49]. В этом подходе вначале получают пористые монолиты с хорошо контролируемым

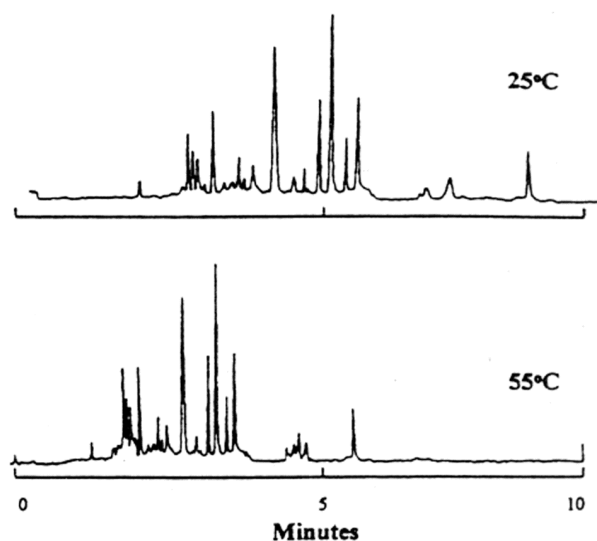


Рис. 6. Электрохроматограммы, иллюстрирующие разделение триптического гидролизата цитохрома C, полученные при изократическом элюировании в монолитной колонке при температурах 25 и 55 °C с постфункционализацией. Использовалась капиллярная колонка из кварцевого стекла с внутренним диаметром 75 мкм со стирольным монолитом, имеющим четвертичные аммонийные функциональные группы; полная и эффективная длина 30 см и 40 см соответственно. Условия эксперимента: подвижная фаза — 40 % ацетонитрила в 50 мМ фосфатном буфере, pH 2.5; приложенное напряжение — 30 кВ; УФ-детектирование на длине волны 214 нм. Воспроизведено по работе [46]

размером пор, а желаемая химия поверхности исходного монолита достигается с помощью фотоиницируемой привитой сополимеризации соответствующих полимерных цепей на поверхности пор. Успех применения привитой фотосополимеризации для изготовления монолитных колонок с использованием поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфокислоты) (AMPS) и 4,4-диметил-2-винилазелактона (VAL) тестируется путем измерения ЭОП и интенсивности флуоресценции соответственно [49]. В качестве иллюстрации описано быстрое и эффективное разделение четырех пептидов при помощи КЭХ с монолитными колонками, изготовленными путем привитой сополимери-

зации с AMPS [49]. Реагенты, часто использовавшиеся для постфункционализации монолитных фаз в упомянутых выше работах, указаны в табл. 2.

Монолиты с кольцевым ЭОП

Адсорбцию пептидов и белков на стационарной фазе можно уменьшить, используя вместо насадок на основе кремнезема, полимеро-органические монолитные насадки. Поскольку в объеме МСФ всегда присутствуют для формирования ЭОП электрические заряды, при разделении пептидов и белков сохраняется проблема электростатического

Табл. 2. Реагенты, часто используемые для постфункционализации монолитных носителей

Реагент	Структура реагента	Поверхность монолита после функционализации	Ссылка
N-этилбутиламин			[44]
N,N-диметилоктиламин			[45]
N,N-диметилбутиламин			[46]
N-метилоктадециламин-йодометан			[47]
Сульфокислота 1,3-пропансульфон			[48]
Поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфокислота)			[49]
Поли-4,4-диметил-2-винилазлактон			[49]

взаимодействия заряженных функциональных групп пептидов и белков с заряженной насадкой. Постфункционализация вносит еще одну проблему, которая называется дилеммой двойного слоя в КЭХ, когда заряды на поверхности монолита того же знака, что и заряды анализируемого вещества; при этом происходит отталкивание зарядов, препятствующее взаимодействию заряженных анализируемых компонентов с центрами удерживания на хроматографической поверхности [46, 47]. Поэтому в большинстве разделений пептидов и белков с помощью КЭХ преобладают процессы электрофоретической миграции, а не комбинация действующих одновременно механизмов хроматографического удерживания и электрофоретической миграции. Для преодоления проблемы необратимой адсорбции и электростатического связывания при сохранении интенсивного ЭОП и, следовательно, высокой скорости разделения в КЭХ получена новая сепарационная среда разделения, содержащая положительно заряженный слой полимера, который наносится на внутренние стенки капилляров для получения кольцевого ЭОП, и нейтральную объемную стационарную фазу из поли(VBC-EG-DMA) [50]. Структура такой монолитной многослойной колонки показана на рис. 7. Разделение пептидов в такой колонке происходит за счет комбинации механизмов обращенно-фазовой хроматографии и электрофоретической миграции.

Другие виды монолитов

Как и гранулированные сорбенты насадочных



Рис. 7. Многослойная структура монолитной колонки с кольцевым электроосмотическим потоком

колонок, монолитные стационарные фазы можно разделить на обращенно-фазные, ионообменные и смешанного типа. Разделение пептидов с использованием КЭХ на сульфированной монолитной колонке со стационарной фазой смешанного типа, содержащей обращенно-фазный материал и сильный катионообменник, описано в работе [51]. Кроме того, монолитные колонки КЭХ также могут быть сегментированными. Однако контроль полимеризации с разными мономерами и кросс-агентами в разных сегментах колонки остается проблемой. Хотя вытеснительная электрохроматография применялась для разделения полимеров, монолитные колонки для этих целей еще не разработаны. Можно ожидать, что в дальнейшем появятся работы по вытеснительной электрохроматографии для разделения пептидов и белков.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ КЭХ

