

Новые подходы к формированию покрытий на основе альбумина и наночастиц золота для хирального разделения методом капиллярного электрофореза

**В.П. Моргачева, *Д.В. Макеева, Е.В. Соловьева,
Е.А. Колобова, Л.А. Карцова**

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии»
Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, в. Петергоф, Университетский пр., 26,

*Адрес для переписки: Макеева Дарья Валерьевна, E-mail: dasha.dzema@gmail.com

Поступила в редакцию 22 января 2023 г., после доработки 17 февраля 2023 г.

Объединение свойств наночастиц золота и бычьего сывороточного альбумина перспективно при создании хиральных стационарных фаз для обеспечения высокой энантиоселективности за счет развитой поверхности покрытий и увеличения концентрации хирального селектора на стенках капилляра. В работе предложены и сопоставлены два подхода к формированию физически адсорбированных полислоистых покрытий на основе цитрат-стабилизированных наночастиц золота (цНЧЗ) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) для осуществления хирального разделения в условиях капиллярного электрофореза. Первый подход заключался в прививке цНЧЗ, предварительно модифицированных БСА, к поверхности капилляра, покрытого поли(диаллилдиметиламмоний хлоридом) (ПДАДМАХ). Полимер ПДАДМАХ выполнял роль связующего слоя, способствующего сорбции наночастиц на поверхности капилляра. Показано, что низкий дзета-потенциал цНЧЗ-БСА снижает эффективную сорбцию наночастиц на поверхности капилляра и не позволяет создавать плотные покрытия с высоким содержанием хирального селектора. Второй подход включал послойное последовательное нанесение ПДАДМАХ и цНЧЗ на предварительном этапе, в результате чего формировался плотный слой наночастиц на поверхности капилляра. Основным этапом состоял в функционализации цНЧЗ альбумином, проводимой непосредственно внутри капилляра. Показано, что послойное нанесение модификаторов обеспечивает формирование плотного слоя наночастиц на поверхности капилляра, что подтверждено снимками сканирующей электронной микроскопии. Покрытие оказалось стабильным во всем диапазоне исследуемых значений pH (2-10). Использование такого покрытия позволяет существенно сократить концентрацию вводимого БСА (до 5 мкМ) в фоновый электролит для разделения энантиомеров триптофана, что подтверждает перспективность сочетания наночастиц золота и хиральных модификаторов в капиллярном электрофорезе для увеличения удельной поверхности внутренних стенок капилляра.

Ключевые слова: наночастицы золота, бычий сывороточный альбумин, поли(диаллилдиметиламмоний хлорид), хиральное разделение, капиллярный электрофорез, полислоистые покрытия.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2023, vol. 27, no. 1, pp. 21-31

DOI:10.15826/analitika.2023.27.1.002

Novel approaches to the formation of coatings based on gold nanoparticles and albumin for chiral separation in capillary electrophoresis

**V.P. Morgacheva, *D.V., Makeeva, E.V. Solovyeva,
E.A. Kolobova, L.A. Kartsova**

Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry
26 Universitetskii Av., Peterhof, St. Petersburg,
198504, Russian Federation

*Corresponding author: Daria V. Makeeva, E-mail: dasha.dzema@gmail.com

Submitted 22 January 2023, received in revised form 17 February 2023

Combination of properties of gold nanoparticles and bovine serum albumin is promising for the formation of chiral stationary phases enabling high enantioselectivity due to developed surface of coatings and increased chiral selector concentration on the capillary walls. In this work we proposed and compared two approaches to the formation of physically adsorbed multilayer coatings based on citrate-stabilized gold nanoparticles (cGNP) and bovine serum albumin (BSA) for the chiral separation in capillary electrophoresis. In the first approach pre-synthesized cGNP modified with BSA were immobilized on the capillary coated by poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC). PDADMAC polymer was used as a binding layer promoting sorption of the nanoparticles on the capillary surface. It was shown that cGNP-BSA was poorly adsorbed on the capillary surface due to low zeta potential and could not be used for the formation of dense coatings. The second approach included sequential layer-by-layer deposition of PDADMAC and cGNP, resulting in the formation of a dense layer of nanoparticles. The main stage included in-capillary functionalization of cGNP with BSA. Scanning electron microscopy confirmed that the layer-by-layer deposition of modifiers ensured the formation of dense layer of nanoparticles on the capillary surface. The coating was stable in the entire range of pH studied (2–10). The application of such coating allowed reduction of BSA concentration (to 5 μM) in the background electrolyte required for the tryptophan enantiomers separation. It confirms the prospectiveness of combining nanoparticles and chiral selectors for the increase of specific surface area of the capillary inner walls.

Keywords: gold nanoparticles, bovine serum albumin, poly(diallyldimethylammonium chloride), chiral separation, capillary electrophoresis, multilayer coatings.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых подходов к экспрессному и селективному разделению энантиомеров биологически активных соединений является актуальной и востребованной задачей аналитической химии [1]. Капиллярный электрофорез (КЭ) отличается от других методов разделения высокой эффективностью, простотой пробоподготовки и отсутствием необходимости использования дорогостоящего оборудования и сорбентов [2]. Для осуществления энантиоселективного разделения в КЭ требуется применение хиральных селекторов в качестве модификаторов внутренней поверхности капилляра или фонового электролита (ФЭ), наиболее часто используемыми из которых являются нейтральные и заряженные циклодекстрины и их производные [3], полимерные поверхностно-активные вещества (ПАВ) [4, 5], ионные жидкости [6], белки [7] и т.д.

Активно применяемый хиральный модификатор - альбумин, представляет собой глобулярный, стабильный, водорастворимый белок, в структуре которого имеется два сайта связывания лекарств. Центры связывания представляют собой гидрофобные карманы, расположенные в субдоменах IIА и IIIА. С сайтом IIА связываются преимущественно соединения с полярными или заряженными боковыми цепями, с сайтом IIIА – соединения, имеющие гидрофобные боковые цепи [8]. В то же время наличие большого количества функциональных групп в структуре белка открывает широкие возможности для его иммобилизации на поверхности внутренних стенок кварцевого капилляра. Имеются данные об использовании бычьего сывороточного альбумина (BSA) для формирования динамических покрытий путем добавления модификатора в фоновый электролит (ФЭ), например, при разделении энантиомеров эфедрина, норэфедрин и триптофана [9, 10]. Главный недостаток таких покрытий – необходимость присутствия

значительных концентраций хирального селектора в составе ФЭ из-за недостаточного количества активных центров на поверхности капилляра для реализации разделения. Эта проблема может быть решена за счет увеличения удельной поверхности капилляра, модифицируемой альбумином.

