МЕТОД КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА: БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ

УДК: 542.07, 542.8
ВАК: 02.00.03

Карцова Л.А., д.х.н., **Макеева Д.В.**, к.х.н.,
Санкт-Петербургский государственный университет, kartsova@gmail.com

Биомедицина – одно из наиболее динамично развивающихся направлений медицины, связанных с диагностикой. Метод капиллярного электрофореза (КЭ) широко используется для выявления различных заболеваний. Важной областью применения КЭ стала фармацевтика, в особенности оценка энантиочистоты лекарственных препаратов. Достоинства электрофоретического метода включают широкие возможности автоматизации и миниатюризации анализа, использование небольших объемов образцов (несколько нл), совместимость с масс-спектрометрическим детектированием, а также доступность оборудования и расходных материалов. В данном обзоре обобщены сферы применения КЭ в биомедицине, включая протеомные и метаболомные исследования, а также рассмотрены основные перспективы метода с точки зрения предельной миниатюризации и автоматизации энантиомерного анализа, в том числе использования достижений микроэлектроники и микрофлюидных систем.

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) является мощным аналитическим инструментом, который продолжает активно развиваться. Предложены принципиально новые подходы к анализу биологических объектов, представляющих собой смеси со сложной матрицей [1–8]. Электрофоретический анализ – "золотой стандарт" в клинической, токсикологической и судебно-медицинской экспертизе для исследования образцов мочи, сыворотки и плазмы крови. В последнее время он также востребован для таких биологических жидкостей, как грудное молоко, слюна, амниотическая и спинномозговая жидкости и др.

Метод КЭ широко используется в целях диагностики различных заболеваний: микроальбуминурии, болезни Паркинсона и Альцгеймера, феохромоцитомы и нейробластомы, мочекаменной болезни и т.д. Определение отношения концентраций γ-аминомасляной (ГАМК) и глутаминовой кислот в спинномозговой жидкости методом КЭ с детектором лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ-детектором) является независимым диагностическим критерием болезни Альцгеймера и других неврологических заболеваний. Электрофоретическое определение оксалата и цитрата в моче позволяет оценивать оксалатный нефролитиаз. Методами КЭ проводят анализ клеточного метаболизма и отдельных клеток. Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) является перспективным при разделении различных моноклональных антител (mAb). Важной областью применения КЭ стала фармацевтика (50% всех работ в КЭ), особенно оценка энантиочистоты лекарственных препаратов.

Отличительной особенностью электрокинетического разделения является возможность применения нескольких режимов к одному и тому же образцу в зависимости от природы целевых соединений. Так, для электрофоретического определения анионных соединений в основном требуются либо щелочные условия для создания быстрого электроосмотического потока (ЭОП), либо модификатор стенок капилляров для формирования обращенного ЭОП и ускорения движения анионов в направлении детектора. Катионные соединения в большинстве случаев нуждаются в нанесении покрытий на внутренние стенки кварцевого капилляра для устранения сорбции аналитов.

Сложность биологических объектов способствовала развитию многомерной капиллярной электрохроматографии (КЭХ) для разделения аналитов различной природы. Создание двумерных систем КЭХ-КЭХ или ВЭЖХ-КЭХ обеспечивает идеальные профили потоков, позволяя повысить эффективность и уменьшить время разделения при малых объемах пробы. Благодаря возможности онлайн-соединения ВЭЖХ и КЭ разработана система ВЭЖХ-КЗЭ-МС. Для быстрого, чувствительного и энантиоселективного анализа сложных биологических образцов с низким содержанием метаболитов требуются новые стратегии объединения предварительной обработки проб с последующим разделением и идентификацией компонентов в едином формате, где капилляр, например, может выполнить функцию химического реактора, обеспечив при этом концентрирование, дериватизацию и, если потребуется, хиральное разделение. Возможность внутрикапиллярного концентрирования,

DOI: 10.32757/2619-0923.2023.2.24.32.46

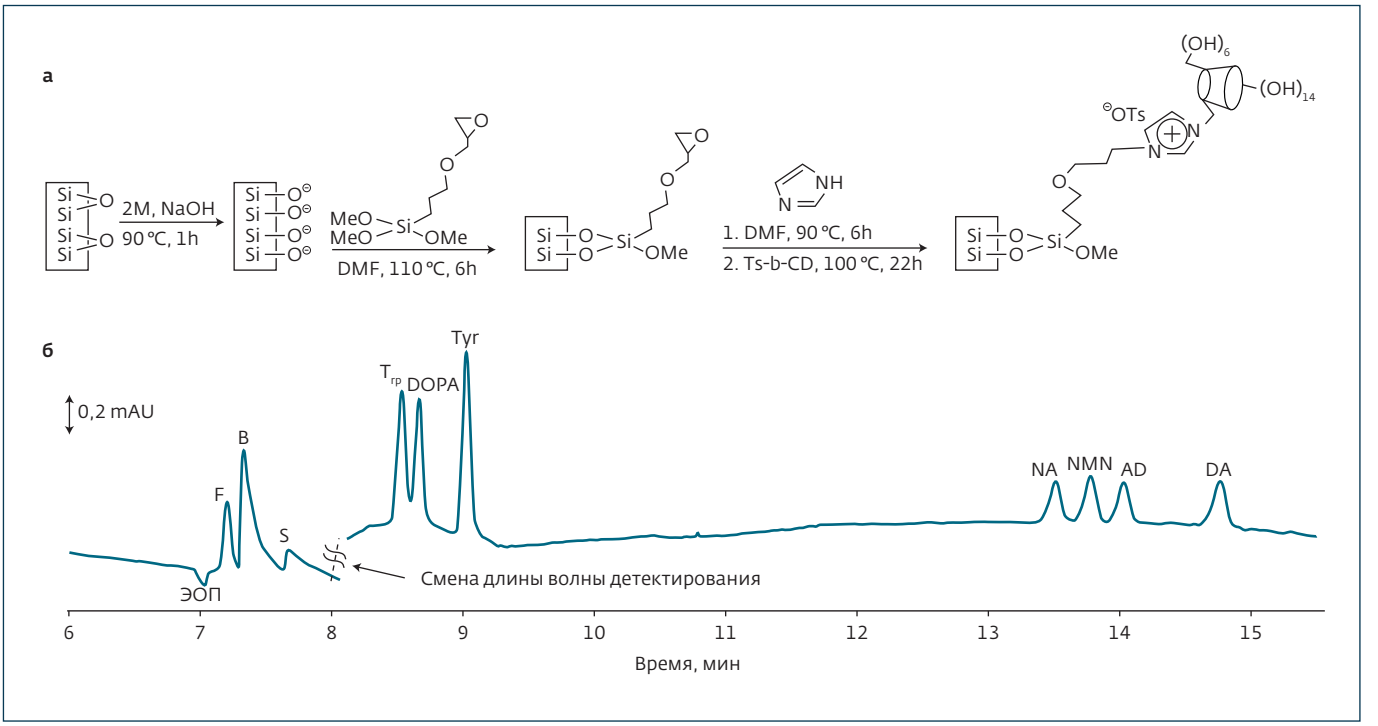

Рис.1. *Схема формирования ковалентного мультифункционального покрытия стенок кварцевого капилляра на основе имидазола и в-ЦД (а). Электрофореграмма одновременного разделения гидрофобных (стероидные гормоны) и гидрофильных аналитов (аминокислоты и биогенные амины) (б). Условия: 10 мМ NaH_2PO_4, доведенный до pH 2,0, 0,1 М HCl, с ковалентным покрытием на основе имидазола и в-ЦД, ввод пробы 2 с×30 мбар; –20 кВ; длина волны: 254 нм (1–8 мин) и 220 нм (8–15 мин), давление: 0 мбар (1–10 мин) и 40 мбар (10–15 мин). Модельная смесь: кортикостерон (B), кортизол (F), 11-дезоксикортизол (S) – 5 мкг/мл; L-триптофан (Trp), 3,4-дигидрокси-L-фенилаланин (ДОФА) – 10 мкг/мл; L-тирозин (Tyr) – 5 мкг/мл; норадреналин (NA), норметанефрин (NMN), адреналин (AD), дофамин (DA) – 20 мкг/мл*

не прерывающего процесса электрофоретического разделения, – одно из главных достоинств метода капиллярного электрофореза, что позволяет значительно снижать пределы обнаружения (ПО) аналитов до значений, достаточных для их определения в реальных объектах.

В настоящее время используется большое число разнообразных подходов к электрофоретическому анализу биологических объектов со сложной матрицей. Например, при реализации режима in-line устройство для предварительной подготовки образца соединяется с системой КЭ посредством специального интерфейса до ввода пробы. В случае режима on-line обработка и концентрирование происходят непосредственно внутри капилляра во время или после введения анализируемой пробы.

Использование гибридных методов концентрирования биологически активных аналитов способствует более широкому внедрению в практику фармакологических и биомедицинских лабораторий различных вариантов электрофоретического метода. В [9] найдены решения внутрикапиллярного концентрирования стероидных гормонов, катехоламинов, аминокислот и лекарственных препаратов в биологических жидкостях (плазма крови, моча) с применением соединений на основе имидазолиевого катиона в качестве модификаторов электрофоретической системы (рис.1). Они обеспечивают формирование стационарной и псевдостационарной фаз с реализацией режимов мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) и капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Предложенный авторами гибридный подход внутрикапиллярного концентрирования – сочетание свипинга и электростэкинга – обеспечил снижение ПО биогенных аминов до 0,5 пг/мл.

В другой работе этих же авторов предложен гибридный вариант онлайн-концентрирования (свипинг в сочетании с градиентом pH) энантиомеров нестероидных противовоспалительных препаратов, позволивший сконцентрировать их в 290–390 раз и снизить ПО до 12– 55 нг/мл [10].

