

Поли-4-винилпиридиниевые наногубки в качестве модификаторов электрофоретических систем для разделения заряженных аналитов

*Д.А. Поликарпова¹, Д.В. Макеева¹, Л.А. Карцова¹, В.А. Даванков², Л.А. Павлова²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский пр., 26
²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Российская Федерация, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 28

*Адрес для переписки: Поликарпова Дарья Александровна, E-mail: polikdaria@yandex.ru

Поступила в редакцию 05 июля 2019 г., после доработки – 18 июля 2019 г.

Новые гидрофильные ионные полимерные наночастицы на основе N-алкилированного сверхсшитого поли-4-винилпиридина (наногубки – НГ) имеют пористую структуру, несут рН-независимый положительный заряд и содержат ароматические звенья, что позволяет предполагать возможность формирования покрытий стенок кварцевого капилляра на их основе для разделения анионных и катионных аналитов. В рамках исследования впервые предложены подходы к формированию покрытий на основе наногубок с молекулярной массой 400 и 10 кДа. Показано, что для обеспечения стабильности таких покрытий необходимо введение НГ в состав фонового электролита (ФЭ). Определен рабочий диапазон рН ФЭ (4-9) для последующих электрофоретических экспериментов. Результаты сопоставлены с полученными нами ранее экспериментальными данными по формированию покрытий на основе наноразмерных частиц (НЧ) сшитого полистирола, функционализированных четвертичными аммонийными группами. Для выявления перспектив покрытия на основе НГ с молекулярной массой 400 кДа рассмотрен широкий спектр аналитов: карбоновые кислоты, аминокислоты, антибиотики фторхинолонового ряда, биогенные амины, белки. Разделение карбоновых кислот на таких капиллярах характеризуется иной селективностью по сравнению с капиллярами, покрытыми НЧ, функционализированными четвертичными аммонийными группами. При разделении аминокислот НГ влияют на селективность разделения за счет взаимодействия с аналитами, а в случае антибиотиков НГ выступают только в роли агента, обращающего электроосмотический поток (ЭОП). Установлено, что модификация стенок капилляра НГ с молекулярной массой 400 кДа позволяет предотвращать сорбцию основных аналитов (биогенные амины, белок лизоцим) в процессе их электрофоретического разделения.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, наночастицы, покрытия стенок капилляра.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 3, pp. 343-353

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.006

Poly-4-vinylpyridinium nanosponges as modifiers of the electrophoretic systems for the charged analytes separation

*D.A. Polikarpova¹, D.V. Makeeva¹, L.A. Kartsova¹, V.A. Davankov², L.A. Pavlova²

¹Saint Petersburg State University, Institute of Chemistry, Universitetskii pr. 26., St. Petersburg, Petergof, 198504, Russian Federation
²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Vavilova St. 28, Moscow, 119334, Russian Federation

*Corresponding author: Daria A. Polikarpova, E-mail: polikdaria@yandex.ru

Submitted 05 July 2019, received in revised form 18 July 2019

Novel hydrophilic ionic polymer nanoparticles based on the N-alkylated hypercrosslinked poly-4-vinylpyridine (nanosponges – **NS**) have porous structure, pH-independent positive charge and contain the aromatic rings. These nanosponges have not yet been studied in the capillary electrophoresis mode, but their characteristics suggest the possibility of creating the fused silica capillary walls coating for the separation of anionic and cationic analytes. In the current research, the authors, for the first time, have proposed the approaches to the formation of coatings based on the nanosponges with a molecular weight of 400 and 10 kDa. It was established that the stability of such coatings could be achieved by the introduction of NS into the background electrolyte. The pH range of background electrolytes for the subsequent electrophoretic experiments was determined to be from 4 to 9. The NS-based coatings were compared with the previously investigated coatings based on the crosslinked polystyrene nanoparticles (**NPs**), functionalized with the quaternary ammonium groups. Capillaries modified with NS (400 kDa) were tested for the electrophoretic separations of wide range of analytes: carboxylic acids, aminoacids, fluoroquinoline antibiotics, biogenic amines, and proteins. The separation selectivity of carboxylic acids on the NS-modified capillaries was different from the separation selectivity on the capillaries modified with NPs, functionalized with quaternary ammonium groups. NS affect the separation selectivity of aminoacids by interacting with these analytes, while for fluoroquinoline antibiotics NS act as an agent generating the reversed electroosmotic flow (**EOF**). The modification of fused silica capillary walls by NS with molecular mass of 400 kDa prevented the sorption of biogenic amines and lysozyme protein during their electrophoretic separation.

Keywords: capillary electrophoresis, nanoparticles, coatings of fused silica capillary walls

ВВЕДЕНИЕ

Капиллярный электрофорез (**КЭ**) – экспрессный, эффективный, простой в исполнении метод, не требующий дорогостоящего оборудования [1]. Главные трудности, связанные с его применением – высокие пределы обнаружения и сорбция основных аналитов на стенках кварцевого капилляра, приводящая к невоспроизводимости результатов разделения. Одно из решений такой проблемы – модификация стенок капилляра, позволяющая предотвратить сорбцию основных аналитов. Модификаторы могут выполнять функции и стационарных фаз с реализацией режима капиллярной электрохроматографии (**КЭХ**) [2].

Предложены различные модификаторы для решения проблем сорбции белков и/или биогенных аминов в КЭ [3-8], различающиеся молекулярной массой, природой функциональных групп, зарядом: поверхностно-активные вещества (катионные ПАВ, ионные жидкости [3]), водорастворимые полимеры [4, 5]. В [6] исследованы аналитические возможности поли(диаллилдиметиламмоний) хлорида, формирующего положительно заряженное покрытие на стенках кварцевого капилляра и обеспечивающего разделение белков в катионной форме. В работах [7, 8] в качестве динамического и ковалентного покрытий для разделения белков и катехоламинов изучены наноразмерные сверхразветвленные полимеры на основе полиэтиленimina с мальтозной оболочкой. За счет протонирования в кислой среде аминогрупп полиэтилениминового ядра такие модификаторы создают положительный заряд на стенках капилляра, существенно снижая сорбцию белков, а сочетание с внутрикапиллярным концентрированием обеспечило низкие пределы обнаружения, необходимые для определения катехоламинов и альбумина в биологических жидкостях.

В последнее время наиболее перспективными материалами стали наноразмерные модификаторы [9] из-за высокой удельной поверхности и адгезии к стенкам капилляра, что гарантирует образование стабильных покрытий. Наноразмерные частицы (**НЧ**)

уже нашли применение в качестве стационарных фаз в газовой [10] и жидкостной [11] хроматографии. Однако особый интерес вызывает применение их именно в капиллярном электрофорезе, поскольку использование НЧ для модификации стенок кварцевого капилляра и фонового электролита (**ФЭ**) может одновременно решать проблему недостаточной селективности метода КЭ по отношению к аналитам с близкими электрофоретическим подвижностями [12] и влиять на величину и направление электросмотического потока (**ЭОП**) [9, 13]. Взаимодействие НЧ, содержащих положительно заряженные ионообменные группы, с внутренней поверхностью капилляра зачастую приводит к обращению ЭОП [14], что в совокупности с реализуемым механизмом ионного обмена позволяет влиять на экспрессность и селективность разделения отрицательно заряженных аналитов. Имеются примеры применения функционализированных аммонийными группами полимерных НЧ для определения и внутрикапиллярного концентрирования неорганических анионов [14, 15], а также анионов карбоновых кислот [16]. Модификация стенок кварцевого капилляра НЧ для предотвращения сорбции белков впервые реализована в [17], где в качестве покрытия использованы полистирольные НЧ, функционализированные аминогруппами. За счет высокой удельной поверхности НЧ могут не только экранировать силанольные группы стенок капилляра, но и выступать в качестве стационарной фазы [18]. Позднее для разделения белков и катехоламинов предлагались НЧ диоксида титана [19] и оксидов металлов, функционализированных карбоксильными группами [20], латексные НЧ, функционализированные диольными группами [21] и др. Авторы данной публикации имеют опыт работы с наночастицами с гидрофобной полимерной матрицей на основе сополимера стирола и дивинилбензола, функционализированными четвертичными аммонийными группами (наноанионит, **НИА**) или же сульфогруппами (нанокатионит, **НИК**) [16]. Предложены подходы к