Для этого возможно использовать наночастицы [11], среди которых наиболее востребованы наночастицы золота (НЧЗ) [12], характеризующиеся способностью к специфическим взаимодействиям с аналитами. Кроме того, НЧЗ могут быть легко модифицированы, что позволяет придавать им и хиральные свойства. Прививка хирального селектора может проводиться путем замены лиганда на поверхности НЧЗ. Например, наночастицы, полученные цитратным методом (стабилизированные цитрат-анионами), зачастую используют как прекурсоры для дальнейшей модификации [13, 14]. Таким образом, объединение свойств наночастиц золота и альбумина при создании хиральных стационарных фаз могло бы обеспечить высокую энантиоселективность покрытий за счет развитой поверхности и увеличения концентрации хирального селектора на стенках капилляра.

Известные в литературе способы нанесения НЧЗ на поверхность капилляра включают ковалентную иммобилизацию за счет взаимодействия с азот- и сера-содержащими линкерами, предварительно нанесенными на стенки капилляра [15, 16]. Недостатками такого подхода являются трудоемкость, многостадийность и, как следствие, плохая воспроизводимость. Альтернативный способ формирования покрытий – физическая адсорбция, где модификация осуществляется за счет неспецифических взаимодействий (в основном – электростатических). Использование многослойности при формировании таких покрытий позволяет наносить на поверхность капилляра модификаторы любого заряда. Так, для нанесения отрицательно заряженных цитрат-стаби-

лизированных НЧЗ (цНЧЗ) возможно использование поли(диаллилдиметиламмоний) хлорида (ПДАДМАХ) в качестве связующего слоя. Он обладает высокой молекулярной массой и не зависящим от значения рН положительным зарядом [17].

Таким образом, цель данного исследования – разработка подходов к формированию на стенках кварцевого капилляра плотных физически адсорбированных многослойных покрытий на основе наночастиц золота и бычьего сывороточного альбумина с использованием поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) в качестве связующего слоя для электрофоретического разделения энантиомеров биологически активных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование

Для проведения электрофоретических экспериментов использовали систему капиллярного электрофореза «Капель-105М» (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург). В функционал прибора входят кассеты с кварцевым капилляром общей длиной 60 см и эффективной – 50 см с внутренним диаметром 50 мкм и внешним полиимидным покрытием. Детектирование спектрофотометрическое (спектральный диапазон от 190 до 380 нм). Обработку электрофоретических экспериментов проводили с использованием программного обеспечения «Эльфوران» («Люмэкс», КЭ). Для получения изображений синтезированных наночастиц просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) использовали электронный микроскоп Libra 200FE (Carl Zeiss, Германия). Снимки внутренней поверхности капилляра получали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью системы Zeiss Merlin (Carl Zeiss, Германия). Электронные спектры синтезированных наночастиц получены с использованием спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Для измерения дзета-потенциала использовали лазерный анализатор Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания).

Средства измерений и дополнительное оборудование: механические микродозаторы переменного объема 1-20, 20-100 и 100-1000, 500-5000 мкл (Sartorius, Германия); лабораторный рН-метр рН 211 (Hanna Instruments, США); аналитические весы (Sartorius, d = 0.1 мг, Германия); ультразвуковая ванна «Сапфир» ТТЦ (РМД) (Россия); центрифуга 5430 (Eppendorf, Германия); деионизатор Д-301 (Аквилон, Китай); мульти-вортекс V32 (Biosan, Латвия).

Реагенты и приготовление растворов

Ацетон ч.д.а., концентрированную соляную кислоту х.ч. приобретали в ЗАО «Вектон» (Россия). Ацетонитрил х.ч., борную кислоту х.ч., дигидрофосфат натрия двуводный х.ч., метанол х.ч., фосфорную кислоту х.ч., диметилформамид (ДМФА) х.ч. приобретали в ООО «АО Реахим» (Россия). Гидроксид

натрия ч.д.а. приобретали в «Химреактив» (Россия), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), х.ч. – в «Sigma» (Германия). Золотохлористоводородную кислоту (HAuCl_4 , 99 %) приобретали в «Alfa Aesar» (США).

Стандартные образцы аминокислот и β -блокаторов: D,L-фенилаланин (Phe) (> 98% ВЭЖХ), D,L-тирозин (Tyr) (> 98% ВЭЖХ), D,L-триптофан (Trp) (> 98% ВЭЖХ), L-триптофан (99% ВЭЖХ), приобретали в «Sigma» (Германия),

Модификацию внутренней поверхности капилляров осуществляли с использованием поли(диаллилдиметиламмония хлорида) (водный раствор с массовой долей 20 %, молярная масса 200000 - 350000 г/моль), и бычьего сывороточного альбумина («Sigma», Германия).

Стоковые растворы триптофана (рацемическая смесь и индивидуальные энантиомеры) с концентрацией 2 мг/мл готовили путем растворения точной навески 0.0080 г в 4 мл смеси метанол-вода (1:1 по объему). Рабочие растворы с концентрациями 50 - 150 мкг/мл готовили непосредственно перед анализом путем разбавления стоковых растворов деионизованной водой. Все приготовленные растворы до использования хранили в холодильнике при температуре +4 - +6 °С. Рабочие растворы β -блокаторов (50 - 100 мкг/мл) готовили путем разбавления стандартных растворов деионизованной водой непосредственно перед анализом. Для формирования покрытия стенок кварцевого капилляра использовали водный раствор полимера ПДАДМАХ с концентрацией 2 г/л, который готовили в мерной колбе на 5 мл путем разбавления точных навесок компонентов: 0.0500 г раствора ПДАДМАХ (массовая доля 20 %), 0.0121 г Трис, 0.0434 г NaCl в 0.5 мл 0.1М раствора HCl. Полученный раствор доводили до метки деионизованной водой.

Синтезированные цНЧЗ и модифицированные бычьим сывороточным альбумином цНЧЗ использовали в виде концентрированных суспензий.

Приготовление фоновых электролитов

Боратный буферный раствор (0.2 М, рН = 9.0, ББР) готовили в мерной колбе вместимостью 50 мл путем растворения навески борной кислоты (0.6180 г) в 30 мл воды и доведения рН до требуемого значения по рН-метру с помощью 0.2 М раствора NaOH. Далее полученный раствор доводили до метки деионизованной водой.

Фосфатный буферный раствор (0.1 М, рН = 2.5, ФБР) готовили в мерной колбе вместимостью 50 мл путем растворения навески дигидрофосфата натрия (0.6000 г) в 30 мл воды и доведения рН до требуемого значения по рН-метру с помощью 0.1 М раствора HCl. Далее полученный раствор доводили до метки деионизованной водой.

Фосфатный буферный раствор (0.5 М, рН = 7.4) готовили в мерной колбе вместимостью 50 мл путем растворения навески гидрофосфата натрия (3.5490 г) в 30 мл воды и доведения рН до

требуемого значения по рН-метру с помощью 0.1 М раствора HCl. Далее полученный раствор доводили до метки деионизованной водой.

Трис-HCl буферный раствор (0.05M, pH = 7.4) готовили в пластиковых пробирках 14 мл путем смешения 3.5 мл 0.2 М Трис, 5.6 мл 0.1 М HCl и 4.9 мл деионизованной воды.

