

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**Proteīnu analizēšanas iespējas izmantojot pašgatavotas
nanokolonnas**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Rūdolfs Rozenvalds**

Studenta apliecības Nr.: RR12017

Darba vadītājs: LU Ķīmijas fakultāte – Dr. chem. Ilva Nakurte
Tartu Universitāte – Dr. biol. Lauri Peil

RĪGA 2017

ANOTĀCIJA

Proteīnu analizēšanas iespējas izmantojot pašgatavotas nanokolonnas. Maģistra darbs. Rozenvalds R., darba vadītāji Dr.chem. Nakurte I., Dr. biol. Peil L., 50 lapas, 29 attēli, 10 tabulas, 19 literatūras avoti, 8 attēli pielikumā. Latviešu valodā.

MONOLĪTI, NANOKOLONNAS, AUGSTI EFEKTĪVĀ ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, PROTEĪNU ANALIZĒŠANA

Literatūras apskatā ir aprakstīta monolītu kolonnu veidošana, vēsture un tipi, kā arī tehnikas ar daļiņām pakoto kolonnu izveidē. Tāpat apskatīta ir abu kolonnu izmantošana proteīnu analīzē.

Darba praktiskajā daļā ir veikta vairāku monolītu kolonnu sintēze, kā arī veikta daļiņu kolonnu pakošana. Abas kolonnas ir testētas kā potenciālas analītiskās kolonnas izmantošanai proteīnu analīzē, savukārt monolītu kolonnas ir testētas arī kā priekškolonnas.

ABSTRACT

Investigation of protein analysis using non-commercial nanocolumns. Master thesis. Rozenvalds R., supervisors Dr.chem. Nakurte I., Dr. biol. Peil L. 50 pages, 29 figures, 10 tables, 19 literature references, 8 figures in appendix. In Latvian.

MONOLITHS, NANOCOLUMNS, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, PROTEOMICS

The theoretical part of this thesis contains a literature review about monolith column synthesis, history and types. Also, a brief review of making a packed particle nanocolumn and application of both column types in analyses is described.

The experimental section contains a description of monolith nanocolumn synthesis and creation of packed particle nanocolumns. Both types of columns are tested as analytical columns in protein analysis, but monolith columns are tested as pre-columns as well.

Saturs

Izmantotie apzīmējumi	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1 Ieguvumi no “nano” izmēru izmantošanas šķidrums hromatogrāfijā.....	8
1.2 Monolītu kolonnu aizsākumi	9
1.3 Monolītu kolonnu veidi un sintēzes metodes.	10
1.4 Poru izveidošana silīcija monolītā	11
1.5 Monolītu kolonnu kvalitātes noteikšana.	13
1.6 Monolītu kolonnas problēmas un iespējamie risinājumi.	14
1.7 Uz silīcija bāzes veidoto monolītu izmantošana ŠH.....	15
1.8 Pakoto nanokolonnu veidi un veidošanas metodes.....	16
1.9 Monolītu un pakoto kolonnu izmantošana proteīnu analīzē.....	18
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	21
2.1 Izmantotā aparatūra un reaģenti.....	21
2.2 Sākotnējā monolītu kolonnas sintēzes recepte.....	23
2.3 Sintezēto sēriju apraksti un veiktās izmaiņas metodē.....	25
2.4 Monolītu kolonnas kvalitātes noteikšana.....	26
2.6 Ar daļiņām pakoto nanokolonnu izveide.....	28
2.7 Kolonnu raksturojošo parametru aprēķini.	29
2.8 Salīdzinājums ar daļiņu kolonnām.....	30
2.9 Sintezēto monolītu kolonnu izmantošana proteīnu analīzei.	31
2.10 Pakoto kolonnu pārbaude ar proteīnu maisījumu	35
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	37
3.1 Kolonnu kvalitāte.....	37
3.2 Uzsintezēto monolītu kolonnu salīdzinājums ar citām kolonnām.	38
3.3 Uzsintezēto monolītu kolonnu savstarpējais salīdzinājums.....	39
3.4 PEG ietekme uz iegūto monolītu kolonnu kvalitāti.....	42
3.5 Monolītu kolonnu izmantošana proteīnu analīzē.....	42
3.6 Ar daļiņām pakoto kolonnu izmantošana proteīnu analīzē.....	45
SECINĀJUMI.....	48
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	49
Pateicības	51
PIELIKUMI.....	52

Izmantotie apzīmējumi

ŠH – šķidrums hromatogrāfija

AEŠH – augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija

SEM – skenējošais elektronu mikroskops

MS – masas spektrometrija

THF – tetrahidrofurāns

TMOS – tetrametoksisilāns

VTMS – viniltrimetoksisilāns

PEG – polietilēna glikols

PEG 10 – polietilēna glikols ar vidējo molmasu 10000 g/mol

PEG 20 – polietilēna glikols ar vidējo molmasu 20000 g/mol

LP – lauroil peroksīds

ACN – acetonitrils

ESI – elektroiesmidzināšana

DDT – dihlordifeniltrihioretāns

SILAC – aminoskābju iezīmēšana ar stabiliem izotopiem

IEVADS

Kopš pirmajiem mēģinājumiem šķidrums hromatogrāfijā, ko iezīmē Mihaela Cveta eksperiments, kas norisinājās vairāk nekā pirms 100 gadiem un kurā tika izmantota paliela diametra stikla caurule, kas pildīta ar neregulāras formas kalcija karbonāta daļiņām, ir sperti daudzi soļi, kā rezultātā tagad mums ir pieejamas hromatogrāfijas metodes, kas spēj atdalīt pat hirālos savienojumus, turklāt analīzes laiks ir būtiski sarucis, bet kolonnu selektivitāte un izšķiršana – palielinājusies. Metodes kļūst arvien jutīgākas un nereti – arī vienkāršākas.

Saskatot tendences un nozares vajadzības, tālākais attīstības virziens jau ir visai skaidrs – izstrādāt analīzes metodes, kas ļaus analizēt arvien sarežģītākus paraugus, pēc iespējas īsākā laikā, iegūstot augstāku jutību un labāku vielu sadalīšanu, turklāt to visu paveiks, patērējot arvien mazāk ķīmisko reaģentu.

Redzot līdzšinējās tendences un nākotnes prasības, nanokolonnu izmantošana šķidrums hromatogrāfijas analīzēs jau šķiet kā viens no nākamajiem loģiskajiem soļiem. Rezultātā tiktu sasniegtas vairākas vēlamas īpašības, sākot no resursu ietaupīšanas, beidzot ar hromatogrāfisko parametru uzlabošanu.

Vārda “nano” lietošana šajā kontekstā nozīmē, ka kolonnu iekšējais diametrs ir sarucis līdz platumam, kas nepārsniedz cilvēka mata diametru. Ir skaidrs, ka šīs tehnoloģijas izmantošana nāk roku rokā ar jauniem izaicinājumiem.

Būtībā nanokolonnu izveidē šobrīd ir divi virzieni. Pirmais no tiem ir monolītu nanokolonnu sintēze, kas nodrošina nelielajiem izmēriem pateicīgas īpašības, piemēram augstāku mobilās fāzes caurplūdi, nodrošinot krietni zemāku pretpiedienu, salīdzinot ar daļiņu kolonnām, kā rezultātā iespējams samazināt analīzes laiku. Vienlaikus gan jāatzīmē, ka monolītu struktūras veidošana tik šaura diametra caurulēs prasa ļoti rūpīgu un akurātu darbu un nevainojami izstrādātu un izpildītu sintēzes recepti.

Otrs virziens ir nano izmēra kapilāru pildīšana ar komerciāli pieejamajām sorbentu daļiņām. Lai arī šo kolonnu izveidošana ir izaicinājums, pateicoties nelielajiem izmēriem, defektu ir būtiski mazāk, turklāt kolonnas veidošanas laiks ir krietni īsāks, ja salīdzina ar jau iepriekš pieminētajām monolītu nanokolonnām. Vienlaikus gan jāņem vērā, ka šāda tipa kolonnām ir augstāks pretpiediens.

Lai iegūtu zināšanas abu tipu nanokolonnu veidošanā, šī darba ietvaros autors ir devies gan uz Oslo Universitātes Matemātikas un dabaszinātņu fakultātes Analītiskās bioķīmijas nodaļas laboratoriju, lai tur apgūtu monolītu veidošanas tehniku un uzlabotu tur izstrādāto

sintēzes recepti, kā arī uz Tartu Universitātes Tehnoloģiju institūtu apgūt ar daļiņām pakoto nanokolonnu veidošanas tehniku.

Ievērojot, to, ka šīs nanokolonnas visbiežāk tiek veidotas un izmantotas bioanalītiskās ķīmijas laboratorijās, izveidoto kolonnu sniegums tiks noteikts, analizējot proteīnu paraugus.

Maģistra darba mērķis ir:

Apzināt dažādu veidu paštaisītu nanokolonnu pielietojamību proteīnu analīzē.

Darba uzdevumi:

1. Sintezēt monolītu nanokolonnās pēc Oslo Universitātes Matemātikas un dabaszinātņu fakultātes Analītiskās bioķīmijas nodaļā izstrādātās metodes un iespēju robežās uzlabot to.
2. Izveidot ar sfēriskām daļiņām pakotas nanokolonnas.
3. Pārbaudīt izveidoto kolonnu kvalitāti un savstarpēji salīdzināt tās
4. Izvērtēt kolonnu piemērotību proteīnu paraugu analīzē.

Maģistra darba tēmas aktualitāte ir sekojoša – pirmkārt, Latvijā nanokolonnas šķidrums hromatogrāfijā netiek veidotas, tāpēc šī darba ietvaros tiek iegūta Latvijas mērogiem unikāla pieredze.

Otrkārt, gan apgūstot un uzlabojot monolītu nanokolonnas sintēzes recepti, gan apgūstot pakoto kolonnu veidošanas tehniku, laboratorijās iespējams ietaupīt līdzekļus, aizvietojojt komerciāli pieejamās kolonnas ar paštaisītām.

Daļa no maģistra darbā apskatītajiem rezultātiem ir iekļauti *Journal of Chromatography A*, „Self-packed core shell nano liquid chromatography columns and silica-based monolithic trap columns for targeted proteomics”. 19 (1498), pp.111-119, doi:10.1016/j.chroma.2017.03.043. Publikācijas autori - H.S. Berg, K.E. Seterdal, T. Smetop, R.Rozenvalds, O.K. Brandtzaeg, T.Vehus, E. Lundanes, S.R. Wilson.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Ieguvumi no “nano” izmēru izmantošanas šķidrums hromatogrāfijā

Hromatogrāfija mūsdienās ir vadošā analītiskās ķīmijas analīzes metode, kura sastopama gandrīz ikvienā pētnieciskajā laboratorijā, kurā veic savienojumu izdalīšanu, identifikāciju un kvantitatīvo analīzi. Viens no svarīgākajiem hromatogrāfiskā procesa priekšnosacījumiem ir pareiza kolonnas izvēle. Mūsdienās turpinās kolonnu izmēru, it īpaši diametra samazināšana. Samazinot kolonnas diametru, iespējams būtiski ietaupīt patērēto kustīgo fāzi un palielināt metodes jutību. Jutība palielinās, tāpēc, ka, samazinot diametru, samazinās arī kustīgās fāzes radītie traucējošie faktori. Tas nozīmē, ka teorētiski, samazinot kolonnas diametru no 4,6 mm uz 0,050mm, jutība palielināsies teju 8500 reizes [1].

Atkarībā no izmantotās kolonnas diametra un aparatūras šķidrums hromatogrāfiju ir iespējams sadalīt apakšnodalījumos, kas apkopoti 1.1. tabulā.

1.1 tabula

AEŠH iedalījums pēc izmantotās kolonnas iekšējā diametra [2]

Hromatogrāfijas apakšnodalījums	Kolonnas iekšējais diametrs (mm)
Konvencionālā ŠH	3-5
Šaura diametra ŠH	1-3
Mikro ŠH	0,5-1
Kapilārā ŠH	0,1-0,5
Nano ŠH	0,01-0,1
Atvērtās caurplūdes ŠH	0,005-0,05

Tiesa, jau sākumā jāmin, ka kolonnas diametra samazināšana līdz nano izmēriem ir visai problemātiska, prasot ne tikai jaunus, bet arī sarežģītus tehniskus risinājumus. Vispirms jāuzsver, ka šāda izmēra kolonnas operē ar krietni mazākiem kustīgās fāzes plūsmas ātrumiem. Ievērojot to, ka šo izmēru izmanto tieši pētnieciskajās laboratorijās, kuru skaits ir salīdzinoši neliels, kompānijas, kas ražo hromatogrāfiskās iekārtas un kolonnas, nesteidz nodrošināt tehniskos risinājumus šādiem hromatogrāfijas izmēriem, tāpēc līdztekus dārgam un tikai daļēji pieejamam laboratorijas aprīkojumam, laboratorijām nākas izstrādāt vai pielāgot atsevišķas aparatūras daļas pašām.