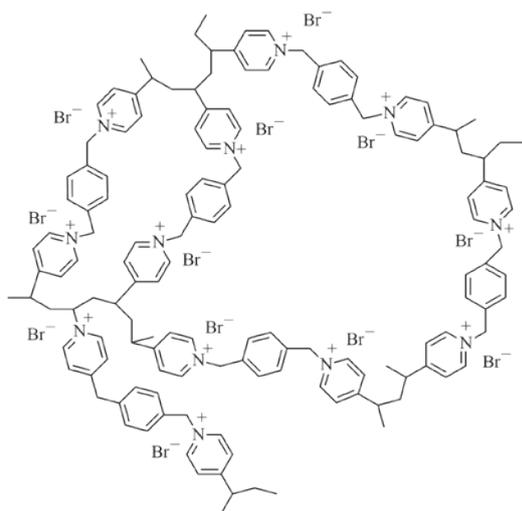


Рис. 1. Структура поли-4-винилпиридиниевых наногубок [22].

Fig. 1. Structure of poly-4-vinylpyridinium nanosponges [22].

формированию и поддержанию стабильности покрытий на основе данных НЧ. Модифицированные НИА капилляры успешно использованы для разделения неорганических анионов и анионов карбоновых кислот в режиме КЭХ с высокой эффективностью, а капилляры, покрытые НИК позволили предотвратить сорбцию катехоламинов при их электрофоретическом разделении.

В [22] описан синтез полимерных наночастиц на основе N-алкилированного 4-винилпиридина – поливинилпиридиниевые наногубки. Они спонтанно образуются при смешении растворов 4-винилпиридина и *l*-ксилилендибромида в полярном растворителе в результате алкилирования атомов азотов двух пиридиновых колец и самопроизвольной полимеризации винильных групп. Концентрация исходного раствора сомономеров определяет размеры образующихся наночастиц, а их очистка осуществляется переосаждением. Наногубки аналогично ионообменным центрами (рис. 1). При этом они более гидрофильны и характеризуются наличием внутримолекулярных полостей, потенциально доступных для проникновения низкомолекулярных соединений. Иная по сравнению с наноанионом природа ионообменных центров, а также возможность взаимодействия аналитов с полимерной матрицей позволяют предполагать иную селективность разделения. Описаны примеры стационарных фаз, содержащих пиридиновые фрагменты, в гидрофильной, ионной [23] и сверхкритической флюидной хроматографии [24], а также в условиях КЭХ, где гидрофильная монолитная фаза на основе N-алкилированного поли-4-винилпиридина с высокой плотностью положительного заряда оказалась эффективна даже при малой длине капилляра при разделении смесей нейтральных органических соединений и слабо диссоциирующих кислот [25]. В [26] обсуждаются ВЭЖХ колонки с монолитными

сорбентами на основе пористого полимера дивинилбензол–стирол с добавкой 4-винилпиридина. Тем не менее, в КЭХ возможности наногубок для разделения аналитов различной природы ранее не изучались.

Данная работа посвящена рассмотрению перспектив использования модифицированных наногубками кварцевых капилляров для электрофоретического разделения модельных смесей карбоновых кислот, аминокислот, антибиотиков фторхинолонового ряда, биогенных аминов, белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Реагенты

Концентрированная соляная кислота («Вектон»); уксусная кислота («х.ч.», «Реахим»); борная кислота («х.ч.», «Реахим»); гидроксид натрия («ч.д.а.», «Химреактив»); диэтаноламин (ДЭА) («х.ч.», «Biochem», США), диметилформамид, **ДМФА** (СК «Гранд»), бензойная кислота («ч.д.а.», «Sigma», США), ацетат аммония, ацетат натрия («Вектон»), натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты («Вектон»). Органические кислоты: молочная, щавелевая, янтарная, лимонная, яблочная и винная («х.ч.», «Реахим»). Аминокислоты: D,L-триптофан, L-тирозин, L-3,4-дигидроксибензилаланин, D,L-тирозин, L-фенилаланин; антибиотики: моксифлоксацин, спарфлоксацин, левофлоксацин; катехоламины: допамин (**DA**), эpineфрин (**E**), норметанефрин (**NM**), норэpineфрин (**NE**); белок лизоцим из куриного яичного белка (Lis, $pI = 11.0$, $M_w = 14300$ г/моль) фирмы «Sigma» (США, Германия). В качестве модификаторов электрофоретических систем изучались сверхсшитые полимерные пористые наночастицы на основе N-алкилированного поливинилпиридина (наногубки, НГ; рис. 1), синтезированные в [22]. Основные характеристики наногубок представлены в табл. 1. Для изучения размеров наночастиц использован метод динамического рассеяния света (ДРС). Эксперименты по ДРС проводили на приборе PhotoCor Complex, оснащенный HeNe лазером (длина волны 633 нм, мощность 10 мВт).

Таблица 1

Основные характеристики изучаемых поли-4-винилпиридиниевых наногубок по данным динамического светорассеяния

Table 1

Main characteristics of poly-4-vinylpyridinium nanosponges under the investigation according to the dynamic light scattering

Параметр	НГ400	НГ10
Размеры частиц (гидродинамический радиус)	8.2 – 8.6 нм	Более 99 % – 3-3.6 нм и менее 1 % – 53-61 нм
Молекулярная масса	400 кДа	10-12 кДа
Концентрация, по твердой фазе, мг/мл	24	6

1.2 Оборудование

Электрофоретические эксперименты проводили на системе КЭ «Капель-105М» со спектрофотометрическим детектором (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург). Источник света – дейтериевая лампа. Диспергирующий элемент – дифракционный монохроматор со спектральным диапазоном работы 190-380 нм. Прибор снабжен кварцевым капилляром с внешним полиимидным покрытием (внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см). Охлаждение капилляра – жидкостное с заданием и контролем температуры теплоносителя (диапазон от +10 °С до +50 °С). Способ ввода пробы: гидродинамический или электрокинетический. Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения «Эльфوران» («Люмэкс»).

1.3 Формирование покрытий стенок капилляра наногубками

Перед началом электрофоретических экспериментов кварцевый капилляр промывали дистиллированной водой (5 минут), 0.1 М раствором HCl (10 минут), затем опять водой (5 минут); 1 М раствором NaOH (60 минут) и деионизованной водой (10 минут). Варьировали время травления стенок кварцевого капилляра раствором NaOH (60 или 120 минут); способ формирования покрытия (статический или динамический); концентрацию раствора НГ400 (0.24 мкг/мл, 0.24 мг/мл и 2.4 мг/мл) и НГ10 (4 или 1 мг/мл) при динамической промывке и время промывки (5, 10, 20 или 40 минут). Избыток наночастиц из капилляра удаляли деионизованной водой (10 минут). Создаваемое покрытие контролировали по величине и направлению ЭОП (маркер – 2 %-й раствор ДМФА), который измеряли в 15 мМ ацетатно-аммонийном фоновом электролите (рН 7.7). Детектирование: прямое, 224 нм; ввод пробы гидродинамический, 2 с·30 мбар; прикладываемое напряжение: –20 кВ для модифицированного капилляра, перед модификацией ЭОП измерялся при напряжении +20 кВ; термостатирование капилляра при 20 °С. Для изучения зависимости величины ЭОП от рН фонового электролита (ФЭ) последовательно измеряли величину ЭОП в ацетатно-аммонийных ФЭ (рН 8.7; 8.5; 7.7; 6.9; 6.1; 4.9; 3.8 и 3). Все ФЭ при работе с капилляром, модифицированным НГ400, содержали наночастицы в концентрации 12 мкг/мл, в случае НГ10 – 32 мкг/мл.