Все буферные растворы непосредственно перед электрофоретическими экспериментами разбавляли до нужной концентрации деионизованной водой и центрифугировали на скорости 7000 оборотов/мин в течение 3 мин.

Синтез, концентрирование и характеристика ц-НЧЗ и ц-НЧЗ-БСА

Цитрат-стабилизированные НЧЗ получали по методу Фримана [18]. Синтез включал: кипячение 50 мл 1 мМ раствора HAuCl_4 при постоянном интенсивном перемешивании в колбе, снабженной обратным холодильником; добавление к кипящему раствору 5 мл 38.8 мМ раствора цитрата натрия; кипячение реакционной смеси при постоянном перемешивании в течение 10 мин; далее – охлаждение до комнатной температуры при слабом перемешивании. Полученные суспензии хранили в стеклянной таре, закрытой алюминиевой фольгой, в холодильнике.

Очистку и концентрирование синтезированных суспензий цНЧЗ проводили центрифугированием 1.5 мл суспензии при 18000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отбрасывали, а сконцентрированную фазу ресуспендировали деионизованной водой, доводя объем до 0.5 мл.

Синтезированные цНЧЗ модифицировали БСА с использованием исходных растворов БСА в трех различных концентрациях: 1.5, 15.0 и 150.0 мг/мл. В виале 6 мл нагревали 5.94 мл раствора синтезированных и очищенных цНЧЗ до 40 °С. В нагретый раствор наночастиц вливали 0.06 мл раствора БСА определенной концентрации (1.5, 15.0 или 150.0 мг/мл), и оставляли при нагревании на 12 ч и хранили закрытым алюминиевой фольгой в холодильнике при температуре +4 - +6 °С. Полученные цНЧЗ-БСА очищали от непрореагировавших реагентов и концентрировали центрифугированием аналогично процедуре, описанной для цНЧЗ.

Синтезированные цНЧЗ модифицировали БСА с использованием исходных растворов БСА в трех различных концентрациях: 1.5, 15.0 и 150.0 мг/мл. В виале 6 мл нагревали 5.94 мл раствора синтезированных и очищенных цНЧЗ до 40 °С. В нагретый раствор наночастиц вливали 0.06 мл раствора БСА определенной концентрации (1.5, 15.0 или 150.0 мг/мл), и оставляли при нагревании на 12 ч и хранили закрытым алюминиевой фольгой в холодильнике при температуре +4 - +6 °С. Полученные цНЧЗ-БСА очищали от непрореагировавших реагентов и концентрировали центрифугированием аналогично процедуре, описанной для цНЧЗ.

Таблица 1

Условия формирования многослойных покрытий с использованием ПДАДМАХ, цНЧЗ, БСА и цНЧЗ-БСА.

Table 1

Conditions of multilayer coatings formation using PDADMAC, cGNP, BSA and cGNP-BSA.

Покрытие	Подготовка поверхности капилляра	Подготовка модифицирующего раствора	Условия формирования покрытия	Стабилизация покрытия / проверка $\mu_{zол}$ после модификации
1. На основе ПДАДМАХ (первый связующий слой)	Последовательная промывка капилляра (травление): ацетонитрил (10 мин), H_2O (5 мин), 0.1 М раствор HCl (10 мин), H_2O (5 мин), 0.1 М раствор NaOH (60 мин), H_2O (10 мин)	Раствор ПДАДМАХ (2 г/л) выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 30, 45, 60, 80 мин при 1000, 2000 мбар	10 мМ ФБР, pH = 2.5, 10 кВ, 10 мин / 10 мМ ФБР pH 2.5, -20 кВ, маркер ЭОП – 0.05 % ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
2. На основе цНЧЗ-БСА (второй слой)	Капилляр с покрытием ПДАДМАХ промывали водой в течение 10 мин при 1000 мбар	Суспензию цНЧЗ-БСА выдерживали на УЗИ (5 мин) и перемешивали с использованием системы <i>Vortex</i> (5 мин)	Капилляр промывали раствором модификатора в течение 30, 45, 60, 80 мин при 1000, 2000 мбар или при приложении напряжения +25 кВ и -25 кВ	10 мМ ФБР pH 7.4, -10 кВ / 10 мМ ФБР pH 7.4, 20 кВ, маркер ЭОП – 0.05 % ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.
3. На основе цНЧЗ с постфункционализацией БСА	Капилляр с покрытием ПДАДМАХ промывали водой в течение 10 мин при 1000 мбар	Суспензия цНЧЗ и 30 мМ раствор БСА в 25 мМ ФБР pH 7.4 подготавливали как для покрытий, описанных в пунктах 1 и 2.	1. Капилляр промывали цНЧЗ 30, 45, 60, 80 мин при 1000, 2000 мбар или +25 кВ и -25 кВ; 2. Капилляр заполняли раствором БСА и оставляли на 10, 12, 14 ч.	10 мМ ФБР pH 7.4, -10 кВ / 10 мМ ФБР pH 7.4, 20 кВ, маркер ЭОП – 0.05 % ДМФА, детектирование прямое, 210 нм.

Синтезированные наночастицы (цНЧЗ и цНЧЗ-БСА) охарактеризованы методами спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии и методом электрофоретического рассеяния света для определения размера, формы, концентрации и дзета-потенциала поверхности. Регистрацию спектров поглощения проводили в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм при средней скорости сканирования. Для измерения дзета-потенциала использовали лазерный анализатор лазерной линией 633 нм, показатель преломления для золота – 0.27. Вязкость растворителя (воды) принимали равной $8.87 \cdot 10^{-4}$ Па·с, а показатель преломления – 1.33. Снимки ПЭМ наночастиц получали в сканирующем режиме с трех случайных областей образца, для чего суспензию НЧЗ капельно наносили на поверхность углеродных пленок и оставляли в темном месте для испарения растворителя на воздухе.

Условия формирования покрытий стенок капилляра на основе ПДАДМАХ, цНЧЗ и БСА

Условия подготовки капилляров, модифицирующих растворов и формирования покрытий на основе ПДАДМАХ, цНЧЗ и цНЧЗ-БСА обобщены в табл. 1. Перед нанесением покрытия на внутреннюю поверхность капилляра проводили стадии подготовки (травления) кварцевого капилляра: последовательная промывка ацетонитрилом, деионизированной водой, 0.1 М раствором HCl, водой и 0.1 М раствором NaOH. Промывка щелочью приводит к появлению отрицательного заряда внутренней поверхности капилляра за счет диссоциации силанольных групп на стенках капилляра, обеспечивающих возможность нанесения первого полимерного слоя (ПДАДМАХ) за счет электростатических взаимодействий. При поиске условий модифицирования капилляра варьировали время и условия промывки раствором модификатора (под давлением или при приложении напряжения).

Условия проведения электрофоретических экспериментов

Для определения стабильности сформированных покрытий при разных значениях *pH* использовали фосфатные буферные растворы различной концентрации, подбираемые эмпирическим путем так, чтобы ионная сила растворов была одинаковой. В качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП) использовали 0.05 %-ный водный раствор ДМФА. Ввод пробы гидродинамический (2с × 30 мбар), детектирование при $\lambda = 210$ нм, $U = -20$ кВ или +20 кВ, термостатирование капилляра при 20°C.