При определении методом КЭ-УФ биологически активных аналитов, не содержащих хромофорные группы, крайне полезным может оказаться использование процессов комплексообразования и/или внутрикапиллярной дериватизации. Так, в [11] предложен вариант электрофо-

ретического анализа смеси нативных аминокислот (АК) с применением фонового электролита, содержащего ионы Cu^{2+}. Детектирование обеспечено образованием комплексов "Cu^{2+}–АК", поглощающих в УФ-области спектра. Ионы Cu^{2+} выступают в качестве координационного центра, а аминокислоты – бидентантного лиганда с участием карбоксильной и аминогрупп. Предлагаемый вариант не требует стадии дериватизации, не нуждается в применении дорогостоящих сорбентов и характеризуется простотой и быстротой проведения анализа. Показана возможность применения данного подхода для исследования образцов культуральных жидкостей при создании клеточной модели неалкогольной жировой болезни печени, а также для анализа аминокислотного метаболизма клеток [12].

Сочетание предварительного концентрирования с химической дериватизацией в КЭ представляет собой уникальную платформу для быстрого, чувствительного и энантиоселективного анализа метаболитов в сложных биологических образцах. Реализация внутрикапиллярной дериватизации способствует снижению времени анализа и требует незначительного расхода реагентов и образцов, разбавление которых сводится к минимуму. На процессы онлайн-концентрирования и степень конверсии оказывают влияние ионная сила, pH фонового электролита (ФЭ) и раствора пробы, концентрация дериватизирующего реагента и длина зоны вводимого образца. Одностадийная стратегия интеграции предварительного электрофоретического концентрирования аналитов в режиме онлайн с последующей дериватизацией продемонстрирована в условиях КЭ с УФ-детектированием для субмикромолярного обнаружения метаболитов, у которых отсутствуют собственные хромофоры. Наряду с увеличением чувствительности детектирования стадия дериватизации позволяет регулировать селективность, изменять гидрофобность в условиях МЭКХ, превращать энантиомеры в диастереомеры, которые далее разделяются в ахиральных условиях, и создавать благоприятные свойства для масс-спектрометрического детектирования. При этом буферный раствор, проба и реагент могут вводиться в капилляр в разных режимах – тандем, сэндвич и смешанный тандем (реагент-буфер-образец). Подобная методология получила название single-step SPCD-CE (sample preconcentration with chemical derivatization). Режим SPCD-CE обеспечивает высокопроизводительный скрининг аналитов при метаболомных исследованиях.

Ключом к успешной интеграции является совместимость динамического pH-скачка с химической дериватизацией. Концентрирование в режиме онлайн с помощью динамического pH-скачка является эффективным способом повышения чувствительности слабоионных метаболитов. Локальное изменение значений pH в капилляре приводит к формированию области с низкой проводимостью внутри зоны пробы, что важно при анализе таких объектов, как плазма крови и микродиализат. В этом случае фоновый электролит (ФЭ) содержит соль слабой кислоты (для определения катионов) или основания (для определения анионов). Раствор пробы с высокой проводимостью электрокинетически вводится в капилляр, что обеспечивает замену анионов/катионов пробы на анионы/катионы ФЭ, затем электрокинетически вводится сильная кислота или основание, что приводит к нейтрализации раствора пробы и снижению его проводимости. В результате в зоне пробы образуется область с высоким электрическим полем, под действием которого ионы аналитов ускоряются и концентрируются. Этот подход применялся к образцам со сложной матрицей для чувствительного и энантиоселективного анализа бактериальных биомаркеров и высокопроизводительного скрининга аминокислот, аминосахаров и других органических производных аминов на субмикромолярном уровне. Получение производных в режиме реального времени в КЭ может быть выполнено, когда реагент вводится в виде концентрированной пробы и мигрирует через медленно движущуюся зону аналита. Требуются всего лишь несколько нанолитров реагента без изменения объемных свойств фонового электролита. Так, дериватизация ортофталевым альдегидом (ОФА) в сочетании с хиральной тиольной компонентой N-ацетил-1-цистеином (NAC) приводит к образованию стабильных изоиндольных аддуктов с различными метаболитами аминосахаров и аминокислот [13–16]. Предложенный вариант внутрикапиллярной дериватизации с последующим электрофоретическим разделением энантиомеров аминокислот был востребован при определении внеклеточных метаболитов Escherichia coli (E. Coli). Используемые в качестве реагентов N-ацетил-L-цистеин и ортофталевый альдегид вводили в капилляр до и после введения образца (рис.2). Синтезированные в режиме реального времени аддукты показали различную электрофоретическую подвижность, что позволило выполнить целевой метаболический анализ бактериальных биомаркеров, связанных с биосинтезом клеточной стенки, для раннего обнаружения бактериального загрязнения, с определением внеклеточных D-аминокислот в сложных бульонных средах культур E. Coli. Добавка β-циклодекстрина (β-ЦД) в фоновый электролит способствовала повышению энантиоселективности.

Таким образом, SPCD-CE капилляр может одновременно выполнить три основные функции: преконцентратор, микрореактор и хиральный селектор, обеспечивая при этом 200-кратное повышение чувствительности и сокращение общего времени анализа.

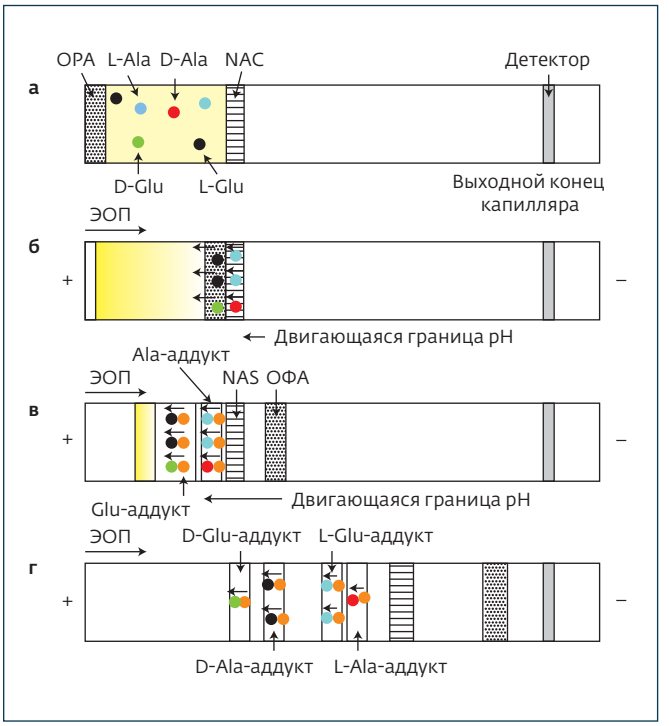

Рис.2. *Схематическое изображение основных этапов внутрикапиллярной дериватизации аминокислот: а – последовательный гидродинамический ввод растворов N-ацетил-L-цистеина (NAC), образца и о-фталевого альдегида (OPA); б – онлайн-концентрирование аминокислот; в – внутрикапиллярная дериватизация, происходящая при смешении зон OPA и NAC с зоной пробы; г – хиральное разделение диастереомерных аддуктов разделяемых аминокислот*

ХИРАЛЬНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ В УСЛОВИЯХ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Определение изомерного состава относится к наиболее трудным видам анализа, в особенности для энантиомеров, которые имеют одинаковый состав и последовательность связывания атомов в молекуле, но отличаются друг от друга относительным расположением в пространстве, то есть конфигурацией. Энантиомеры обладают одинаковыми физическими и химическими свойствами (температурой кипения, температурой плавления, растворимостью, электропроводностью и др.), но в зависимости от ориентации заместителей вокруг асимметричного атома углерода по-разному реагируют с другими хиральными соединениями – этим объясняется их различие в физиологическом действии. Толчком к развитию энантиомерного анализа послужило то, что энантиомеры сильнодействующих лекарственных препаратов обладают разной биологической активностью и токсичностью. Например, бактерицидная активность левовращающей формы левомицетина в 50 раз превышает активность правовращающей формы. Другим примером является кетопрофен: левовращающий R-энантиомер лишен обезболивающей и противовоспалительной активности, при этом он токсичен, повышает риск желудочно-кишечных осложнений. Напротив, правовращающий S-кетопрофен или декскетопрофен (Дексалгин) является мощным анальгетиком с высокой противовоспалительной активностью и сниженной токсичностью. Помимо этого, один и тот же хиральный селектор в зависимости от того, где он сосредоточен, может вызвать разный порядок элюирования двух энантиомеров.

Электромиграционные методы энантиомерного анализа уступают ВЭЖХ по воспроизводимости, но они обеспечивают большой выигрыш в сокращении времени анализа и его эффективности [17]. Электрофоретическая подвижность ионов энантиомеров резко увеличивает потенциальные возможности разделительной техники. В электрофоретических системах необходимо учитывать и то обстоятельство, что аналит и его комплекс с хиральным селектором имеют разные электрофоретические подвижности, а иногда и различный заряд.

Благодаря простоте, эффективности и экспрессности хиральный капиллярный электрофорез постепенно вытесняет хиральную ВЭЖХ в области научных исследований, но при этом сильно отстает от нее в сфере практических применений [18]. Добавление хирального селектора непосредственно в ФЭ в режиме электрокинетической хроматографии обеспечивает высокую гибкость хирального КЭ. Небольшое количество реагентов, растворителей и образцов, необходимых для КЭ, целиком соответствует принципам зеленой химии.

Еще одним преимуществом КЭ является возможность регулировки селективности разделения на основе нескольких равновесий и электрокинетических параметров с помощью добавок в ФЭ. Обычно энантиоселективность комплексообразования в растворе крайне мала, тем не менее КЭ позволяет разделять даже наиболее трудно делимые пары энантиомеров.