КЭХ с применением давления или микро-ВЭЖХ с применением электрического напряжения

Один из подходов к увеличению скорости разделения основывается на приложении давления в КЭХ или электрического напряжения в μ -ВЭЖХ. Хотя названия этих методов кажутся взаимозаменяемыми, между ними есть отличия. Понятие КЭХ с приложением давления (Р-КЭХ) охватывает методы, в которых элюент движется по капиллярной колонке, а дополнительное давление либо усиливает объемный поток под действием ЭОП, либо является фактором градиентного элюирования [52]. В то же время μ -ВЭЖХ с приложением электрического напряжения (V- μ -ВЭЖХ) включает методы, в которых объемный поток прокачивается через капиллярную колонку за счет градиента давления, а напряжение, приложенное к колонке, приводит к формированию небольшого ЭОП, зависящего от природы стационарной и подвижной фаз. Предполагается, что приложение давления в колонке (Р-КЭХ) может использоваться также для регулировки избирательности, т. к. это дает возможность изменять относительные подвижности в выражении (6) и тем самым создает разность кажущихся коэффициентов удерживания в КЭХ [4].

В работе [53] описано картирование триптического гидролизата цитохрома С методом градиентной КЭХ с использованием колонок с набивкой 5 мкм сферами октадецилкремнезема. Разрешение, полученное при использовании Р-КЭХ, оказалось выше, чем при градиентной μ -ВЭЖХ. Стационарная фаза смешанного типа (обращенно-фазная/анионообменная) использовалась для на-

бивки колонок при разделении ангиотензинов, энкефалинов и триптических пептидов миоглобина сердца лошади с помощью Р-КЭХ [54]. Используемая стационарная фаза содержала октадецилсилан и диалкиламины. Заряженные аминные группы стационарной фазы создавали сильный постоянный ЭОП и позволяли регулировать как время удерживания, так и избирательность разделения путем подбора рН подвижной фазы в диапазоне от 2 до 5. На профиль элюирования пептидов сильно влияют величины и полярность напряжения разделения. Недавно продемонстрирован высокоэффективный анализ пептидов с помощью Р-КЭХ/Р-КЭ при использовании монокристаллических колонок, изготовленных по методике,

описанной в работе [44]. Эффективность разделения составляла свыше 300 000 тарелок/м [55].

Детектирование в КЭХ

Одним из недостатков КЭХ, как и других капиллярных методов анализа, является недостаточная чувствительность детектирования. Поэтому для полной реализации возможностей КЭХ необходимо использовать высокочувствительное детектирование. Этот раздел, естественно, касается электрохроматографии как в капиллярных колонках, так и в микрофлюидных чипах. Чувствительность детектирования в КЭХ значительно повышена при ее использовании в комбинации