При электрофоретическом разделении смесей энантиомеров триптофана использовали ФЭ следующего состава:

- 10, 20, 30, 40 мМ Трис-HCl буферный раствор *pH* 7.4, 8.0,
- 10, 20, 30, 40 мМ ФБР *pH* 7.0, 7.2, 7.4, 7.8, 8.0, 8.2.

В качестве модифицирующих добавок в ФЭ вводили 5, 10, 20, 30 мкМ БСА.

Условия электрофоретического разделения: гидродинамический ввод пробы (2с × 30 мбар), прямое спектрофотометрическое детектирование при $\lambda = 220$ нм, $U = -15, -17, -20, -25$ кВ, термостатирование капилляра при 20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе предложены и сопоставлены два варианта формирования многослойных покрытий на основе БСА с использованием цНЧЗ для увеличения удельной поверхности покрытий и ПДАДМАХ в качестве связующего слоя, обеспечивающего сорбцию модификаторов на стенках капилляра (рис. 1А). Первый подход заключался в нанесении на ПДАДМАХ-модифицированный капилляр предварительно синтезированных наночастиц золота, покрытых альбумином (цНЧЗ-БСА). Второй подход подразумевал последовательное нанесение слоев модификаторов (ПДАДМАХ и цНЧЗ) с последующей прививкой БСА к поверхности наночастиц непосредственно внутри капилляра за счет лигандного обмена цитрат-анионов и молекул БСА. Оба подхода характеризуются простотой осуществления и экспрессностью, при этом слоистая структура покрытий формируется преимущественно за счет электростатических взаимодействий при чередовании противоположно заряженных слоев модификаторов. Наличие плотного функционального слоя БСА обеспечивает возможность применения модифицированных капилляров для разделения энантиомеров оптически активных соединений. Увеличение удельной поверхности и концентрации хирального селектора на внутренней поверхности капилляра могло бы обеспечить увеличение энантиоселективности, либо уменьшение количества хирального селектора, добавляемого в фоновый электролит.

Работа включала следующие этапы:

- получение цитрат-стабилизированных наночастиц золота заданного размера и проведение их поверхностной модификации альбумином; оценка размеров, концентрации и потенциала поверхности полученных наночастиц методами электронной спектроскопии, ПЭМ и электрофоретического рассеяния света;
- оптимизация условий формирования первого слоя на основе полимера ПДАДМАХ и оценка стабильности полученного покрытия при различных значениях *pH* фонового электролита;
- проведение модификации ПДАДМАХ-капилляра наночастицами золота, модифицированными альбумином (цНЧЗ-БСА), а также цНЧЗ с последующей их постфункционализацией альбумином на поверхности капилляра;

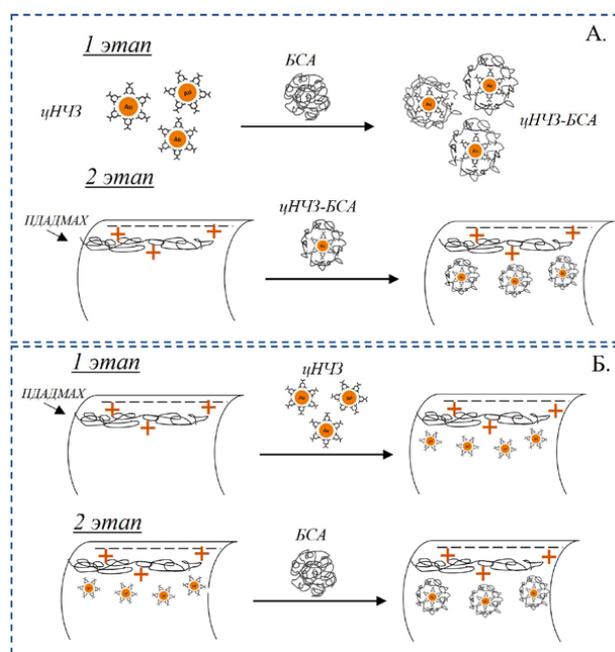


Рис. 1. Схематическое изображение двух подходов к формированию покрытия стенок капилляра на основе: А. цНЧЗ-БСА с предварительным получением модифицированных наночастиц, Б. цНЧЗ с проведением внутрикапиллярной постфункционализации БСА.

Fig. 1. Schematic image of two approaches to the formation of the capillary coating based on: A. pre-synthesized modified cGNP-BSA nanoparticles; B. cGNP followed by in-capillary functionalisation with BSA.

- оценка рабочих характеристик сформированных покрытий: значение и направление ЭОП, стабильность при различных значениях *pH* фонового электролита, получение СЭМ снимков внутренней поверхности капилляра;
- анализ модельной смеси энантиомеров триптофана на разработанных покрытиях для выявления возможностей использования модифицированных капилляров для хирального разделения.

Характеризация синтезированных цНЧЗ и цНЧЗ-БСА

Синтезированные цНЧЗ были охарактеризованы методами электронной спектроскопии поглощения, электрофоретического рассеяния света и ПЭМ. Диаметр частиц согласно ПЭМ - снимкам составил 13 ± 3 нм, длина волны максимума поглощения $\lambda_{max} = 520$ нм, дзета-потенциал поверхности $\zeta = -45$ мВ. Высокое отрицательное значение дзета-потенциала поверхности обуславливает необходимость использования положительно заряженных промежуточных слоев модификаторов для обеспечения сорбции цНЧЗ на поверхности капилляра.

Наночастицы золота, модифицированные альбумином, готовили из цНЧЗ путем смешения растворов наночастиц и альбумина и перемешивания в течение 12 ч при комнатной температуре. Опробованы три различные концентрации БСА в реакционной смеси: 0.015 мг/мл (цНЧЗ-БСА-1), 0.15 мг/мл (цНЧЗ-БСА-2) и 1.5 мг/мл (цНЧЗ-БСА-3) в целях выявления влияния концентрации БСА на

характеристики получаемых частиц и покрытий на их основе. Концентрирование и очистку полученных цНЧЗ-БСА от избытка альбумина проводили при помощи центрифугирования. Основные характеристики полученных частиц представлены в табл. 2. Смещение полосы поглощения излучения модифицированными частицами по сравнению с исходными цНЧЗ, а также значительное снижение дзета-потенциала поверхности независимо свидетельствуют об осуществлении реакции.

При проведении синтеза с использованием концентрации БСА в реакционной смеси 0.15 мг/мл наблюдалось образование агломератов размером 125 ± 5 нм (табл. 2). Такие наночастицы (цНЧЗ-БСА-2) отличались низкой стабильностью и при хранении более 2 суток выпадали в осадок. Напротив, наночастицы цНЧЗ-БСА-1 и цНЧЗ-БСА-3 между собой обладали схожими характеристиками и оказались стабильными при хранении. В последующих экспериментах при создании покрытий выявлены аналитические возможности всех синтезированных цНЧЗ-БСА.