В качестве хиральных селекторов применяют циклофруктаны, белки, соли желчных кислот, полисахариды, нуклеотиды, антибиотики, циклодекстрины (ЦД) и др. Циклодекстрины представляют собой хиральные олигосахаридные макроциклы, которые обычно используются как при хиральном, так и при ахиральном разделении методом КЭ в качестве добавок, способных к динамическому комплексообразованию [19–22]. В системе с заряженным циклодекстрином удовлетворительные факторы энантиоразделения наблюдаются уже при относительно малых концентрациях селектора [23, 24]. Особенно это относится к тем случаям, когда аналит сам несет заряд, противоположный

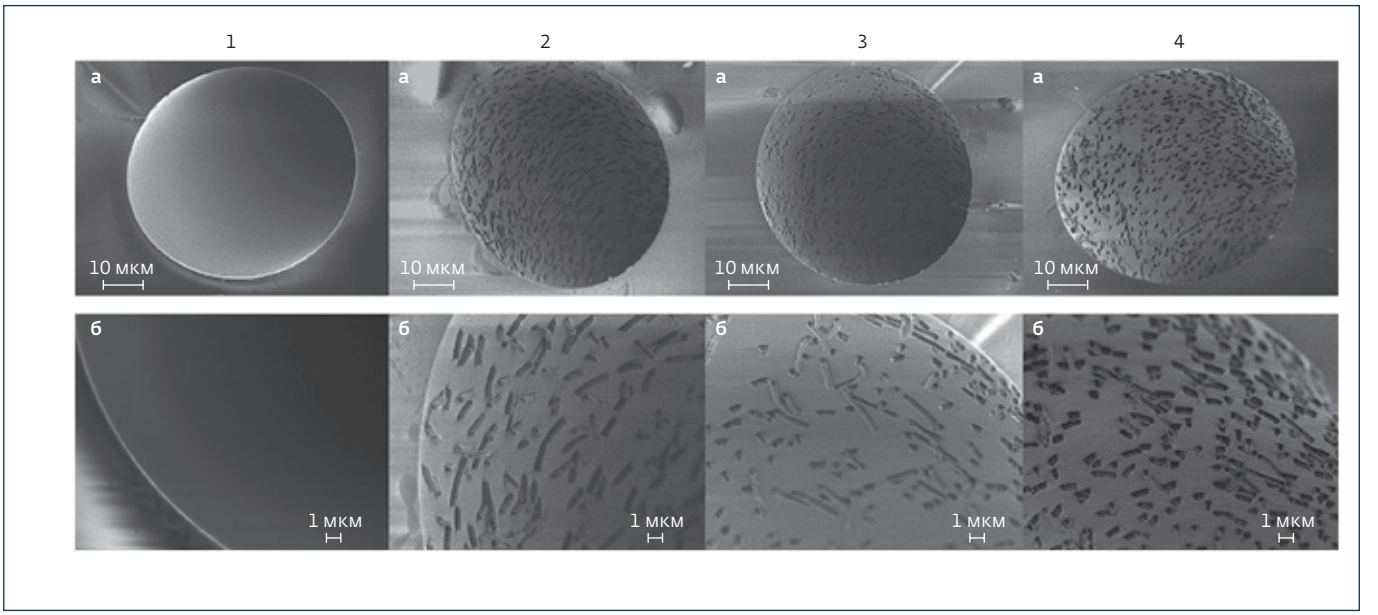

Рис.3. *СЭМ-изображения внутренней поверхности немодифицированного капилляра (1), свежеполученного капилляра, модифицированного E. coli (2); капилляр, модифицированный E. coli, после 90 циклов анализа (3); капилляр, модифицированный E. coli, после стерилизации (4); а – поперечный срез капилляров; б – внутренняя стенка капилляра [38]*

заряду хирального селектора, что также увеличивает и константу комплексообразования.

Если хиральный селектор обладает поверхностной активностью, то его добавляют в ФЭ в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) с возможностью реализации режима мицеллярной электрокинетической хроматографии с хиральными мицеллами. Перспективными оказались хиральные ионные жидкости с хиральным катионом, анионом либо и с тем, и с другим. Использование новых функциональных материалов (ионные жидкости (ИЖ), глубокие эвтектические растворители (ГЭР) [25], наночастицы (НЧ) [26–28], молекулярно-импринтированные полимеры (МИП) и др.) в качестве добавок в фоновый электролит, в том числе и при разделении энантиомеров, существенно расширило аналитические возможности метода КЭ. Однако хиральные селекторы, сравнимые с циклодекстринами с точки зрения их разнообразия и универсальности областей применения, пока не найдены.

Примером хирального анализа биологической пробы методом капиллярной электрохроматографии может служить определение энантиомеров препарата венлафаксина и его метаболита в плазме крови двух пациентов на ванкомицинсодержащем сорбенте [29].

В последнее десятилетие проявляется повышенный интерес к использованию в аналитической химии ионных жидкостей – солей органических четвертичных оснований, имеющих температуру плавления ниже комнатной или близкую к ней [30–35]. Наиболее интересным является создание хиральных полиэлектролитных мультислойных покрытий на поверхности кварца или силикагеля [36]. Динамическим методом из раствора на отрицательно заряженные силанольные группы поверхности адсорбируется слой хирального поликатиона, например поли-L-лизина, затем – слой хирального полианиона, например поли(ундеценоил-L-лейцил-L-аланина). В качестве первичного взаимодействия между аналитом и хиральным селектором во многих системах выступает электростатическое притяжение противоположно заряженных групп. Правильный выбор значения pH фонового электролита позволяет усилить взаимодействие ионов аналита с хиральными селекторами – заряженными молекулами антибиотиков, пептидов, замещенных циклодекстринов. Аддукт двух противоположно заряженных ионов можно рассматривать как ионную пару, в которой при возникновении дополнительных контактов происходит взаимное распознавание конфигурации партнеров.

Интересный пример хирального разделения методом КЭ описан в работе [37]. Разделение энантиомеров лекарственного препарата офлоксацина достигнуто на капилляре, модифицированном E. Coli. Отрицательно заряженные E. Coli прикрепляются к положительно заряженным полиэтилениминовым стенкам капилляров за счет электростатического взаимодействия. СЭМ-изображения внутренней поверхности полученных капилляров представлены на рис.3. Эта работа является первым примером использования бактерий в качестве хиральной стационарной фазы

в КЭ, тогда как применение бактерий в качестве хиральных псевдостационарных фаз в КЭ было описано ранее [38].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ КЭ-МС

Совмещение КЭ с МС-детектированием расширяет применение электрофоретических методов до метаболомного изучения бактериальных образцов. Определение бактериального состава различных проб, включая природные объекты и биологические жидкости в связи с их влиянием на здоровье человека, является важной аналитической задачей.

Метод КЭ обладает большим потенциалом для исследования бактериального метаболома. Важную роль в метаболизме бактерий играют аминокислоты. Одни бактерии используют аминокислоты в составе питательных смесей, другие, наоборот, сами их продуцируют за счет утилизации белков питательной среды и в процессах катаболизма. Определение аминокислот во внеклеточной среде важно при мониторинге биотехнологических процессов, изучении метаболизма, профиля поглощения углерода при росте бактерий и т.д. Анализ внутриклеточных аминокислот часто используют для исследования метаболических процессов микроорганизмов. Доказано, что аминокислоты действуют как предшественники биосинтеза липопептидов. Бактерии также продуцируют широкий спектр нелетучих и летучих карбоновых кислот за счет процессов ферментации компонентов питательной среды, поэтому контроль содержания этих аналитов во внеклеточных средах, а также в экстрактах бактериальных клеток может быть использован для самых различных целей.

Подавляющее большинство бактериальных метаболитов и компонентов бактериальных клеток – пептиды, аминокислоты, фосфорилированные сахара, витамины, карбоновые кислоты, нуклеотиды и липополисахариды – представляют собой ионные или ионогенные соединения, отличающиеся по полярности, заряду, молекулярной массе, летучести и растворимости. К тому же сами бактерии, благодаря белкам и полисахаридам, имеют поверхностный заряд и могут быть обнаружены и разделены электрокинетическими методами. В зависимости от состава ФЭ функциональные группы клеточных стенок могут быть диссоциированы или протонированы, вызывая у каждого вида бактерий появление двойного электрического слоя и дзета-потенциала на поверхности клетки. Разделение основано на различиях в электрофоретической подвижности.

За последнее десятилетие опубликовано немало исследований вне- и внутриклеточного метаболома бактерий с помощью КЭ [2, 7, 8, 39], посвященных его применению для мониторинга биопроцессов, оптимизации условий роста бактерий, определения целевых метаболитов и их очистки, а также идентификации бактериальных эндотоксинов в различных образцах. Имеются сообщения, где модификацию электрофоретических систем, направленную на достижение более высокого разрешения аналитов, проводят с применением бактерий в качестве модификатора ФЭ и стенок капилляров [41].

Сочетание КЭ с масс-спектрометрическим детектированием объединяет достоинства обоих методов, обеспечивая электрофоретическое разделение с высоким разрешением, эффективностью и чувствительностью, а также возможностью идентификации компонентов сложных смесей за счет определения их молекулярных масс. К настоящему времени достигнуты успехи при объединении практически всех режимов электрофоретического разделения аналитов с МС-детектированием, включая капиллярный гель-электрофорез, капиллярный изотахофорез, капиллярное изоэлектрическое фокусирование, МЭКХ, аффинный капиллярный электрофорез, а также КЭХ. КЭ-МС успешно применяется для определения широкого спектра аналитов и решения задач метаболомики [42], протеомики [43], пептидомики [44], гликомики [45], анализа объектов окружающей среды и продуктов питания [46, 47], фармацевтики и биомедицины [3], в клинической диагностике [48] и при поиске биомаркеров [49]. Обсуждается применение метода КЭ-МС для обнаружения специфических полипептидных биомаркеров в спинномозговой жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера и шизофренией [50].

Соединение КЭ с МС-детектированием возможно в режимах онлайн и офлайн. В последнем случае успешно применяется матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), что перспективно при идентификации бактерий в образцах различной природы и в протеомных исследованиях [51]. Подобный подход, явившийся альтернативой методам молекулярной биологии, оказался весьма перспективным при идентификации различных микроорганизмов. Использование мягкой ионизации позволяет записывать их характерные молекулярные профили (так называемые отпечатки пальцев), сопоставление которых со спектрами, хранящимися в базе данных, обеспечивает идентификацию микроорганизмов [52].