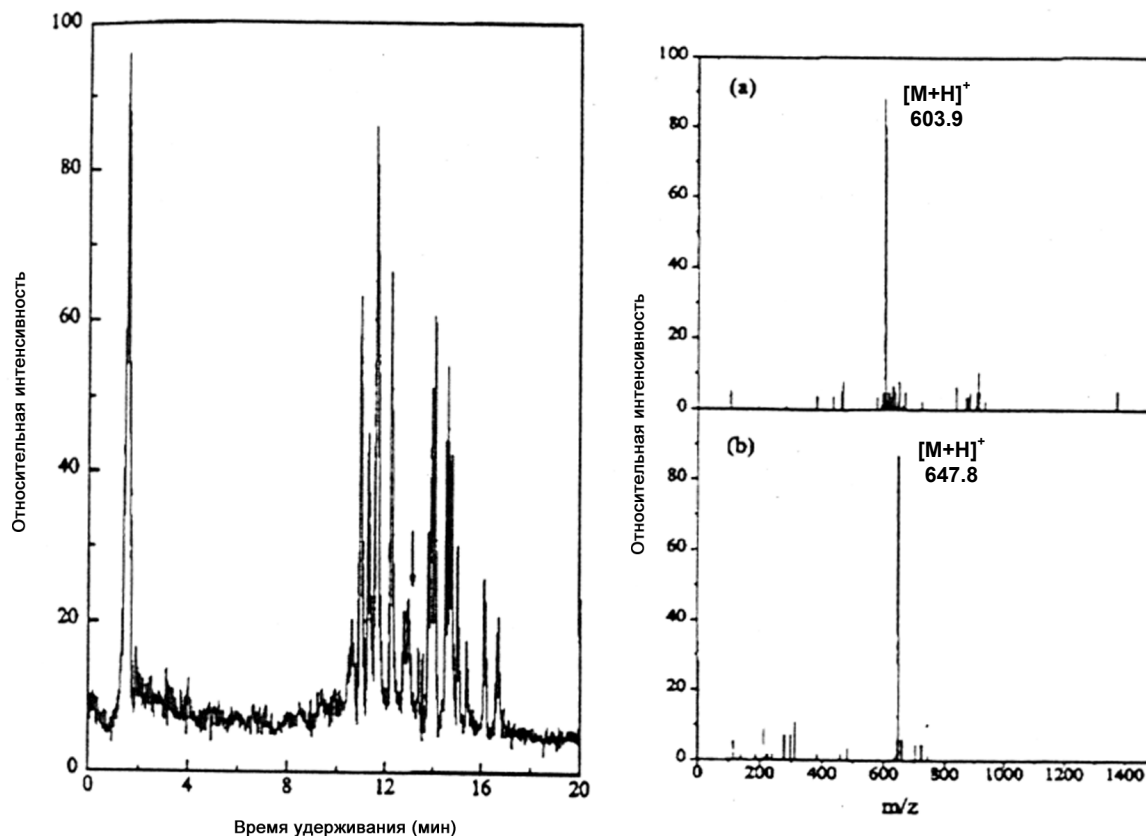


Рис. 8. Хроматограмма (левая часть) полного ионного тока при разделении триптического гидролизата куриного яичного белка при объеме введенной пробы 12 пмоль, соответствующем количеству исходного белка, и масс-спектры, соответствующие пику, отмеченному стрелкой на хроматограмме. Длина колонки 6 см. Условия эксперимента: градиент 0–40 % ацетонитрила за 20 мин; приложенное напряжение 1000 В; дополнительное давление 40 бар. Масс-спектрометрия: (a) — фрагмент TQINK, $m/z = 603.9$, время выхода 12.95 мин; (b) — фрагмент VYLPR, $m/z = 647.8$, время выхода 13.01 мин. Воспроизводится по работе [64]

с масс-спектрометрией (МС). Впервые сочетание электрохроматографического метода с МС продемонстрировано в 1991 г. в работе Verheij и др. [56], в которой описывалось использование Р-КЭХ и МС с непрерывным динамическим потоком и ионизацией путем бомбардировки быстрыми атомами (CG-FAB) для анализа алкалоидов морфина и нуклеотидов. Позднее указанные авторы использовали Р-КЭХ в сочетании с ESI-МС для анализа пептидов и других биомолекул [57]. Работы Verheij открыли дорогу широкомасштабной, высокопроизводительной и высокочувствительной идентификации пептидов, их высокочувствительному секвенированию и определению посттрансляционных модификаций белков. Именно сочетание КЭХ и ESI-МС [58] составляет в настоящее время основу идентификации пептидов в протеомике, особенно с применением электроспрей-ионизации [59] и ионизации с матричной лазерной десорбцией (MALDI) [60]. Эти масс-спектрометрические методы обеспечили грандиозный прогресс в определении характеристик электрофоретически разделенных пептидов и белков как в режиме on-line, так и в автономном режиме (off-line).

В 1995 г. метод Р-КЭХ-ESI-МС был использован для анализа N-защищенных пептидов в колонке, заполненной О-Ф стационарной фазой, при скоростях элюции 1–2 мкл/мин [61]. Недавно комбинация V-μ-BЭЖХ и ESI-МС была использована для исследования влияния приложенного напряжения на избирательность при разделении и картировании пептидов [62]. Описано несколько примеров использования КЭХ-ESI-МС для анализа белков и пептидов [63–65]. КЭХ с полыми C8 функционализированными капиллярными колонками использовалась для разделения и идентификации триптического гидролизата миоглобина сердца лошади [63]. При этом пятнадцать пептидов идентифицировались на хроматограмме полного ионного тока при детектировании время-пролетным масс-спектрометром, что охватывало 90 % пептидной последовательности. Р-КЭХ с колонкой, заполненной 3 мкм зернами Vydac C18, сочеталась с времяпролетной МС рефлекторного типа с ионной ловушкой для анализа шести стандартных проб пептидов и белковых гидролизатов [64]. На рис. 8 представлены хроматограммы полного ионного тока триптического гидролизата куриного овальбумина и масс-спектры, соответствующие току, отмеченному стрелкой на хроматограмме. В другом исследовании таким же образом анализировали бычий β-лактоглобулин А и гемоглобин человека [65]. Описано использование серийно выпускаемых колонок смешанного типа (с обращенно-фазным анионообменным материалом насадки для разделения пептидов и триптического гидролизата миоглобина сердца лошади методом Р-КЭХ с детектированием на основе время-

пролетной МС рефлекторного типа с ионной ловушкой [54]. Эффективность разделения оказалась такой же, как у О-Ф колонки, однако с другим порядком элюирования. Поскольку подбор электрического поля и градиента давления обеспечивал высокопроизводительный анализ сложных смесей пептидов, была доказана применимость монолитных колонок для определения масс и анализа триптического гидролизата альбумина бычьей сыворотки методами Р-КЭХ/Р-КЭ в сочетании с электроспрей-МС [55]. Высокая эффективность колонок и крутой градиент позволяли осуществлять разделение пептидов за минуты с определением их масс, охватывающим 73 % всей последовательности альбумина бычьей сыворотки.

Последние разработки в КЭХ с детектированием лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) также представляют высокочувствительную альтернативу УФ-детектированию при исследовании пептидов и белков. При КЭХ-разделении аминокислот, меченных нафталин-2,3-дикарбоксальдегидом (NDA), с ЛИФ-детектированием в качестве стационарной фазы использовались заряженные лаурилакритатные монолиты, функционализированные сульфокислотными группами [41]. При использовании ЛИФ для детектирования аминокислот, дериватизированных флуорогенными реагентами, достигалось значительное снижение пределов детектирования. КЭХ применялась и в сочетании со спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [66]. Пять алкилбензоатов разделялись в КЭХ-колонке, заполненной на 90 % 5 мкм сферами и на 10 % 3 мкм сферами Gromsil ODS-2 с использованием 2 мМ бората D₂O/CD₃CN(20/80) при давлении 8 бар и напряжении 20 кВ. Сравнение этого метода с комбинацией μ-BЭЖХ-ЯМР показало, что в случае КЭХ-ЯМР время анализа значительно сокращается в результате дополнительного влияния давления и электроосмотических сил на скорость потока в КЭХ. Ожидается дальнейшее расширение применения КЭХ-ЯМР для разделения пептидов.

