

УДК 543.544.5.068.7

**Е. Д. Грибова, Е. В. Андреев, С. А. Новикова, Н. Н. Трошкина,  
П. П. Гладышев**

## **Определение квантовых точек и их конъюгатов методом эксклюзионной хроматографии**

*Конъюгаты квантовых точек (КТ) с белками могут применяться в самых различных приложениях биоанализа – от иммунохимических тест-методов до визуализации пораженных тканей и отслеживания лекарственных веществ в организме. Все большее расширение потенциала практического применения КТ и их конъюгатов с биомолекулами обуславливает необходимость поиска надёжных и эффективных способов анализа, позволяющих проводить идентификацию аналитов, определять их качество и отслеживать процессы деградации при хранении и в процессе эксплуатации. Использование эксклюзионной хроматографии позволяет провести оценку размера, однородности, процессов агрегации синтезированных КТ, моноклональных антител и их конъюгатов. В данной работе проведен выбор условий хроматографического анализа, при которых наблюдается высокая селективность и эффективность разделения объектов исследования. Продемонстрировано, что использование добавки анионного поверхностно-активного вещества в подвижную фазу позволяет значительно снизить взаимодействие аналитов с неподвижной фазой и делает возможным проведение оценки их размеров.*

*Ключевые слова:* квантовые точки, конъюгаты квантовых точек с моноклональными антителами, эксклюзионная хроматография, подвижная фаза

### **Об авторах**

**Грибова Елена Дмитриевна** – к.х.н., доцент кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна». *E-mail:* elena\_g67@mail.ru. Московская обл., г. Дубна, пр. Боголюбова 45, кв. 3.

**Андреев Евгений Валерьевич** – магистрант кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

**Новикова Сагила Алаудиновна** – старший преподаватель кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

**Трошкина Наталья Николаевна** – студент 3-го курса кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

**Гладышев Павел Павлович** – д.х.н., профессор кафедры химии, новых технологий и материалов государственного университета «Дубна».

Большинство современных методов биомедицинских исследований и диагностики основано на использовании флуоресцентных меток биомолекул. Использование в качестве флуорофоров коллоидных квантовых точек (КТ), представляющих собой наноразмерные кристаллы, является инновационным направлением. По сравнению с традиционными органическими флуорофорами КТ обладают рядом преимуществ. К ним можно отнести растворимость в широком диапазоне растворителей, высокий коэффициент экстинкции, узкий и симметричный пик люминесценции, фотостабильность и зависимость длины волны излучаемого света от структурных и размерных характеристик нанокристалла. КТ могут быть

сконъюгированы с биомолекулами за счёт ковалентного связывания между группами лигандов, покрывающих КТ, и функциональными группами биомолекул. Их конъюгаты могут применяться в самых различных приложениях биоанализа – от иммунохимических тест-методов до визуализации пораженных тканей и отслеживания лекарственных веществ в организме. На сегодняшний день биоанализ является одной из самых перспективных областей применения люминесцирующих нанокристаллов. Уникальные свойства КТ делают их идеальными флуорофорами для сверхчувствительной многоцветной детекции в медицинской диагностике, требующей регистрации сразу нескольких аналитических параметров одновременно [1–3].

Для оценки качества синтезированных КТ и их характеристики используют различ-

ные физико-химические методы анализа, такие как фотолюминесценция, рентгеновская дифракция, просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, а также метод динамического рассеяния света. В последнее время для исследования свойств КТ все чаще применяют хроматографические методы. Одним из таких методов является высокоэффективная жидкостная хроматография в эксклюзионном варианте, позволяющая проводить анализ таких наночастиц, как КТ [1]. Использование эксклюзионной хроматографии позволяет провести оценку размера наночастиц и их однородности, а также исследовать процессы синтеза и конъюгации КТ с биомолекулами.

В связи с вышесказанным, целью данной работы являлась разработка способа анализа КТ и их конъюгатов с белками методом эксклюзионной хроматографии.

Как известно, свойства КТ, вследствие квантовых и поверхностных эффектов, сильно зависят от их размеров [4]. Процессы агрегации КТ сопровождаются увеличением их размеров, а следовательно, изменением оптических свойств. В связи с этим одним из важных параметров характеристики полученных КТ является их устойчивость во времени. Наиболее подходящим методом оценки данного явления служит эксклюзионная хроматография, поскольку с её помощью осуществляется хроматографическое разделение частиц по размерам. Очень крупные молекулы не проникают в поры сорбента и элюируются первыми. Менее крупные молекулы, в зависимости от размера, могут проникать в поры на разную глубину и элюироваться с различными временами удерживания.