Par spīti izdaudzinātajiem plusiem un skaidrai vīzijai, ka izmēru samazināšana līdz nano izmēriem ir nākotne, nākas sastapties ar realitāti, ka nano izmēra hromatogrāfijas metodes un

aparātūra ir agrīnā attīstības stadijā. Piemēram, hromatogrāfiskās sistēmas sūkņi, kas spēj nodrošināt pietiekami lēnu kustīgās fāzes plūsmu, lai to varētu izmantot kopā ar nanokolonnām, visbiežāk ir modificēti parastie hromatogrāfijas sūkņi, no kuru nodrošinātās plūsmas tiek izmantota tikai neliela daļa. Rezultātā kustīgās fāzes patēriņš ir tāds pats kā parastām iekārtām. Jāatzīmē gan, ka tām iekārtām, kas spēj nodrošināt nano mērogiem atbilstošu plūsmu, to nedalot, ir cits mīnuss – šādas plūsmas apstākļos nav iespējams izmantot aparātos integrētos degazatorus, jo nanoplūsmas apstākļos vakuuma tipa degazatori var panākt to, ka organiskais šķīdinātājs daļēji vai pilnībā iztvaiko, mainot kustīgās fāzes sastāvu. [3]

Tāpat jāmin fakts, ka ņemot vērā nelielos izmērus, daudz lielāku ieguldījumu smaiļu paplašināšanā dod dažādi “tukšie” tilpumi, piemēram, kolonnas savienojumu vietas. Turklāt šādu “tukšo” tilpumu izskaušana ir krietni sarežģītāka nekā normāla izmēra hromatogrāfijā, jo visiem savienojumiem ir perfekti jāsadē. Tas, savukārt, ir sarežģīts uzdevums, ņemot vērā, ka daļa no šādiem savienojumiem, dārdzības un pieejamības dēļ, tiek ražoti laboratorijā uz vietas [1].

Šajā brīdī gan jāmin, ka no “tukšajiem” tilpumiem var lieliski izvairīties, ja par detektoru tiek izmantota MS iekārta, kas aprīkota ar ESI paraugu ievadīšanu. Turklāt ESI izmantošana lieliski sader ar izmēru samazināšanu līdz nano izmēram. Salīdzinot ar parasto ESI, nanoplūsmas ESI var nodrošināt līdz pat 50 reizēm labāku jutību, turklāt samazinātā mobilās fāzes plūsmas rezultēsies mazākos ESI pilienu izmēros, kā rezultātā uzlabosies desolvatācija, jonizācija un MS efektivitāte [4].

1.2 Monolītu kolonnu aizsākumi

Monolītu kolonnu aizsākumi meklējami jau 1950. gadā, kad tika veidotas pirmās polimēru struktūras, tiesa, toreiz tie bija gēlam līdzīgi polimēri, kuru izturība pret paaugstinātu spiedienu bija maza. Pirmo polimerizāciju stikla kolonnā 1967. gadā veica čehs M. Kubins (Kubin). Jāatzīmē gan, ka kolonnas efektivitāte bija zema. Trīs gadus vēlāk tika izveidotas kolonnas, kas pildītas ar atvērtu poru poliuretāna pildījumu. Šīs kolonnas bija paredzētas gan GH, gan AEŠH analizēm, taču tās netika plaši izmantotas galvenokārt mehāniskās izturības trūkuma dēļ [5].

Tiesa, tikai pagājušā gadsimta astoņdesmitajos gados, kad zinātnieki saka meklēt pilnvērtīgu alternatīvu pakotajām daļiņu kolonnām, aizsākās intensīvāks darbs pie monolītu

kolonnām. Tas rezultējās ar pirmajām pilnvērtīgi izmantojamajām monolītu struktūras kolonnām pagājušā gadsimta deviņdesmito gadu sākumā.

Par moderno monolītu struktūru pionieri varam uzskatīt čehu František Švecu (Frantisek Svec), kas pirmo pilnvērtīgi izmantojamo monolītu struktūras hromatogrāfijas kolonnu sintezēja 1991. gadā [6].

Paralēli F. Šveca komandai darbu pie monolītu nanokolonnām veica arī Upsalas Universitātes Bioķīmijas nodaļa Stelana Hjertena (Stellan Hjerten) vadībā un Kioto Tehnoloģiju institūta komanda Nobuo Tanakas (Nobuo Tanaka) vadībā. Šo trīs un arī citu pētniecisko komandu ieguldījums vairāk nekā 20 gadu laikā ir rezultējies faktā, ka monolītu kolonnas vairs nav tikai nepraktiska ekstra, ko var izveidot vien dažas laboratorijas, bet gan komerciāli pieejams produkts, ko izmanto pat farmācijas industrijā [7].

Labākās monolītu kolonnas, kas var lepoties ar lielu makroporu un mezoporu daudzumu, var sasniegt virsmas laukumu pat 600 m²/g. Šis skaitlis ir līdzvērtīgs tam, ko nodrošina komerciāli pieejamās pakotās kolonnas.

Pašlaik, ir iespējams iegādāties komerciāli ražotas monolītu kolonnas no tādiem ražotājiem kā Merck, Phenomenex un Thermo. Piedāvātās kolonnas ir pieejamas ar C8 un C18 funkcionālām grupām, bet to diametrs sākas no 50 μm [8].

1.3 Monolītu kolonnu veidi un sintēzes metodes

Šķidrums hromatogrāfijā pārsvarā tiek izmantotas kolonnas, kas pildītas ar sfēriskas, regulāras formas daļiņām. Tiesa, eksistē arī monolītu kolonnas, kuras sastāv no monolītas struktūras, kurā kustīgā fāze tiek virzīta cauri neregulāras formas kanāliem un porām. Uz šo kanālu un poru virsmām ir iespējams pievienot funkcionālās grupas, lai nodrošinātu vēlamo aktīvās vielas un stacionārās fāzes mijiedarbību.

Eksistē divi galvenie monolītu kolonnu veidi – organisko un neorganisko polimēru monolītu kolonnas. Ir pieejamas arī hibrīdā tipa monolītu kolonnas, kurā monolītu veido gan no neorganiskajiem, gan organiskajiem polimēriem [7].

Monolītu kolonnas, kas veidotas uz organisko polimēru bāzes, parasti tiek veidotas kapilārā. Pievadot siltumu, radiāciju vai atbilstošu gaismas enerģiju tiek ierosinātas brīvo radikāļu polimerizēšanas reakcijas no attiecīgajiem monomēriem. Lai veidotos poras, ievadāmajam šķīdumam ir jāpievieno porogēni. Mainot izmantoto porogēnu, kā arī polimerizēšanas temperatūru un laiku iespējams izmanīt arī iegūto poru parametrus.

Jāatzīmē, ka monolītiem, kas veidoti uz organisko polimēru bāzes, ir relatīvi zemāka mehāniskā izturība. Tāpat šiem monolītiem ir zemāka ķīmiskā izturība un atkarībā no

izmantotajiem organiskajiem šķīdinātājiem, monolītu poras var uzbriest vai sarauties. Rezultātā šī tipa monolītiem ir relatīvi īsāks dzīves ilgums, salīdzinot ar neorganisko polimēru monolītiem un zemāka rezultātu reproducējamība (novērotas nobīdes vielu izdalīšanās laikos). Turklāt organisko polimēru kolonnas tikai retos gadījumos ir stabili temperatūrās, kas pārsniedz 200°C.

Organisko monolītu stacionārās fāzes ir ar salīdzinoši zemu virsmas laukumu un relatīvi lielām porām, kas padara šo stacionāro fāzi piemērotu lielu bio-molekulu atdalīšanai [7].

Vispopulārākais materiāls neorganisko monolītu kolonnu veidošanai ir silīcijs. Silīcija monolītu kolonnas, atšķirībā no organisko monolītu kolonnām, necieš no organisko šķīdinātāju izraisītas uzbriešanas vai saraušanās, savukārt to struktūra spēj izturēt arī īpaši augstas temperatūras, kas pārsniedz 750°C [7,9].

Tiesa, kā negatīvs aspekts jāmin, ka silīcija monolītu darba pH diapazons ir no pH 2 līdz pH 8, turklāt monolītu iespējams degradēt ar atsevišķām kustīgajām fāzēm, piemēram, fosfātu buferšķīdumiem. Vienlaikus jāatzīmē, ka silīcija monolīts parasti sastāv no liela skaita makro un mezoporām, kas ļauj sasniegt salīdzinoši lielu virsmas laukumu. Šī īpašība padara silīcija monolītus par piemērotiem mazu un makro izmēra molekulu atdalīšanai [7,9].

Neorganisko monolītu kolonnu veidošanai tiek izmantoti arī tādi elementi (pārsvārā oksīdi) kā cirkonijs, titāns, alumīnijs, hafnijs, ogleklis, dzelzs, zelts, sudrabs, cērijs un germānijs. Atsevišķos gadījumos tiek veidotas arī hidroksiapatītu kolonnas. Lai arī silīcija monolīti ir visuniversālākie, katra iepriekš pieminētā elementa izmantošana monolītu sintēzē var radīt vēlamus efektus vielu atdalīšanā [9].

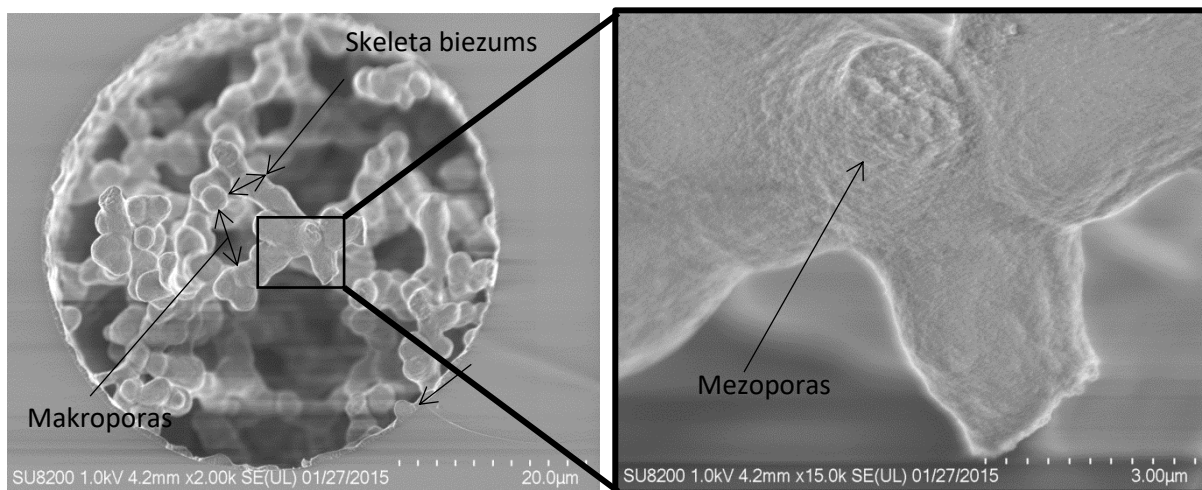
Piemēram, alumīnija un cirkonija oksīdi ir amfotērie oksīdi, kā rezultātā tiem ir augstāka pH stabilitāte, salīdzinājumā ar silīcija monolītiem. Īpaši efektīvs kā stacionārā fāze alumīnija oksīds ir gadījumos, kad jāatdala bāziskie savienojumi, savukārt cirkonija oksīds ir piemērots Luisa skābju un bāzu atdalīšanai, kā arī atsevišķu biomolekulu, it īpaši proteīnu un peptīdu atdalīšanai. Tāpat jāmin fakts, ka cirkonija oksīds ir blīvāks, kā rezultātā tam ir augstāka mehāniskā izturība, ja salīdzina ar silīcija monolītiem [9].

Piemēram, zelta oksīda monolīti ir lieliski piemēroti tiol-grupu saturošu biomolekulu izdalīšanai, savukārt, dzelzs oksīda monolīti ir piemērotāki, lai izdalītu vielas, kas satur funkcionālās grupas ar skābekli [9].

1.4 Poru izveidošana silīcija monolītā

Monolītu kolonnu kvalitāte galvenokārt tiek saistīta ar poru izmēru, to sadalījumu un daudzumu. Pēc izmēriem izšķir mikroporas (diametrs mazāks par 2nm), mezoporas (diametrs

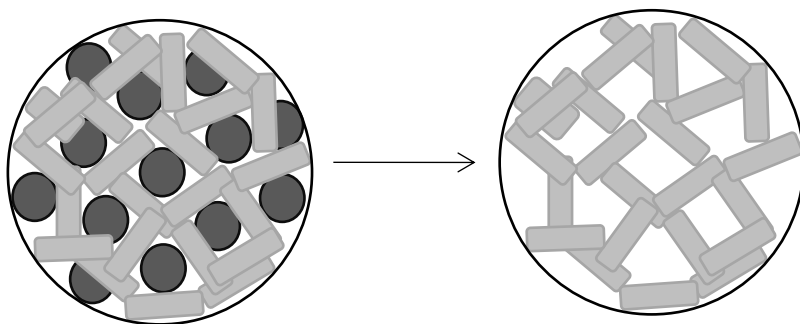
starp 2 nm un 50 nm) un makroporas (diametrs lielāks par 50 nm). Mezoporas un makroporas aplūkojamas 1.1 attēlā. Lielākas poras un lielāks to daudzums samazina spiedienu, savukārt lielāks mazo poru īpatsvars nodrošina labāku analīta-stacionārās fāzes mijiedarbību, kā rezultātā uzlabojas vielu atdalīšana. Monolīta skeleta porainība parasti sasniedz 45-50% [10].



1.1.att. Ar augstas izšķirtspējas SEM uzņemtie monolīta kolonnas šķērsriezuma attēli, kas vizualizē kolonnā esošo monolīta struktūru, kā arī makroporas un mezoporas. Attēli no Oslo Universitātes Analītiskās bioķīmijas nodaļas arhīva.