КЭХ на микрочиповых платформах

Переходим к результатам КЭХ, полученным непосредственно на приборах, изготавливаемых методами микротехнологии (микрочипах), которые позволяют получить хорошо контролируемые микроканалы для разделения. Можно быть уверенным, что в будущем КЭХ на микрочипах станет мощным инструментом аналитической химии с широким применением в медикобиологических исследованиях, в особенности при изучении генома и в протеомике, где требуется быстрое, высокоэффективное и высокопроизводительное разделение и определение свойств биомолекул, таких как пептиды и белки [67].

В работах [64, 69] представлен анализ триптических пептидов с использованием микроколонок на основе матричных коллокационных структур, модифицированных C18 (CJVOSS). Показано, что эффективность разделения пептидов и белков с использованием КЭХ на микрочипах сравнима с эффективностью разделения при использовании μ -ВЭЖХ. Недавно продемонстрирована возможность применения чипов COMOSS из полидиметилсилоксана (PDMS) [70]. Поверхность PDMS модифицировалась с помощью AMPS, поли(4-стиролсульфокислоты), полиакриловой кислоты, поливинилсульфокислоты и полистеарилметакрилатного сополимера AMPS путем полимеризации с цериевым (IV) катализатором на COMOSS-микрочипах, что обеспечивало высокоэффективное разделение смесей пептидов [71]. Каналы в микрочипах, модифицированные C18-AMPS, обеспечивали избирательное разделение триптического гидролизата бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC-BSA), с высокой воспроизводимостью и эффективностью. Схема разделительной COMOSS-колонки и разделение пептидов из гидролизата FITC-BSA на микрочипе, модифицированном C18-AMPS, показаны на рис. 9 и 10 соответственно.

Недавно был изготовлен микрочип с гранулированной насадкой для выполнения КЭХ без использования фритты [72]. Канал разделения на микрочипе заполнялся микросферами диаметром 3 мкм из октадецилсиланизированного кремнезема. На рис. 11 приведены фотографии каналов в PDMS, заполненных частицами, дериватизированными с помощью октадецилсилана (ODS). В таком канале разделение двух нейтральных тестовых соединений: метанола и бензальдегида на уровне базовой линии достигалось менее чем за 15 с.

В работе [41] описано электрохроматографическое разделение на чипах пептидов, меченных NDA. Отрицательно заряженные монолиты из лаурилата с сульфокислотными группами помещались в микроканалы стеклянных чипов. Для повышения чувствительности использовалось ЛИФ-детектирование. Разработаны другие микрочипы с целью совмещения электрофоретического разделения пептидов и белков с детектированием методом электроспрей-МС через специальный жидкостной интерфейс в системе микрочип-МС [73–77]. Эти успешные технологии создания комбинированных систем легко реализовать для КЭХ на микрочипе в комбинации с масс-спектрометрией.

Многомерное электрохроматографическое разделение

Сложность биологических образцов способст-

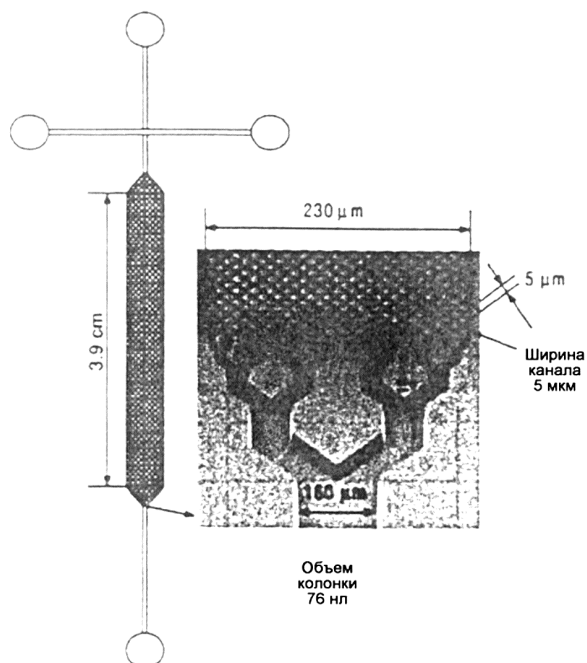


Рис. 9. Схема разделительной колонки COMOSS. Воспроизводится по работе [71]

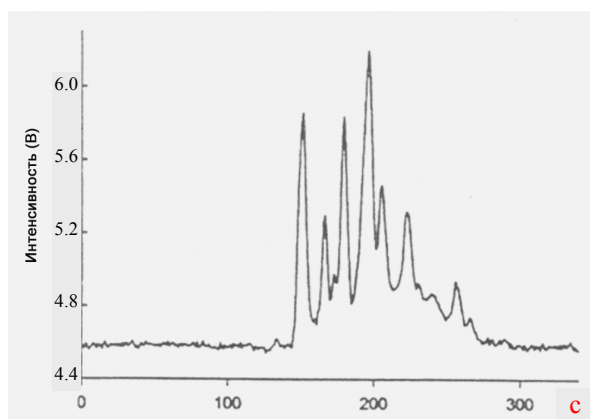


Рис. 10. Разделение пептидов гидролизата альбумина бычьей сыворотки с флуоресцеин-изотиоцианатной меткой (FITC-BSA) на микрочипе, подверженном модификации с помощью C18-AMPS. Напряжение 1000 В; подвижная фаза: 1 мМ карбонатный буфер (pH 9.0). Диффузионная инъекция в течение 60 с. Воспроизводится по работе [71]

вовала развитию для их разделения многомерной электрохроматографии. Представляется, что разработка двухмерных систем КЭХ-КЭХ или ВЭЖХ-КЭХ, которые обеспечат идеальные профили потоков, позволит значительно повысить