Первые исследования КТ методом эксклюзионной хроматографии с органической подвижной фазой (ПФ) были проведены в 1994 г. [5]. Авторами были продемонстрированы возможности разделения CdS КТ, стабилизированных алкантиолами, в тетрагидрофуране, содержащем  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$  с концентрацией 1 ммоль/л и додекантиол с концентрацией

1 ммоль/л. Более поздние исследования [6–9] показали, что данный метод позволяет выявлять размерные характеристики и свойства, зависящие от размера, на примере таких КТ, как CdSe и CdSe/ZnS. Выбор сорбентов, обеспечивающих оптимальные условия для решения аналитической задачи, проводят, основываясь на данных о химическом составе и растворимости анализируемых наночастиц. В зависимости от растворимости КТ определяют, какой вариант хроматографического процесса следует применить – хроматографию в водных системах или в органических растворителях [10].

В отличие от других хроматографических методов, основанных главным образом на распределении аналитов между неподвижной и подвижной фазами, определяемым прежде всего энтальпийным фактором, эксклюзионная хроматография представляет собой процесс, где в идеальных условиях взаимодействие между аналитами и неподвижной фазой (НФ) не происходит. Однако на практике взаимодействие аналитов с матрицей эксклюзионного сорбента трудно полностью исключить. В эксклюзионной хроматографии обычно используют НФ либо на основе полимера (например, матрицы на основе стирол/дивинилбензол или полисахаридов), либо на основе диоксида кремния. В качестве ПФ могут быть использованы как водные, органические, так и водно-органические растворы. В обзоре [11] рассмотрено большое количество комбинаций колонок и ПФ для анализа КТ методом эксклюзионной хроматографии. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, для хроматографического анализа КТ используют колонки с сорбентом как на основе полимеров, так и на основе диоксида кремния (*Nucleosil*). В этом случае в качестве ПФ применяют водные буферные растворы с определенным рН. Для анализа нерастворимых в воде КТ используют колонки с сорбентом на основе полимера (*Nucleogel* и *PL/PLgel*) с органическими растворителями в качестве ПФ.

Таблица 1. Обзор различных комбинаций неподвижных и подвижных фаз при анализе КТ [11]

КТ	Эксклюзионная колонка	Состав подвижной фазы	Детектор
<i>Эксклюзионная хроматография с использованием водной подвижной фазы</i>			
Стабилизированные полифосфатом CdS КТ	<i>Nucleosil 500 C4, Nucleosil 1000 C4 (Machery-Nagel)</i>	1 ммоль·л <sup>-1</sup> Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 1 ммоль·л <sup>-1</sup> гексаметафосфат	диодно-матричный
Стабилизированные полифосфатом ZnS КТ	<i>Nucleosil 500 C4, Nucleosil 1000 C4 (Machery-Nagel)</i>	1 ммоль·л <sup>-1</sup> Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 1 ммоль·л <sup>-1</sup> гексаметафосфат	диодно-матричный
Стабилизированные амфифильным полимером CdSe КТ	<i>Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences)</i>	0.1 моль·л <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7.4	фотометрический, флуоресцентный, масс-спектрометрический
Стабилизированные амфифильным полимером CdSe/ZnS КТ	<i>Superdex 200 (GE Healthcare Life Sciences)</i>	0.1 моль·л <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 7.4	фотометрический, флуоресцентный, масс-спектрометрический
<i>Эксклюзионная хроматография с использованием органической подвижной фазы</i>			
Стабилизированные додекантиолом CdS КТ	<i>Nucleosil 500, Nucleosil 1000 (Machery-Nagel)</i>	1 моль·л <sup>-1</sup> Cd(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> и 1 моль·л <sup>-1</sup> додекантиол в тетрагидрофуране	диодно-матричный
Стабилизированные алкилфосфином CdSe КТ	<i>PL-50, PL-1000 (Agilent/Polymer Laboratories)</i>	тетрагидрофуран	диодно-матричный, рефрактометрический, флуоресцентный
Стабилизированные алкилтиолом CdSe КТ	<i>PLgel 1110 (Agilent/Polymer Laboratories)</i>	0.1 моль·л <sup>-1</sup> триоктилфосфин в толуоле	фотометрический
Стабилизированные алкилфосфином CdSe/ZnS КТ	<i>PL-50, PL-1000 (Agilent/Polymer Laboratories)</i>	тетрагидрофуран	диодно-матричный, рефрактометрический, флуоресцентный

Одной из существенных проблем при анализе КТ методом эксклюзионной хроматографии является их адсорбция на матрице сорбента. Это влечет за собой ряд сложностей: во-первых, если происходит частичная необратимая адсорбция, то результаты количественного анализа могут быть сильно искажены; во-вторых, гидродинамические диаметры наночастиц, полученные при калибровке колонки с использованием эталонов размеров, будут смещены из-за сдвига удерживающих объемов аналитов, взаимодействующих с неподвижной фазой колонки. Для преодоления данных проблем обычно используют колонки с большим размером пор, а также модифицируют ПФ различными добавками с целью уменьшения взаимодействий между КТ и НФ колонки.