1.4 Электрофоретическое разделение карбоновых кислот на капиллярах, модифицированных НГ400

Для разделения карбоновых кислот использованы ФЭ состава 10 мМ бензойной кислоты (БК), 9 мМ диэтанолamina (ДЭА), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (от 0.1 до 2 мМ) и НГ400 (1.2 мкг/мл). Концентрация модельной смеси карбоновых кислот 50 мкг/мл; ввод пробы гидродинамический, 2 с·30 мбар; напряжение -20 кВ; детектирование косвенное, 224 нм; термостатирование капилляра при 20 °С.

1.5 Электрофоретическое разделение аминокислот и антибиотиков фторхинолонового ряда на капиллярах, модифицированных НГ400

Для поиска условий разделения аминокислот (триптофана, фенилаланина, 3,4-дигидроксифенилаланина и тирозина) и антибиотиков фторхинолонового ряда (спарфлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин) варьировали природу (ацетатно-аммонийный и боратный буферные растворы) и концентрацию ФЭ (30 – 120 мМ). Все ФЭ содержали 12 мкг/мл НГ400. Концентрация модельной смеси аминокислот 50 мкг/мл; антибиотиков – 25 мкг/мл; ввод пробы гидродинамический, 2 с·30 мбар; напряжение -20 кВ; детектирование прямое, 224 нм (аминокислоты), 280 нм (антибиотики); термостатирование капилляра при 20 °С.

1.6 Электрофоретическое разделение катехоламинов и белков на капиллярах, модифицированных НГ400

При электрофоретическом разделении катехоламинов (метанефрин, норметанефрин, эпинефрин, норэпинефрин, дофамин) на модифицированных НГ400 капиллярах варьировали рН (4-6) и концентрацию (15 и 50 мМ) ацетатно-аммонийного ФЭ. Все ФЭ содержали 12 мкг/мл НГ400. Концентрация модельной смеси катехоламинов 25 мкг/мл, ввод пробы 2 с·30 мбар, напряжение -20 кВ, длина волны детектирования 224 нм. При поиске условий определения лизоцима варьировали природу (ацетатно-аммонийный или боратный буферные растворы), рН (5-8) и концентрацию ФЭ. Концентрация белка в модельной смеси 1 мг/мл, ввод пробы гидродинамический, 2 с·30 мбар; напряжение -20 кВ; детектирование прямое, 214 нм; термостатирование капилляра при 20 °С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новые гидрофильные частицы на основе поли-4-винилпиридина (наногубки – НГ) имеют пористую структуру, несут рН-независимый положительный заряд и содержат ароматические звенья. В табл. 1 представлены характеристики изучаемых наногубок с молекулярной массой 400 кДа (НГ400) и 10 кДа (НГ10). Предполагалась способность таких полимеров модифицировать стенки кварцевого капилляра с генерацией обращенного ЭОП. Алкилпиридиниевые ионообменные центры в структурах таких полимеров могли бы обеспечить реализацию ионообменного механизма при разделении анионных аналитов на капиллярах, модифицированных НГ, и повышенную селективность разделения за счет пористой структуры НГ и наличия ароматических фрагментов.

Для оценки перспектив применения модифицированных НГ капилляров в капиллярном электрофорезе выбраны карбоновые кислоты, аминокислоты, антибиотики фторхинолонового

ряда, биогенные амины, белки, различающиеся молекулярной массой, природой функциональных групп, наличием или отсутствием ароматических фрагментов в составе молекул, кислотно-основными свойствами. Такой широкий круг аналитов позволил бы найти область, где применение НГ наиболее эффективно. Однако поиску условий разделения модельных смесей аналитов на модифицированных капиллярах предшествовала предварительная оптимизация условий модификации капилляра НГ с молекулярными массами 400 и 10 кДа, а также оценка величины ЭОП и стабильности покрытий на их основе при различных значениях pH фонового электролита.

2.1 Формирование покрытий стенок кварцевого капилляра наногубками

Для подтверждения гипотезы о возможной модификации стенок кварцевого капилляра наногубками, капилляр промывали водным раствором НГ10 или НГ400, затем – деионизованной водой и далее – фоновым электролитом. О степени насыщения поверхности капилляра НГ судили по величине и направлению ЭОП. Варьировали концентрацию модифицирующего раствора (0.24 мкг/мл, 0.24 мг/мл и 2.4 мг/мл) НГ400 и время промывки. Показано, что наиболее эффективна промывка капилляра раствором модификатора с высокой концентрацией (максимальный обращенный ЭОП всего за 10 мин промывки).

На рис. 2 представлены графические зависимости величины ЭОП от времени промывки капилляра раствором модификатора (НГ10) в различных концентрациях и условиях (щелочная или нейтральная среда). Показано, что при одном и том же времени более высокая концентрация модифицирующего раствора позволяет достичь большего по модулю значения ЭОП: $\mu(\text{ЭОП}) = -3.3 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$ для раствора НГ10 с концентрацией 1 мг/мл и $\mu(\text{ЭОП}) = -4.6 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$ с концентрацией 4 мг/мл. Для достижения максимальной модификации в случае НГ10 требуется большая мольная концентрация модифицирующего раствора, что связано с меньшей молекулярной массой этих модификаторов и меньшим размером наночастиц.

Найдены условия модифицирования капилляров: для НГ400 – промывка (10 мин) раствором с концентрацией наногубок 2.4 мг/мл; создаваемая величина $\mu(\text{ЭОП}) = -4.8 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$; для НГ10 – промывка (10 мин) раствором концентрацией 4 мг/мл, $\mu(\text{ЭОП}) = -4.6 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$.

Оценку стабильности сформированных покрытий осуществляли по воспроизводимости скорости ЭОП в 15 мМ ацетатно-аммонийном фоновом электролите с pH 7.7 (табл. 2). Если в ФЭ отсутствовали частицы модификатора, наблюдалось постепенное снижение величины ЭОП, что указывало на удаление наночастиц с поверхности. При этом в случае НГ10 и НГ400 требовались разные концентрации наночастиц в

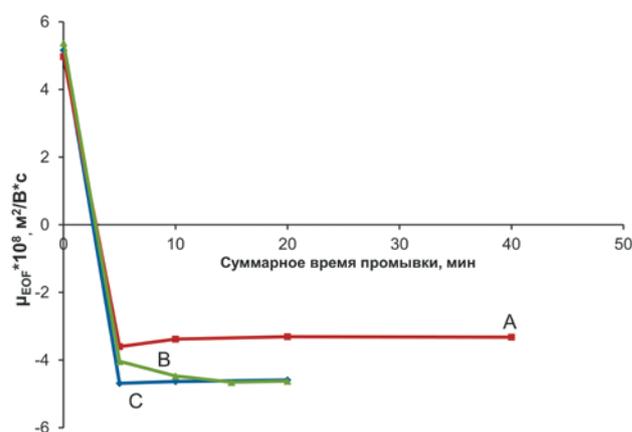


Рис. 2. Зависимость скорости ЭОП от времени модификации, концентрации и pH модифицирующего раствора. А – промывка раствором НГ10 1 мг/мл в деионизованной воде, В – 1 мг/мл в растворе 0.12 мМ NaOH, pH 9, С – 4 мг/мл в деионизованной воде. Условия: маркер ЭОП – 2%-й раствор ДМФА; ацетатно-аммонийный ФЭ, 15 мМ, pH 7.7.