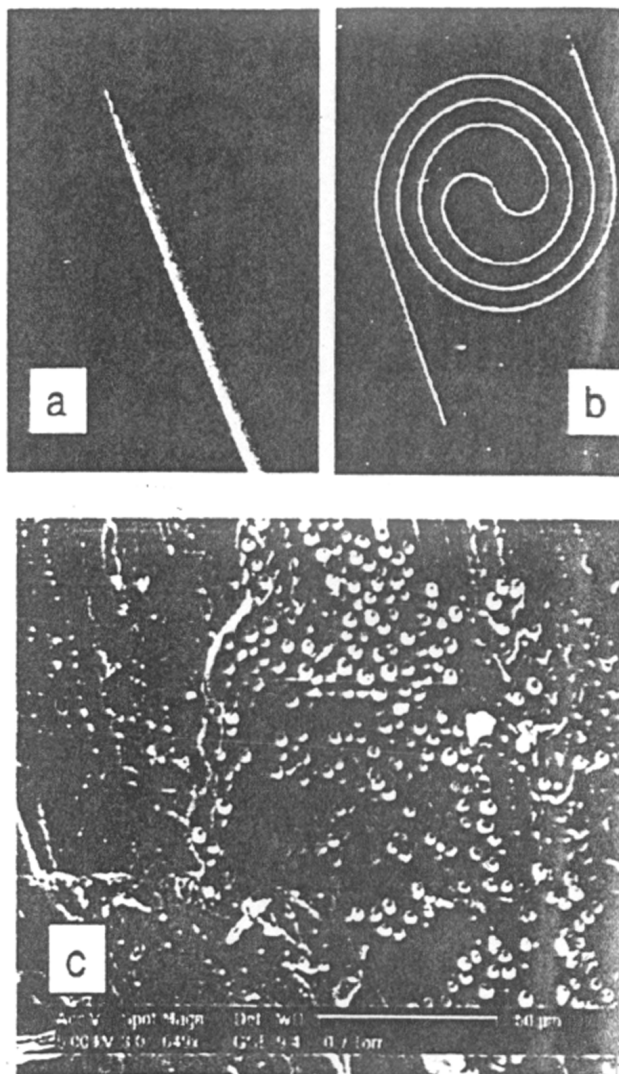


Рис. 11. Фотографии конусных прямолинейного (а) и спирального (б) каналов, выполненных в полидиметилсилоксане и заполненных частицами материала, дериватизированного с помощью октадецил-кремнезема, и электронные микрофотографии (с) поперечного сечения канала с наполнителем, выполненного в пластиковом материале, до тепловой обработки. Диаметр частиц 3 мкм. Воспроизводится по работе [71]

эффективность и селективность анализа пептидов и белков, значительно уменьшить время разделения, уменьшить объемы пробы. Поскольку МС-детектор может стыковаться в on-line комбинации с ВЭЖХ и КЭ, обеспечивается дополнительная размерность анализа. Недавно была разработана система ВЭЖХ-КЗЭ-МС [76] и предложено таким же образом реализовать комбинацию ВЭЖХ-КЭХ-МС. В работе [77] описана система трехмерной электрохроматографии в микрочиповом формате

для разделения гистидин-содержащих фрагментов пептидов. В этом исследовании использовались трипсиновое расщепление и аффинная хроматография на гранулированных насадочных колонках с фриттой, полученной методами микро-технологий, а обращенно-фазное разделение выполнялось на колонках COMOSS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показанные в настоящем обзоре успехи в области КЭХ пептидов и белков достигнуты благодаря высокой эффективности и избирательности этого метода КЭХ. При этом внимание фокусировалось на технических разработках, главным образом на колоночных технологиях и различных конструкциях колонок для КЭХ. Поскольку каждый вид колонок имеет свои преимущества и недостатки, то следует направлять усилия на выполнение конкретных требований разделения пептидов и белков методом КЭХ. При разработке и изготовлении новых колонок важно, чтобы среда разделения содержала необходимые группы для требуемых хроматографических разделений и заряды для формирования надлежащего ЭОП, чтобы обеспечить высокую скорость и эффективность разделения. Последнее достигается при переходе к монолитным колонкам за счет увеличения отношения гидродинамического и диффузионного диаметров стационарных фаз. Использование различных аналитических платформ КЭХ обеспечили поразительные успехи в области анализа пептидов и белков, которые освещены в данном обзоре. Проведенные фундаментальные исследования ставили своей целью демонстрацию механизмов разделения и удерживания при КЭХ белковых веществ.

Хотя КЭХ сочетает в себе достоинства μ -ВЭЖХ и КЭ, она имеет и недостатки, которые необходимо преодолеть. В конечном счете успех КЭХ, как любого другого гибридного метода, основывается на усилении достоинств и исключении недостатков. Задача хроматографического и протеомического сообществ заключается в превращении технических достижений в решения практических биологических проблем. КЭХ пептидов и белков в микрочиповом формате представляет перспективную область решения сложных аналитических задач протеомики.

Приложение. РАЗВИТИЕ МОНОЛИТНЫХ СТАЦИОНАРНЫХ ФАЗ ДЛЯ БЫСТРОЙ ВЭЖХ БИОПОЛИМЕРОВ

Первое поколение монолитных стационарных фаз (МСФ) — макропористые монолитные слои

Монолитная пористая стационарная фаза, впервые предложенная в 1989 г. в дисковом формате

(высокоэффективная мембранная хроматография) Б.Г. Беленьким, Ф. Швецом и Т.Б. Тенниковой [78–81], разработана в Институте макромолекулярной химии (Прага, Чешская Республика). Созданные монолитные диски толщиной до 3 мм помещались в специально разработанные полиолефиновые картриджи, которые можно было последовательно соединять в серии. Благодаря реализованному в монолитных слоях конвективному межфазному массопереносу монолитные диски позволяли очень быстро и эффективно разделять белки и нуклеиновые кислоты [82, 83].