Silīcija skelets kapilārā tiek izveidots “sol-gel” (no angļu valodas solution-gel jeb šķīduma gēla) procesā. Tā ir metode, pēc kuras tiek iegūtas cietas struktūras materiāls no šķīduma, kas satur mazas molekulas [6].

Silīcija skelets tiek veidots hidrolizējot silānus vai to maisījumus, piemēram, izmantojot TMOS vai MTMS. Tiesa, lai skelets izveidotos ar makroporām, nepieciešams pievienot inerti savienojumu, kas kalpos kā porogēns. Notiekošā reakcija ir polikondensēšanās reakcija, kuru produkts ir ciets silīcija monolīta skelets, savukārt starpā esošais porogēns ir ūdenī šķīstošs un vēlāk tiek izskalots. Attiecība starp izmantoto silānu un porogēnu nosaka iegūtā monolīta skeleta un makroporu parametrus. Palielinot izmantotā porogēna koncentrāciju, palielinās vidējais makroporu izmērs. Ja porogēna koncentrācija ir pārāk liela, tad iegūtā struktūra var gan nebūt monolīts, bet gan skelets ar lielām porām un atsevišķi nošķirtām silīcija daļām, kas izskalotos kopā ar porogēnu. Jāatzīmē, ka, ja tiek izmantots PEG kā porogēns, tad jāpievērš uzmanība arī tā vidējai molekulmasai. Atsevišķās publikācijās norādīts, ka, izmantojot PEG ar lielāku molekulmasu, iespējams samazināt mezoporu izmēru izkliedi [11].



1.2.att. Vienkāršota shēma kā kapilārā izvietojas silāns (taisnstūri) un inerta porogēns (apļi), veidojot monolīta struktūru.

Mezoporas silīcija monolītā tiek iegūtas ar kodināšanu, par vielu izmantojot amonjaku vai karbamīdu, kas tiek karsēts temperatūrā virs 120°C, lai tas kolonnā sadalītos par amonjaku un ūdeni. Mezoporu izmēru ietekmē izmantotā kodināšanas šķīduma koncentrācija – to variējot no 0,001 M līdz 1 M, iespējams iegūt poras ar vidējo diametru no 5 nm līdz 25 nm. Tāpat poru izmēru ietekmē temperatūra, kurā kolonna tiek turēta.

Veiksmīgāko sintēžu gadījumā ir iespējams iegūt monolīta struktūru, kur virsmas laukums sasniedz pat 600 m²/g, kas ir līdzvērtīgs rādītājs, ja salīdzinām ar komerciāli izmantojamajām pakotajām daļiņu kolonnām [7].

1.5 Monolītu kolonnu kvalitātes noteikšana

Lai noteiktu poru parametrus tiek izmantotas trīs metodes – dzīvsudraba iespiešanās porometrija, slāpekļa adsorbciija un apgrieztā eksklūzijas hromatogrāfija.

Dzīvsudraba iespiešanās porometrija (Mercury Intrusion porosimetria) tiek izmantots dzīvsudrabs kā neslapinošs šķīdums, kas paaugstinātā spiedienā iespiežas kapilārā. Ja netiek pievadīts paaugstināts spiediens, dzīvsudrabs kapilārā neiesūcas, taču, palielinot spiedienu, dzīvsudrabs iespiežas arvien mazāka izmēra porās [7].

Rezultātā dzīvsudraba iespiešanās porometrija sniedz informāciju par poru izmēra izkliedi, kopējo poru tilpumu, kā arī specifisko poru laukumu. Tāpat iespējams noteikt vidējo poru diametru.

Slāpekļa adsorbciijas metode (arī dēvēta par BET metodi) tiek izmantota, lai noteiktu poru specifisko laukumu. Metodes princips balstās uz vairāku kārtu šķidrā slāpekļa adsorbciiju.

Protams, vienkāršāks veids kā novērtēt izveidoto monolītu kolonnu kvalitāti ir novērtēt kolonnas spēju atdalīt savienojumus, taču šajā gadījumā iegūtais rezultāts būs atkarīgs gan no

monolīta kvalitātes – makroporu un mezoporu izkliedes un izmēriem, gan no tā, cik vienmērīgi izvietojušās funkcionālās grupas uz monolīta virsmas [7].

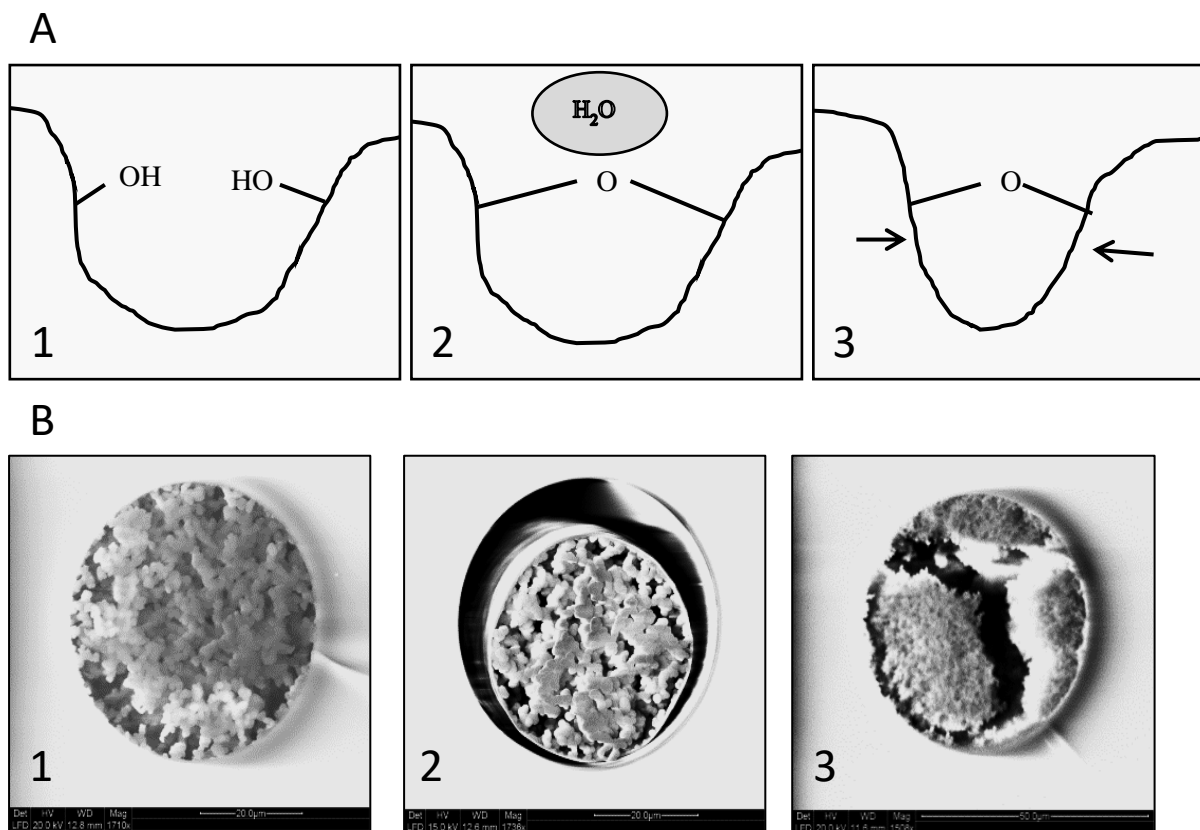
Ieskatu izveidotā monolīta kvalitātē nodrošina arī dažādu mikroskopu izmantošana, it īpaši SEM izmantošana.

1.6 Monolītu kolonnas problēmas un iespējamie risinājumi

Viena no būtiskākajām monolītu kolonnu problēmām ir zemā rezultātu atkārtojamība. Veidojot kolonnas arī pēc Oslo Universitātē izstrādātās metodes, tikai 17% gadījumu tika iegūtas kolonnas bez defektiem, taču arī šajos 17% gadījumos kolonnas bija atšķirīgas, nodrošinot dažādu rezultātu efektivitāti un selektivitāti.

Viens no iemesliem zemajai atkārtojamībai ir dažādā poru diametra izkliede. Kā savā publikācijā secina Beļģijas un Japānas zinātnieki, ja eksperimentā palielina izmantotajā PEG molmasu, iespējams samazināt makroporu izmēru izkliedi. Savukārt, palielinot pievienotā PEG masu, iespējams samazināt poru izmēru. Vienlaikus gan jāatzīmē, ka, lai sasniegtu līdzīgu poru izmēru ar augstākas molmasas PEG, tas būs jāpievieno vairāk nekā zemākas molmasas PEG. Piemēram, salīdzinot PEG 10 un PEG 20, lai sasniegtu aptuveni vienādu vidējo poru izmēru, PEG 20 būs jāpievieno aptuveni par 12 procentiem vairāk [11].

Vēl viena problēma ir defekti, kas var rasties veidojoties monolīta skeletam. Silāna grupām reaģējot savā starpā monolīta skelets sarausies (1.3. attēls A daļa) un veidos neregulāras formas plaisas vai monolīts atrausies no kapilāra sienas (1.3. attēls B daļa).



1.3. att. A – defektu veidošanās shēma, savā starpā reaģējot silāna grupām, B – ar SEM novērotie kolonnas defekti (2,3) kolonnas šķērsgriezumā, salīdzinājumā ar kolonnu bez defektiem (1) [12].

1.7 Uz silīcija bāzes veidoto monolītu izmantošana ŠH

Visām monolītu kolonnām ir laba šķīduma caurplūde, kā rezultātā, palielinot mobilās plūsmas ātrumu, ir iespējams samazināt kopējo analīzes laiku, būtiski nepalielinot spiedienu. Rezultātā monolīti, kas veidoti uz silīcija bāzes, piemēroti analīzēm, kur nepieciešams īss analīzes laiks, piemēram, zāļu vielu un metabolītu noteikšanā. Šādos gadījumos analīzes parasti tiek veiktas, par detektoru izmantojot masspektrometru, kas nodrošina augstu jutību un selektivitāti [13].

Tāpat silīcija monolīta kolonnas tiek izmantotas vides un pārtikas analīzēs, kur šīs kolonnas tiek izmantotas augstās rezultātu atkārtojamības un zemu detektēšanas limitu dēļ.

Jāatzīmē, ka monolītu kolonnas tiek izmantotas arī hirālo savienojumu atdalīšanā, proteīnu (proteomics) analīzē, kā arī divdimensionālajā šķīduma hromatogrāfijā (2D-HPLC) [13].

1.8 Pakoto nanokolonnu veidi un veidošanas metodes

Līdzīgi kā monolītu kolonnas, arī nanokolonnas, kas piepildītas ar sfēriskām daļiņām, tiek veidotas silīcija kapilāros, kā rezultātā ir pieejami tie paši kapilāru diametri, ļaujot variēt nepieciešamo jutību un pretpiedienu. Jāatzīmē, ka, līdzīgi kā citiem kapilāriem, to ārējais diametrs ir 360 μm, kas nozīmē, ka arī šo nanokolonnu saslēgšanai ar šķidrums hromatogrāfu, masspektrometru un citu aparāturu, ir izmantojami standartizētie savienojumi.

Pakotās nanokolonnas parasti tiek pildītas ar komerciāli pieejamajām sorbentu daļiņām. Rezultātā pakotās nanokolonnas var iegūt to pašu dažādību, kādas atrodamas standarta izmēru kolonnu piedāvājumā [14].

Ņemot vērā, ka teju visi sorbentu ražotāji pieļauj iespēju iegādāties atsevišķi tikai sorbentu, paveras plašas iespējas nanokolonnu veidošanā, kā rezultātā iespējams izveidot pakotās nanokolonnas ar visu veidu funkcionālajām grupām, visa veida daļiņu tipiem un izmēriem, kā arī ar sorbenta specifiskajām īpašībām, kas izriet no ražošanas procesā izvēlētajā sintēzes. Jāatzīmē gan, ka plašais sorbentu klāsts pieejams tikai gadījumos, ja kolonnu pakošana tiek veikta pašrocīgi, izmantojot spiediena kapsulas, jo sorbentu ražotāji ne vienmēr piedāvā nanokolonnu ar attiecīgajiem sorbentiem. Turklāt vairāki sorbentu ražotāji vispār nepiedāvā jau gatavas pakotās kolonnas. Iemesls gan šādai situācijai ir visai triviāls – pildīšanas process ir laikietilpīgs un prasa īpaši augstu precizitāti, ņemot vērā nelielos izmērus [14].

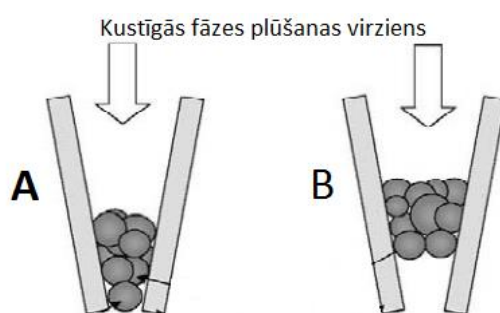
Pakoto kolonnu problemātiskais punkts ir daļiņu noturēšana kapilārā brīdī, kad cauri tiek virzīta šķidrums plūsma. Normāla izmēra hromatogrāfiskajās kolonnās daļiņu palikšanu kolonnā nodrošina īpaši filtri.