Эксклюзионная хроматография с водной ПФ применялась для разделения гидрофильных полифосфат-стабилизированных КТ CdS

и ZnS [11]. Относительно короткое время анализа при проведении исследований КТ позволило охарактеризовать быстро растущие в растворе коллоидные частицы, а также исследовать их стабильность и механизм роста. С целью снижения взаимодействий исследуемых CdS и ZnS КТ был использован элюент, содержащий как полифосфат (также используемый в качестве стабилизатора КТ в растворе), так и перхлорат кадмия для CdS и перхлорат цинка для ZnS. Для калибровки эксклюзионных колонок по диаметру частиц использовали частицы CdS и ZnS с узкой дисперсией, диаметры которых были определены с помощью просвечивающей электронной спектроскопии. Хотя данный метод успешно использовался для разделения и определения размеров частиц КТ в водных растворах, была обнаружена зависимость адсорбции КТ на неподвижной фазе колонки от их концентрации, когда её значение превышало 5 ммоль·л<sup>-1</sup>

(данные для CdS). В работе [12] было показано, что метод эксклюзионной хроматографии позволяет определять гидродинамический радиус частиц. Кроме того, сравнение данных, полученных методом эксклюзионной хроматографии или методом динамического рассеяния света, позволяющих определять гидродинамический радиус КТ, с данными измерения размера ядра методами просвечивающей электронной микроскопии или сканирующей туннельной микроскопии, дополнительно позволяет рассчитать радиус покрывающего КТ стабилизатора.

Как считают многие авторы [11; 12], адсорбция аналита на НФ колонки является довольно серьезным ограничивающим фактором для характеристики КТ методом эксклюзионной хроматографии. Однако решение этой проблемы открывает большие возможности данного метода для исследования КТ.

### Экспериментальная часть

#### Материалы и реактивы

Метанол  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 99,0 %, (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). Ацетонитрил,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , *HPLC*, *DFSIC*, (*Scharlau*, Испания). Изопропанол  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , 99,0 %, (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). Нитрат калия  $\text{KNO}_3$ , х.ч. (НПО ЭКРОС, Россия). Гидрофосфат натрия ч.д.а,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Химмед, Россия). Дигидрофосфат калия,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 90,0 % (Лабтех, Россия). Ортофосфорная кислота,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85 %, (Химмед, Россия). Додecilсульфат натрия,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$  99,0 %, (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (*EDC*)  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \geq 99$  % (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). N-гидроксисукцинимид (*NHS*)  $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3 \geq 97$  %, (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). Хлорид натрия  $\text{NaCl}$  (ч.д.а, Химмед). Хлорид калия  $\text{KCl}$  (ч.д.а, Химмед). Гидрофосфат натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (ч.д.а, Лабтех). Дигидрофосфат калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ч.д.а, Лабтех). Диэтаноламин (*DEA*)  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$  (99,9 %, *Sigma-Aldrich*). *Superose-6* (размер частиц: 30 мкм, матрица: высокосшитая агароза, Химмед). Диметилформамид (ДМФА)  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$  99 % (*SIGMA-ALDRICH*, Швейцария). КТ состава  $\text{CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS}$ -ПТВП после гидрофилизации их поверхности представлены ФГУП «НИИ ПА». Моноклональные антитела *ADV 34/2* к гликопротеину *gB* вируса болезни Ауески были получены в Ин-

ституте биофизики клетки РАН (г. Пущино) по методике [13].

#### Оборудование

Анализатор размера частиц серии *Zetasizer Nano S* (*Malvern Instruments Ltd, UK*), центрифуга *Sorvall ST 16R* (*Thermo Fisher Scientific, USA*). Жидкостной хроматограф *LC-20* фирмы “*Shimadzu*” (Киото, Япония), оснащенный диодно-матричным детектором *SPD-M20 A*, системой обработки данных *LC-Solutions* и аналитической колонкой *ZORBAX GF-250* с гидрофильной диольной привитой фазой на основе диоксидов циркония и кремния. рН-метр *SEVEN COMPACT S220-KIT* (*Mettler Toledo, USA*). Аналитические весы *AW-220* (*Shimadzu, Japan*). Система подготовки деионизированной воды “*Elix Advantage 5*” с блоком *E-POD* (*Millipore, USA*).