Fig. 2. Dependence of EOF mobility on the modification time, concentration and pH of the modifying solution. А – rinsing with a solution of nanosponges (NS10) with the concentration of 1 mg/ml in deionized water, В – 1 mg/ml in 0.12 mM NaOH, pH 9, С – 4 mg/ml in deionized water. Conditions: electroosmotic flow (EOF) marker – 2 % dimethylformamide solution; background electrolyte based on the ammonium acetate, 15 mM, pH 7.7.

составе ФЭ: для последних – более низкие (1.2 мкг/мл), что обусловлено более прочной сорбцией высокомолекулярных НГ на стенках капилляра (табл. 2).

Величина ЭОП и ее воспроизводимость при разных значениях pH ФЭ позволяет делать заключения о состоянии поверхности модифицированного капилляра. Поскольку при отсутствии наночастиц в составе ФЭ воспроизводимость величины ЭОП недостаточна, что связано с их постепенной десор-

Таблица 2

Зависимость воспроизводимости величины ЭОП от концентрации наногубок в составе фонового электролита (в 15 мМ ацетатно-аммонийном фоновом электролите с pH 7.7)

Table 2

Dependence of EOF reproducibility on the concentration of nanosponges in the background electrolyte (background electrolyte based on the ammonium acetate, 15 mM, pH 7.7)

Капилляр, модифицированный НГ400		Капилляр, модифицированный НГ10	
Концентрация НГ400 в ФЭ, мкг/мл	СКО (n = 10), %	Концентрация НГ10 в ФЭ, мкг/мл	СКО (n = 10), %
12	0.6	32	0.4
1.2	0.8	16	2.6
0.12	5.4	4	5.2
0	6.2	0	11

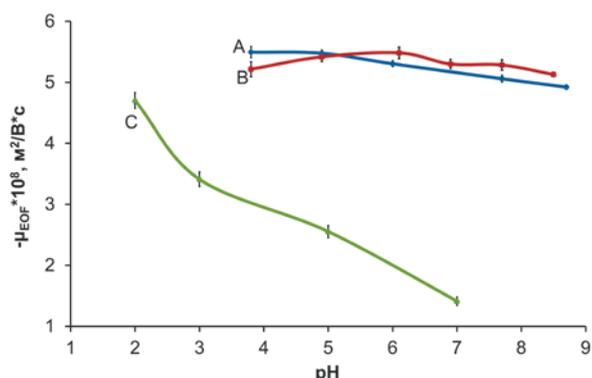


Рис. 3. Зависимость скорости ЭОП от величины pH ($P=0.95, n=5$). А – капилляр, модифицированный НГ10, В – капилляр, модифицированный НГ400, С – капилляр, модифицированный nanoанионитом (НИА). Условия для НГ-модифицированных капилляров: ацетатно-аммонийные фоновые электролиты, pH 8.7 (15 мМ), 8.5 (15 мМ), 7.7 (15 мМ), 6.9 (15 мМ), 6.1 (15 мМ), 4.9 (14 мМ) и 3.8 (14 мМ). Концентрация НГ в составе ФЭ: НГ400 – 12 мкг/мл, НГ10 – 32 мкг/мл. Детектирование: прямое, 220 нм. Ввод пробы гидродинамический, 2 с*30 мбар; -20 кВ. Условия для НИА – ацетатный буфер pH 2 (5 мМ), 3 (10 мМ), 5 (20 мМ) и 7 (40 мМ). Детектирование: прямое, 224 нм. Ввод пробы гидродинамический (маркер – 2% раствор ДМФА), 5 с*30 мбар; -20 кВ.

Fig. 3. Dependence of EOF mobility on pH ($P=0.95, n=5$). A – capillary modified with NS10, B – capillary modified with nanosponges400, C – capillary modified with nano-sized anion exchanger. Conditions for NS-modified capillaries: BGE based on the ammonium acetate, pH 8.7 (15 mM), 8.5 (15 mM), 7.7 (15 mM), 6.9 (15 mM), 6.1 (15 mM), 4.9 (14 mM) and 3.8 (14 mM). The concentration of NS in BGE: 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for NS400 and 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for NS10. Detection: direct, 220 nm. Hydrodynamic sample injection, 2 s*30 mbar; -20 kV. Conditions for nano-sized anion exchanger – acetate buffer pH 2 (5 mM), 3 (10 mM), 5 (20 mM) and 7 (40 mM). Detection: direct, 224 nm. Hydrodynamic sample injection (EOF marker – 2% dimethylformamide solution), 5 s*30 mbar; -20 kV.

бцией, при электрофоретических анализах все ФЭ содержали НГ400 (12 мкг/мл) или НГ10 (32 мкг/мл). Процесс сорбции НЧ основан преимущественно на электростатических взаимодействиях. В кислой среде диссоциация силанольных групп подавлена, что и снижает стабильность сформированных покрытий на основе наногубок в этих условиях. Установлен рабочий диапазон pH фоновых электролитов: от 4 до 9 единиц. Сопоставлены зависимости величины ЭОП от значения pH фонового электролита для капилляров, модифицированных НГ400, НГ10 и наночастицами анионита (рис. 3). Видно, что в случае НИА – сополимера стирола и дивинилбензола с четвертичными аммонийными группами – величина ЭОП снижается при увеличении pH ФЭ. Частицы НИА формируют на поверхности капилляра неплотный монослой: остаточные силанольные группы объясняют уменьшение скорости ЭОП при переходе от фонового

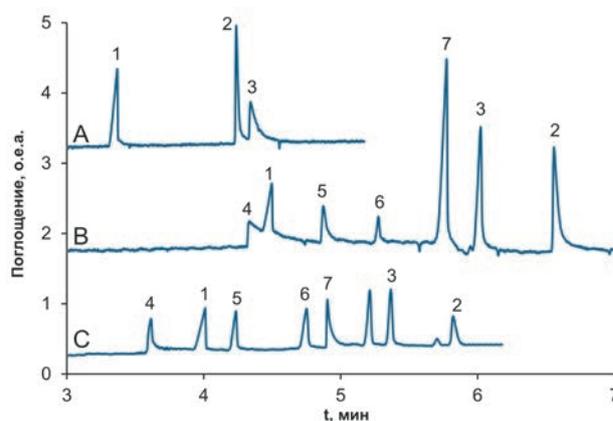


Рис. 4. Электрофореграммы модельной смеси карбоновых кислот (концентрация 50 мкг/мл) на модифицированных НГ 400 (А, В) и nanoанионитом (С) капиллярах. 1 – муравьиная, 2 – уксусная, 3 – янтарная, 4 – щавелевая, 5 – винная, 6 – яблочная, 7 – лимонная кислота. (А) ФЭ: 10 мМ БК, 9 мМ ДЭА, 1.2 мкг/мл НГ400; (В) ФЭ: 10 мМ БК, 9 мМ ДЭА, 2 мМ ЭДТА, 1.2 мкг/мл НГ400; (С) ФЭ: 10 мМ БК, 9 мМ ДЭА.