Для онлайн-комбинации КЭ с МС-детектированием наиболее подходящим методом ионизации является ионизация электрораспылением (ЭРИ). При этом существует и ряд определенных трудностей, основные из которых:

- ограниченный набор ФЭ для проведения электрофоретического разделения. В КЭ-МС используют ФЭ на основе летучих формиатов, ацетатов и солей аммония. Использование их в миллимолярном концентрационном диапазоне способствует ионизации аналитов и не мешает работе МС-детектора. Однако ограничения в выборе ФЭ значительно сокращают

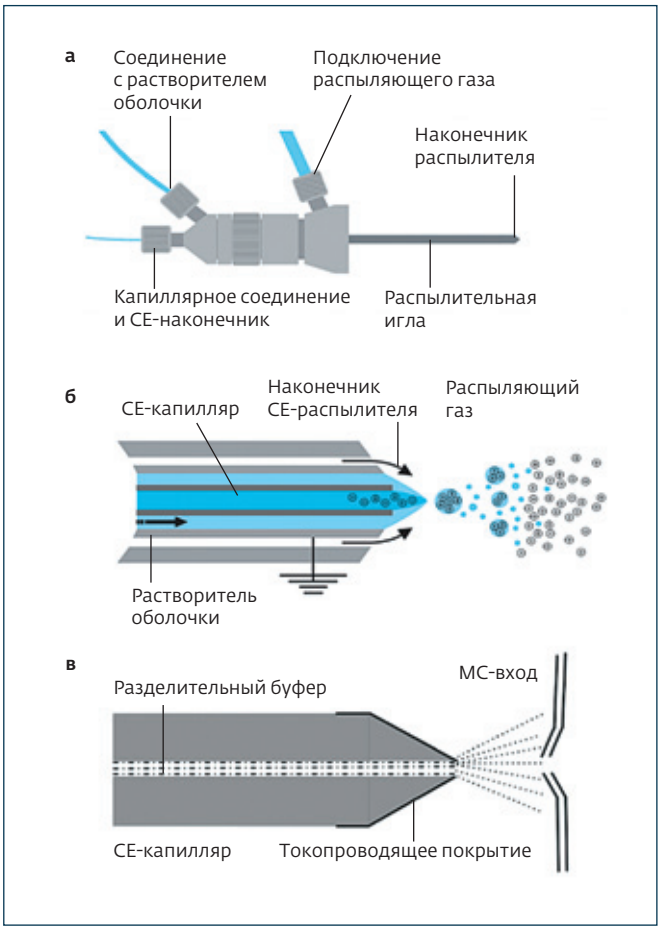

Рис.4. *Схематическое изображение: а – соединения КЭ с ЭРИ-МС для интерфейса с ОЖ; б – области электроспрей распыления для ЭРИ-МС с ОЖ; в – области электроспрей распыления для наноЭРИ-МС [56]*

возможности для оптимизации электрофоретического разделения аналитов [53];

- технические трудности при соединении КЭ с ЭРИ-МС, связанные с необходимостью наличия свободного конца капилляра для осуществления ионизации электрораспылением. Как в КЭ, так и при ЭРИ-МС требуется наличие замкнутой электрической цепи. Например, в КЭ оба конца капилляра должны быть опущены в раствор фонового электролита. В таком случае иглу для ЭРИ используют в качестве общего электрода для систем КЭ и МС, что может привести к нежелательным электрохимическим реакциям, влияющим на селективность разделения, стабильность ионизации и чувствительность метода [54];
- медленный поток жидкости на выходном конце разделительного капилляра (1–1000 нл/мин) требует модификации уже имеющихся ЭРИ-МС источников, созданных для работы с жидкостными хроматографами, либо же конструирования новых.

Таким образом, поиск универсального интерфейса для соединения КЭ и ЭРИ-МС, позволяющего учитывать особенности методов и возможности их комбинаций, остается по-прежнему актуальной задачей развития КЭ-МС.

На сегодняшний день известны два основных интерфейса КЭ-ЭРИ-МС: с обволакивающей жидкостью (ОЖ) (sheath-flow interface) и без нее (sheathless interface). Их можно классифицировать по величине рабочего потока жидкости, выходящей из иглы источника ЭРИ. В первом случае она составляет от 1 до 1000 мкл/мин, что соответствует классической ионизации электрораспылением. Если же интерфейс без ОЖ – от 1 до 1000 нл/мин. Такой вариант называют наноэлектроспрей ионизацией (наноЭРИ).

В классическом интерфейсе с ОЖ используется трехтрубная коаксиальная конструкция, включающая разделяющий капилляр, окруженный последовательно трубкой с ОЖ и с распыляющим газом (газом-небулайзером) (рис.4). В качестве ОЖ чаще всего используются системы H_2O/MeOH или H_2O/iPrOH в соотношении 1:1 (объемн.) с добавками уксусной или муравьиной кислот. Главное достоинство такого подхода состоит в практически полном разделении КЭ и ЭРИ процессов, в результате чего значительно расширяется арсенал возможных фоновых электролитов. Кроме того, использование вспомогательной жидкости позволяет достичь высокой стабильности распыления. Однако общая чувствительность все-таки снижается за счет значительного разбавления пробы. Решение этой проблемы обсуждается в [55–57]. Henion и соавт. [56, 57] предложили интерфейс с жидкостным соединением, в котором для смешения ФЭ и проводящей жидкости используется объединяющий тройник (рис.4), что обеспечивает существенно меньшее разбавление образца, но требует более тонкой настройки, включающей регулировку скорости потока вспомогательной жидкости, выравнивание выходного конца капилляра и т.д. [58].

В интерфейсах без ОЖ выходной конец капилляра подсоединяется непосредственно к ЭРИ-источнику, что достигается путем модификации кончика капилляра электропроводящим материалом. Достоинством таких систем является не только отсутствие разбавления пробы, но и высокая эффективность нанораспыления, в результате которой формируются очень маленькие капли (~мкм в диаметре), что способствует распылению даже низколетучих растворов. Кроме того, наноэлектро-

спрей ионизация совместима с фоновыми электролитами с большим содержанием солей [59].

Интерфейсы с ОЖ и наноэлектроспрей ионизацией являются коммерчески доступными, в то время как интерфейсы с жидкостным соединением пока не представлены в продаже. Однако их неоспоримые достоинства позволяют в ближайшем будущем ожидать распространения таких систем на рынке.

МЕТАБОЛОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ КЭ-МС

Капиллярная электрофорез-масс-спектрометрия представляет собой перспективную платформу для диагностики метаболических нарушений, поскольку позволяет проводить качественное и количественное определение широкого спектра полярных метаболитов в биологических образцах без их дополнительной обработки [60–63].

В отличие от ВЭЖХ-МС или ГХ-МС систем, сочетание КЭ и ЭРИ-МС позволяет проводить экспрессное определение высокополярных низкомолекулярных аналитов без необходимости предварительной их дериватизации. Другие достоинства КЭ-ЭРИ-МС систем для метаболомики – низкая стоимость анализа, экспрессность, высокая эффективность, меньшая чувствительность к матричным эффектам пробы. Кроме того, в отличие от хроматографии, данный метод может характеризоваться значительно большей пропускной способностью при применении мультисегментного инжекционного режима [63].

Как правило, исследования в области метаболомики включают стадию пробоподготовки с использованием многоступенчатой процедуры экстракции и дериватизации. Данный процесс может быть осуществлен за меньшее время и с большей эффективностью в случае использования микрофлюидных систем (МФС), которые стали применяться в этой области сравнительно недавно [64–67].

Пример успешного применения КЭ в микрочип-формате в сочетании с наноЭРИ-МС описан в [60], где авторами разработана методика определения 40 целевых метаболитов за 3 мин, при этом объем вводимой пробы составил всего 4 мкл. Метод применен для исследования метаболических изменений у мышей с моделью серозной карциномы высокой степени злокачественности, в образцах сыворотки крови которых обнаружено 30 целевых метаболитов (аминокислот и их производных).

Автоматизированные чипы включают модули для сбора образцов, лизиса клеток, флуоресцентной дериватизации и электрофоретического анализа белкового профиля. О первой автоматизированной системе для обнаружения аэрозольных бактериальных биологических агентов, таких как Bacillus subtilis (B. subtilis), с высокой чувствительностью сообщалось в [61]. Разработаны алгоритмы обнаружения пиков для точной идентификации бактерий при использовании микрофлюидных автоматизированных систем [62]. Реализация МС-детектирования обеспечивает идентификацию отдельных белков по электрофоретическим профилям.

Не менее интересным является приложение КЭ-ЭРИ-МС в интерфейсе с ОЖ для мониторинга секреции и поглощения аминокислот в культуральной среде дробящимися эмбрионами после экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [63]. Особым преимуществом КЭ-МС для решения этой задачи является малый объем вводимой пробы, необходимый для анализа (8 мкл). Полного разделения 19 аминокислот без предварительной стадии дериватизации удалось достичь с использованием водного раствора уксусной кислоты (15%, объемн.). В результате исследования 40 образцов культуральной среды показано, что их аминокислотные профили коррелируют с морфологией исследуемых эмбрионов. Таким образом, по мнению авторов, метаболические КЭ-МС профили в сочетании с морфологической оценкой эмбрионов позволяют получать максимальную информацию об эмбрионах перед их трансплантацией, а разработанная КЭ-ЭРИ-МС методика является надежной, точной и потенциально может быть применена для сопровождения процедуры ЭКО.

В [64] изучены возможности применения КЭ-ЭРИ-МС с интерфейсом с ОЖ для исчерпывающего анализа в одном аналитическом цикле анионных метаболитов, включающем определение фосфорилированных углеводов, карбоновых кислот, ацетилкофермента-А и его производных, нуклеотидов и никотинаминаденин динуклеотида. Показано, что использование нержавеющей стали в качестве материала иглы для электрораспыления вызывает коррозию и засорение наконечника иглы, а также формирование множественных комплексов анионных аналитов с образующимися катионами металлов. Решением данной проблемы явилось использование платины, что нивелировало все вышеперечисленные нежелательные эффекты.