Pakoto nanokolonnu veidošanā tiek izmantotas divas metodes, lai nepieļautu daļiņu izkļūšanu no kolonnas. Pirmais un vienkāršākais ir kapilāra galā veidot 1-2 mm biezu porainu struktūru, kas iegūta ķīmiskā veidā. Šādas struktūras tiek veidotas uz silīcija bāzes, kā rezultātā struktūra labi saistās ar silīcija kapilāra iekšpusi. Tiesa gan, šīs struktūras neveicina vielu sadalīšanas procesus kolonna, turklāt vēl kalpo kā “tukšais” tilpums, veicinot smaiļu paplašināšanos, kā rezultātā tiek zaudēts smaiļes augstums un sarūk jutība, kas ir īpaši nevēlama parādība, jo paaugstinātā jutība ir viens no nanokolonnu izmantošanas plusiem [14].

Otrs risinājums ir izmantot kapilāru ar konusveida sašaurinājumu vienā galā. Šādi kapilāri ir komerciāli pieejami un tiek veidoti parastos silīcija kapilārus sagriežot daļās un vienā galā (aptuveni 1-2 cm garumā) noņemot polimēru apvalku, kas nodrošina paaugstināto mehānisko izturību, un paaugstinātā temperatūrā izveidojot sašaurinājumu. Šādiem kapilāriem

parasti tiek veikta kvalitātes kontrole, nodrošinot, lai izveidotajiem kapilāru sašaurinājumiem diametrs ir vēlamajās robežās [15].

Izmantojot šādu risinājumu, kapilāra gals, kas nav sašaurināts, vispirms tiek iemērīts eluenta un sorbenta daļiņu suspensijā, ļaujot kapilārajiem spēkiem piepildīt kolonnu ar šo suspensiju. Kad kolonna teju pilnībā piepildīta, ir novērojams, ka daļiņas sablīvējas pie sašaurinājuma, veidojot arkveida struktūru. Šajā brīdī kolonna tiek ievietota spiediena kamerā un attiecīgā suspensija tiek ar spiedienu virzīta cauri kolonnai. Rezultātā izveidotā sorbenta arka tiek nostiprināta, bet sorbents visā kolonnā sablīvējas ciešāk. Spiediena kamerai pievadītais spiediens atkarīgs no kolonnas garuma, izmantotajām daļiņām, izmantotā eluenta viskozitātes un daļiņu izveidotās arkveida struktūras platuma [15].



1.4. att. Shematisks attēlojums daļiņu novietojumam, ja ir defekts (A) – kolonnas sašaurinājums ir nobloķēts, un bez defekta (B) – daļiņas sablīvējušās arkveida struktūrā [15].

Šādas uzpildīšanas tehnikas izmantošanā ir divi kritiskie punkti. Pirmkārt, ne vienmēr izdosies izveidot vienādu arkveida struktūru, kā rezultātā iegūtajām kolonnām var būt atšķirīgi pretspiedieni un, sliktākos gadījumos, viena vai divas daļiņas var pilnībā nobloķēt eluenta (suspensijas) caurplūdi, neļaujot kolonnu uzpildīt ar daļiņām, par šādu kolonnu izmantošanu analīzē nemaz nerunājot [15].

Otrs kritiskais punkts ir straujš spiediena kritums spiediena kamerā. Ņemot vērā, ka kolonnas tiek uzpildītas ar spiedienu, kas ir robežās no 20 līdz 100 bar, ir jābūt īpaši uzmanīgiem ar spiediena izlīdzināšanu brīdī, kad kolonna ir uzpildīta. Straujš spiediena kritums rezultēsies sablīvētā sorbenta izkļūšanā no kolonnas pa to pašu galu, pa kuru tika veikta uzpilde. Rezultātā radīsies defekti – sorbenta izretināšanās un pārrāvumu veidošanās, ko iespējams viegli konstatēt apskatot kapilāru pret gaismu. Šādos gadījumos kolonnas uzpilde ir jāveic atkārtoti, lielāku uzmanību pievēršot spiediena kritumam.

Ar spiediena krituma veidoto defektu risks palielinās, izmantojot mazāka izmēra daļiņas. Tas skaidrojams ar mazāku telpu starp daļiņām un daļiņu sablīvēšanos, kā rezultātā kolonna nodrošina lielāku pretspiedienu, līdz ar to nepieciešams palielināt pildīšanas spiedienu.

Jāatzīmē, ka šādu no sorbenta daļiņām veidotu arku iespējams izveidot gadījumos, kad sašaurinājuma diametra un daļiņu vidējā diametra attiecība nepārsniedz piecas reizes. Ja tiek izmantotas daļiņas ar vidējo izmēru 5 μm , tad sašaurinājuma maksimālais diametrs nedrīkst būt lielāks par 25 μm [15].

Būtisks ieguvums izmantojot šādus kapilārus ir fakts, ka kapilāru galu sašaurinājums ir viegli savietojams ar MS, kas apgādāti ar ESI paraugu ievadīšanas metodi. Šādos gadījumos kapilāram tiek pievadīta strāva, kā rezultātā analīzes laikā analīts ar kustīgo fāzi pamet kolonnu jau jonizētā aerosola veidā, nodrošinot sistēmu bez “tukšajiem” tilpumiem. Tiesa, kā mīnuss jāmin fakts, ka šādi kapilāri nav savietojami ar citiem paraugu ievadīšanas veidiem [15].

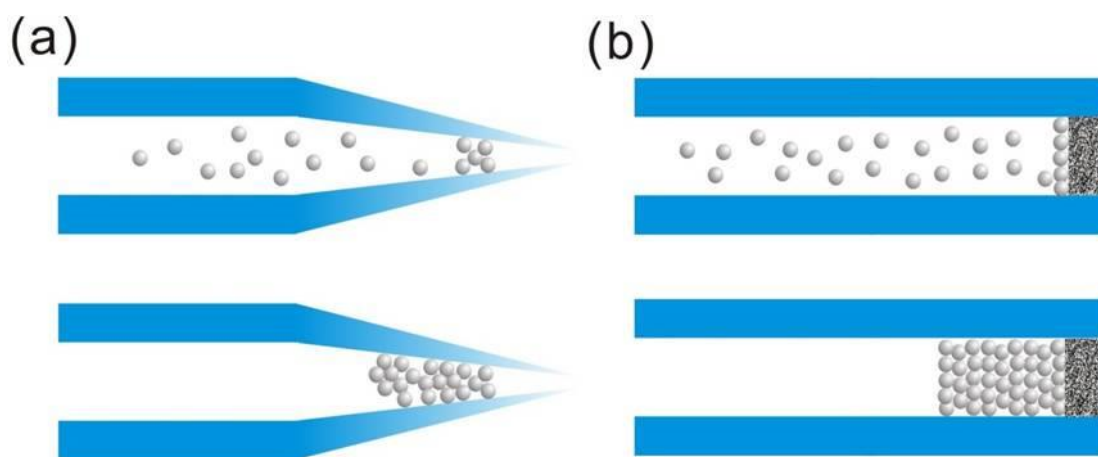
Jāatzīmē, ka visu pakoto kolonnu gadījumā kapilāra uzpildīšana tiek veikta ar spiediena kapsulu, savukārt tā sablīvēšana notiek, pievienojot kapilāru šķidrums hromatogrāfam.

1.9 Monolītu un pakoto kolonnu izmantošana proteīnu analīzē

Proteīnu un peptīdu analīzē vēljoprojām priekšroka tiek dota pakotajām nanokolonnām. Galvenokārt tas tiek darīts atkārtojamības un vienkāršības labad. Gadījumos, ja proteīnu analīze tiek veikta ar MS iekārtu, kas apgādāta ar ESI, tad lieliska izvēle ir pakotās kolonnas ar sašaurinātu galu. Pievadot strāvu šīm kolonnām, sašaurinātais gals izstumj šķidro kustīgo fāzi jonizēta aerosola veidā, samazinot “tukšo” tilpumu līdz minimumam. Kā trūkums gan šādam risinājumam jāmin, ka sašaurinājuma gals ir trausls un to var ne tikai viegli saplēst, ja tas tiek pakļauts pat nelielam fiziskam triecienam, kā arī ESI pievadītā strāva noārda to. Rezultātā sašaurinājums var kļūt neregulārs, pasliktinot radītā aerosola viendabīgumu, vai arī noārdīties tik tālu, ka tas nebalsta no sorbenta daļiņām izveidoto arkveida struktūru, izskalojot sablīvēto sorbentu ārā no kolonnas [4].

Tāpat jāmin fakts, ka pakotās kolonnas ar sašaurināto galu nav izmantojamas kā priekškolonas vairāku dimensiju hromatogrāfiskajās sistēmās, jo nav atrasti savienojumu, kas būtu pilnvērtīgi savietojami ar jau pieminēto kapilāra sašaurinājumu.

Pakotās nanokolonnas ar fritiem (no angļu valodas – *frits*) tiek izmantotas arī proteīnu analīzē, taču visbiežāk tās izmanto kā priekškolonnas paraugu sakoncentrēšanai, galvenokārt “tukšo” tilpumu dēļ, ko rada fritu izmantošana.



1.5. att. Sorbenta sablīvēšanās pakotajās kolonnās, veidojot arkveida struktūru kapilāros ar sašaurinājumu (a), un kapilāros ar fritu (b) [4].

Jāatzīmē, ka pakoto kolonnu pildīšanai ir pieejams plašs sorbentu klāsts, turklāt īpaši populāri proteīnu un peptīdu analīzē ir izmantot sorbenta daļiņas, kuru kodols nav porains jeb *core-shell* daļiņas. Šī sorbenta izmantošana uzlabo masas pārnesi un samazina virpuļdifūzijas ietekmi [17].

Kvalitatīvi izgatavotas monolītu nanokolonnas proteīnu un peptīdu analīzei ir vēl piemērotākas nekā pakotās kolonnas. Piemēram, peptīdu analīzei monolītu kolonnām sorbenta saistīšanās ar peptīdiem ir līdz pat 10 reizēm labāka, ja salīdzina ar pakotajām daļiņu nanokolonnām. Turklāt monolītu kolonnu uzbūve samazina arī virpuļdifūzijas ietekmi, uzlabojot smailes formu [17, 4].

Turklāt monolītu kolonnas var operēt ar krietni lielākiem plūsmas ātrumiem, būtiski saīsinot analīzes laiku, kas ir nozīmīgs proteīnu un peptīdu analīzē, jo paraugā esošo peptīdu skaits var sasniegt vairākus simtus un pat tūkstošus. Turklāt palielinot plūsmas ātrumu, monolītu kolonnas būtiski nezaudē efektivitāti (teorētiskā šķīvja augstums būtiski nepalielinās) un Van Demtera (Van Deemter) līkne saglabājas paralēla x asij pie plūsmas ātruma no 1 līdz 7 mm/s, savukārt, pakotajām kolonnām augstākā efektivitāte ir pie plūsmas ātruma 1 mm/s un, palielinot plūsmas ātrumu, efektivitāte sāk būtiski sarukt [16].

Jāatzīmē, ka “rožainākajās” publikācijās un reklāmas rakstos norādīts, ka monolītu nanokolonnu efektivitāte peptīdu analīzē var sasniegt pat 250 tūkstošus teorētisko šķīvju uz metru kolonnas, nodrošinot smailes vien dažu sekunžu platumā, turklāt kolonnas var lepoties ar lielisku robustumu, atkārtojamību un ilgmūžību [18]. Realitātē gan publikācijās atrodamās monolītu receptes ir ar zemu atkārtojamību, turklāt arī komerciāli pieejamo monolītu skeleti

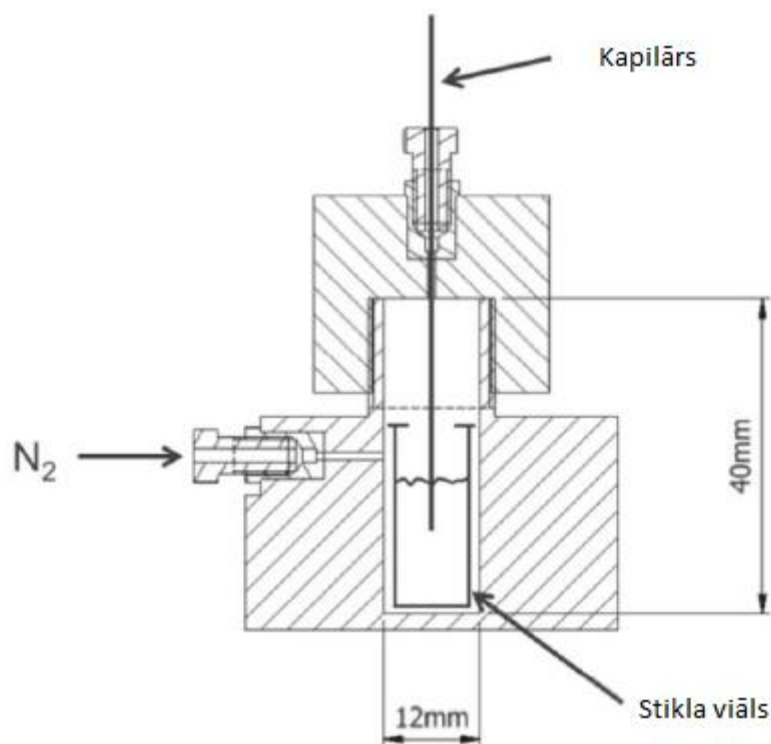
nereti ir tik neizturīgi, ka pie strauja pretspiediena krituma, struktūra var “sabrukt”. Kā vēl viens mīnuss monolītu kolonnām ir jāatzīmē, ka tās nevar operēt vidē, kuras pH pārsniedz pH 8 [19].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1 Izmantotā aparatūra un reaģenti

Kapilāru uzpildīšana, skalošana un žāvēšana notiek, izmantojot Oslo Universitātē izveidotās spiediena kapsulas skatīt 2.1.att. Tajās tiek ievietots stikla viāls ar šķīdumu, ar kuru nepieciešams uzpildīt vai skalot kapilāru. Žāvēšanas gadījumā tiek ievietots tukšs viāls. Tad tiek ievietots arī kapilārs, bet spiediena kapsula tiek kārtīgi aizskrūvēta. Pievadot spiediena kapsulai augstspiediena slāpekļa plūsmu, šķīdums no viāla tiek iespiests kapilārā.