Fig. 4. Electrokinetic chromatograms of the model mixture of carboxylic acids (concentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on the modified with NS400 (A, B) and nano-sized anion exchanger (C) capillaries. 1 – formic, 2 – acetic, 3 – succinic, 4 – oxalic, 5 – tartaric, 6 – malic, 7 – citric acid. (A) BGE: 10 mM benzoic acid (BA), 9 mM diethanolamine (DEA), 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NS400; (B) BGE: 10 mM BA, 9 mM DEA, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt, 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NS400; (C) BGE: 10 mM BA, 9 mM DEA.

электролита с pH = 3 к pH = 7. Для капилляров, модифицированных НГ400, подобного эффекта не наблюдалось, что является косвенным доказательством формирования плотного слоя наночастиц на поверхности капилляра. Для капилляра, покрытого НГ10, наблюдается небольшая тенденция к увеличению обращенного ЭОП при переходе к более низким pH ФЭ, что свидетельствует о некотором количестве остаточных силанольных групп. Поскольку покрытие на основе НГ400 оказалось несколько стабильнее, дальнейшие электрофоретические эксперименты проводились с его участием.

2.2 Разделение карбоновых кислот и аминокислот на капиллярах, модифицированных НГ400

Покрытия на основе наногубок генерируют быстрый обращенный ЭОП, что открывает перспективы разделения анионных аналитов. Изучение свойств сформированных покрытий проводили с использованием модельной смеси карбоновых кислот, содержащих различное число карбокси- и гидроксигрупп (муравьиная, уксусная, янтарная, яблочная, винная, лимонная, щавелевая). Иная природа ионообменного центра по сравнению с НИА позволяла ожидать иную селективность разделения.

Фоновый электролит на основе бензойной кислоты (10 мМ бензойной кислоты и 9 мМ диэтанолamina, pH 5.2) выполнял также функцию поглощающей добавки, позволяя реализовать косвенное детектирование кислот, а диэтаноламин обеспечивал требуемый для ионизации аналитов pH [1].

Из модельной смеси карбоновых кислот на модифицированном НГ400 капилляре оказалось возможным определение муравьиной, уксусной и янтарной кислот (рис. 4, А). При таком составе ФЭ двухосновная янтарная кислота находится преимущественно в форме однозарядного аниона ($pK_{a_2} = 5.6$), а винная, яблочная, щавелевая и лимонная диссоциированы полностью ($pK_{a_2} = 4.3; 5.2; 4.3; 4.8$, соответственно). Очевидно, двухзарядные анионы слишком сильно удерживаются иммобилизованными на поверхности капилляра наногубками, тем более, что ионообменное взаимодействие происходит по всему объему этих высокопористых наночастиц. Это может приводить к сильному размыванию аналитических сигналов двухзарядных кислот при данном pH с невозможностью их детектирования.

Такой результат значительно отличается от разделения на модифицированном наноанионитом

капилляре в аналогичных условиях (рис. 4, С), что может быть объяснено разной природой ионообменных центров наноразмерных НГ и НИА. Инвертирование порядка миграции уксусной и янтарной кислот на модифицированных НИА и НГ400 капиллярах объясняется близостью значений pH ФЭ к изоэлектрической точке и вкладом двухзарядной формы кислоты во взаимодействие с ионообменными центрами модификатора. Введение в состав ФЭ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) – конкурирующего по отношению к аналитам агента (0.1–2 мМ) – могло бы повлиять на результат разделения. ЭДТА при pH фонового электролита (5.2) находится в виде двухзарядного аниона. На рис. 4, В представлены электрофореграммы смеси 7 карбоновых кислот: яблочной, янтарной, винной, уксусной, муравьиной, щавелевой, лимонной в присутствии 2 мМ ЭДТА в составе ФЭ. Начиная с концентрации ЭДТА 0.1 мМ становится возможным детектирование всех карбоновых кислот, кроме лимонной. Порядок миграции аналитов на модифицированных НИА и НГ400 капиллярах разный. При концентрации ЭДТА 2 мМ различие устраняется (рис. 4, В и С) за счет

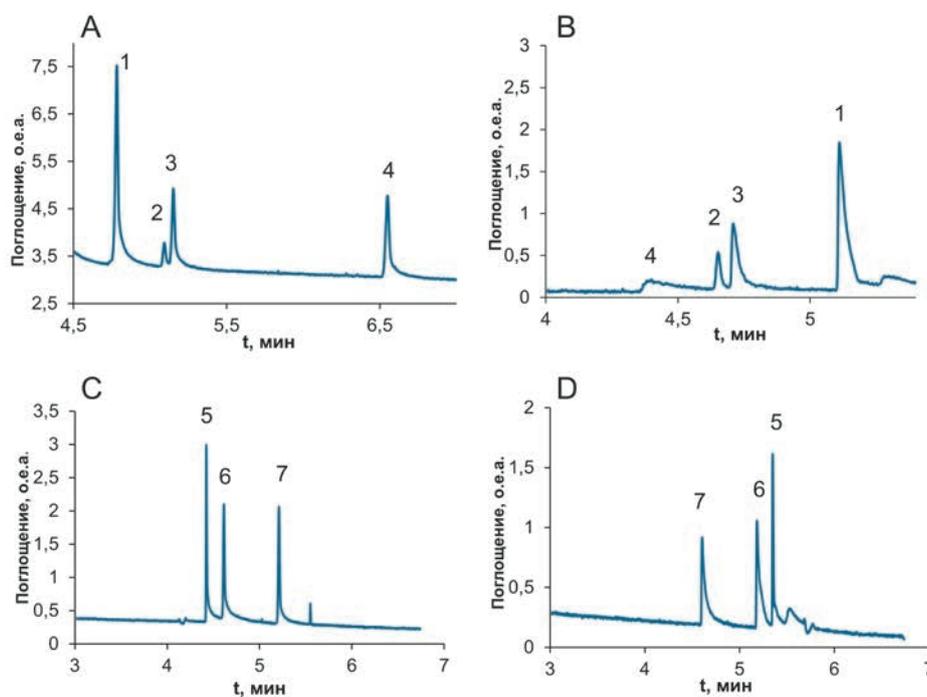


Рис. 5. Электрофореграммы модельной смеси аминокислот ($C = 50$ мкг/мл) и антибиотиков ($C = 25$ мкг/мл) на немодифицированном (А, С, соответственно) и модифицированном НГ400 (В, D, соответственно) капиллярах. 1 – триптофан, 2 – тирозин, 3 – фенилаланин, 4 – 3,4-дигидроксифенилаланин, 5 – моксифлоксацин, 6 – спарфлоксацин, 7 – левофлоксацин. (А, В) ФЭ: боратный буферный раствор, 60 мМ, pH 9 (А), в случае (В) с добавкой НГ400 12 мкг/мл. Прикладываемое напряжение (А): 20 кВ, (В): -20 кВ. (С, D) ФЭ: боратный буферный раствор 60 мМ pH 8.8 (С), в случае (D) с добавкой НГ400 12 мкг/мл. Прикладываемое напряжение (С): 20 кВ, (D): -20 кВ.

Fig. 5. Electrokinetic chromatograms of model mixtures of amino acids (concentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and antibiotics (concentration 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on unmodified (A, C, respectively) and modified with NS400 (B, D, respectively) capillaries. 1 – tryptophan, 2 – tyrosine, 3 – phenylalanine, 4 – 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5 – moxifloxacin, 6 – sparfloxacin, 7 – levofloxacin. (A, B) BGE: borate buffer solution, 60 mM, pH 9 (A), in the case of (B) with additive of NS400 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Applied voltage (A): 20 kV, (B): -20 kV. (C, D) BGE: borate buffer solution, 60 mM, pH 8.8 (C), in the case of (D) with additive of NS400 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Applied voltage (C): 20 kV, (D): -20 kV.