Разработанный в [65] метод мультисегментной инжекции позволяет проводить анализ сразу нескольких образцов одновременно за счет применения в качестве внутрикапиллярного концентрирования стэкинга с усилением поля. Авторами предложена методика одновременного анализа 7 образцов и более в одном аналитическом цикле с возможностью детектирования 66 катионных и анионных метаболитов, включая некоторые изомерные соединения. Схематическое изображение основных этапов мультисегментного инжекционного КЭ-ЭРИ-МС/МС анализа представлено на рис.5.

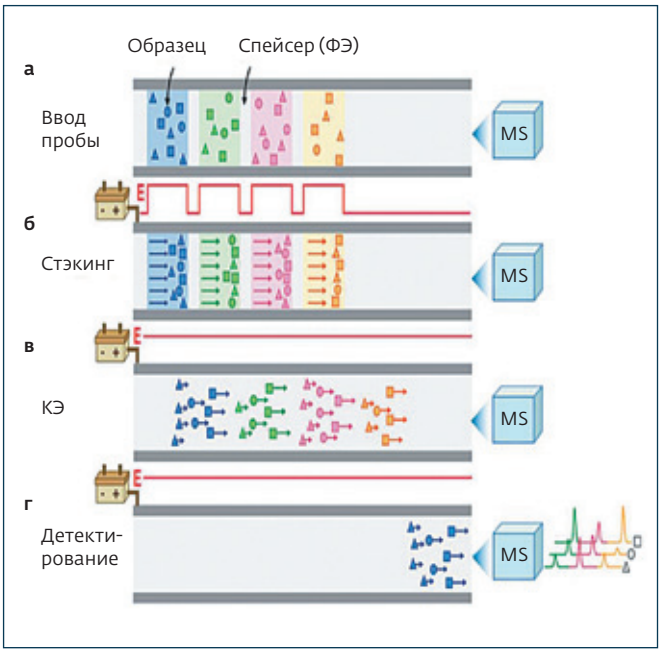

Рис.5. *Основные этапы мультисегментного КЭ-МС/МС анализа полиаминов: а – последовательный ввод образцов и ФЭ в капилляр; б – стэкинг с усилением поля и концентрирование за счет меньшей электропроводности раствора проб по сравнению с ФЭ; в – электрофоретическое разделение компонентов проб; г – детектирование полиаминов с использованием тандемной масс-спектрометрии при их характеристических значениях m/z [65]*

В последующих исследованиях этих авторов возможности предложенного подхода существенно расширены за счет уменьшения объема пробы и разделяющего инжекции спейсера (представляющего собой ФЭ) до 1 и 20 нл соответственно [70]. Таким образом, общее количество образцов, определяемых в одном аналитическом цикле, увеличилось до 40. Стоит отметить, что в данном случае разделение и определение изомеров достигается не за счет электрофоретического разделения, а посредством применения тандемного масс-спектрометрического анализа. Разработанный метод применен для высокопроизводительного скрининга полиаминов в слюне, являющихся биомаркерами различных видов рака. Пропускная способность метода – менее 1 мин на анализ образца. Однако пока не решена проблема негативного влияния матричных эффектов и коэлюирующихся соединений на эффективность и стабильность ионизации аналитов и, следовательно, на количественное определение метаболитов. Некоторые примеры применения КЭ-ЭРИ-МС в метаболомных исследованиях обсуждаются в [71].

Еще одним важнейшим применением КЭ-ЭРИ-МС является протеомика [43], где КЭЭ превосходит жидкостную хроматографию за счет высочайшей пиковой емкости при разделении сложных смесей протеоформ (около 300) и активно используется в исследованиях, так называемая протеомика сверху вниз (top-down proteomics). Под протеоформами понимают все виды белков одного и того же гена, возникающие за счет модификации белка при помощи аминокислотных замен, посттрансляционных модификаций, например фосфорилирования, альтернативного спайсинга и т.д. Различные протеоформы одного и того же гена могут иметь совершенно разные функции, что делает актуальным разделение, идентификацию и характеризацию протеоформ в клетках.

С использованием КЭЭ-ЭРИ-МС идентифицировано 6000 протеоформ почти 1000 семейств белков в сложном образце, что на данный момент представляет собой один из крупнейших наборов протеомных данных сверху вниз.

Типичная схема протеомного исследования сверху вниз включает следующие этапы:

- извлечение протеоформ из клеток;
- фракционирование по размерам с использованием гель-фильтрационной хроматографии или электрофореза;
- дальнейшее фракционирование по гидрофобности с использованием ОФ-ЖХ (эта стадия иногда может быть пропущена);
- проведение КЭЭ-ЭРИ-МС анализа фракций.

Для увеличения количества вводимого образца и снижения пределов обнаружения (ПО) при дальнейшей идентификации протеоформ часто в качестве внутрикапиллярного концентрирования используют стэкинг с усилением поля. Протеоформы идентифицируют с использованием баз данных (ProSight, TopPIC, Proteoform Suite, MASH Suite и pTop [72-75]). После проведения МС-анализа протеоформы могут быть выделены для дальнейшей фрагментации с целью получения более детальной информации о структуре белка.

Получению максимальной информации о протеоме способствует и многомерное жидкофазное разделение перед МС или МС/МС анализом [76]. Для повышения пиковой емкости разделения протеоформ различные методы жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза могут быть объединены в автономном режиме или в режиме онлайн. В отличие от режима офлайн, схемы с онлайн-комбинацией методов могут свести к минимуму потерю образца в процессе анализа и увеличить пропускную способность [77]. Различные системы, объединяющие онлайн ЖХ и КЭЭ-ЭРИ-МС, обсуждаются в [78–80].

МАЛДИ – десорбционный метод мягкой ионизации, который в основном применяется для анализа высокомолекулярных соединений (углеводов, пептидов и белков). Высокая толерантность к содержанию солей в ФЭ, а также получение однозарядных ионов при использо-

СДЕЛАНО В РОССИИ

ЛЮМЭКС

Системы капиллярного электрофореза «Капель»

«Капель-205»

«Капель-105М»

Единственная серийно выпускаемая система капиллярного электрофореза в странах ЕАЭС с 1997 года.
Приборы «Капель» включены в Госреестр СИ.

- Высочайшая, уникальная эффективность разделения компонентов смесей
- Экспрессность
- Крайне низкий расход реактивов и растворителей
- Отсутствие дорогостоящих колонок с сорбентами и проблем с их старением и заменой
- Низкая стоимость прибора и единичного анализа
- Простота анализа

Центральный офис ГК «Люмэкс»

195220, г. Санкт-Петербург,
ул. Обручевых, д. 1, лит. Б
+7 (812) 335-03-36
lumex@lumex.ru

Московский офис ГК «Люмэкс»

117105, г. Москва,
Варшавское шоссе, д. 28А,
Технопарк «Нагатино», 5 этаж
+7 (495) 981-54-49
centrum@lumex.ru

lumex.ru

вании данного типа ионизации крайне привлекательны для комбинации с КЭ при решении задач протеомики, пептидомики, а также идентификации микроорганизмов. Однако, поскольку для реализации МАЛДИ необходимо предварительное нанесение образца на твердую матрицу, соединение КЭ с МАЛДИ-МС детектированием затруднено, и комбинация методов осуществляется в основном в офлайн-режиме [81–83].

Одно из важнейших применений КЭ-МАЛДИ-МС – идентификация микроорганизмов в объектах природного происхождения, а также продуктах питания. Например, присутствие липополисахаридов (ЛПС) и тейхоевых кислот на внешней клеточной стенке отвечает за наличие отрицательного заряда, формирование двойного электрического слоя и дзета-потенциала поверхности бактерий. Липополисахариды выполняют роль защитного барьера. Высвобождаясь из бактерий после лизиса клеток, они проявляют высокую токсичность, вызывая различные патологические реакции (септический шок, воспаление и др.). Поскольку амфифильная природа ЛПС требует чувствительности как к заряду, так и к гидрофобным звеньям аналитов, режим МЭКХ представляется наиболее предпочтительным при их разделении. Попытки преодолеть проблемы чувствительности при анализе ЛПС методом КЭ с УФ-детектированием привели к разработке метода их обнаружения в виде комплексов с белками. Доказана способность гемоглобина человека образовывать устойчивые комплексы с эндотоксинами в соотношении от 1:5 до 1:3, обладающие сильным УФ- и видимым поглощением при 205 нм и 415 нм.

Электромиграционные методы, такие как капиллярный зонный электрофорез, капиллярное изоэлектрическое фокусирование и изотахофорез активно востребованы при анализе и идентификации широкого спектра микроорганизмов в различных объектах, а сочетание этих методов с МАЛДИ-МС детектированием может стать альтернативой трудоемким и дорогостоящим традиционным методам идентификации микроорганизмов.

В [84] описан метод, объединяющий КЭ и МАЛДИ-МС с времяпролетным масс-анализатором для in vivo мониторинга терапевтических фагов семейств Siphoviridae, Podoviridae и Myoviridae. Аналогичное сочетание предложено в [82] для быстрой и надежной идентификации бактериального патогена рода Dickeya в образцах растительной ткани. В обоих исследованиях сконцентрированные и разделенные в условиях КЗЭ или капиллярного изоэлектрического фокусирования фракции бактерий собирали сразу на предварительно подготовленную пластинку с нанесенной матрицей для последующей идентификации с использованием МАЛДИ-МС. Это существенно сократило время анализа, которое в среднем составляло около 30 мин одного образца. При этом возможен другой метод проведения анализа, при котором фракции бактерий после разделения собирают в культуральную среду. Последующее культивирование бактерий обеспечивает не только большую чувствительность метода, но позволяет получать дополнительную информацию о культурах с применением других методов, например микроскопических исследований [83].