В середине 1980-х Б.Г. Беленький с сотрудниками изучали хроматографию белков на дисках МСФ незначительной толщины различной химической структуры и конфигурации [84], используя градиентное вытеснение. Было показано, что хорошего разрешения белковых зон в градиентных условиях можно достичь на дисках малой толщины. Это открытие привело к концепции коротких монолитных пористых слоев (дисков) [84].

Полная теория массообмена в монолитных пористых материалах разработана Liapis [85] и Tas-sarek [86].

Поскольку трудно создать тонкие слои из микрочастиц вследствие неоднородности упаковки и образования каналов, новая МСФ была разработана Ф. Швецом в Институте макромолекулярной химии ЧСАН (Прага, Чешская Республика) в мембранном формате. Впоследствии монолитные пористые диски в полиолефиновых кольцах под коммерческим названием СИМ Диски начала выпускать фирма BIA Separation (Любляна, Словения). СИМ Диски можно ставить друг на друга для многомерной хроматографии, названной "объединенной жидкостной хроматографией", в которой СИМ Диски различной химической природы использовались одновременно.

МСФ второго поколения — твердые макропористые полимерные монолитные слои (колонок и капилляры)

В Корнельском университете (Итака, Нью-Йорк, США) в 1990-х годах Ф. Швец предложил новые макропористые монолитные слои, которые формировались путем полимеризации (литья) под давлением [87]. В отличие от полученных ранее монолитных дисков в мембранном формате эти монолиты полимеризуются *in situ* в трубках типа хроматографических колонок или капилляров, в которых они остаются после окончания отливки и промывания пористого монолита. Для этого трубки заполняются смесью мономеров (один из них должен быть кросс-агентом), свободно радикальным инициатором и пороженным растворителем. Полимеризация выполняется после герметизации колонки при тщательно контроли-

руемом тепловом режиме. Эти колонки выпускаются компанией Isco (Линкольн, Небраска, США) под торговым названием SWIFT в различных форматах с большим ассортиментом функциональных групп. С появлением протеомики формат капиллярных колонок из пористого монолита, хорошо совместимый с масс-спектрометром, становится очень популярным, т. к. значительно проще полимеризовать жидкие предшественники полимеров и формировать стационарную фазу *in situ* в капиллярах, чем изготавливать узкофракционированные микрочастицы и эффективно упаковывать ими насадочные колонки. Фирмы Isco и LC Packings (Саннивейл, Калифорния, США) называют монолитные пористые колонки и капиллярные слои в своих каталогах. Б. Karger [88] с сотрудниками недавно продемонстрировали потенциал этих монолитных капиллярных колонок, изготовленных с 20 мкм диаметром из плавленого кварца, для самых эффективных разделений белков и триптических гидролизатов.

МСФ третьего поколения — монолитные колонки для капиллярной электрохроматографии (КЭХ)

Предложены несколько методов изготовления монолитных пористых стационарных фаз с заданной химией поверхности. Так, непосредственно полимеризуемые монолиты из сополимера дивинилбензола и стирола являются превосходными стационарными фазами для самого быстрого разделения пептидов и белков [89]. Другой вариант — это синтез монолита с реактивными функциональными группами и их последующей модификацией. Полиглицидилметакрилат [90] является основным монолитом для подобных приложений. Другой метод, который позволяет как приготавливать монолиты, так и модифицировать их поверхность, представляют УФ-иницируемые процессы. При использовании капилляров с УФ-прозрачным покрытием из ПТФЭ, может быть осуществлена более быстрая полимеризация, чем инициируемая термически [91, 92]. Химия этих слоев определяется выбором УФ-прозрачных мономеров.

Монолитные диски на основе кремнезема

Поскольку пористые неорганические материалы очень популярны, N. Tanaka разработал монолитные диски из кремнезема [93, 94]. В отличие от дисков из органических полимеров монолитные колонки из кремнезема не могут быть изготовлены *in situ* непосредственно аналитических размеров из-за значительной усадки при гидротермически инициированной поликонденсации тетраалкоксисилана в присутствии пороге — этиленгликоля. Модификация кремнеземного стержня с помощью C18 позволяет получить монолитную колонку для

обращенно-фазных разделений. Указанные колонки продаются Merck KGaA (Дармштадт, Германия) под торговым названием Chromolith.