#### Получение конъюгатов квантовых точек с моноклональными антителами

Существует множество методов конъюгации КТ с биомолекулами. В данной работе для синтеза конъюгатов  $\text{CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS}$  КТ с моноклональными антителами *ADV 34/2* к гликопротеину *gB* вируса болезни Ауески был использован карбодиимидный метод [14]. Наиболее простым и хорошо изученным методом сшивания карбоксил-функциональных-КТ с молекулами антител является активирование при помощи 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (*EDC*).

В качестве рабочего буфера для получения конъюгатов используется фосфатно-солевой буфер (*PBS*)  $\text{pH} = 7,8$  (137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$ , 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 1,76 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Синтезированные КТ активируют реагентами: *EDC* и *NHS*. Необходимые количества соединений *EDC* и *NHS* готовятся соответственно в виде 1,64 % и 1,21 % растворов в ДМФА. После 15–20 минутной активации к КТ при перемешивании добавляют необходимое количество раствора антител (Ат) из расчета КТ:Ат 1:10 по молям. Смесь инкубируют 1,5–2 часа при комнатной температуре в темноте. После конъюгирования раствор стабилизируют, добавляя 1/10 часть от общего объема конъюгата 10 %-го *DEA* (диэтанолamina) в деионизированной воде, и оставляют еще на 20 минут в темноте. После стабилизации конъюгат концентрируют ультрацентрифугированием в пробирках *Amicon* при ускорении  $g = 16,1$ . Конечным этапом является очистка

конъюгатов от несвязавшихся свободных антител методом гель-фильтрации на колонке, заполненной *Superose 6*.

### Результаты и обсуждения

КТ представляют собой полупроводниковые нанокристаллы размером от 2 до 10 нм, которые создаются на основе неорганических полупроводниковых материалов (CdSe, InP, Si и др.). Для стабилизации КТ и обеспечения устойчивости в различных средах их покрывают монослоем стабилизирующих органических лигандов или полимеров. В данной работе исследования проводили с CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS КТ, покрытых поли(винилпирролидоном-со-малеиновым ангидридом-со-этиленгликольдиметакрилатом) с концевыми тиольными группами (ПТВП) [15] (рис. 1).

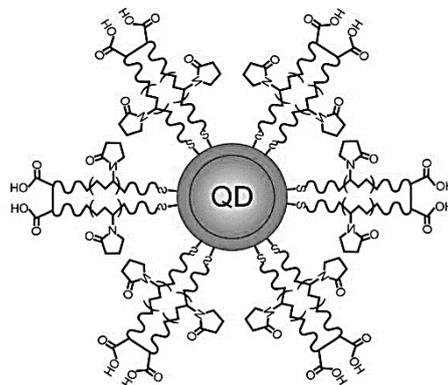


Рис. 1. CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП – КТ, по материалам [15]

Конъюгацию антител с карбоксильными группами стабилизатора, находящимся на поверхности КТ, осуществляли в мягких условиях карбодимидным методом с образованием ковалентной связи [14] согласно выше описанной методике по схеме (рис. 2).

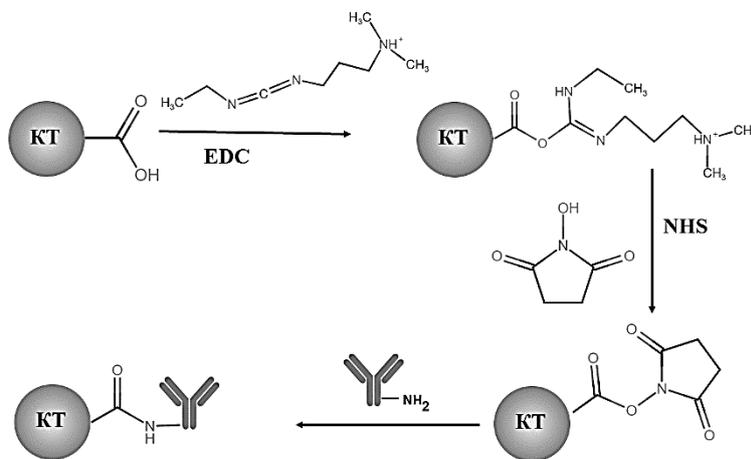


Рис. 2. Схема конъюгации КТ с антителами при использовании *EDC* и *NHS*

После присоединения первой молекулы антитела на поверхности КТ остается поверхность для присоединения последующих молекул антител. Предельное количество молекул антител, которое может присоединиться к КТ, определяется соотношением размеров этих наночастиц. Обычно к поверхности КТ могут быть присоединены от одной до пяти молекул антител. Кроме этого, процесс взаимодействия антител (в общем случае белков) с КТ может приводить к образованию более сложных надструктур, в которых имеет место чередование антител с КТ.