В последние годы предпринимались многократные попытки автоматизации КЭ-МАЛДИ-МС для обеспечения возможности проводить непрерывный анализ образцов. В [85] предложено использовать вращающийся шар из нержавеющей стали, который транспортирует образцы из области атмосферного давления с выходного конца капилляра после электрофоретического разделения в глубокий вакуум масс-спектрометра для десорбции и ионизации. Другие варианты интерфейсов, реализующих вакуумное осаждение для непрерывного сбора фракций и анализа, описаны в [86, 87]. Однако эти техники требуют наличия довольно сложного оборудования и на данный момент не могут быть внедрены повсеместно в лабораторную практику. В [88] предложено экспрессное и легко реализуемое решение данной проблемы. Для непрерывного сбора фракций аналитов авторы помещали выходной конец капилляра на плоскую МАЛДИ-мишень из нержавеющей стали, движение которой осуществлялось за счет автоматического шприцевого насоса, к которому была прикреплена платформа. С ее использованием авторам удалось провести идентификацию 200 нейропептидов в экстрактах тканей головного мозга и синусовых желез. Для уменьшения сорбции аналитов и обеспечения обращенного ЭОП предложено использовать капилляры, покрытые полиэтиленимином, а для снижения ПО проводить в качестве онлайн-концентрирования стэкинг с усилением поля с большим объемом вводимой пробы. Достигнутые значения пределов обнаружения (на примере аллатостатина-3) составили 100 пкМ. На рис.6. приведено схематическое изображение основных этапов эксперимента.

Современные методы КЭ-МС требуют для профилирования метаболитов жидкие экстракты, что ограничивает информацию о распределении аналитов в биологических тканях. Анализ липидов, пептидов, белков может пролить свет на патогенез того или иного заболевания, выявить эффекты фармацевтических препаратов и ксенобиотических воздействий на основные биологические процессы в живом организме [89, 90].

Первое устройство КЭ-МС, обеспечивающее непосредственное картирование метаболитов с поверхности тканей для их нецелевого профилирования без трудоемкой подготовки образца предложено в [89]. При отборе проб с поверхности ткани методом КЭ-МС (Surface sampling capillary electrophoresis–mass spectrometry,

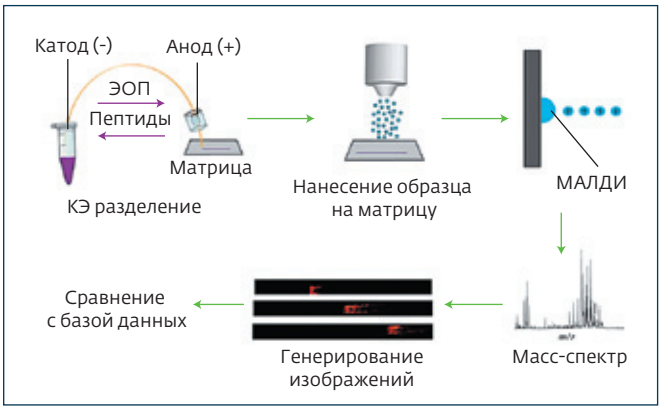

Рис.6. *Схематическое изображение основных этапов эксперимента, включающих КЭ разделение, нанесение образцов на матрицу, анализ в режиме МАЛДИ-МС, получение масс-спектров, создание изображений и сопоставление с базой данных [88]*

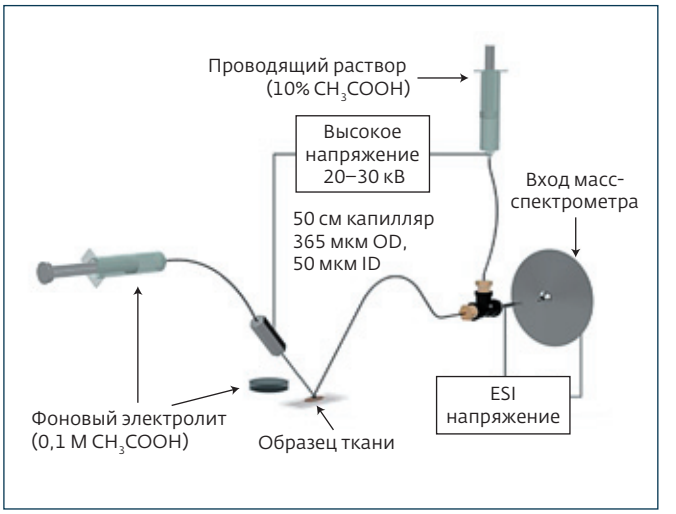

Рис.7. *Сочетание КЭ-МС с пробоподготовкой*

SS-CE-MS) эндогенные аналиты регистрируются в конкретном участке, включая головной мозг, спинной мозг, почки и т.д. Основным преимуществом такого метаболомного анализа CE-MS является возможность профилирования очень малых объемов биологических образцов, аликвоты детского пота для выявления биомаркеров муковисцидоза, экстрактов биопсии мышечной ткани и экстрактов одиночных клеток для обнаружения аналитов, участвующих в эмбриональном развитии.

Предложенное устройство содержит специально напечатанный на 3D-принтере элемент, удерживающий капилляр из нержавеющей стали для подачи растворителя (внешний диаметр 360 мкм, внутренний 100 мкм) и кварцевый разделительный капилляр с эмиттером TaperTip (длина 50 см; внешний диаметр 360 мкм; внутренний – 50 мкм), совмещенные под углом 85° (рис.7). Фоновый электролит содержал 0,1 М раствор уксусной кислоты и 50 мМ бензохинона в системе деионизированная вода (80%, масс)/метанол (20%, масс). С помощью этого устройства были успешно проанализированы образцы тканей головного мозга крысы, включая кору, гиппокамп и таламус [89].

* * * *

На сегодняшний день сфера применения электрофоретических методов в области биомедицинских исследований крайне обширна. Многие вопросы еще остаются нерешенными. Это относится в первую очередь к возможности объединения иммуноанализа и капиллярного электрофореза (ИА-КЭ), известного в настоящее время также под английской аббревиатурой CE-IA (capillary electrophoresis based immunoassay) – сравнительно нового метода, который уже успел завоевать большую популярность за последние 10–15 лет. Метод сочетает в себе все особенности иммуноаффинных взаимодействий. Физиологические условия взаимодействия в КЭ (pH, ионная сила, температура и т.д.) и тот факт, что реагенты находятся в растворе в свободном, а не в иммобилизованном состоянии, позволяют максимально приблизить условия анализа к реальным, существующим in vivo взаимодействиям с уникальной разделительной способностью КЭ. На основе подобных взаимодействий создаются лекарства нового поколения и разрабатываются высокочувствительные системы детектирования.

Исследования последних лет показывают, что методы капиллярного электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией получат самое активное дальнейшее развитие и применение в областях биофармацевтического и биохимического анализа, включая протеомные исследования.