Хотя монолиты — новый формат стационарных фаз для ВЭЖХ, должно быть сделано еще много новаций, чтобы полностью раскрыть перспективы этого нового класса хроматографических слоев для ВЭЖХ. Подытоживая развитие МСФ в последние годы, выдающийся международный эксперт хроматографии G. Guiochon недавно [95] заявил: "Изобретение и разработка монолитных дисков (колонок) — это главная технологическая новация в изготовлении стационарных фаз, это — действительно первое новое крупное достижение в этой области, с тех пор как M. Tswett изобрел хроматографию столетие назад".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Yan, Xiang Rong, Wilkins James A., Horvath Csaba Капиллярная электрохроматография пептидов и белков // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. P. 2242–2256.
2. Bartle K.D., Myers P.J. // *Chromatogr. A* 2001. V. 976. P. 3–23.
3. Rathore A.R. // *Eectrophoresis*. 2002. V. 23. P. 3827–3846.
4. Xiang R., Horvath Cs. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 762–770.
5. Steiner F., Scherer B. // *J. Chromatogr. A* 2000. V. 887. P. 55–83.
6. Colon L.A., Gurgos G., Maloney T.D., Cinton J.M., Rodriguez R.L. // *Electrophoresis*. 2000. V. 27. P. 3965–3993.
7. Dermaux A., Sandra P. // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3027–3065.
8. Fu H.J., Huang X.D., Jin W.H., Zou H.F. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. V. 74. P. 96–100.
9. Rathore A.S., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 787. P. 185–195.
10. Wen E., Asiaie R., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 855, Is. 2. P. 349–366.
11. Pesek J.J., Matyska M.T. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 387. P. 31–41.
12. Colon L.A., Maloney T.D., Fermier A.M. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 887. P. 43–53.
13. Matyska M., Pesek J., Boysen R., Hearn M. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 5116–5125.
14. Huang X., Zhang J., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 858. P. 91–101.
15. Xu W., Regnier F.E. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 853. P. 243–256.
16. Zhang J., Horvath Cs. // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. P. 115–120.
17. Cobb K.A., Dolnik V., Novotny M. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 2478–2483.
18. Nashabeh W., El Rassi Z. // *J. Chromatogr. A*. 1991. V. 559. P. 367–383.
19. Schmalzing D., Piggee C.A., Foret F., Canrilho E., Karger B.L. // *J. Chromatogr. A*. 1993. V. 652. P. 149–159.
20. Chian M., Nesi M., Sandoval J.E., Pesek J.J. // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 777. P. 1–13.
21. Gilges M., Kleemiss M.H., Schomburg G. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 2038–2046.
22. Chiu R.W., Jimenez J.C., Monnig C.A. // *Anal. Chem. Acta*. 1995. V. 307. P. 193–201.
23. Busch M.H.A., Kraak J.C., Poppe H. // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 695. P. 287–296.
24. Ren X., Shen Y., Lee M.L. // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 747. P. 115–122.
25. Stol R., Kok W.Th., Poppe H. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 974. P. 201–209.
26. Walhagen K., Unger K.K., Olsson A.M., Hearn M.T.W. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 353. P. 263–275.
27. Walhagen K., Unger K.K., Hearn M.T.W. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 893. P. 401–409.
28. Walhagen K., Unger K.K., Hearn M.T.W. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 4924–4936.
29. Ye M., Zou H., Liu Z., Ni J. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 869. P. 385–394.
30. Zhang J., Huang X., Zhang S.H., Horvath Cs. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 3022–3029.
31. Zhang J., Zhang S.H., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 953. P. 239–249.
32. Yang C., El Rassi Z. // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 18–23.
33. Wen E., Rathore A.S., Horvath Cs. // *Electrophoresis*. 2001. P. 3720–3727.
34. Svec F., Peters E.C., Sykora D., Frechet J.M.J. // *J. Chromatogr. A*. 2000 V. 887. P. 3–29.
35. Svec F., Peters E.C., Sykora D., Yu C., Frechet J.M.J. // *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000. N 23. P. 3–18.
36. Hilder E.F., Svec F., Frechet J.M.J. // *Electrophoresis*. 2002. N 23. P. 3934–3953.
37. Quigley C.L., Martin N.D., Melin V., Manz A., Smith N.W. // *Electrophoresis*. 2003. N 24. P. 917–944.
38. Palm A., Novotny M.V. // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 4499–4507.
39. Zhang M.Q., El Rassi Z. // *Electrophoresis*. 2001. N 22. P. 2593–2599.
40. Bedair M., El Rassi Z. // *Electrophoresis*. 2002. N 23. P. 2938–2948.
41. Shediak R., Ngola S.M., Throckmorton D.J., Anex D.S., Shepodd T.J., Singh A.K. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 925. P. 251–263.
42. Bedair M., El Rassi Z. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1013. P. 35–45.
43. Bedair M., El Rassi Z. // *J. Chromatogr. A*. 2003, V. 1013. P. 47–56.
44. Zhang S.H., Huang X., Zhang J., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 887. P. 465–477.