Формирование покрытий на основе цНЧЗ и БСА и характеристика покрытий

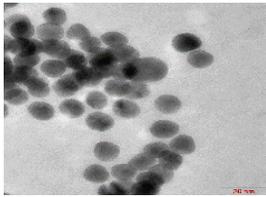
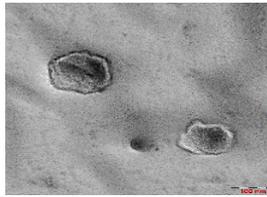
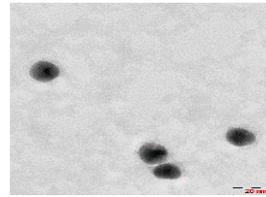
На предварительном этапе работы необходимо было оптимизировать условия формирования первого связующего слоя ПДА/ДМАХ, для чего варьировали концентрацию модификатора и время промывки капилляра. Поскольку при формировании покрытий происходит перезарядка поверхности,

Таблица 2

Основные характеристики синтезированных цНЧ3-БСА

Table 2

Principle characteristics of synthesized cGNP modified with BSA.

	цНЧ3-БСА-1	цНЧ3-БСА-2	цНЧ3-БСА-3
С (БСА), мг/мл	0.015	0.15	1.5
λ_{max} , нм	524	530	527
Размер, нм	13±3	125±5	13±3
ζ , мВ	-25	-25	-32
$\mu_{ЭОП} \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$	1.9231	0.8333	1.8518
ПЭМ изображения			

оценка плотности сформированных покрытий проводилась по значению обращенного ЭОП. Найденные условия, позволяющие создавать наиболее прочные и плотные покрытия с максимальным ЭОП ($\mu_{ЭОП} = -3.57 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$), следующие: промывка

капилляра раствором ПДАДМАХ (2 г/л) в течение 1 ч. Для оценки стабильности данного покрытия была получена зависимость скорости электроосмотического потока от *pH* фонового электролита (рис. 2, кривая 3). В диапазоне *pH* от 2 до 6 ЭОП изменялся незначительно, однако, при более высоких значениях *pH* происходило заметное снижение скорости миграции обращенного ЭОП, свидетельствующее о смывании покрытия с поверхности капилляра. Это согласуется и с литературными данными [17].

Покрытия на основе ПДАДМАХ и цНЧ3-БСА

Формирование двухслойного покрытия на основе ПДАДМАХ и цНЧ3-БСА (рис. 1А) проводили путем промывки ПДАДМАХ-модифицированного капилляра концентрированными суспензиями цНЧ3-БСА. Варьировали время промывки и давление (1000 и 2000 мбар). Контроль формирования покрытия проводили путем измерения скорости и направления ЭОП. В процессе модификации к поверхности капилляра прививаются молекулы БСА, отвечающие за формирование заряда поверхности и генерирование ЭОП. Являясь амфолитом, альбумин способствует генерации анодного ЭОП при *pH* ниже изоэлектрической точки БСА ($pI_{БСА} = 4.7 - 5.0$) и катодного ЭОП при *pH* > *pI*. Таким образом, регистрация ЭОП на прямой полярности (+20 кВ) в 10 мМ ФБР *pH* 7.4 явилась доказательством наличия наночастиц на поверхности капилляра, а значение ЭОП указывает на плотность сформированного покрытия (чем быстрее ЭОП, тем больше концентрация активных групп на поверхности капилляра).

Условия формирования покрытий оптимизировали при использовании цНЧ3-БСА-1. Максимального катодного ЭОП удалось достичь промывкой ПДАДМАХ-капилляра неразбавленной суспензией наночастиц в течение 1 ч при 1000 мбар. Аналогичным образом формировали покрытия и на основе цНЧ3-БСА-2 и цНЧ3-БСА-3. Значения $\mu_{ЭОП}$ для полученных капилляров приведены в табл. 2. Видно, что для капилляров, модифицированных цНЧ3-БСА-1 и цНЧ3-БСА-3 наблюдаются близкие значения катодного

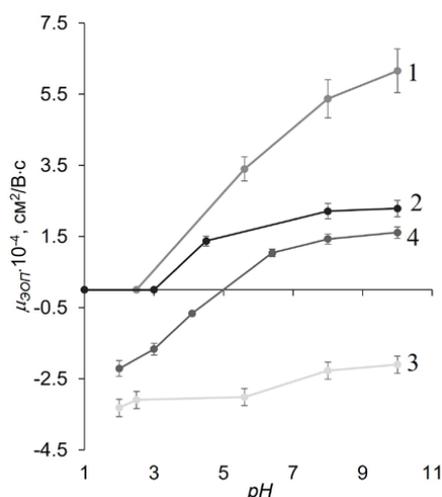


Рис. 2. Графики зависимости скорости ЭОП ($\mu_{ЭОП}$) от значения *pH* фонового электролита, полученные для капилляров: 1 – немодифицированного, 2 – с ПДАДМАХ-цНЧ3 покрытием, 3 – с ПДАДМАХ покрытием, 4 – с ПДАДМАХ-цНЧ3-БСА покрытием. Условия: маркер ЭОП раствор ДМФА с объемной долей 0.05 %, гидродинамический ввод пробы 2 с × 30 мбар, фосфатные фоновые электролиты одинаковой ионной силы (*pH* 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.5, 8.0, 10.0), +20 кВ/-20 кВ, 220 нм.

Fig. 2. Dependence of μ_{EOF} on *pH* of the background electrolyte for different capillaries: 1 – unmodified; 2 – with PDADMAC-cGNPs coating; 3 – with PDADMAC coating; 4 – with PDADMAC-cGNP-BSA coating. Conditions: EOF marker – 0.05 vol. % DMFA, hydrodynamic sample injection 2 s × 30 mbar, phosphate background electrolytes with equal ionic strength (*pH* 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.5, 8.0, 10.0), +20 kV/-20 kV, 220 nm.