Diemžēl, ņemot vērā, ka slāpekļa balons ir tiešā veidā savienots ar spiediena kameru, izveidotā spiediena kameras uzbūve neparedz iespēju regulēt pievadīto spiedienu.



2.1 att. Spiediena kapsulas uzbūve šķērsgriezumā.

Eksperimentos izmantotās vielas un reaģenti ir apkopoti tabulā 2.1, savukārt tabulā 2.2 ir uzskaitīta eksperimentos izmantotā aparatūra.

Eksperimentālajā daļā izmantotie reaģenti un vielas

Savienojums	Piegādātājs un tīrība	Sērijas nr.
TMOS	Sigma-Aldrich >99%	341336-100G, Lot BCBR5684V
VTMS	Sigma-Aldrich, 98%	Lot MKBQ7644V, 235768-100mL
Acetonitrils	VWR Chemicals LC-MS grade Biochem, LC-MS grade	Lot. 16D121182, 83640.320 200122500-1015-611
Etiķskābe	Sigma-Aldrich F 49-51%	BCBJ2505V, 45654-100mL-
Skudrskābe	Fluka 49-51%	LOT BCBL8403V, 09676-500mL
PEG 10	Sigma-Aldrich	309028-250G LOT BCBM8018V
PEG 20	Luka Chemika 1kg	81300, Lot426792/1 33201
Metanols	VWR Prolabo chemical UPLC- HPLC gradient grade	20864.320, LOT 15K0650512
Uracils	Calbiochem	Cat 6630 LotB60343
Toluols	RatBurn	Batch 3E08HB, Cat. RG2025
Bifenils	Merk 1kg , >99%	1290417
THF	Sigma-Aldrich 99,9%	Lot# SHBF3634V, 34865-100 ML
1-oktāntiols	Sigma-Aldrich >98,5%	Lot#24496TKV, 471836-25
Amonija hidroksīds	AnalR 25%	Lot k26601409 925
Nātrija hidroksīds	Merck 1kg>99%	1.06498.100 B886598 629
Trietilamīns	Merck >99%	S6068952 030 , 8.08352.0500
Silīcija kapilārs (monolītu kolonnām)	Polimicro technologies, Beg ID 49,1; End ID 48,9, OD 360um	BALQ08A 106815017
150 mm kapilārs (pakotajām kolonnām)	PicoTip EMITTER SilicaTip, Tip 8±1 μm, ID 75,0 μm	Stock: FS360-75-8-N-20-C15, Batch: 04515
500 mm kapilārs (pakotajām kolonnām)	PicoTip EMITTER SilicaTip, Tip 8±1 μm, ID 75,0 μm	Stock: FS360-75-8-N-5-C50, Batch: 04415
Pakošanas sorbents	Reprosil-Pur C18-AQ 3μ, Dr. Maisch	

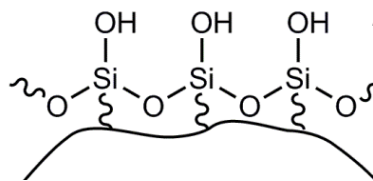
Ekspimentālajā daļā izmantotā aparatūra

Iekārtas nosaukums	Ražotājs un modelis	Partijas nummurs
Gaismas mikroskops	Motic	95583
Gaismas mikroskops	Olympus PME	501919
AEŠH	Agilent 1200 series (ar nanoplūsmas pumpi)	DE60555234 (Oslo Universitāte) DE50534223 (Tartu Universitāte)
Kustīgās fāzes degazēšanas sistēma	Agilent Series 1200	JP63703694
Sistēmas vadības bloks	Agilent Series 1200 Instant Pilot	DE64458781
Detektors	Knauer UV Detector K2600	79501
Hromatogrāfijas sistēmas interfeiss	PE Nelson 900 series interface	9006510932
Krāsns	Fisons instruments GC 8000 series	31003
Hromatogrāfijas sistēma (Oslo Universitāte)	Bruker Proxeon easy-LV	LC-000295
Hromatogrāfijas sistēma (Tartu Universitāte)	Dionex Ultimate 3000 RSLCnano	
Masspektrometrs (Oslo Universtītāte)	Thermo Fisher Scientific Q Exacutive Orbitrap	
Masspektrometrs (Tartu Universtītāte)	Thermo Electron, LTQ Orbitrap classic	
Masspektrometrs (Tartu Universtītāte)	Thermofisher Scientific, Q Exactive Plus	
Skenējošais elektronu mikroskops	FEI Quanta 200 PEG-ESEM (zemā vakuumā)	

2.2 Sākotnējā monolītu kolonnas sintēzes recepte**1. solis – kapilāra sagatavošana.**

Lai sagatavotu izvēlēto kapilāru monolīta skeleta sintēzei, ir nepieciešams tukšo kapilāru uzpildīt ar 1 M nātrija hidroksīda šķīdumu. Kad pirmie nātrija hidroksīda šķīduma pilieni ir ieraugāmi kapilāra otrā galā, noslēdz slāpekļa balonu, apturot tālāku plūsmu. Kapilāra abus galus noslēdz ar septām un ievieto krāsni 40°C temperatūrā uz 3 stundām.

Šajā solī tiek izveidotas silanola grupas, pie kurām nākamajā solī polimerizēsies TMOS.



2.2 att. Shematisks attēls silanolu grupu izveidošanai silīcija kapilāra iekšpusē

Pēc 3 stundām kolonna vispirms tiek skalota ar 3 mL ūdens, pēc tam ar 1,5 ml acetoniitrila un visbeidzot žāvēta 30 minūtes ar slāpekļa plūsmu.

2. solis – monolīta skeleta izveidošana.

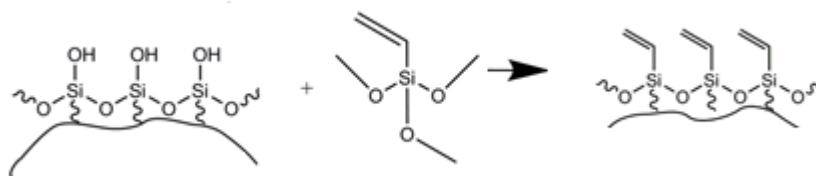
Tiek pagatavots šķīdums, kas sastāv no 4,5 mL TMOS, 10 mL 0,1M etiķskābes šķīduma un izšķīdinātiem 1,06 gramiem PEG 10. Šķīdums tiek ievietots ledusskapī maisīts ar magnētisko maisītāju 45 minūtes aptuveni 4°C temperatūrā. Iepriekš sagatavotais kapilārs tiek uzpildīts ar pagatavoto šķīdumu, izmantojot spiediena kapsulu, un tā gali noslēgti, bet kapilārs ievietots žāvskapī 40°C temperatūrā uz 24 stundām. Jāatzīmē, ka šajā solī nedrīkst kavēties ar kapilāra uzpildi.

3. solis - mezoporu kodināšana.

Pēc tam, kad kapilārs noturēts žāvskapī 24 stundas 40°C temperatūrā, tas tiek uzpildīts ar 0,01M amonija hidroksīda šķīdumu, bet tā gali atkal noslēgti ar septām. Kapilārs tiek ievietots krāsnī 120°C temperatūrā uz 3 stundām. Pēc 3 stundām tiek noņemtas gumijveida septas un krāsns temperatūra tiek palielināta līdz 330°C. Kapilārs 330°C tiek turēts 24 stundas.

4. solis – vinil funkcionālo grupu pievienošana.

Stikla viālā tiek pagatavots šķīdums no 0,25 mL VTMS, 0,125 mL TMA un 5,625 mL 95% metanola šķīduma. Kapilārs tiek uzpildīts ar šķīdumu, tā gali noslēgti ar septām, un tas tiek ievietots 80°C temperatūrā žāvskapī uz 6 stundām. Pēc 6 stundām kapilāru izņem no žāvskapja un skalo ar metanolu.

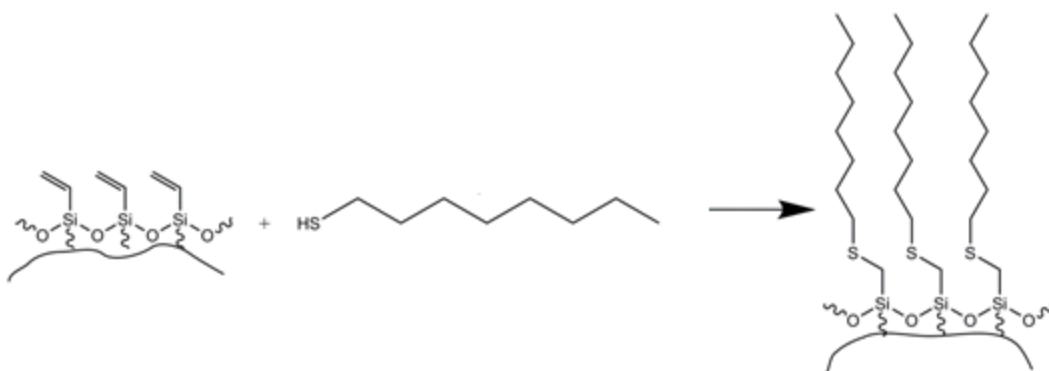


2.3 att. Shematisks attēlojums vinil funkcionālo grupu pievienošanai monolīta struktūrā

5. solis – tiola “klikšķa” reakcija.

Stikla viālā tiek pagatavots šķīdums, kas sastāv no 5 mL THF, 25 mg LP un 1 mL 1-oktāntiola. Šķīdums tiek kratīts ultraskaņas vannā līdz LP izšķīst. Ar pagatavoto šķīdumu tiek

uzpildīts kapilārs, bet tā gali noslēgti ar septām. Kapilārs tiek ievietots žāvskapī 73°C temperatūrā uz 16 stundām. Pēc 16 stundām kapilārs tiek izņemts no žāvskapja un skalots ar THF. Pēc tam žāvēts ar slāpekļa plūsmu 30 minūtes.



2.4 att. Shematisks attēlojums C8 ķēdes pievienošanai vinil-grupām tiola “klikšķa” reakcijā

2.3 Sintezēto sēriju apraksti un veiktās izmaiņas metodē

Monolītu kolonnas tika sintezētas, izmantojot iepriekš aprakstīto metodi, taču, konstatējot trūkumus monolītu struktūrā, tika veikti koriģējumi metodē, lai atrastu optimāli labāko receptes versiju.

Par “partiju” šajos eksperimentos uzskata tās kolonnas, kuru sintēzē tika izmantoti vieni un tie paši sol-gel šķīdumi. Katrā partijā tika sintezētas gan PEG 10, gan PEG 20 kolonnas, lai iegūtu priekšstatu par PEG ietekmi uz poru izmēru izkliedi. Tāpat katrā partijā (izņemot astoto) tika sintezētas vismaz divas vai trīs PEG 10 un divas vai trīs PEG 20 kolonnas, lai izslēgtu rupjas kļūdas un dotu priekšstatu par atkārtojamību.

Pirmās trīs partijas tika izveidotas pēc nodaļā 2.2 aprakstītās receptes un tajā izmaiņas netika ieviestas. Pēc nesekmīgo rezultātu iegūšanas, kas norādīja uz būtiskām struktūras problēmām, tika izlemts samazināt izmantojamā slāpekļa balona spiedienu, lai samazinātu pretspiedienu. Tāpat, sākot ar ceturto partiju, tika ieviestas izmaiņas metodē un 2. solī tika izmantota 0,01M etiķskābe.

Piektā partija tika sintezēta tāpat kā ceturta, taču pēc defektu novērošanas mikroskopos, tika izlemts veikt eksperimentu, kapilāru atkārtoti uzpildīt ar receptes otrajā solī aprakstīto šķīdumu. Tika pārbaudīts, vai, atkārtoti uzpildot ar monolīta struktūru veidojošo šķīdumu, izdosies aizpildīt pārrāvumus struktūrā un lielākās poras.

Sintezējot sesto partiju, tika vēlreiz samazināts slāpekļa balonā esošais spiediens, lai samazinātu spiediena krituma radītos defektus.

Sintezējot septīto partiju abi PEG porogēni tika izmantoti ar līdzīgu masu (pretēji publikācijās aprakstītajai nepieciešamībai masas palielināšanai par 12% gadījumos, kad PEG 10 vietā tiek izmantots PEG 20).

Astotās partijas gadījumā kolonnas tika sintetētas, izmantojot tikai PEG 20 kā porogēnu.

Devītās partijas gadījumā 2. solī aprakstītais šķīdums tika ievietots ledus vannā, lai nodrošinātu efektīvāku dzesēšanu.

Katras sērijas izmantotā porogēna iesvari apkopoti tabulā 2.3.