Контролировать процессы синтеза и конъюгации с антителами КТ удобно методом эксклюзионной хроматографии. Основными факторами, определяющими поведение КТ, антител и их конъюгатов в эксклюзионной хроматографии, являются размеры исходных объектов, их комплексов (конъюгатов) и химическая структура поверхности.

Эксклюзионная хроматография широко используется для определения молекулярного веса и зарядовых изоформ белковых молекул, их агрегации и гликозилирования низкомолекулярными компонентами, а также для разде-

ления белков различного размера и выделения из смеси определенного вида белка. В отличие от других видов хроматографии, в данном методе отсутствует взаимодействие анализируемого вещества с материалом НФ колонки. Благодаря этому обеспечивается идеальное разделение и исследование белков, которые содержат агрегаты, вспомогательные вещества и другие загрязнения, образующиеся при деградации белков. По этой причине эксклюзионная хроматография широко используется для характеристики биомолекул. Порядок элюирования зависит от размеров молекул в растворе, но есть ряд особенностей хроматографического поведения белков. Большинство белков имеют компактную форму молекул, но некоторые из них имеют цилиндрическую форму и вследствие этого больший гидродинамический радиус в растворе, и поэтому элюируются раньше, чем ожидается. Более того, различные подвижные фазы могут способствовать изменению формы молекул в растворе (гидродинамического радиуса или радиуса инерции), что приводит к изменению порядка элюирования.

Таким образом, условия хроматографического разделения влияют на правильность интерпретации анализа. Помимо этих затруднений при анализе моноклональных антител *ADV 34/2* к гликопротеину *gB* вируса болезни Ауески методом эксклюзионной хроматографии, определенные сложности вызывает и анализ КТ. Стабильность анализов при

проведении их анализа будет зависеть от природы ПФ. В связи с этим, были проведены исследования влияния состава подвижной фазы на их хроматографические параметры и стабильность.

В эксклюзионной хроматографии в качестве подвижной фазы обычно используется свежеприготовленный буферный раствор. Так как аналиты устойчивы и не подвержены агрегации или разложению в фосфатном буфере при  $\text{pH} = 7$ , он был выбран в качестве ПФ. Хроматографирование проводили в изократическом режиме на колонке *ZORBAX GF-250* фирмы *Agilent* на основе диоксидов циркония и кремния с гидрофильной диольной привитой фазой. Изначально в качестве ПФ был выбран фосфатный буферный раствор с концентрацией  $c = 0,067$  М. Однако при этом время анализа было велико, и даже в течение 40 минут вещества не элюировались с колонки. В режиме эксклюзионной хроматографии увеличение элюирующей силы ПФ достигается уменьшением ионной силы элюента. Поэтому для дальнейших исследований был выбран фосфатный буферный раствор с концентрацией  $c = 0,034$  М, а объемная скорость ПФ – 3 мл/мин.

Хроматограмма представлена на рис. 3.

Идентификацию хроматографических пиков, соответствующих КТ и конъюгату, проводили по времени удерживания и по спектрам поглощения в хроматографических зонах отдельных аналитов (рис. 4).

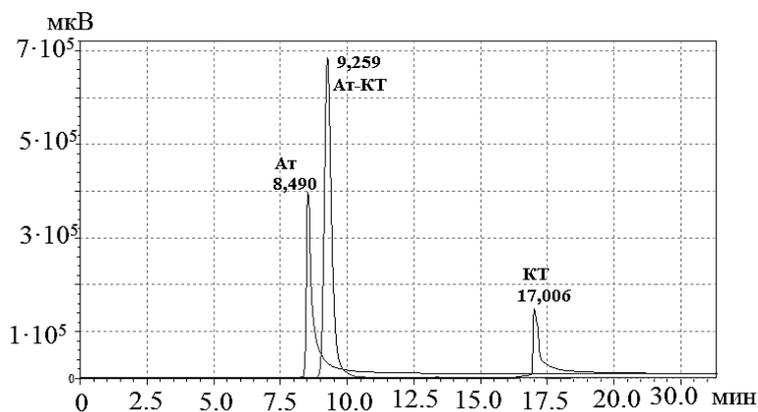


Рис. 3. Хроматограммы растворов конъюгата (розовый), CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП – КТ (черный) и моноклональных антител *ADV 34/2* к гликопротеину *gB* вируса болезни Ауески (синий). Условия анализа: ПФ фосфатный буферный  $c = 0,0335$  М; изократический режим элюирования; объем инъекции 5 мкл; скорость потока – 3 мл/мин