подавления взаимодействий карбоксильных групп с ионообменными центрами наногубок.

Карбоновые кислоты помимо недиссоциированной могут находиться только в анионной форме. Представлялось интересным выявить электрофоретическое поведение на модифицированном НГ капиллярах аналитов, содержащих в составе молекулы помимо карбоксильной группы еще и катионный центр, отталкивание которого от одноименно заряженных стенок капилляра могло бы привести к росту эффективности. В качестве таких аналитов выбраны поглощающие в УФ-области аминокислоты: триптофан (**Trp**), фенилаланин (**Phe**), 3,4-дигидроксифенилаланин (**DOPA**) и тирозин (**Tyr**). В зависимости от рН ФЭ они могут находиться в анионной, катионной или цвиттерионной формах. При поиске условий разделения варьировали концентрацию и рН боратного буферного раствора. Установлено, что разделение этих аналитов при рН ФЭ ниже 8.5 невозможно: аминокислота с наименьшей электрофоретической подвижностью – триптофан – элюируется совместно с ЭОП, что объясняется как собственной низкой электрофоретической подвижностью триптофана, так и возможным взаимодействием с наночастицами модификатора. При увеличении рН с 8.8 до 9.2 происходит снижение эффективности с 600–1000 тыс.т.т./м до 30–680 тыс.т.т./м), обусловленное возрастанием вклада анионной формы аналитов (pK_{a2} Trp – 9.4, Tyr – 9.1, Phe – 9.2, DOPA – 8.2). При значениях рН, ниже pK_{a2} аминокислот, в ионе имеются анионный и катионный центры (протонированная аминогруппа): наличие последнего компенсирует сильное взаимодействие с НГ, способствуя повышению эффективности.

Уширение пика 3,4-дигидроксифенилаланина (Рис. 5, В) обусловлено тем, что при данном значении рН (9) эта аминокислота находится в анионной форме. Для аминокислот, находящихся при таком значении рН в форме цвиттер-иона, ионообменные взаимодействия менее вероятны, и, следовательно, эффективность выше. В случае отсутствия специфических взаимодействий, аналит, для которого характерна наименьшая электрофоретическая подвижность на немодифицированном капилляре (Trp), на покрытом НГ400 капилляре будет мигрировать

последним. Таким образом, должно наблюдаться инвертирование порядка миграции аналитов. Однако из электрофореграмм (рис. 5), видно, что при переходе к модифицированному НГ400 капилляру данная зависимость нарушается для Trp и Phe. Вероятнее всего, это связано с различной возможностью этих аналитов вступать во взаимодействия с полимерной матрицей наногубок.

Таким образом, применение покрытий на основе наногубок при анализе более сложных по структуре аналитов, содержащих карбоксильные группы, для реализации ионообменного механизма на стенках капилляра ограничено: дополнительные взаимодействия аналитов с модификаторами приводят к уширению электрофоретической зоны без повышения селективности.

2.3 Разделение антибиотиков фторхинолонового ряда на модифицированных НГ400 капиллярах

Для изучения свойств покрытия на основе НГ400 реализовано разделение антибиотиков фторхинолонового ряда которые, подобно аминокислотам, могут находиться в цвиттерионной форме, но при этом характеризуются более сложной структурой и большими размерами ионов (рис. 6) а, следовательно, и с меньшей вероятностью могут включаться в поры наногубок [27].

При рН 8 фонового электролита на модифицированном НГ400 капилляре наименее подвижный аналит – моксифлоксацин – мигрирует совместно с ЭОП. При увеличении рН ФЭ до 8.8 собственной электрофоретической подвижности моксифлоксацина достаточно для возможности его детектирования. При этом значении рН эффективность для лево- и спарфлоксацина меньше, чем в случае моксифлоксацина практически на порядок (260-320 тыс.т.т./м против 2600 тыс.т.т./м) (рис. 5, D). Вероятнее всего, такие отличия объясняются различной аналитической формой разделяемых соединений при данном значении рН: меньшая эффективность характерна для антибиотиков, которые при рН 8.8 находятся в анионной форме, а наибольшая – соответствует аналиту в цвиттерионной форме (pK_{a2} моксифлоксацина – 9.3). По сравнению с немодифицированным

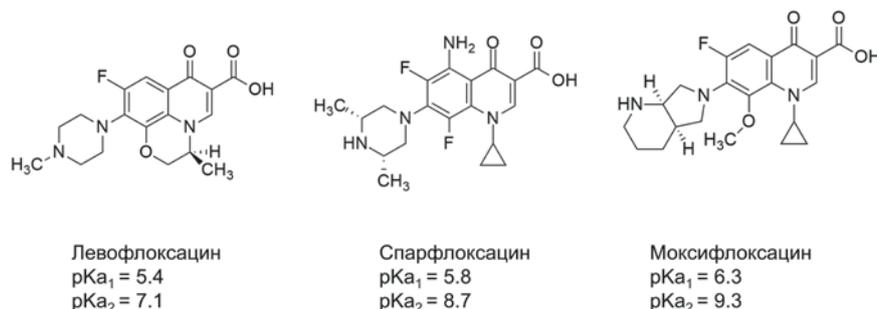


Рис. 6. Структуры и константы диссоциации рассматриваемых аналитов – антибиотиков фторхинолонового ряда [27].

Fig. 6. Structures and dissociation constants of the analytes – fluoroquinolone antibiotics [27].

капилляром наблюдается инвертирование порядка миграции аналитов, что связано с обращением ЭОП. Селективность разделения при этом сохраняется. Таким образом, модификатор выполняет только функцию обращающего ЭОП агента.

2.4 Разделение катионных аналитов на капиллярах с НГ400

На примере карбоновых кислот, аминокислот и антибиотиков фторхинолонового ряда рассмотрена возможность использования наногубок в качестве обращающих ЭОП агентов, способных влиять на эффективность и селективность разделения аналитов в условиях капиллярной электрохроматографии. Стенки капилляров, модифицированные НГ, заряжены положительно, что открывает перспективы повышения эффективности при электрофоретическом разделении склонных к сорбции катионных аналитов – катехоламинов и белков.

При поиске условий разделения катехоламинов варьировали природу, рН и ионную силу фонового электролита. Установлено, что использование покрытых НГ400 капилляров позволяет предотвратить сорбцию катехоламинов (эпинефрин, норэпинефрин, дофамин, метанефрин, норметанефрин) с максимальной достигаемой эффективностью 300 тыс.т.т./м. Однако собственное поглощение полимерной матрицы наночастиц не обеспечивает снижения пределов обнаружения аналитов при использовании внутрикапиллярного концентрирования до требуемых при анализе биологических жидкостей значений. Тем не менее, полученные для катехоламинов результаты разделения позволили перейти к высокомолекулярным соединениям – белкам. В качестве модельного выбран

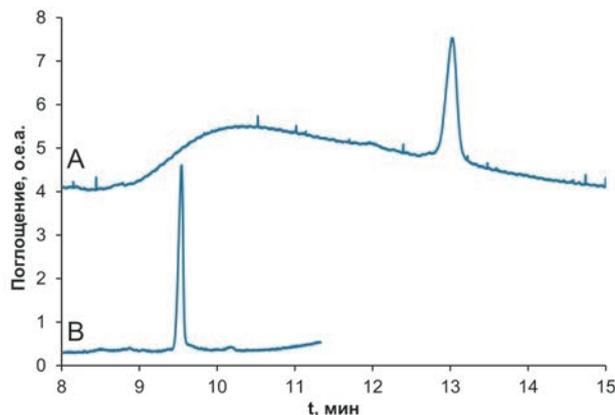


Рис. 7. Электрофореграммы белка лизоцима (концентрация лизоцима в модельном растворе 1 мг/мл) на капилляре, модифицированном НГ400. А – ацетатно-аммонийный фоновый электролит, 50 мМ, рН 5 с добавкой НГ400 12 мкг/мл; В – боратный буферный раствор, 90 мМ, рН 8.5 с добавкой НГ400 12 мкг/мл.