2.3. tabula

Porogēna iesvari, kas izmantoti katras partijas sol-gel šķīduma pagatavošanā

Partijas Nr.	PEG 10, g	PEG 20, g
1	1,0590	1,0700
2	1,0589	1,0679
3	1,0608	1,0591
4	1,0614	1,1790
5	1,0644	1,1880
6	1,0634	1,1870
7	1,0631	1,0640
8	-	1,1876
9	1,0601	1,1891

2.4 Monolītu kolonnas kvalitātes noteikšana

Kad kolonna uzpildīta ar monolītu veidojošo šķīdumu, kura sastāvā ir porogēns, un noturēta krāsni vismaz 24 stundas 40°C temperatūrā, ir iespējams pārbaudīt pirmos indikatorus, kas vēsta par kolonnas monolīta kvalitāti. Kapilāra ārpusē nav nekādu izmaiņu, kuras būtu iespējams novērot ar neapbruņotu aci un kas liecinātu par monolīta esamību un tā kvalitāti. Tiesa, ņemot vērā, ka kapilārs ir daļēji caurspīdīgs, izmantojot gaismas mikroskopus, ir iespējams noteikt, vai kapilārā vispār atrodas monolītam līdzīga struktūra, un virspusēji novērtēt tā kvalitāti.

Vispirms kolonna tiek apskatīta Motic mikroskopā perpendikulāri kapilāram. Tas ļauj spriest, cik blīvs ir kolonnā atrodamais monolīts, un konstatēt uzskatāmākos defektus – pārrāvumus. Šādi kolonnu iespējams apskatīt visā garumā.

Pēc tam tiek veikta kolonnas apskate Olympus mikroskopā paralēli kapilāram. Šādā veidā ir iespējams novērtēt kvalitāti tikai kapilāra galam, taču tas dod precīzāku priekšstatu par monolīta kvalitāti un veikto kapilāra griezumumu. Ar šo metodi iespējams jau noteikt mazāka izmēra defektus - laterālas plaisas, monolītu atrāvumus no kapilāra sienām u.c..

Kolonnu pārbaudīšanai ar AEŠH-UV sistēmu tika izmantoti divi kolonnu testi, kuru sistēmas parametri parādīti tabulā 2.4. Pirmais tests jau izstrādāts Oslo Universitātes Ķīmijas fakultātes Bioķīmijas nodaļā, lai savstarpēji salīdzinātu izveidotās nano izmēra kolonnas.

Savukārt otru testu izveidoja darba autors, lai varētu pēc iespējas pilnvērtīgāk savstarpēji salīdzināt sintezētās kolonnas. Šajā testā tika izmantoti četri savienojumi – uracils (koncentrācija 0,7 μg/mL), ar kura palīdzību tiek noteikts “tukšais” tilpums, un trīs citi savienojumi – toluols (77,5 μg/mL), naftalēns (0,05 μg/mL), bifenils (0,006 μg/mL) – , kas ļauj objektīvāk noteikt kolonnas aiztures spējas, aprēķinot iegūto smaiļu teorētisko šķīvjū skaitu un smaiļu savstarpējo izšķiršanu. Kustīgās fāzes ātrums un organiskā šķīdinātāja īpatsvars tajā tika izvēlēts pēc maisījuma analizēšanas ar trīs dažādām kolonnām, kuras, pēc novērotās struktūras mikroskopos, atšķīrās visvairāk.

Rezultātā tika izstrādāts kolonnas tests, kura kustīgās fāzes ātrums ir optimāls, lai kolonnu nodrošinātais pretspiediens iekļautos sūkņa darba intervālā, vienlaikus nodrošinot gana ātru analīzi. Arī organiskā šķīdinātāja īpatsvars tika noteikts tā, lai vielas tiktu pilnībā atdalītas gan tajās kolonnās, kuru kvalitāte ir zemāka, gan tajās, kur augstāka. Tāpat organiskā šķīdinātāja īpatsvars kustīgajā fāzē tika regulēts, lai iegūtu apmierinošu smaiļu formu, netraucējot noteikt smaiļu parametrus, kas nepieciešami tālāku aprēķinu veikšanai.

Tālāk kolonna pieslēgta hromatogrāfam un tiek nodrošināta 0,5 μL/min plūsma gradienta režīmā (30% B kanāls - 0,1% skudrskābes šķīdums acetonitrilā, 70% A kanāls – 0,1% skudrskābes šķīdums ūdenī). Lai sūknis stabili darbotos, kolonnai jānodrošina vismaz 10bar pretspiediens.

Kolonnas nodrošinātais pretspiediens un pretspiediena stabilitāte ir viens no indikatoriem kolonnas kvalitātei. Ja pretspiediens ir zems, vai hromatogrāfs nespēj nodrošināt stabilu plūsmu – kolonna nebūs izmantojama analīzēm. Gadījumā, ja kolonnas spiediens testa laikā konstanti samazinās, tas nozīmē, ka monolīts nav pietiekami labi saistījies ar kapilāra sienām un tas tiek izskalots no sistēmas. Jāatzīmē, ka kolonnas pretspiediena pārbaude ir jāveic, nepievienojot kolonnu detektoram, jo pretējā gadījumā, ja monolīts tiek izskalots no kolonnas, tas var sabojāt sistēmu un radīt aizsprostojumus.

Hromatogrāfiskās sistēmas parametri izmantotajiem kolonnu testiem

Parametrs	Kolonnas tests Nr. 1	Kolonnas tests Nr. 2
Plūsmas ātrums, $\mu\text{L}/\text{min}$	0,5	0,75
Kustīgās fāzes A īpatsvars (0,1% skudrskābes šķīdums ūdenī), %	70	55
Kustīgās fāzes B īpatsvars (0,1% skudrskābes šķīdums acetonitrilā), %	30	45
Izmantotie savienojumi un to koncentrācija	uracils (0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) toluols (77,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	uracils (0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) toluols (77,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) naftalēns (0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bifenils (0,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
Analizējamā parauga injekcijas tilpums, nL	50	50
UV detektora viļņu garums, nm	254	254

2.6 Ar daļiņām pakoto nanokolonnu izveide

Veicot 15 cm kapilāru kolonnu uzpildi, stikla viālā pārnes aptuveni 20 mg izvēlēta sorbenta un pievieno aptuveni 1 mL acetona. Pagatavotās suspensijas koncentrācija var tikt mainīta, taču jāņem vērā, ka, pagatavojot pārāk koncentrētu maisījumu, pastāv lielāka iespēja nosprostot kolonnu, taču, izmantojot mazākas koncentrācijas suspensiju, kolonnas uzpilde prasīs ilgāku laiku. Stikla viālā ievieto magnētisko maisītāju un ievieto spiediena kapsulā, kas novietota virs magnētiskā maisītāja. Spiediena kameru aizskrūvē un ievieto izvēlēto kapilāru. Kapilārs jāievieto uzmanīgi, aptuveni 2-3 mm no viāla apakšas tā, lai magnētiskais maisītājs to neaizskartu.

Skatoties pret gaismu novēro, ka pa kapilāru uz augšu lēnām pārvietojas viālā pagatavotā suspensija. Kad suspensija sasniegusi kapilāra galu, spiediena kamerā rada 20 – 50 bar spiedienu, atverot slāpekļa balona vārstu, kas savieno balonu ar spiediena kameru. Šajā brīdī novēro nelielu pilienu izveidošanos kapilāra galā, kas nozīmē, ka kapilāra gals nav nobloķēts, un suspensijas šķīdums veiksmīgi tiek cauri, savukārt suspensijas sorbents sablīvējas un lēnām piepilda kapilāru. Arī kolonnas pildīšanas ar sorbentu iespējams novērot, apskatot kapilāru pret gaismu. Ir iespējams novērot atšķirību starp vietu, kur sorbents sablīvējies un starp vietu, kur sorbents ir suspensijas koncentrācijā.

Gadījumā, kad kolonna tika nosprostota un ilgāka laika posmā netika novērota nedz kolonnas piepildīšanās ar sorbentu, nedz pilienu veidošanās kapilāra galā, t.i. nav redzamu

pazīmju, ka notiktu pildīšanās process, nepieciešams procedūru apstādināt un veikt sablīvējumu izstumšanu pretējā virzienā. To veic, apgriežot kapilāru pretējā virzienā un pievadot slāpekļa gāzes plūsmu, 20 – 50 bar spiedienā. Arī šajā gadījumā var novērot kolonnā esošā sorbenta izspiešanu ārā. Kad kolonna atbrīvota no sorbenta un sorbenta sablīvējuma, uzpildīšanas procedūru veic atkārtoti.

Gadījumā, ja uzpilde tiek veikta garākām kolonnām, nepieciešams paaugstināt uzpildīšanas spiedienu, tāpat šis process prasa ilgāku laiku. Piemēram, 15 cm kolonnas uzpilde prasa aptuveni 2 stundas 40 bar spiedienā, savukārt 50 cm kolonnas uzpilde prasa līdz pat 15 stundām 80 bar spiedienā.

Maģistra darba ietvaros tika izveidotas divas ar sorbentu pakotas nanokolonnas. Viena no tām tika pakota 150 mm silīcija kapilārā (uzpildītā sorbenta garums – aptuveni 144 mm), bet otra – 500 mm silīcija kapilārā (uzpildītā sorbenta garums – aptuveni 492 mm). Kapilāru diametrs – 75 μm, bet uzpildīšanai izmantotais sorbents ir Reprosil-Pur C18-AQ. Vidējais daļiņu izmērs ir 3 μm. Jāatzīmē, ka šis sorbents ir apgādāts ar apgrieztās fāzes funkcionālajām grupām, kas spēj veiksmīgi darboties arī gadījumos, ja par kustīgo fāzi izmanto ūdens šķīdumu bez pievienotiem organiskajiem šķīdinātājiem.

2.7 Kolonnu raksturojošo parametru aprēķini

Visām kolonnām tika aprēķināts aiztures faktors “K”, atbilstoši formulai 2.1

$$K = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2.1)$$

, kur

t_R - aiztures laiks apskatāmajai smailei;

t_0 – laiks, kurā tiek izskalots “tukšais” tilpums

Uzsintezēto monolītu kolonnām savstarpējai salīdzināšanai tika aprēķināta izšķirtspēja starp toluolu – naftalēnu un naftalēnu – bifenilu, atbilstoši formulai 2.2.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} - W_{b2}} \quad (2.2)$$

, kur

R_s – izšķiršana starp divām smailēm,

t_{R2} – otrā smailes izdalīšanās laiks,

t_{R1} – pirmās smailes izdalīšanās laiks,

W_{b1} – pirmās smailes platums bāzes līnijas augstumā,

W_{b2} – otrās smailes platums bāzes līnijas augstumā.

Tāpat toluola, naftalēna un bifenila smailēm tika aprēķināts teorētisko šķīvju skaits, atbilstoši formulai 2.3.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \quad (2.3)$$

, kur

N – teorētisko šķīvju skaits,

t_R – smailes izdalīšanās laiks,

W_b – smailes platums bāzes līnijas augstumā.

Noteiktais teorētisko šķīvju skaits tika pārrēķināts uz garuma vienībām, nosakot viena teorētiskā šķīvja augstumu pēc formulas 2.4.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2.4)$$

, kur

H – teorētiskā šķīvja augstums, mm

L – kolonnas garums, mm

N – kolonnas teorētisko šķīvju skaits.

2.8 Salīdzinājums ar daļiņu kolonnām

Sintezētās monolītu nanokolonnas tika salīdzinātas ar Bioķīmijas laboratorijā sintezētajām nanokolonnām, kas pildītas ar komerciāli pieejamajām C8 5 μm sfēriskajām cietā kodola (*core-shell*) daļiņām.

Tāpat tika veikts salīdzinošs tests ar komerciāli pieejamo C8 kolonnu (Waters Sunfire C8, garums – 30 mm, diametrs – 4.6mm, daļiņu izmērs – 5 μm). Lai testa rezultātus varētu aptuveni salīdzināt, plūsmas ātrums tika palielināts atbilstoši diametra pieaugumam, kā rezultātā analīze tika veikta ar plūsmu 4,23 mL/min.

Nemot vērā, ka kolonnas testam izmantotā aparatūra nav pilnībā piemērota nanokolonnas testēšanai, neproporcionāli lielās detektora caurplūdes šūnas dēļ, testa ietvaros netika salīdzināti faktori, kurus var ietekmēt smaiļu platuma palielināšanās, piemēram, teorētisko šķīvju skaits un izšķiršana.

2.9 Sintezēto monolītu kolonnu izmantošana proteīnu analīzei

Kolonna tika pievienota Agilent šķidrums hromatogrāfa sūkņu sistēmai, bet par detektoru tika izmantots masspektrometrs Thermo Electron LTQ Orbitrap ar ESI paraugu ievadišanu. Ņemot vērā, ka izveidotajām nanokolonnām kapilāra galā nav sašaurinājums, kas nodrošinātu pilnvērtīgu aerosola radīšanu, kolonnas galā tika pievienots komerciāli pieejams kapilārs ar sašaurinājumu, kas šaurākajā punktā ir 8 μm plats.

Jāatzīmē gan negatīvais aspekts - šāda sašaurinājuma pievienošana izveido nelielu “tukšo” tilpumu, kurā nenotiek vielu atdalīšana, turklāt difūzijas rezultātā var rasties smaiļu platuma palielināšanās. Taču pievienotais kapilārs ir tikai 3 cm garš, tāpēc iegūtais rezultāts būtiski netiks ietekmēts, turklāt jāņem vērā, ka cits tehniskais risinājums nebija pieejams.