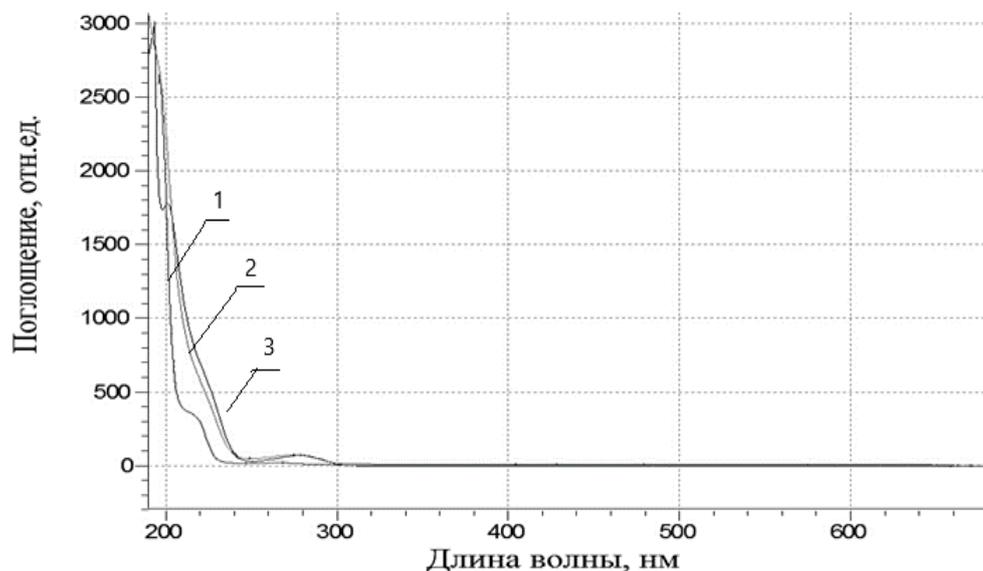


Рис. 4. Спектры поглощения CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП – КТ (1), моноклональных антител ADV 34/2 к гликопротеину *gB* вируса болезни Аюески (2), конъюгата CdTeSe/CdS/CdZnS/ZnS-ПТВП – КТ с моноклональными антителами ADV 34/2 (3)

Из приведенных на рис. 3 хроматограмм видно, что при данных условиях анализа хроматографическая зона аналитов формируется достаточно хорошо, однако порядок элюирования КТ, антител и их конъюгата нарушен.

Хроматографические параметры для КТ, моноклональных антител и конъюгата в условиях изократического режима элюирования при объеме инъекции 5 мкл и скорости потока 1 мл/мин представлены в табл. 2.

Таблица 2. Хроматографические параметры в выбранных условиях хроматографирования

Аналит	Размер частиц, определенные методом ДРС, нм	Время удерживания, мин	Приведенное время удерживания, мин	Коэффициент емкости, $k'$
Конъюгат	30-40	9,259	7,159	3,409
КТ	12-15	17,006	14,906	7,098
Ат	10	8,490	6,390	3,044

Из приведенных в таблице данных видно, что в выбранных условиях достигается хорошее разрешение пиков, значения коэффициентов емкости  $k'$  для всех пиков находятся в оптимальном диапазоне. Эффективность хроматографической колонки ( $N$ ) для исследуемых компонентов высока. Однако время удерживания частиц не согласуется с закономерностью для эксклюзионной хроматографии. В частности, время удерживания конъюгата, который представляет собой сшитые антитело и КТ, больше времени удерживания моноклональных антител в отличие от предполагаемого в эксклюзионной (ситовой) хроматографии. Это указывает на то, что в условиях хроматографирования имеет место взаимодействие частиц конъюгата с матрицей эксклюзионного сорбента. Производители обыч-

но не выдают точную информацию о матрице сорбента. Однако можно предположить, что структура поверхностного слоя НФ представляется схемой, приведенной на рис. 5. Порядок выхода из колонки КТ и антител также не соответствует эксклюзионному механизму и указывает на взаимодействие КТ с матрицей используемого эксклюзионного сорбента.