Fig. 7. Electrokinetic chromatograms of lysozyme (lysozyme concentration in the model solution is 1 mg/ml). А – BGE: ammonium acetate, 50 mM, pH 5 with additive of NS400 12 µg/ml; В – BGE: borate buffer solution, 90 mM, pH 8.5 with additive of NS400 12 µg/ml.

белок лизоцим – индикатор протективных свойств слюны при различных патологических процессах. Он характеризуется высокой изоэлектрической точкой ($pI = 11.0$) и во всем диапазоне стабильности покрытия (от 4 до 9 единиц рН) находится в катионной форме. Испытаны ацетатно-аммонийные и боратные фоновые электролиты (рис. 7). Переход от ацетатного к боратному ФЭ сопровождается повышением эффективности пика лизоцима. Карбоксильные группы в составе белковых молекул могут взаимодействовать с ионообменными центрами модификаторов, при этом двухзарядный борат-анион препятствует такому взаимодействию более эффективно по сравнению с однозарядным ацетат-ионом, что приводит к лучшей эффективности. Найдены следующие условия анализа: 90 мМ боратный буферный раствор (рН 8.5) с добавкой в фоновый электролит НГ400 12 мкг/мл, при которых эффективность максимальна. Определение лизоцима на капилляре в отсутствие модификатора невозможно из-за сильной сорбции белка на его стенках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены возможности применения гидрофильных поли-4-винилпиридиниевых наногубок в качестве модификаторов стенок кварцевого капилляра. Предложены условия формирования и обеспечения стабильности покрытий на основе НГ400 и НГ10. Предлагаемые подходы характеризуются экспрессностью, диапазон рабочих значений рН фоновых электролитов на таких капиллярах 4 - 9.

Для выявления возможностей применения модифицированных наногубками капилляров рассмотрены особенности электрофоретического разделения карбоновых кислот, аминокислот и антибиотиков фторхинолонового ряда. Показано, что для таких цвиттерионных соединений как аминокислоты и антибиотики фторхинолонового ряда, эффективность выше, если определяемый аналит находится в цвиттерионной форме за счет отталкивания катионного центра от одноименно заряженных стенок капилляра.

На примере биогенных аминов и белка лизоцима показана возможность сформированного на основе НГ400 покрытия препятствовать сорбции основных аналитов в процессе их электрофоретического разделения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-03-01282 и 18-33-01091. Исследования проведены с использованием оборудования Ресурсного Образовательного Центра по направлению химия, Научный парк СПбГУ.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the financial support provided by the Russian Foundation for Basic Research,

no. 17-03-01282 and 18-33-01091. The research was performed at the Chemistry Educational Center, Research Park, Saint Petersburg State University.

ЛИТЕРАТУРА

- Shallan A., Guijt R., Breadmore M. Capillary Electrophoresis: Basic Principles // *Encyclopedia of Forensic Sciences, Second Edition*, Elsevier Ltd, 2013. P. 549-559.
- Stutz H. Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE // *Electrophoresis*. 2009. V. 30. P. 2032-2061.
- Bessonova E., Kartsova L., Gallyamova, V. Ionic liquids based on imidazole for online concentration of catecholamines in capillary electrophoresis // *J. Sep. Sci.* 2017. V. 40. P. 2304-2311.
- Lucy C. A., MacDonald A. M., Gulcev, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1184. P. 81-105.
- Dynamic Coating Agents in CE / J. Znalezionia [et al.] // *Chromatographia*. 2008. V. 67, P. 5-12.
- Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE / R. Nehme [et al.] // *Electrophoresis*. 2009. V. 30. P. 1888-1898.
- Dendritic glycopolymers as dynamic and covalent coating in capillary electrophoresis: View on protein separation processes and detection of nanogram-scaled albumin in biological samples / N. Polikarpov [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1378. P. 65-73.
- New Approach to the Formation of Physically Adsorbed Capillary Coatings Consisting of Hyperbranched Poly(Ethylene Imine) with a Maltose Shell to Enhance the Separation of Catecholamines and Proteins in CE / D. Dzema [et al.] // *Chromatographia*. 2017. V. 80. P. 1683-1693.
- Zarei M. Nanoparticle improved separations: From capillary to slab gel electrophoresis // *TrAC*, 2017. V. 86. P. 56-74.
- Duan, A.-H. Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations // *TrAC*. 2011. V. 30, P. 484-491.
- Nanomaterials as stationary phases and supports in liquid chromatography / S. Beeram [et al.] // *Electrophoresis*. 2017. V. 38. P. 2498-2512.
- Preparation and characterization of lysine-immobilized poly(glycidyl methacrylate) nanoparticle-coated capillary for the separation of amino acids by open tubular capillary electrochromatography / L. Xu [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2014. V. 1323. P. 179-183.
- Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography / W. Hu [et al.] // *TrAC*. 2014. V. 61. P. 29-39.
- Preparation and application of trimethylamine amination polychloromethyl styrene nanolatex coated capillary column for the determination of bromate by field-amplified sample stacking open-tubular capillary electrochromatography / Y. Guo [et al.] // *Electrophoresis*. 2013. V. 34. P. 1312-1318.
- Latex-Coated Polymeric Monolithic Ion-Exchange Stationary Phases. 1. Anion-Exchange Capillary Electrochromatography and In-Line Sample Preconcentration in Capillary Electrophoresis / J. Hutchinson [et al.] // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 407-416.
- Nano-sized anion-exchangers as a stationary phase in capillary electrochromatography for separation and on-line concentration of carboxylic acids / D. Polikarpova [et al.] // *Talanta*. 2018. V.188. P. 744-749.
- Capillary electrophoresis of peptides and proteins fused-silica capillaries coated with derivatized polystyrene nanoparticles / G. Kleindienst [et al.] // *Electrophoresis*. 1998. V. 19. P. 262-269.
- Hajba L., Guttman A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins // *TrAC*. 2017. V. 90. P. 38-44.
- Titanium dioxide nanoparticles-coated column for capillary electrochromatographic separation of oligopeptides / Y.-L. Hsieh [et al.] // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. P. 4089-4097.
- Carboxyl modified magnetic nanoparticles coated open tubular column for capillary electrochromatographic separation of biomolecules / W.T. Wang [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2015. V. 1411. P. 92-100.
- CE coupled to MALDI with novel covalently coated capillaries / S. Bachmann [et al.] // *Electrophoresis*. 2010. V. 31. P. 618-629.
- Наногубки как продукты реакции N-алкилирования 4-винилпиридина и поли-4-винилпиридинов в разбавленных растворах / Л.А. Павлова [и др.] // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*. 2013. Т. 55, № 10. С. 1263-1273.
- Takeuchi T., Kawasaki T., Lim L.W. Separation of Inorganic Anions on a Pyridine Stationary Phase in Ion Chromatography // *Anal. Sci.* 2010. V. 26. P. 511-514.
- Poly(4-vinylpyridine) based novel stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions / K. Nagai [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2018. V. 1572. P. 119-127.
- Маерле К.В., Павлова Л.А., Даванков В.А. Изучение свойств монолитных колонок на основе 4-винилпиридина и 1,4-бис-(бромметил)-бензола в условиях капиллярной электрохроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9. № 4. С. 469-476.
- Patrushev Y., Yudina Y., Sidelnikov V. Monolithic rod columns for HPLC based on divinylbenzene-styrene copolymer with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine // *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2018. V. 41. P. 458-466.
- He K., Blaney L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater // *J. Hazard. Mater.* 2015. V. 282. P. 96-105