Analizējamais paraugs ir *Escherichia coli* šūnu lizāta paraugs, kas iezīmēts ar SILAC metodi. Paraugs sastāvēja no vieglās iezīmēšanas (Lys0 un Arg0) un smagās iezīmēšanas (Lys8 un Arg10) proteīniem, attiecībā 3:1. Ekstrahētie proteīni tika reducēti ar 1 mM DTT, savukārt citozīni tika bloķēti ar 5 mM jodacetamīdu. Pēc tam proteīni tika apstrādāti ar endoproteāzi LysC (enzīma – proteīna attiecība bija 1:50), savukārt pēc tam ar tripsīnu (enzīma – proteīna attiecība bija 1:50). Tālāk aptuveni 150 ng iegūto peptīdi tika attīrīti uz C18 StageTips stacionārās fāzes.

Paraugu analīzē tika izmantots gradienta režīms (2.5 tabula), kurā proteīnu sadalīšanai paredzētas aptuveni 30 minūtes. Pirmās 20 minūtes paredzētas parauga koncentrēšanai kolonnā, savukārt pēdējās 7 gradienta minūtes paredzētas kolonnas pilnīgai izskalošanai un mobilās fāzes atgriešanai sākumstāvoklī.

30 minūšu gradienta cikla režīma uzstādījumi

Soļa Nr.	Laiks, min	Kustīgās fāzes B saturs, %	Plūsmas ātrums, $\mu\text{L}/\text{min}$	Maksimālais pieļaujamais spiediens, bar
1	0,0	3,0	0,600	400
2	20,00	3,0	0,600	
3	20,01	8,0	0,300	
4	50,00	40,0	0,300	
5	55,00	100,0	0,300	
6	57,00	100,0	0,300	
7	57,01	3,0	0,250	

Tiesa, pēc pirmajiem eksperimentiem netika iegūta apmierinoša peptīdu sadalīšana, tādēļ tika pieņemts lēmums izmantot garāku gradienta ciklu, kur proteīnu sadalīšana tiktu veikta 90 minūtes (2.6. tabula) un 240 minūtes (2.7. tabula).

90 minūšu gradienta cikla režīma uzstādījumi

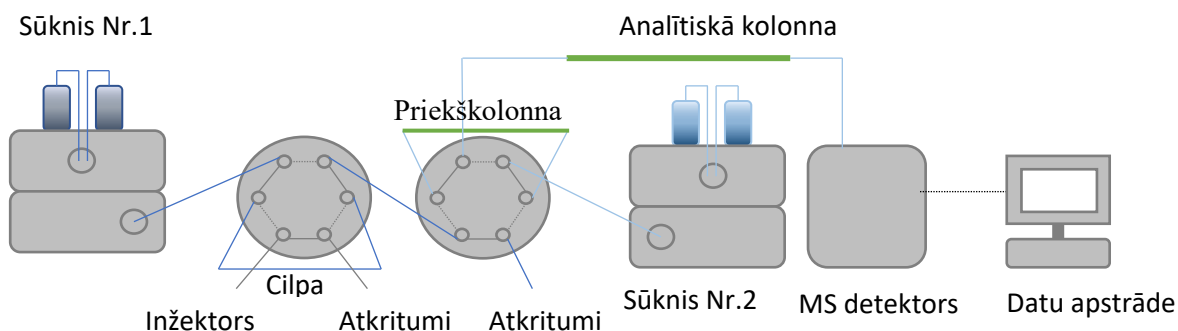
Soļa Nr.	Laiks, min	Kustīgās fāzes B saturs, %	Plūsmas ātrums, $\mu\text{L}/\text{min}$	Maksimālais pieļaujamais spiediens, bar
1	0,0	3,0	0,600	400
2	20,00	3,0	0,600	
3	20,01	8,0	0,300	
4	110,00	40,0	0,300	
5	115,00	100,0	0,300	
6	117,00	100,0	0,300	
7	117,01	3,0	0,250	

240 minūšu gradienta cikla režīma uzstādījumi

Soļa Nr.	Laiks, min	Kustīgās fāzes B saturs, %	Plūsmas ātrums, $\mu\text{L}/\text{min}$	Maksimālais pieļaujamais spiediens, bar
1	0,0	3,0	0,600	400
2	20,00	3,0	0,600	
3	20,01	8,0	0,300	
4	260,00	40,0	0,300	
5	265,00	100,0	0,300	
6	267,00	100,0	0,300	
7	268,00	3,0	0,250	

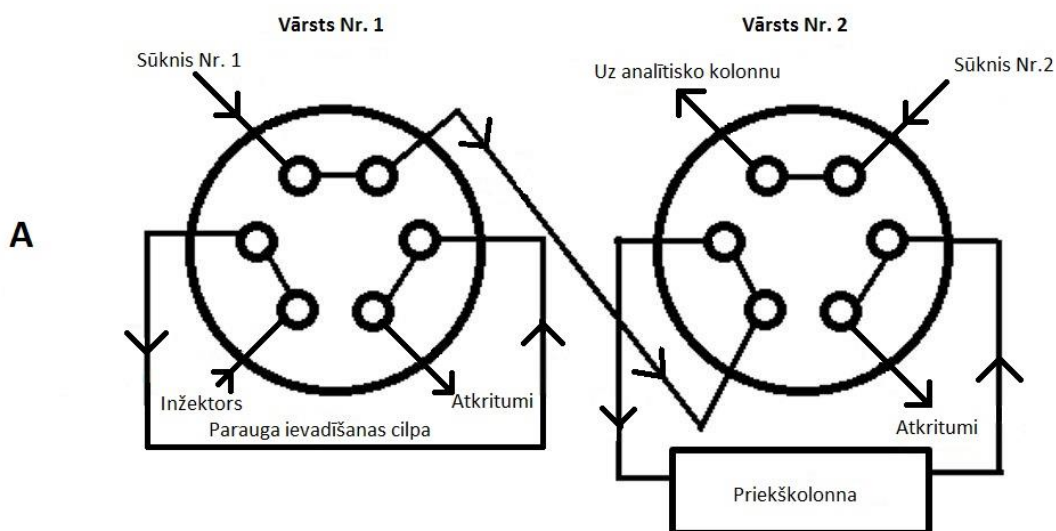
Visos gadījumos pēc gradienta beigām sistēmā tika injicēts 50% acetonitrila šķīdums ūdenī un 20% trifluoretanola šķīdums ūdenī, katrs trīs reizes. Šis solis tika veikts, lai pilnībā izskalotu inžektoru, parauga cilpu un novērstu iespējamo paraugu pārnesei uz nākamo injekciju (novērstu *carry-over*).

Oslo Universitātes Analītiskās bioķīmijas laboratorijā monolītu kolonnas tiek izmantotas arī kā priekškolonnas, kurās sakoncentrēt paraugu, atdalīt no parauga sāļus un ļoti hidroforas vielas. Lai izmantotu šādu tehniku nepieciešama īpaša sūkņu sistēma, kas redzama 2.5. attēlā.



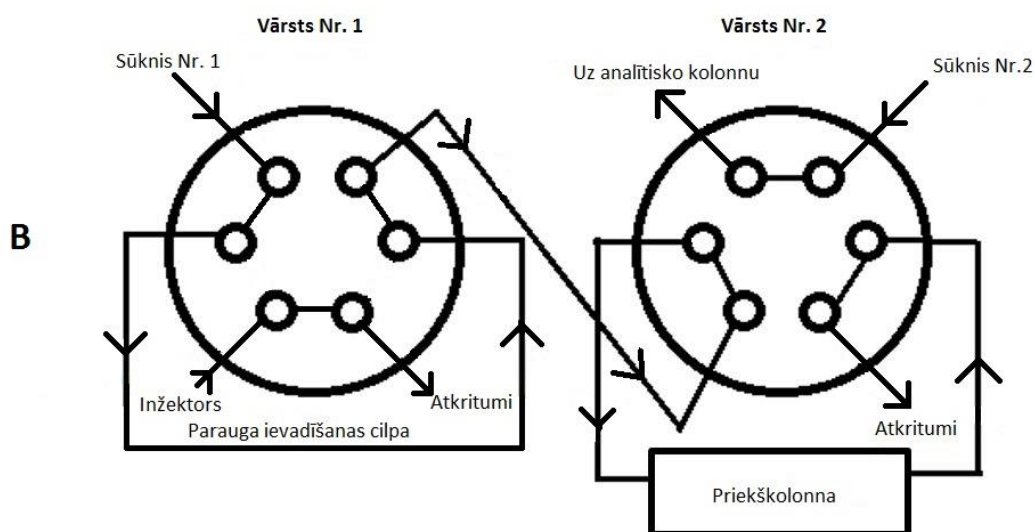
2.5. att. Shēma hromatogrāfiskajai sistēmai, kurā tiek izmantota nano izmēra priekškolonna parauga koncentrēšanai un attīrīšanai.

Kā redzams 2.5. attēlā, sistēmā tiek izmantotas divas sūkņu sistēmas un divi vārsti, kur katram ir divas pozīcijas, kuru rezultātā tiek nodrošināts savienojums starp ik diviem kanāliem.



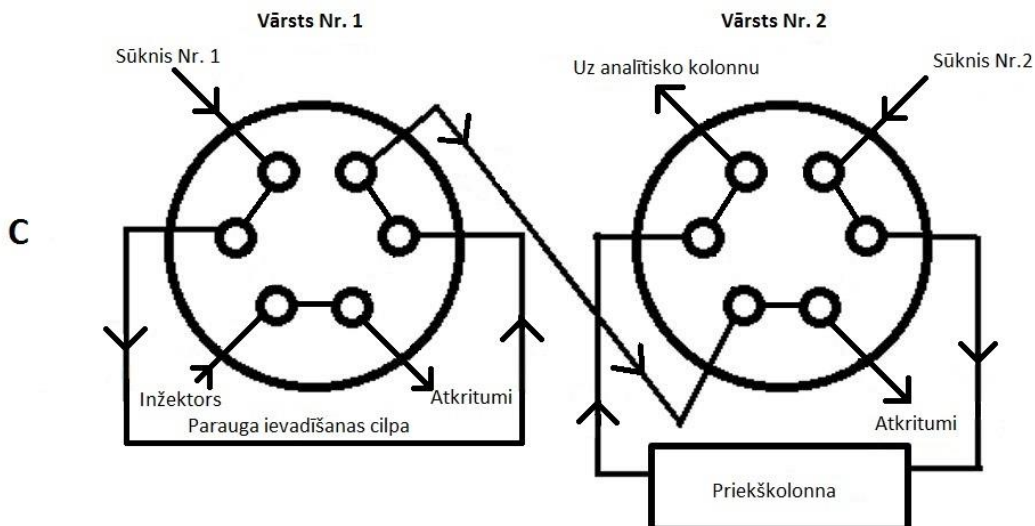
2.6 att. Vārsta Nr.1 un vārsta Nr.2 shēma novietojumam pozīcijā A.

Kā redzams attēlā 2.6. pozīcijā A sūknis Nr. 1 nodrošina kustīgās fāzes plūsmu caur priekškolonna, stabilizējot to, savukārt sūknis Nr. 2 nodrošina analītiskās kolonnas stabilizēšanu. Pozīcijā A ir iespējams veikt parauga ievadišanu no inžektora uz parauga ievadišanas cilpu.



2.7 att. Vārsta Nr.1 un vārsta Nr.2 shēma novietojumam pozīcijā B

Kad abas kolonnas ir stabilizētas ar kustīgo fāzi pietiekami ilgu laiku un paraugs ir atrodas ievadišanas cilpā, vārsts Nr. 1 tiek pārslēgts uz otro stāvokli, savukārt vārsts Nr. 2 paliek sākumstāvoklī. Šajā gadījumā sūknis Nr. 1 nodrošina parauga ievadišanu priekškolonnā, kur paraugs saistās ar stacionāro fāzi un tiek koncentrēts, savukārt paraugā un kustīgajā fāzē esošie sāļi tiek izskaloti, lai nepiesārņos analītisko kolonnu. Sūknis Nr. 2 šajā pozīcijā turpina nodrošināt analītiskās kolonnas stabilizēšanu.



2.8. att. Vārsta Nr.1 un vārsta Nr.2 shēma novietojumam pozīcijā C.

Kā redzams 2.8. attēlā, pozīcijā C vārsts Nr. 2 tiek pārslēgts no sākumstāvokļa. Rezultātā sūkņa Nr. 1 sūknētā kustīgā fāze nonāk izlietoto eluentu atkritumos, savukārt sūknis Nr. 2 strādā gradienta režīmā un nodrošina priekškolonnā koncentrētā parauga nonākšanu analītiskajā kolonnā.

Lai pārbaudītu iespēju izmantot sintezētās monolītu kolonnas kā priekškolonnas, kurās koncentrēt un attīrīt paraugu, tika izmantota iepriekš aprakstītā vārstu un sūkņu sistēma, savukārt par analizējamo paraugu tika izmantots ekstrahēts cilvēka asins seruma albumīna proteīns, kas tika apstrādāts ar tripsīna šķīdumu.