Дальнейший научный поиск постепенно сдвинется в том направлении, где у капиллярного электрофореза нет перспективных конкурентов, а именно в направлении предельной миниатюризации и автоматизации энантиомерного анализа, использования достижений микроэлектроники и микрофлюидных систем. Кроме того, электрофоретические методы должны занять нишу рутинного энантиомерного анализа в тех областях, где скорость анализа оказывается важнее точности, и прежде всего в практической медицине, а именно в создании индивидуальных протоколов лечения, базирующихся на постоянном контроле терапевтического уровня лекарственных препаратов и процессов их метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер гранта 19-13-00370).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Morani M.**, **Duc Mai T.**, **Krupova Z.**, **van Niel G.**, **Defrenaix P.**, **Taverna M.** Recent electrokinetic strategies for isolation, enrichment and separation of extracellular vesicles // Trends in Analytical Chemistry. 2021. V. 135. P. 116179.
2. **Terry M.** Phillips. Clinical Applications of Capillary Electrophoresis Methods and Protocols-Springer. New York Humana Press. 2019.
3. **Seyfinejad B.**, **Jouyban A.** Capillary electrophoresis-mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analyses // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2022. V. 221. P. 115059.
4. **Kartsova L.A.**, **Makeeva D.V.**, **Bessonova E.A.** Current status of capillary electrophoresis // Journal of Analytical Chemistry. 2020. V. 75. N. 12. P. 1497–1513.
5. **Ou X.**, **Chen P.**, **Huang X.**, **Li S.**, Liu B-F. Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis // J. Sep. Sci. 2020. V. 43. P. 258–270.
6. **Soga T.** Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics // Trends in Analytical Chemistry. 2023. V. 158. P. 116883.
7. **Kartsova L.A.**, **Makeeva D.V.**, **Kravchenko A.V.**, **Moskvichev D.O.**, **Polikarpova D.A.** Capillary electrophoresis as a powerful tool for the analyses of bacterial samples // Trends in Analytical Chemistry. 2021. V. 134. P. 116110.
8. **Lothert K.**, **Eilts F.**, **Wolff M.W.** Quantification methods for viruses and virus-like particles applied in biopharmaceutical production processes // Expert Review of Vaccines. 2022. V. 21. P. 1029–1044.
9. **Kravchenko A.**, **Kolobova E.**, **Kartsova L.** Multifunction covalent coatings for separation of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // Sep. Sci. plus. 2020. V. 3. P. 102–111.
10. **Kravchenko A.V.**, **Kolobova E.A.**, **Kechin A.A.**, **Kartsova L.A.** Development of a capillary electrophoretic method for determination of ketorolac enantiomers in human plasma using cationic β-cyclodextrin derivative as a chiral selector // J. Sep. Sci. in press.
11. **Makeeva D.**, **Polikarpova D.**, **Demyanova E.**, **Roshchina E.**, **Vakhitov T.**, **Kartsova L.** Determination of native amino acids and lactic acid in Lactobacillus helveticus culture media by capillary electrophoresis using Cu2+and β-cyclodextrins as additives // J. Chrom. B. 2020. V. 1156. P. 122304.
12. **Makeeva D.**, **Sall T.**, **Moskvichev D.**, **Kartsova L.**, **Sitkin S.**, **Vakhitov T.** CE with Cu^2+ions and 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin additives for the investigation of amino acids composition of the culture medium in a cellular model of non-alcoholic fatty liver disease // J. Pharm. Biomed. Anal. 2022. V. 213. P. 114663.
13. **Ptolemy A.S.**, **Tran L.**, **Britz-McKibbin P.** Single-step enantioselective amino acid flux analysis by capillary electrophoresis using on-line sample preconcentration with chemical derivatization // Anal. Biochem. 2006. № 354. P. 192–204.
14. **Kartsova L.A.**, **Moskvichev D.O.** In-capillary chiral derivatization of amino acids // J. of Anal. Chemistry. 2022. V. 77. P. 618–624.
15. **Oliveira R.**, **Simionato V.A.C.**, **Cass B.** Enantioselectivity effects in clinical metabolomics and lipidomics // Molecules. 2021. V. 26. P. 5231.
16. **Tanwar S.**, **Bhushan R.** Enantioresolution of amino acids: a decade's perspective, prospects and challenges // Chromatographia. 2015. V. 78. P. 1113–1134.
17. **Bernardo-Bermejo S.**, **Sánchez-López E.**, **Castro-Puyana M.**, **Marina M.L.** Chiral capillary electrophoresis // TrAC – Trends Anal. Chem. 2020. V. 124.
18. **Fanali S.**, **Chankvetadze B.** Some thoughts about enantioseparations in capillary electrophoresis // Electrophoresis. 2019. V. 40. P. 2420–2437.
19. **Saz J.M.**, **Marina M.L.** Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1467. P. 79–94.
20. **Řezanka P.**, **Navrátilová K.**, **Řezanka M.**, **Král V.**, **Sýkora D.** Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis // Electrophoresis. 2014. V. 35. P. 2701–2721.
21. **Yu R.B.**, **Quirino J.P.** Chiral separation using cyclodextrins as mobile phase additives in open-tubular liquid chromatography with a pseudophase coating // J. Sep. Sci. 2022. V. 45. P. 1195–1201.
22. **Peluso P.**, **Chankvetadze B.** Native and substituted cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis enantioseparations: structures, features, application, and molecular modeling // Electrophoresis. 2021. V. 42. P. 1676–1708.
23. **De Boer T.**, **De Zeeuw R.A.**, **De Jong G.J.**, **Ensing K.** Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis // Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 3220–3239.
24. **Dai Y.**, **Wang S.**, **Zhou J.**, **Liu Y.**, **Sun D.**, **Tang J.**, **Tan W.** gCationic cyclodextrin as versatile chiral selector for enantiomeric separation in capillary electrophoresis // J. Chromatogr. A. 2012. V. 1246. P. 98–102.
25. **Li A.**, **Xue S.**, **Ren S.**, **Xu Y.**, **Zhang Q.** Hydrophobic deep eutectic solvents as pseudo-stationary phases in capillary electrokinetic chromatography // Analytica Chimica Acta. 2022. V. 121. P. 339936.
26. **Hu W.**, **Hong T.**, **Gao X.**, **Ji Y.** Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography // Trends in Analytical Chemistry. 2014. V. 61. P. 29–39.
27. **Chen J.L.**, **Hsieh K.H.** Nanochitosan crosslinked with polyacrylamide as the chiral stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2011. V. 32. P. 398–407.
28. **Wang D.**, **Song X.**, **Duan Y.**, **Xu L.**, **Zhou J.**, **Duan H.** Preparation and characterization of a polystyrene/bovine serum albumin nanoparticle-coated capillary for chiral separation using open-tubular capillary electrochromatography // Electrophoresis. 2013. V. 34. P. 1339–1342.
29. **Fanali S.**, **Rudaz S.**, **Veuthey J.L.**, **Desiderio C.** Use of vancomycin silica stationary phase in packed capillary electrochromatography // J. Chromatogr. A. 2001. V. 919. P. 195.
30. **Zhang Q.** Ionic liquids in capillary electrophoresis for enantioseparation // TrAC – Trends Anal. Chem. 2018. V. 100. P. 145–154.
31. **Zhang J.**, **Du Y.**, **Zhang Q.**, **Lei Y.** Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflamatory drugs by capillary electrophoresis // Talanta. 2014. V. 119. P. 193.

32. **Stavrou I.J.**, **Kapnissi-Christodoulou C.P.** Use of chiral amino acid ester-based ionic liquids as chiral selectors in CE // Electrophoresis. 2013. V. 34. P. 524–530.
33. **Franc Y.**, **Varenne A.**, **Juillerat E.**, **Villemin D.**, **Gareil P.** Evaluation of chiral ionic liquids as additives to cyclodextrins for enantiomeric separations by capillary electrophoresis // Yannis Franc. 2007. V. 1155. P. 134–141.
34. **Ali Rizvi S.A.**, **Shahab S.A.** Synthesis, characterization, and application of chiral ionic liquids and their polymers in micellar electrokinetic chromatography // Anal. Chem. 2006. V. 78. P. 7061–7069.
35. **Колобова Е.А.**, **Карцова Л.А.**, **Алопина Е.В.**, **Смирнова Н.А.** Разделение энантиомеров тирозина, триптофана и β-блокаторов методом капиллярного электрофореза с участием аминокислотной ионной жидкости 1-бутил-3-метилимидазолий L-пролинат [C_4MIm][L-Pro] в качестве хирального селектора // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22. С. 51–60.
36. **Constantinou A.S.**, **Nicolaou I.N.**, **Kapnissi-Christodoulou C.P.** Separation of acetylcholinesterase inhibitors using polymeric surfactants in polyelectrolyte multilayer coatings // J. Chromatogr. Sci. 2012. V. 50. P. 228–236.
37. **Fu Q.**, **Zhang K.**, **Gao D.**, **Wang L.**, **Yang F.**, **Liu Y.**, **Xia Z.** Escherichia coli adhesive coating as a chiral stationary phase for open tubular capillary electrochromatography enantioseparation // Anal. Chim. Acta. 2017. V. 969. P. 63–71.
38. **Li L.**, **Xia Z.**, **Yang F.**, **Chen H.**, **Zhang Y.** Enantioselective analysis of ofloxacin enantiomers by partial-filling capillary electrophoresis with bacteria as chiral selectors // J. Sep. Sci. 2012. V. 35. P. 2101–2107.
39. **Fung F.M.**, **Su M.**, **Feng H.T.**, **Li S.F.Y.** Extraction, separation and characterization of endotoxins in water samples using solid phase extraction and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 1–10.
40. **Geurink L.**, **van Tricht E.**, **van der Burg D.**, **Scheppink G.**, **Pajic B.**, **Dudink J.**, Sänger-van **de Griend C.** Sixteen capillary electrophoresis applications for viral vaccine analysis // Electrophoresis. 2022. V. 43. P. 9–10.
41. **Kłodzin´ska E.**, **Buszewski B.** Electrokinetic detection and characterization of intact microorganisms // Anal. Chem. 2009. V. 81. P. 8–15.
42. **Soga T.** Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics // Trends in Analytical chemistry. 2023. V. 158. P. 116883.
43. **Nagy C.**, **Andrási M.**, **Hamidli N.**, **Gyémánt G.**, **Gáspár A.** Top-down proteomic analysis of monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry // Journal of Chromatography Open. 2022. V. 2. P. 100024.
44. **Herrero M.**, **Ibañez E.**, **Cifuentes A.** Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics // Electrophoresis. 2008. V. 29. P. 2148.
45. **Mechref Y.**, **Novotny M.V.** Glycomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry // Mass Spectrom. Re. v. 2009. V. 28. P. 207.
46. **Font G.**, **Ruiz M.J.**, **Fernandez M.**, **Pico Y.** Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for determining organic food contaminants and residues // Electrophoresis. 2008. V. 29. P. 2059.
47. **Robledo V.R.**, **Smyth W.F.** The application of CE-MS in the trace analysis of environmental pollutants and food contaminants // Electrophoresis. 2009. V. 30. P. 1647.
48. **Mischak H.**, **Coon J.J.**, **Novak J.**, **Weissinger E.M.**, **Schanstra J.P.**, **Dominiczak A.F.** Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker // Mass Spectrom. Re. v. 2009. V. 28. P. 703.
49. **Servais A.C.**, **Crommen J.**, **Fillet M.** Capillary electrophoresis-mass spectrometry, an attractive tool for drug bioanalysis and biomarker discovery // Electrophoresis. 2006. V. 27. P. 2616.
50. **Jou Y.**, **Lin C.**, **Lai C.**, **Chen C.**, **Kao J.**, **Chen S.**, **Tsai M.**, **Huang S.**, **Lin C.** Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer // Anal. Chim. Acta. 2010. V. 681. P. 41.
51. **Ashfaq M.Y.**, **Dána A.D.**, **Al-Ghouti M.A.** Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: a review // Journal of Environmental Management. 2022. V. 305. P. 114359.
52. **Dingle T.C.**, **Butler-Wu S.M.** MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification // Clin. Lab. Med. 2013. V. 33. P. 589–609.
53. **Cloupeau M.**, **Prunet-Foch B.** Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review // J. Aerosol Sci. 1994. V. 25. P. 1021–1036.
54. **Prudenta M.**, **Hubert H.**, **Girault H.** Functional electrospray emitters // Analyst. 2009. V. 134. P. 2189–2203.
55. **Reiter S.M.**, **Buchberger W.**, **Klampf C.W.** Investigations on the Influence of Interface-Geometry in CE-ESI-TOF-MS // Chromatographia. 2010. V. 71. P. 715.
56. **Lee E.D.**, **Muck W.**, **Henion J.D.**, **Covey T.R.** On-line capillary zone electrophoresis—ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphin // J. Chromatogr. 1988. V. 458. P. 313.
57. **Lee E.D.**, **Muck W.**, **Henion J.D.**, **Covey T.R.** Liquid junction coupling of capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1989. V. 18. P. 844.
58. **Pleasance S.**, **Thibault P.**, **Kelly J.** Comparison of liquid-junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to compounds to the aquaculture industry // J. Chromatogr. 1992. V. 591. P. 325.
59. **R.Juraschek T. Dulcks M.** Karas. Nanoelectrospray – More than just a minimized-flow electrospray ionization source // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999. V. 10. P. 300.
60. **Sah S.**, **Yun S.R.**, **Gaul D.A.**, **Botros A.**, **Park E.Y.**, **Kim O.**, **Kim J.**, **Fernández F.M.** Targeted microchip capillary electrophoresis-orbitrap mass spectrometry metabolomics to monitor ovarian cancer progression // Metabolites. 2022. V. 12. P. 532.
61. **Stachowiak J.C.**, **Shugard E.E.**, **Mosier B.P.**, **Renzi R.F.**, **Caton P.F.**, **Ferko S.M.**, Van **De Vreugde J.L.**, **Yee D.D.**, **Haroldsen B.L.**, **Vander Noot V.A.** Autonomous microfluidic sample preparation system for protein profile-based detection of aerosolized bacterial cells and spores // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 5763–5770.
62. **McLaughlin J.**, **Nelson M.**, **McNevin D.**, **Roffey P.**, **Gahan M.E.** Characterization of Bacillus strains and hoax agents by protein profiling using automated microfluidic capillary electrophoresis // Forensic. Sci. Med. Pathol. 2014. V. 10. P. 380–389.
63. **Langmajerov M.S.**, **Pelcov M.**, **Vedrova P.**, **Cel A.**, **Glatz Z.** Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a tool for the

noninvasive target metabolomic analysis of underivatized amino acids for evaluating embryo viability in assisted reproduction // Electrophoresis. 2022. V. 43. P. 679–687.