Для хорошего разделения конъюгатов и белков необходимо минимизировать взаимодействие между биомолекулой и матрицей сорбента [16]. Одной из причин нарушения последовательности выхода анализируемых веществ могут являться возникновение электростатического взаимодействия между аналитами и НФ или образование ионных и водородных связей между материалом сорбента (диольные группы) и аналитом. Для ослабле-

ния таких взаимодействий необходим подбор состава ПФ.

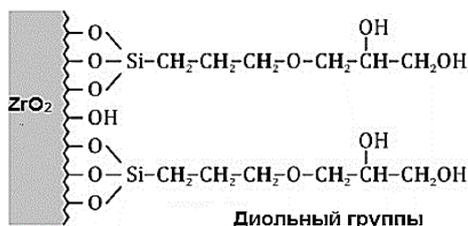


Рис. 5. Предположительная схема матрицы сорбента колонки для эксклюзионной хроматографии ZORBAX GF-250

Обычно для снижения такого взаимодействия и получения узких и симметричных пиков в условиях эксклюзионной хроматографии в подвижную фазу добавляют анионные и неионногенные поверхностно-активные вещества (ПАВ). При добавлении в ПФ ПАВ может происходить увеличение отрицательного заряда НФ и смена заряда аналита с положи-

тельного на отрицательный. Таким образом, за счет отталкивания одноименных зарядов между НФ и объектами исследования снижается их взаимодействие.

Для изменения порядка выхода веществ было решено модифицировать ПФ с помощью добавки в ПФ додецилсульфата натрия (ДДСН). Дальнейший анализ антител и их конъюгатов был проведен при следующих условиях: изократический режим элюирования, ПФ: фосфатный буфер с добавлением ПАВ, скорость потока 3 мл/мин, объем инъекции 5 мкл. Наложенные хроматограммы КТ, антител и конъюгата представлены на рис. 6.

Из представленных данных видно, что пики аналитов разрешены и выходят в порядке увеличения размеров, что свидетельствует о возможности проведения их анализа в смеси в выбранных условиях.

Хроматографические параметры для КТ, моноклональных антител и конъюгата были рассчитаны в выбранных условиях и представлены в табл. 3.

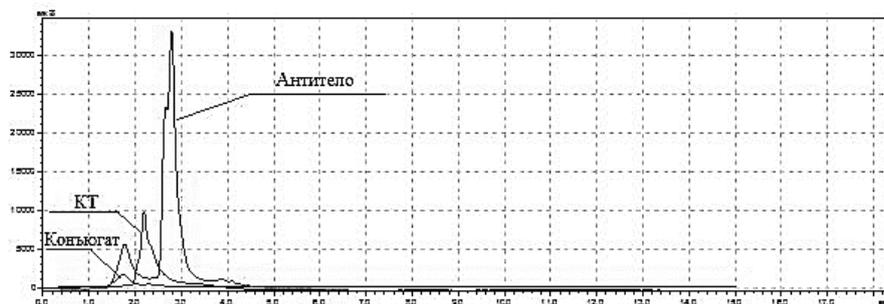


Рис. 6. Наложение хроматограмм КТ, антитела и конъюгата Условия анализа: ПФ 0,0335 М ФБ, 1мМ ДДСН; изократический режим элюирования, скорость потока 3 мл/мин, объем инъекции 5 мкл

Таблица 3. Хроматографические параметры

Аналит	Время удерживания, мин	Приведенное время удерживания, мин	Коэффициент емкости, $k'$	Ширина пика у основания, сек	Эффективность колонки, $N$	ВЭТТ $H$ , мм
КТ	2.178	1.878	6.260	60	76	3.280
Конъюгат	1.732	1.432	4.773	48	75	3.330
Антитела	2.781	2.481	8.270	42	252	0.992

Как видно из табл. 3, эффективность и селективность разделения увеличивается при использовании анионного ПАВ в качестве добавки в ПФ. Теоретически аналиты в соответствии с их размером должны выйти в следующем порядке: конъюгат, КТ, антитело, т.к. конъюгат представляет собой связанные КТ и

антитела, что согласуется с данными, полученными методом динамического рассеяния света (ДРС). Помимо этого, если сравнить порядок элюирования при использовании различного состава ПФ, то можно увидеть, что при добавке в ПФ анионного ПАВ времена

удерживания смещаются и аналиты выходят в порядке уменьшения их размеров.