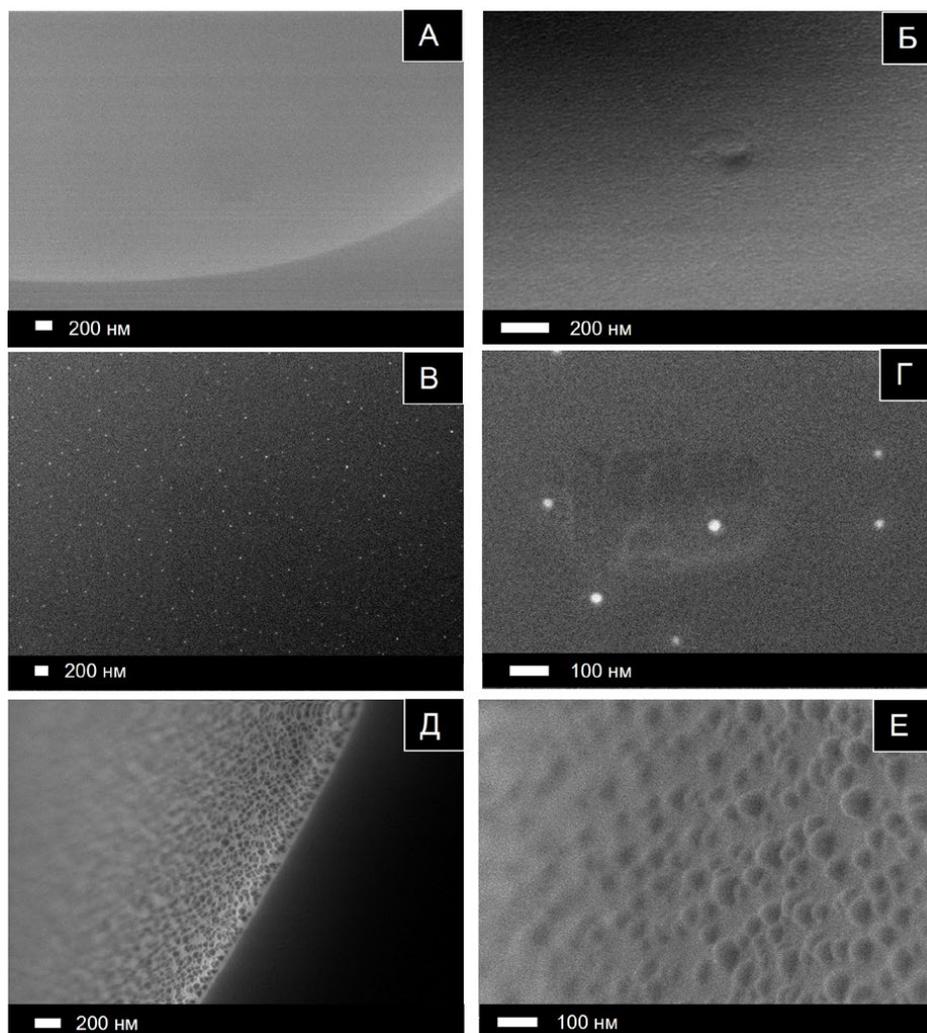


Рис. 3. СЭМ изображения внутренней поверхности капилляров: А - немодифицированного, Б - с ПДАДМАХ покрытием, В и Г – с покрытием на основе ПДАДМАХ и цНЧЗ-БСА, полученным по схеме 1, Д и Е – с покрытием с послойным нанесением ПДАДМАХ, цНЧЗ и БСА, полученным по схеме 2.

Fig. 3. SEM-images of the internal capillary walls: А – unmodified; В – with PDADMAC coating; С and D – with PDADMAC and cGNP-BSA based coating prepared by Scheme 1; Е and F – with layer-by-layer coating by PDADMAC, cGNP and BSA prepared by Scheme 2.

ЭОП, в то время как в случае *цНЧЗ-БСА-2* скорость миграции ЭОП оказалась минимальной: большой размер и склонность к агрегации данных частиц приводят к формированию неплотного слоя БСА на поверхности, и, как следствие, низкого заряда внутренних стенок капилляра.

Для капилляра с максимально наблюдаемым значением ЭОП (*цНЧЗ-БСА-1*) получены СЭМ-снимки внутренней поверхности (рис. 3В и 3Г). Видно наличие неплотного слоя частиц на поверхности.

Сформированные покрытия протестированы при разделении энантиомеров триптофана. Вероятно недостаточное количество хирального селектора на поверхности капилляра стало причиной отсутствия разделения энантиомеров триптофана без дополнительной добавки альбумина в состав ФЭ. При этом введение 30 мкМ альбумина обеспечило полное разделение энантиомеров, что является подтверждением высказанного предположения.

Низкая плотность модификатора на поверхности может быть объяснена низким значением дзета-потенциала наночастиц, модифицированных БСА, и, как следствие, плохой адгезией к поверхности ПДАДМАХ-модифицированного капилляра. Таким образом, более перспективным является второй путь модификации.

Покрyтия на основе ПДАДМАХ и цНЧЗ с последующей внутрикапиллярной постфункционализацией БСА

Второй способ получения покрытий основан на послойном нанесении модификаторов (рис. 1Б). Капилляр последовательно промывали раствором ПДАДМАХ и цНЧЗ, в результате чего формировалось двухслойное плотное покрытие, чему способствовало наличие высокого дзета-потенциала поверхности цитрат-стабилизированных наночастиц золота. Для двухслойного ПДАДМАХ-цНЧЗ покрытия получена

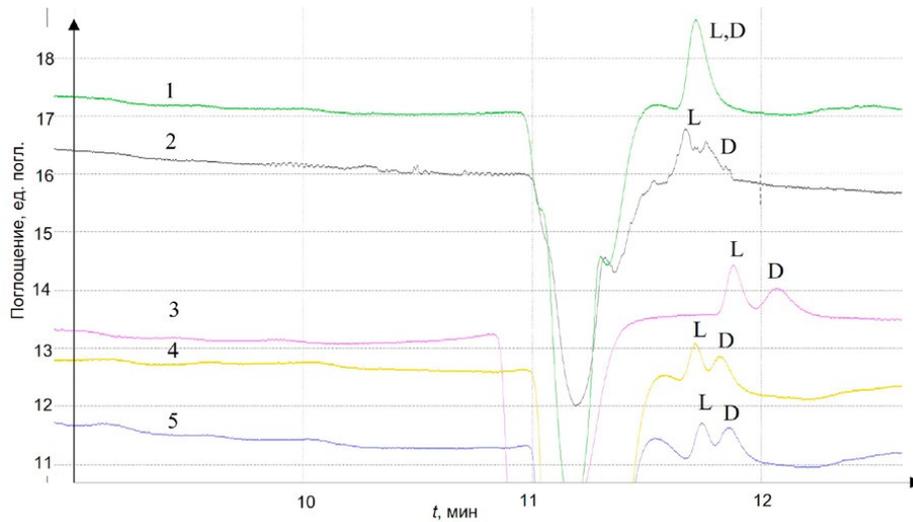


Рис. 4. Электрофореграммы D,L-Trp (20 мкг/мл), полученные на полислоистом покрытии ПДАДМАХ-цНЧЗ-БСА с различными добавками БСА в фоновый электролит: 1 – без добавок, 2 – 5 мкМ БСА, 3 – 10 мкМ БСА, 4 – 15 мкМ БСА, 5 – 20 мкМ БСА. Условия: 10 мМ ФБР pH 8, +20 кВ, 210 нм, ввод пробы гидродинамический 5 с 30 мбар.

Fig. 4. Electrophoregrams of DL-Trp (20 µg/mL) on the multilayer PDADMAC-cGNP-BSA coating with BSA additives in the background electrolyte: 1 – without additives, 2 – 5 µM BSA, 3 – 10 µM BSA, 4 – 15 µM BSA, 5 – 20 µM BSA. Conditions: 10 mM PBS pH 8, +20 kV, 210 nm, hydrodynamic sample injection 5 s 30 mbar.