64. **Soga T.**, **Igarashi K.**, **Ito C.**, **Mizobuchi K.**, **Zimmermann H.P.**, **Tomita M.** Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry // Anal. Chem. 2009. V. 81. P. 6165–6174.
65. **Shanmuganathan M.**, **Kroezen Z.**, **Gill B.**, **Azab S.**, **de Souza R.J.**, **Teo K.K.**, **Atkinson S.**, **Subbarao P.**, **Desai D.**, **Anand S.S.**, **Britz-McKibbin P.** The maternal serum metabolome by multisegment injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry: a high-throughput platform and standardized data workflow for large-scale epidemiological studies // Nat. Protoc. 2021. V. 16. P. 4538–4538.
66. **Aturki Z.**, **Fanali S.**, **Rocco A.** Online sample concentration and analysis of drugs of abuse in human urine by micelle to solvent stacking in capillary zone electrophoresis // Electrophoresis. 2016. V. 37. P. 2875.
67. **Tejada-Casado C.**, **Moreno-Gonzalez D.**, **Del Olmo-Iruela M.**, **Garcia-Campana A.M.**, **Lara F.J.** Coupling sweeping-micellar electrokinetic chromatography with tandem mass spectrometry for the therapeutic monitoring of benzimidazoles in animal urine by dilute and shoot // Talanta. 2017. V. 175. P. 542.
68. **Xiaowen Ou, Peng Chen,Xizhi Huang,Shunji Li, Bi-Feng Liu.** Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis // J. Sep. Sci. 2020. V. 43. P. 258–270.
69. **Li Z.**, **Luo F.**, **Dai G.**, **Lu Y.**, **Ai S.**, **He P.**, **Wang Q.** Microchip electrophoretic detection of bacterial lipopolysaccharide based on aptamer-modified magnetic beads and polymerase chain amplification // Microchem. J. 2019. V. 150. P. 104178.
70. **Igarashi K.**, **Ota S.**, **Kaneko M.**, **Hirayama A.**, **Enomoto M.**, **Katumata K.**, **Sugimoto M.**, **Soga T.** High-throughput screening of salivary polyamine markers for discrimination of colorectal cancer by multisegment injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2021. V. 1652. P. 462355.
71. **Ramautar R. Shyti B. Schoenmaker L. de Groote R.J.E. Derks M.D. Ferrari A.M.J.M., van den Maagdenberg A.M. Deelder O.A.** Mayboroda. Metabolic profiling of mouse cerebrospinal fluid by sheathless CE-MS // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 404. P. 2895–2900.
72. **Zamdborg L.**, **LeDuc R.D.**, **Glowacz K.J.**, **Kim Y.B.**, **Viswanathan V.**, **Spaulding I.T.**, **Early B.P.**, **Bluhm E.J.**, **Babai S.**, **Kelleher N.L.** ProSight PTM 2.0: improved protein identification and characterization for top down mass spectrometry // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 701–706.
73. **Kou Q.**, **Xun L.**, **Liu X.** TopPIC: a software tool for top-down mass spectrometrybased proteoform identification and characterization // Bioinformatics. 2016. V. 32. P. 3495–3497.
74. **Cesnik A.J.**, **Shortreed M.R.**, **Schaffer L.V.**, **Knoener R.A.**, **Frey B.L.**, **Scalf M.**, **Solntsev S.K.**, **Dai Y.**, **Gasch A.P.**, **Smith L.M.** Proteoform suite: software for constructing, quantifying, and visualizing proteoform families // J. Proteome Res. 2018. V. 17. P. 568–578.
75. **Cai W.**, **Guner H.**, **Gregorich Z.R.**, **Chen A.J.**, **Ayaz-Guner S.**, **Peng Y.**, **Valeja S.G.**, **Liu X.**, **Ge Y.** MASH suite pro: a comprehensive software tool for top-down proteomics // Mol. Cell. Proteom. 2016. V. 15. P. 703–714.
76. **Yuan H.**, **Jiang B.**, **Zhao B.**, **Zhang L.**, **Zhang Y.** Recent advances in multidimensional separation for proteome analysis // Anal. Chem. 2019. V. 91. P. 264–276.
77. **Magdeldin S.**, **Moresco J.J.**, **Yamamoto T.**, **Yates J.R.** 3rd, Off-line multidimensional liquid chromatography and auto sampling result in sample loss in LC/ LC-MS/MS // J. Proteome Res. 2014. V. 13. P. 3826–3836.
78. **Lewis K.C.**, **Opiteck G.J.**, **Jorgenson J.W.**, **Sheeley D.M.** Comprehensive on-line RPLC-CZE-MS of peptides // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1997. V. 8. P. 495–500.
79. **Zhang J.**, **Hu H.**, **Gao M.**, **Yang P.**, **Zhang X.** Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem timeof-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis // Electrophoresis. 2004. V. 25. P. 2374–2383.
80. **Michels D.A.**, **Hu S.**, **Schoenherr R.M.**, **Eggertson M.J.**, **Dovichi N.J.** Fully automated two-dimensional capillary electrophoresis for high sensitivity protein analysis // Mol. Cell. Proteom. 2002. V. 1. P. 69–74.
81. **Horká M.**, **Karásek P.**, **Šalplachta J.**, **Růžička F.**, **Štveráková D.**, **Pantůček R.**, **Roth M.** Nano-etched fused-silica capillary used for on-line preconcentration and electrophoretic separation of bacteriophages from large blood sample volumes with off-line MALDI-TOF mass spectrometry identification // Microchim. Acta. 2020. V. 187. P. 4154.
82. **Horká M.**, **Salplachta J.**, **Karásek P.**, **Kubesova A.**, **Horky J.**, **Matouskova H.**, **Slais K.**, **Roth M.** Combination of Capillary Isoelectric Focusing in a Tapered Capillary with MALDI-TOF MS for Rapid and Reliable Identification of Dickeya Species from Plant Samples // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 6806–6812.
83. **Horka M.**, **Karasek P.**, **Salplachta J.**, **Ruzicka F.**, **Vykydalova M.** Capillary isoelectric focusing of probiotic bacteria from cow's milk in tapered fused silica capillary with off-line matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 788. P. 193–199.
84. **Musyimi H.K.**, **Narcisse D.A.**, **Zhang X.**, **Stryjewski W.**, **Soper S.A.**, **Murray K.K.** Capillary electrophoresis coupled to MALDI mass spectrometry imaging with large volume sample stacking injection for improved coverage of C. borealis // Neuropeptidome Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 5968–5973.
85. **Preisler J.**, **Hu P.**, **Rejtar T.**, **Karger B.L.** Capillary electrophoresis–matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a vacuum deposition interface // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 4785–4795.
86. **Rejtar T.**, **Hu P.**, **Juhasz P.**, **Campbell J.M.**, **Vestal M.L.**, **Preisler J.**, **Karger B.L.** Off-Line Coupling of High-Resolution Capillary Electrophoresis to MALDI-TOF and TOF/TOF MS // J. Proteome Res. 2002. V. 1. P. 171–179.
87. **DeLaney K.**, **Li L.** Capillary electrophoresis coupled to MALDI mass spectrometry imaging with large volume sample stacking injection for improved coverage of C. borealis // Neuropeptidome Analyst. 2019. V. 16. P. 61–69.
88. **Duncan K.D.**, **Lanekoff I.** Spatially defined surface sampling capillary electrophoresis mass spectrometry // Anal. Chem. 2019. V. 91. P. 7819.
89. **Golubova A.**, **Lanekoff I.** Surface sampling capillary electrophoresis–mass spectrometry for a direct chemical characterization of tissue and blood samples // Electrophoresis. 2023. V. 44. P. 387–394.

PreeKem

PreeKem EXTRA

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Подготовка проб для анализа пестицидов, контроля медицинских и ветеринарных препаратов, пищевых добавок, красителей и др.

- ЗАПАТЕНТОВАННАЯ СИСТЕМА КОНТРОЛЯ УРОВНЯ ЖИДКОСТИ
- ВЫСОКОТОЧНЫЙ ДВУХПРИВОДНЫЙ АВТОСЕМПЛЕР
- ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ДАВЛЕНИЯ
- ПРЕЦИЗИОННЫЙ ШПРИЦЕВОЙ НАСОС
- СУШКА В ТОКЕ АЗОТА
- АВТОНОМНАЯ ЗАГРУЗКА ОБРАЗЦА
- ФУНКЦИЯ ПРОМЫВКИ ИГЛЫ

КР-АНАЛИТИКА
КОМПЛЕКС РЕШЕНИЙ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ

Авторизованный дистрибьютор PreeKem в России

+7 (495) 118-41-60
general@kr-analytical.ru
kr-analytical.ru

Москва, Варшавское шоссе, д. 1, стр. 6, БЦ "W Plaza 2", оф. А 201