REFERENCES

- Shallan A., Guijt R., Breadmore M. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. *Encyclopedia of Forensic Sciences, Second Edition*, 2013, pp. 549-559. doi: 10.1016/B978-0-12-382165-2.00241-5.
- Stutz H. Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, no. 12, pp. 2032-2061. doi:10.1002/elps.200900015
- Bessonova E., Kartsova L., Gallyamova V. Ionic liquids based on imidazole for online concentration of catecholamines in capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, 2017, vol. 40, no. 10, pp. 2304-2311. doi:10.1002/jssc.201601394.
- Lucy C. A., MacDonald A. M., Gulcev, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1184, no. 1-2, pp. 81-105. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.114.
- Znalezionia J., Petr J., Knob R., Maier V., Sevcik J. Dynamic Coating Agents in CE. *Chromatographia*, 2008, vol. 67, pp. 5-12. doi:10.1365/s10337-007-0509-y.
- Nehme R., Perrin C., Cottet H., Blanchin M.-D., Fabre H. Influence of polyelectrolyte capillary coating conditions on protein analysis in CE. *Electrophoresis*, 2009, vol. 30, pp. 1888-1898. doi: 10.1002/elps.200800688.

7. Polikarpov N., Potolytsyna V., Bessonova E., Tripp S., Appelhans D., Voit B., Kartsova L. Dendritic glycopolymers as dynamic and covalent coating in capillary electrophoresis: View on protein separation processes and detection of nanogram-scaled albumin in biological samples. *J. Chromatogr. A*, 2015, vol. 1378, pp. 65–73. doi: 10.1016/j.chroma.2014.11.051.
8. Dzema D., Kartsova L., Kapizova D., Appelhans D. New approach to the formation of physically adsorbed capillary coatings consisting of hyperbranched poly(ethylene imine) with a maltose shell to enhance the separation of catecholamines and proteins in CE. *Chromatographia*, 2017, vol. 80, no. 11, pp.1683–1693. doi:10.1007/s10337-017-3390-3.
9. Zarei M., Ghasemabadi M. Nanoparticle improved separations: From capillary to slab gel electrophoresis. *TrAC*, 2017, vol. 86, pp. 56-74. doi: 10.1016/j.trac.2016.11.004.
10. Duan A., Xie S., Yuan L. Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations. *TrAC*, 2011, vol. 30, pp. 484-491. doi: 10.1016/j.trac.2011.01.007.
11. Beeram S. R., Rodriguez, E., Doddavenkatanna S., Li Z., Pekarek A., Peev D., Goerl K., Trovato G., Hofmann T., Hage D. S. Nanomaterials as stationary phases and supports in liquid chromatography. *Electrophoresis*, vol. 38, no. 19, pp. 2498–2512. doi:10.1002/elps.201700168.
12. Xu L., Cui P., Wang D., Tang C., Dong L., Zhang C., Duan H., Yang V. C. Preparation and characterization of lysine-immobilized poly(glycidyl methacrylate) nanoparticle-coated capillary for the separation of amino acids by open tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, vol. 1323, pp. 179–183. doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.093.
13. Hu W., Hong T., Gao X., Ji Y. Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography. *TrAC*, 2014, vol. 61, pp. 9-39. doi: 10.1016/j.trac.2014.05.011.
14. Guo Y., Xu F., Meng L., Tang W., Xia Y., Wu Y., Zhang S. Preparation and application of trimethylamine amination polychloromethyl styrene nanolatex coated capillary column for the determination of bromate by field-amplified sample stacking open-tubular capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 2013, vol. 34, pp. 1312-1318. doi: 10.1002/elps.201200541.
15. Hutchinson J. P., Zakaria P., Bowie A. R., Macka M., Avdalovic N., Haddad P. R. Latex-Coated Polymeric Monolithic Ion-Exchange Stationary Phases. 1. Anion-Exchange Capillary Electrochromatography and In-Line Sample Preconcentration in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, no. 2, pp. 407–416. doi:10.1021/ac048748d
16. Polikarpova D., Makeeva D., Kartsova L., Dolgonosov A., Kolotilina N. Nano-sized anion-exchangers as a stationary phase in capillary electrochromatography for separation and on-line concentration of carboxylic acids. *Talanta*, 2018, vol. 188, pp. 744-749. doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.094.
17. Kleindienst G., Huber C., Gjerde D., Yengoyan L., Bonn G. Capillary electrophoresis of peptides and proteins fused-silica capillaries coated with derivatized polystyrene nanoparticles. *Electrophoresis*, 1998, vol. 19, pp. 262–269. doi: 10.1002/elps.1150190220.
18. Hajba L., Guttman A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *TrAC*, 2017, vol. 90, pp. 38–44. doi: 10.1016/j.trac.2017.02.013.
19. Hsieh Y.-L., Chen T.-H., Liu C.-P., Liu C.-Y. Titanium dioxide nanoparticles-coated column for capillary electrochromatographic separation of oligopeptides. *Electrophoresis*, 2005, vol. 26, pp. 4089–4097. doi: 10.1002/elps.200500462.
20. Wang W.T., Xiao X., Chen J., Jia L. Carboxyl modified magnetic nanoparticles coated open tubular column for capillary electrochromatographic separation of biomolecules. *J. Chromatogr. A*, 2015, vol. 1411, pp. 92-100. doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.111
21. Bachmann S., Vallant R., Bakry R., Huck C., Corradini D., Bonn G. CE coupled to MALDI with novel covalently coated capillaries. *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, pp. 618–629. doi: 10.1002/elps.200900507.
22. Pavlova L.A., Davankov V.A., Timofeeva G.I., Il'in M.M. (jr), Bladodatskih I.V., Sinitsyna O.V., Matveev V.V., Chalykh A.E. [Nanosponges as products of 4 - vinylpyridine and poly-4-vinylpyridines N-alkylation in diluted solutions] // *Vysokomolekuliarnye soedineniia, Seriya A* [Polymer Science Series A], 2013, vol. 55, no. 10, pp. 1263–1273. doi: 10.7868/S0507547513090067 (in Russian).
23. Takeuchi T., Kawasaki T., Lim L.W. Separation of inorganic anions on a pyridine stationary phase in ion chromatography. *Anal. Sci.*, 2010, vol. 26, pp. 511-514.
24. Nagai K., Shibata T., Shinkura S., Ohnishi A. Poly(4-vinylpyridine) based novel stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions. *J. Chromatogr. A*, 2018, vol. 1572, pp. 119–127. doi: 10.1016/j.chroma.2018.08.038.
25. Maerle K.V., Pavlova L.A., Davankov V.A. [Investigation of properties of monolithic columns based on 4-vinylpyridine and 1,4-bis- (bromomethyl) -benzene in capillary electrochromatography]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and chromatographic processes], 2009, vol. 9, no. 4, pp. 469-476 (in Russian).
26. Patrushev Y., Yudina Y., Sidelnikov V. Monolithic rod columns for HPLC based on divinylbenzene-styrene copolymer with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 2018, vol. 41, pp. 458–466. doi:10.1080/10826076.2018.1455149.
27. He K., Blaney L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. *J. Hazard. Mater.*, 2015, vol. 282, pp. 96–105. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.027.