зависимость $\mu_{\text{ЭОП}}$ от pH фонового электролита (рис. 2, кривая 2). Видно, что для данного покрытия характерно наличие катодного ЭОП при $\text{pH} > 3$, что согласуется со значениями констант кислотности лимонной кислоты ($\text{p}K_1 = 3.14$, $\text{p}K_2 = 4.77$, $\text{p}K_3 = 6.39$). При $\text{pH} < 3$ диссоциация лимонной кислоты на поверхности цНЧЗ подавлена, что приводит к отсутствию заряда и, соответственно, нулевому ЭОП. Это также служит доказательством полного перекрывания цНЧЗ связующего слоя ПДАДМАХ. Покрытие оказалось стабильно во всем исследуемом диапазоне pH (2 - 10).

Этап формирования трехслойного покрытия включал внутрикапиллярную постфункционализацию альбумином, для чего в капилляр вводили раствор БСА в фосфатном буферном растворе pH 7.4 и оставляли минимум на одну ночь. В ходе оптимизации условий постфункционализации варьировали концентрацию раствора БСА, вводимого в ФЭ. Максимальный ЭОП наблюдали при использовании концентрации БСА 30 мг/мл ($\mu_{\text{ЭОП}} = -2.29 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$).

На рис. 3Д и 3Е представлены СЭМ-снимки внутренней поверхности полученного капилляра, на которых видно наличие плотного равномерного слоя наночастиц золота. Средний диаметр наночастиц на поверхности капилляра составил 70 ± 10 нм. Для данного покрытия исследована зависимость $\mu_{\text{ЭОП}}$ от значения pH фонового электролита (рис. 2, кривая 4). При $\text{pH} < \text{pI}$ наблюдается анодный ЭОП, поскольку протонирование amino- групп белка приводит к формированию положительного заряда поверхности капилляра. В то же время при $\text{pH} > \text{pI}$ наблюдается катодный ЭОП, формирующийся за счет диссоциации карбоксильных групп белка. При этом нулевое значение $\mu_{\text{ЭОП}}$ наблюдалось при pH,

равном или близким к значениям pI альбумина, что подтверждает наличие плотного слоя альбумина на поверхности капилляра. Покрытие оказалось стабильным во всем исследуемом диапазоне pH (2 - 10). Таким образом, использование второго подхода с послойным нанесением модификаторов обеспечивает формирование более плотных покрытий.

Применение данных капилляров позволило существенно снизить количество БСА, вводимого в ФЭ для достижения разделения энантиомеров триптофана: разрешение энантиомеров начинает фиксироваться при введении 5 мкМ БСА (рис. 4). Для оценки селективности разделения рассчитывали факторы энантиоселективности (α) по следующей формуле: $\alpha = \mu_1/\mu_2$ где μ_1 – электрофоретическая подвижность наиболее удерживаемого энантиомера, а μ_2 – электрофоретическая подвижность наименее удерживаемого энантиомера. При этом, максимальная энантиоселективность достигается при использовании 10 мкМ БСА ($\alpha = 1.02$). При дальнейшем увеличении концентрации модификатора селективность падает ($\alpha = 1.009 - 1.010$). Известно, что D- и L-триптофан взаимодействуют с двумя различными центрами связывания в структуре альбумина, при этом константы комплексообразования каждого из энантиомеров значительно отличаются друг от друга [19]. В предыдущих исследованиях [20], где БСА использовали в качестве модификатора электрофоретических систем для разделения энантиомеров триптофана, концентрации активных центров на БСА-модифицированной поверхности капилляра оказалась недостаточно: необходимо было наличие и в фоновом электролите более 10 мкМ БСА. Без добавок хирального селектора в ФЭ требовалось 10 – 100 - кратное увеличение концентрации БСА

на поверхности капилляра. Достигнутое в данной работе снижение концентрации БСА указывает на повышение количества активных центров на поверхности капилляра за счет использования НЧЗ и получения покрытий с высокой удельной поверхностью. Таким образом, продемонстрирована перспективность сочетания наночастиц и хиральных модификаторов в капиллярном электрофорезе для увеличения удельной поверхности капилляра и, как следствие, селективности разделения оптически активных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложены и сопоставлены два подхода к формированию покрытий стенок кварцевого капилляра на основе цитрат-стабилизированных наночастиц золота и альбумина с использованием поли(диаллилдиметиламмоний хлорида) в качестве связующего слоя. Первый подход заключается в иммобилизации предварительно синтезированных цНЧЗ-БСА на поверхность капилляра, модифицированную полимером ПДАДМАХ. Второй – в послойном нанесении ПДАДМАХ и цНЧЗ с последующим проведением внутрикапиллярной постфункционализации БСА. Оба подхода характеризуются экспрессностью и простой процедуры модификации, однако именно послойное нанесение модификаторов обеспечивает формирование плотного слоя наночастиц на поверхности капилляра. Использование такого покрытия позволяет существенно сократить концентрацию вводимого БСА в фоновый электролит для достижения разделения энантиомеров триптофана (до 5 мкМ).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено к 300-летию Санкт-Петербургского государственного университета за счет гранта Российского научного фонда № 21-73-00211, <https://rscf.ru/project/21-73-00211>. Эксперименты проведены с использованием оборудования Междисциплинарного ресурсного центра по направлению «Нанотехнологии», Научный парк СПбГУ. Эксперименты проведены с использованием инфраструктуры СПбГУ (кафедра органической химии, лаборатория плазмонно-усиленной спектроскопии и биоимиджинга, ресурсный центр по направлению «Нанотехнологии»).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was done for the 300th anniversary of St. Petersburg State University's founding and was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 21-73-00211, <https://rscf.ru/project/21-73-00211>). The authors gratefully acknowledge the assistance of the Interdisciplinary Resource Center for Nanotechnology of Saint Petersburg State University. The authors gratefully acknowledge Saint-Petersburg State University

for infrastructure support: the department of organic chemistry, the laboratory of plasmon-enhanced spectroscopy and bioimaging, the interdisciplinary resource center for nanotechnology.