### Заключение

Проведен анализ КТ, моноклональных антител ADV 34/2 к гликопротеину *gB* вируса болезни Ауески и их конъюгатов в выбранных условиях. Экспериментально показано, что для анализа КТ, моноклональных антител и их конъюгата можно использовать метод эксклюзионной хроматографии. Анализ проводят в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы фосфатного буферного раствора pH = 7 с добавлением додецилсульфата натрия, что позволяет снизить электростатическое взаимодействие аналитов с НФ. Это позволяет разделить пики аналитов и обеспечить порядок элюирования аналитов в соответствии с их размерами, определенными методом ДРС.

### Благодарности

Авторы данной работы выражают благодарность д.х.н., профессору Крыльскому Д.В. и к.х.н Новичкову Р.В. за предоставленную возможность выполнить экспериментальную работу по изучению размеров методом ДРС в лаборатории ФГУП «НИИ ПА» и обсуждение результатов.

### Библиографический список

1. Pathak S., Choi, S. et al. Hydroxylated Quantum Dots as Luminescent Probes for in Situ Hybridization // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 4103–4104.
2. Wang Y., Li J. et al. Stabilization of Inorganic Nanocrystals by Organic Dendrons // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124, № 10. P. 2293–2298.
3. Gladyshev P.P., Tumanov Yu.V., Ibragimova S.A., Kouznetsov V.V., Gribova E.D. Quantum dots in proteomic studies and medical diagnostics // *Russian Chemical Bulletin.* 2018. T. 67, №. 4. C. 600–613.
4. Novikova S.A., Gribova E.D., Andreev E.V., Gladyshev P.P., Kalganova N.V., Ibrahim M.A. Colloidal Synthesis and Characterization of Hydrophilic CdTe Quantum Dots for Medical Diagnostics // *The First International Conference on Molecular Modeling and Spectroscopy 19–22 February, 2019 // Egyptian Journal of Chemistry.* 2019. T. 62. C. 77–88.
5. Fischer C.H., Giersig M., Siebrands T. Analysis of colloidal particles V. Size-exclusion chromatography of colloidal semiconductor particles // *Journal of Chromatography A.* 1994. V. 670, № 1–2. P. 89–97.
6. Wilcoxon J.P., Provencio P.P. Chemical and optical properties of CdSe and CdSe/ZnS nanocrystals investigated using high-performance liquid chromatography // *The Journal of Physical Chemistry B.* 2005. V. 109, № 28. P. 13461–13471.
7. Wang M. et al. Colloidal CdSe Nanocrystals Passivated by a Dye-Labeled Multidentate Polymer: Quantitative Analysis by Size-Exclusion Chromatography // *Angewandte Chemie International Edition.* 2006. V. 45, № 14. . 2221–2224.
8. Krueger K.M. et al. Characterization of nanocrystalline CdSe by size exclusion chromatography // *Analytical chemistry.* 2005. V. 77, № 11. P. 3511–3515.
9. Krueger K.M. et al. The hydrodynamic size of polymer stabilized nanocrystals // *Nanotechnology.* 2007. V. 18, № 47. C. 475709.
10. Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. Обобщенные критерии элюирующей способности растворителей в высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2012. Т. 12, №. 2.
11. Pitkänen L., Striege A.M. Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots // *Trends Analyt Chem.* 2016. V. 80. C. 311–320.
12. Pitkänen L., Striegel A.M. Determining the core, corona, and total size of CdSeS/ZnS quantum dots by SEC/QELS and TEM // *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2016. T. 408, №. 15. C. 4003–4010.
13. Vrublevskaya V.V., Afanasyev V.N., Grinevich A.A., Skarga Y.Y., Gladyshev P.P., Ibragimova S.A., Krylsky D.V., Dezhurov S.V., Morenkov O.S. A sensitive and specific lateral flow assay for rapid detection of antibodies against glycoprotein B of Aujeszky's disease virus // *Journal of virological methods.* 2017. T. 249. C. 175–180.
14. You C., Piehler J. Multivalent chelators for spatially and temporally controlled protein functionalization // *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2014. V. 406, №. 14. P. 3345–3357.
15. Dezhurov S.V., Krylsky D.V., Rybakova A.V., Ibragimova S.A., Gladyshev P.P., Vasiliev A.A., Morenkov O.S. One-pot synthesis of polythiol ligand for highly bright and stable hydrophilic quantum dots toward bioconjugate formation // *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology.* 2017. T. 9, №. 1. C. 015002.
16. Ремпель С.В., Подкорытова А.А., Ремпель А.А. Концентрационное тушение флуоресценции коллоидных квантовых точек сульфида кадмия // *Физика твердого тела.* 2014. Т. 56, вып. 3. С. 549–552.