45. Gusev I., Huang X., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 855. P. 273–290.
46. Zhang S.H., Zhang J., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 2001. V. 974. P. 189–200.
47. Zhang S.H., Huang X., Yao N.S., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 948. P. 193–201.
48. Zhang S.H., Zhang J., Horvath Cs. // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 965. P. 83–92.
49. Rohr T., Hilder E.F., Donovan J.J., Svec F., Frechet J.M.J. // *Macromolecules*. 2003. V. 36. P. 1677–1684.
50. Li Y., Xiang R., Horvath Cs., Wilkins J.A. // *Electrophoresis*. 2004. V. 25. P. 545–553.
51. Wu R., Zou H., Fu H., Jin W., Ye M. // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 1239–1245.
52. Rimmer C.A., Piraino S.M., Dorsey J.G. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 887. P. 115–124.
53. Behnke B., Metzger J.W. // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 80–83.
54. Huang P.Q., Jin X.Y., Chen Y.J., Srinivasan J.R., Lubman D.M. // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 1786–1791.
55. Ivanov A.R., Horvath Cs., Karger B.L. // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. P. 3663–3673.
56. Verheij E.R., Tjaden U.R., Niessen W.M.A., Van der Greet J. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 554. P. 339–349.
57. Dekkers S.E.G., Tjaden U.R., Van der Greef J. // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 772. P. 201–209.
58. Choudhary G., Apffel A., Yin H.F., Hancock W. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 887. P. 85–101.
59. Lord G.A., Gordon D.B. // *Capillary Electrophoresis* / Eds: Bartle K.D., Myers P. Academic Press, Cambridge, UK, 2001. P. 87–106.
60. Egelhofer V., Gobom J., Seitz H., Giavalisco P., Lehrach H., Nordhoff E. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 1760–1771.
61. Schmeer K., Behnke B., Bayer E. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3656–3658.
62. Apffel A., Yin H.F., Hancock W.S., McManigill D., Frenz J., Wu S.L. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 832. P. 149–163.
63. Wu J.T., Huang P.Q., Li M.X., Qian M.G., Lubman D.M. // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 320–326.
64. Wu J.T., Huang P.Q., Li M.X., Lubman D.M. // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 2908–2913.
65. Huang P.Q., Wu J.T., Lubman D.M. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 3003–3008.
66. Pusecker K., Schewitz J., Gfrorer P., Tseng L.H., Albert K., Bayer E. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 3280–3285.
67. Regnier F.E. // *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000. N 23. P. 19–26.
68. He B., Tait N., Regnier F.E. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 3790–3797.
69. He B., Ji J.Y., Regnier F.E. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 953. P. 257–262.
70. Slentz B.E., Penner N.A., Lugowska E., Regnier F.E. // *Electrophoresis*. 2001. V. 22. P. 3736–3743.
71. Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F.E. // *J. Chromatogr. A*. 2002. V. 948. P. 225–233.
72. Ceriotti L., De Rooij N.F., Verpoorte E. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 639–647.
73. Ly J., Thibault P., Bings N.H., Skinner C.D., Wang C., Colyer C., Harrison J. // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 3036–3045.
74. Chan J.H., Timperman A.T., Qin D., Aebersold R. // *Anal. Chem.* 1999. V. 77. P. 4437–4444.
75. Zhang B.L., Foret F., Karger B.L. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 1015–1022.
76. Issaq H.J., Chan K.C., Janini G.M., Muschik G.M. // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2000. V. 23. P. 145–154.
77. Slentz B.E., Penner N.A., Regnier F.E. // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 984. P. 97–107.
78. Svec F., Bleha M., Tennikova T., Belenkii B. // *Macroporous polymeric membranes for the separation of polymers and a method of their application*. Patent USA: N 4 889 632, Dec. 26, 1989.
79. Svec F., Belenkii B. *Macroporous polymeric membranes for the separation of polymers and a method of their application*. Patent USA: N 4 923 610, May 8, 1990.
80. Bleha M., Tennikova T. *Macroporous polymeric membranes for the separation of polymers and a method of their application*. Patent USA: N 4 952 349, Aug. 28, 1990.
81. Tennikova T., Belenkii B., Svec F. // *J. Liquid Chrom.* 1990. V. 63. P. 13.
82. Svec F. *Porous monoliths: Emerging stationary phases for HPLC and related methods* // *Suppl. LC-GC. North America*, June 2004. P. 18–21.
83. *Monolithic Materials: Preparation, Properties, and Applications* / Eds: Svec F., Tennikova T.B., and Deyl Z. Elsevier, Amsterdam, 2003.
84. Belenkii B.G., Podkladenko A.M., Kurenbin O.I., Mal'tsev V.G., Nasledov D.G., Trushin S.A. // *J. Chromatogr.* 1993. V. 645. P. 1–15.
85. Meyers J.J. and Liapis A.I. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 852. P. 3–23.
86. Leinweber F.C., Lubda D., Cabrera K., Tassarek U. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 2470–2477.
87. Svec F., Frechet J.M.J. // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 820–822.
88. Ivanov A.R., Zang L., Karger B.L. // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 5306–5316.
89. Xie S., Allington R.W., Svec F., Frechet J.M.J. // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 865. P. 169–174.
90. Xie S., Allington R.W., Frechet J.M.J., Svec F. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2002. V. 76. P. 87–125.
91. Viklund C., Ponten E., Glad B., Irgum K., Hor-

- sted P., Svec F.* // Chem. Mater. 1997. V. 9. P. 463–471.
92. *Yu C., Svec F., Frechet J.M.J.* // Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 120–127.
93. *Tanaka N., Ishizuka N., Hosoya K., Kimata K., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N.* // Kuromatogurafi. 1993. V. 14. P. 50–51.
94. *Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T.* // J. Chromatogr. A. 2002. V. 965. P. 35–49.
95. *Al-Bokari M., Cherrak D., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. 2002. V. 975. P. 275–284.
- Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*
- Материал поступил в редакцию 28.04.2005.

HIGH TECHNOLOGIES IN MICROBIOSEPARATION (A review based on the publication in "Electrophoresis", 2004)

B. G. Belenkii

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

This paper is an extended version of the Russian translation from English of the review article "Capillary Electrochromatography of Peptides and Proteins" by Yan Li et al. ("Electrophoresis", 2004, 25, 2242–2256). This is an overview of recent advances in bioanalysis using capillary electrochromatography (CEC) for separation of proteins and peptides. Basic principles of CEC are briefly described. Much attention is given to the development of new stationary phases and new column designs, their advantages and disadvantages. New CEC column technologies, including monolithic ones, recently developed to achieve high speed and efficiency of separation are considered. Various analytical CEC platforms are introduced, namely: pressure assisted CEC, voltage assisted high performance microliquid chromatography (μ -HPLC), ON-CHIP and multidimensional electrochromatography. A number of detection methods, primarily mass spectrometry (in hybrid instruments with built-in microfluidic chips) are considered.