ЛИТЕРАТУРА

- Advances and applications of chiral resolution in pharmaceutical field / Y. Teng [et al.] // *Chirality*. 2022. V. 34. P. 1094-1119.
- Kartsova L.A., Makeeva D.V., Bessonova E.A. Current status of capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. P. 1497–1513.
- Saz J.M., Marina M.L. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis // *J. Chrom. A*. 2016. V. 1467. P. 79-94.
- Rizvi S.A., Shamsi 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.
- Gübitz G., Schmid M.G. Chiral separation by capillary electromigration techniques // *J. Chromatogr. A*. 2008. V. 1204. P. 140-156.
- 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 [C4MIm][L-Pro] в качестве хирального селектора // *Аналитика и контроль*. 2018. Т. 22, №1. С. 51-60.
- Millot M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors // *J. Chrom. B*. 2003. V. 797. P. 131-159.
- Kuntip N., Japrun D., Pongprayoon P. How human serum albumin-selective DNA aptamer binds to bovine and canine serum albumins // *Biopolymers*. 2021. V. 112. Article 23421.
- Ye N., Gu X., Luo G. Chiral separation of ephedrine isomers by capillary electrophoresis using bovine serum albumin as a buffer additive // *J. Chrom. Sci.* 2007. V. 5. P. 246-250.
- Yang Y., Hage D.S. Chiral separations in capillary electrophoresis using human serum albumin as a buffer additive // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 2719-2725.
- Kartsova L.A., Makeeva D.V., Davankov V.A. Nano-sized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 120. Article 115656.
- J. You, L. Zhao, G. Wang, H. Zhou, J. Zhou, L. Zhang, Quaternized cellulose supported gold nanoparticles as capillary coatings to enhance protein separation by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A* 2014. V. 1343. P. 160-166.
- Bovine serum albumin/gold nanoparticles as a drug delivery system for Curcumin: experimental and computational studies / B. Khodashenas [et al.] // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 38. P. 4644-4654.
- Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2011. V. 217. P. 395-401.
- Screening α-glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles / A. Zhang [et al.] // *Food Chem.* 2013. V. 141. P. 1854–1859.
- Evaluation of chiral separation based on bovine serum albumin-conjugated carbon nanotubes as stationary phase in capillary electrochromatography / Q. Bai [et al.] // *Electrophoresis*. 2020. V. 41. P. 1-19.

17. Liu Q., Lin F., Hartwick R.A. Poly (diallyldimethylammonium chloride) as a coating for capillary electrophoresis // *J. Chrom. Sci.* 1997. V. 36. P. 126-130.
18. Preparation and characterization of Au Colloid Monolayers / K.C. Grabar [et al.] // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 735-743.
19. Study of competitive binding of enantiomers to protein by affinity capillary electrochromatography / Ye M. [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002. V. 15. P. 651-660.
20. Ye N., Gu X., Luo G. Chiral separation of ephedrine isomers by capillary electrophoresis using bovine serum albumin as a buffer additive // *J. Chrom. Sci.* 2007. V. 5. P. 246-250.

REFERENCES

1. Teng Y., Gu C., Chen Z., Jiang H., Xiong Y., Liu D., Xiao D. Advances and applications of chiral resolution in pharmaceutical field. *Chirality*, 2022, vol. 34, pp. 1094-1119. doi: 10.1002/chir.23453.
2. Kartsova L.A., Makeeva D.V., Bessonova E.A. Current status of capillary electrophoresis. *J. Anal. Chem.*, 2020, vol. 75, pp.1497–1513. doi: 10.1134/S1061934820120084.
3. Saz J.M., Marina M.L. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. *J. Chrom. A*, 2016, vol. 1467, pp. 79-94. doi: 10.1016/j.chroma.2016.08.029.
4. Rizvi S.A., Shamsi S.A. Synthesis, characterization, and application of chiral ionic liquids and their polymers in micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, pp. 7061-7069. doi: 10.1021/ac060878u.
5. Gübitz G., Schmid M.G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. *J. Chromatogr. A*, 2008, vol. 1204, pp. 140-156. doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.071.
6. Kolobova E.A., Kartsova L.A., Alopina E.V., Smirnova N.A. [Separation of amino acids and β -blockers enantiomers by capillary electrophoresis with 1-butyl-3-methylimidazolium L-prolinate [C4MIm][L-Pro] as a chiral selector]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 51-60 (in Russian). doi: 10.15826/analitika.2018.22.1.
7. Millot M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J. Chrom. B*, 2003, vol. 797, pp.131-159. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.08.035.
8. Kuntip N., Japrun D., Pongprayoon P. How human serum albumin-selective DNA aptamer binds to bovine and canine serum albumins. *Biopolymers*, 2021, vol. 112, article 23421. doi: 10.1002/bip.23421.
9. Ye N., Gu X., Luo G. Chiral separation of ephedrine isomers by capillary electrophoresis using bovine serum albumin as a buffer additive. *J. Chrom. Sci.*, 2007, vol. 5, pp. 246-250. doi: 10.1093/chromsci/45.5.246.
10. Yang Y., Hage D.S. Chiral separations in capillary electrophoresis using human serum albumin as a buffer additive. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66, pp. 2719-2725. doi: 10.1093/chromsci/45.5.246.
11. Kartsova L.A., Makeeva D.V., Davankov V.A. Nano-sized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations, *Trends Anal. Chem.*, 2019, vol. 120, article 115656. doi: 10.1016/j.trac.2019.115656.
12. J. You, L. Zhao, G. Wang, H. Zhou, J. Zhou, L. Zhang, Quaternized cellulose supported gold nanoparticles as capillary coatings to enhance protein separation by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 2014, vol. 1343, pp.160-166. doi: 10.1016/j.chroma.2014.03.079.
13. Khodashenas B., Ardjmand M., Baei M.S., Rad A.S., Khyavi A.A. Bovine serum albumin/gold nanoparticles as a drug delivery system for Curcumin: experimental and computational studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2020, vol.38, pp. 4644-4654. doi: 10.1080/07391102.2019.1683073.
14. Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 2011, vol. 217, pp. 395-401. doi: 10.1016/j.jphotochem.2010.11.012.
15. Zhang A., Ye F., Lu J., Zhao S. Screening a-glucosidase inhibitor from natural products by capillary electrophoresis with immobilised enzyme onto polymer monolith modified by gold nanoparticles. *Food Chem.*, 2013, vol. 141, pp. 1854-1859. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.100.
16. Bai Q., Zhang C., Zhao Y., Wang C., Maihemuti M., Sun C., Qi Y., Peng J., Guo X., Zhang Z., Fang L. Evaluation of chiral separation based on bovine serum albumin-conjugated carbon nanotubes as stationary phase in capillary electrochromatography. *Electrophoresis.*, 2020, vol. 41, pp. 1-19. doi: 10.1002/elps.202000003.
17. Liu Q., Lin F., Hartwick R.A. Poly (diallyldimethylammonium chloride) as a coating for capillary electrophoresis. *J. Chrom., Sci.* 1997, vol. 36, pp. 126-130. doi: 10.1093/chromsci/35.3.126.
18. Grabar K.C., Freeman R.G., Hommer M.B., Natan M.J. Preparation and characterization of Au Colloid Monolayers, *Anal. Chem.*, 1995, vol. 67, pp. 735-743. doi: 10.1021/ac00100a008.
19. Ye M., Zou H., Liu Z., Wu R., Lei Z., Jianyi-Ni. Study of competitive binding of enantiomers to protein by affinity capillary electrochromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, vol. 15, pp. 651-60. doi: 10.1016/S0731-7085(01)00608-2.
20. Ye N., Gu X., Luo G. Chiral separation of ephedrine isomers by capillary electrophoresis using bovine serum albumin as a buffer additive. *J. Chrom. Sci.*, 2007, vol. 5, pp. 246-250. doi: 10.1093/chromsci/45.5.246.