2.10 Pakoto kolonnu pārbaude ar proteīnu maisījumu

150 mm pakotās kolonnas tika pārbaudītas ar Thermo Electron LTQ Orbitrap masspektrometru, Agilent 1200 nano-LC šķidruma hromatogrāfiju, izmantojot kādu no tālāk nodaļā aprakstītajiem gradienta režīmiem, kur pa kanālu A tika nodrošināta 0,5% etiķskābes šķīdums ar MilliQ attīrītā ūdenī, savukārt pa kanālu B tika nodrošināta 80% acetonitrila šķīdums 0,5% etiķskābes ūdenī.

500 mm pakotās kolonnas tika pārbaudītas ar Thermofisher Scientific Q Exactive Plus masspektrometru, Dionex Ultimate 3000 RSLCnano šķidruma hromatogrāfu. Šajā sistēmā pa kanālu A tika nodrošināts 0,1% skudrskābes šķīdums ar MilliQ attīrītā ūdenī, savukārt pa kanālu B tika nodrošināts 80% acetonitrila šķīdums 0,1% skudrskābes ūdenī. Pārbaudot 500 mm kolonnas peptīdu paraugi vispirms tika sakoncentrēti 300 μ m x 10mm C18 Thermofisher

Scientific priekškolonnās, izmantojot izokrātisku plūsmas režīmu, kur B īpatsvars bija 3%, bet plūsmas ātrums 25µL/min. Koncentrēšanas ilgums – 20 minūtes. Tālāk paraugi tika ieskaloti izveidotajā pakotajā kolonnā, izmantojot kādu no zemāk aprakstītajiem gradienta režīmiem.

Analizējamais paraugs ir *Escherichia coli* šūnu lizāta paraugs, kas aprakstīts 2.9. nodaļā, savukārt analīzei izmantotas gradienta cikls parādīts tabulā 2.6. Jāatzīmē, ka arī šajā gadījumā sistēmā tika injicēti 2.9. nodaļā aprakstītie šķīdumi, lai novērstu vielas pārnesi uz nākamo paraugu.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1 Kolonnu kvalitāte

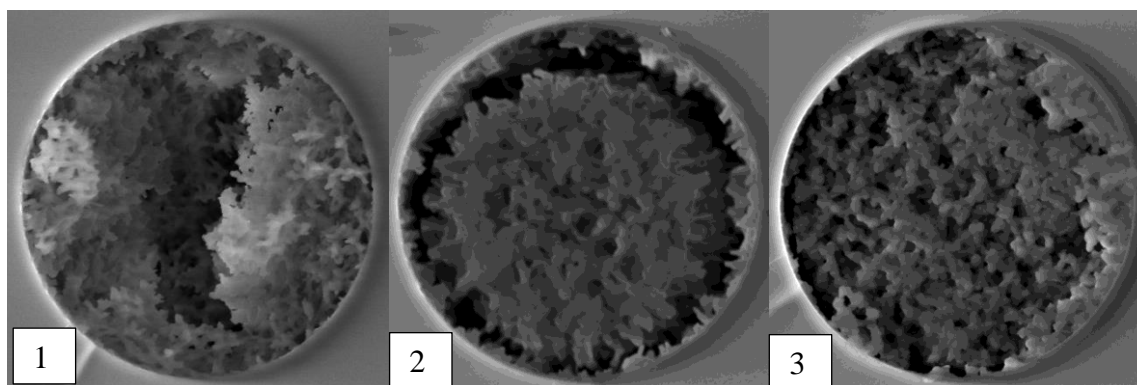
Pirmās trīs sintezētās monolītu partijas vizuālajā apskatē uzrādīja būtiskus struktūras defektus – zema blīvuma monolītu, kas vairumā gadījumu atrāviēs no kapilāra sienām. Rezultātā struktūras blīvums bija tik zems, ka nespēja nodrošināt nepieciešamo pretspiedienu, lai veiktu pilnvērtīgu kolonnas testu.

Domājams, ka neveiksmīgo eksperimentu iemesls slēpjas vairākos faktoros, bet, galvenokārt, spiediena kritums, kas rodas pēc kolonnas izņemšanas no spiediena kameras. Tā rezultātā šķīdums, ar ko kolonna uzpildīta, var izretoties un veidot pārrāvumus. Tāpat tika novēroti gadījumi, kad monolīta struktūrā bija mazāk defektu, ja kolonnas temperatūra, pēc karsēšanas 330°C temperatūrā, tika samazināta pakāpeniski.

Labākas kvalitātes kolonnas tika iegūtas pēc tam, kad monolīta struktūras veidošanas solī tika samazināta katalizatora – etiķskābes šķīduma – molaritāte no 0,1M šķīduma uz 0,01 M šķīdumu.

Pirmās veiksmīgi uzsintezētās kolonnas izdevās izveidot, kad spiediena kamerā radītais gāzes spiediens bija nokritis zem 100 bar.

Lai arī visās atlikušajās partijās tiek iegūtas kolonnas, kuru kvalitāti izdevās veiksmīgi pārbaudīt ar kolonnu testu, jāatzīmē, ka izmantojot SEM tika konstatēti defekti (redzams attēlā 3.1).



3.1. att. Ar SEM iegūtie kolonnu attēli un novērotie defekti (1, 2), salīdzinājumā ar monolītu bez defektiem (3).

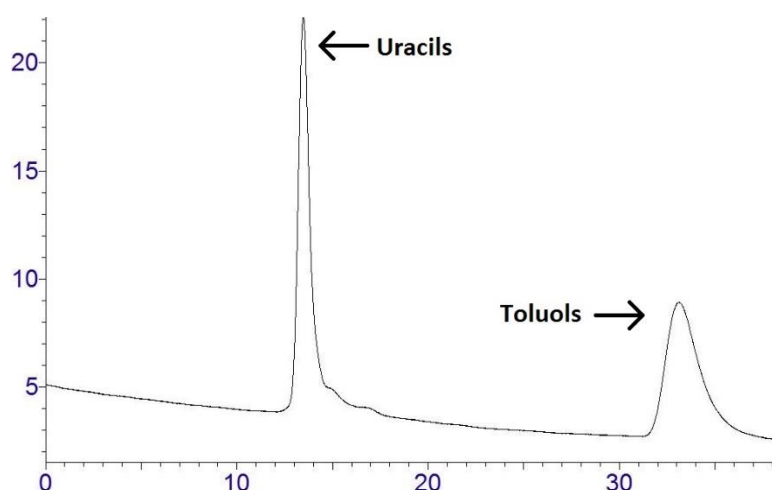
3.2 Uzsynetuzēto monolītu kolonnu salīdzinājums ar citām kolonnām

Salīdzinājums ar citām kolonnām ir parādīts tabulā 3.1. Kā redzams, tad “K” vērtība, kas aprēķināta pēc kolonnas testa Nr. 1 (2.4. tabulā), pārrēķinot monolīta kolonnai ir viszemākā, savukārt komerciāli ražotajai Waters kolonnai tā ir visaugstākā. Monolīta kolonna savas priekšrocības nodemonstrē brīdī, kad jāsalīdzina pretspiediens – tur monolīta kolonna uzrādījusi viszemāko vērtību, teorētiski ļaujot visvairāk palielināt plūsmas ātrumu un samazināt analīzes laiku.

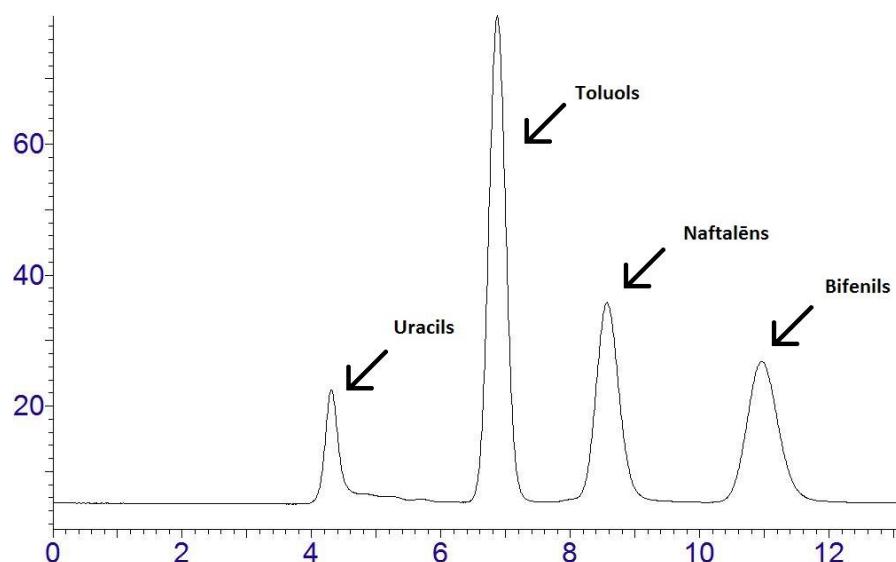
3.1 tabula

Uzsynetuzētās kolonnas salīdzinājums ar pakotu nanokolonnu un komerciāli pieejamo konvencionālo kolonnu

Izstrādātājs, ražotājs	Tips	Diametrs, mm	Garums, mm	K vērtība	Pretspiediens, bar/m	Plūsma, mL/min
Henriette	C8, 5µm daļiņas	0,00050	130	1,47	154	0,0005
Rūdofls	C8, monolīts	0,00050	951	1,96	39	0,0005
Waters	Sunfire, C8, 5µm	4.6	30	14,71	4133	4,32



3.2. att. Hromatogramma kolonnu testam Nr. 1, kas veikts uz Henriettes pakotās nanokolonnas

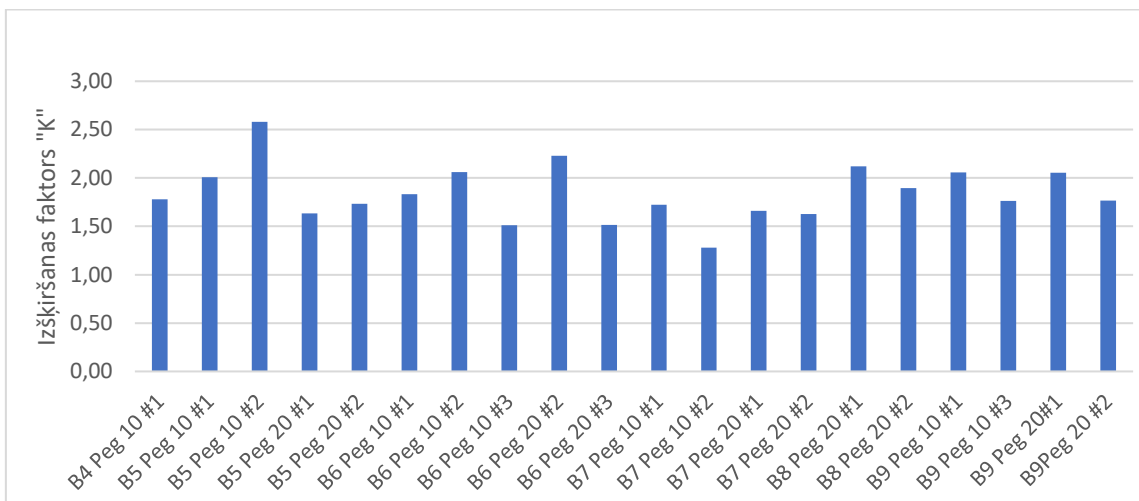


3.3. att. Hromatogramma kolonnu testam Nr. 2, kas veikts ar 8. partijas 1. kolonnu.

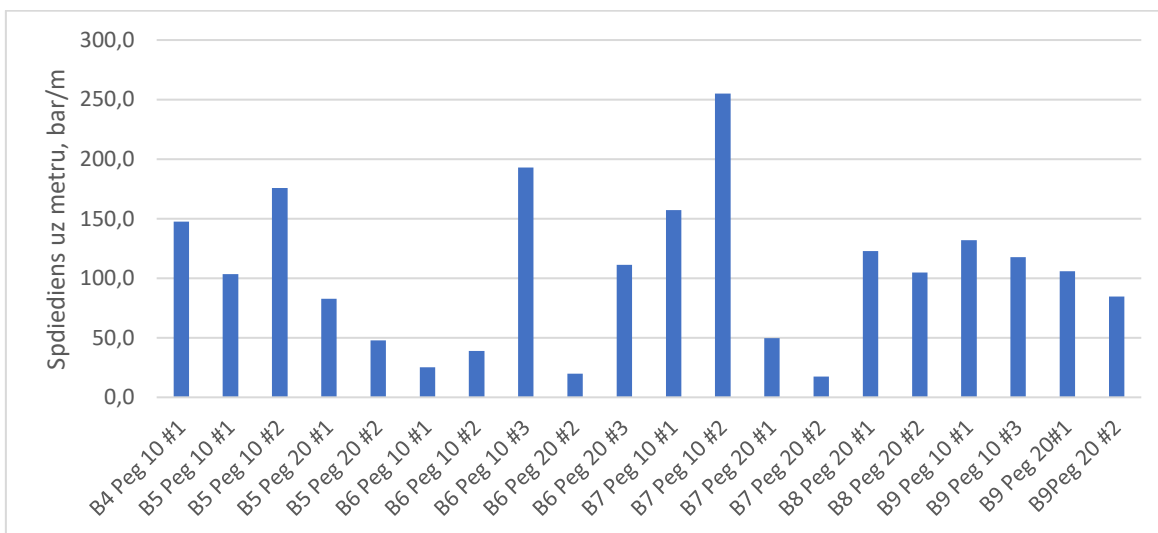
3.3 Uzsintezēto monolītu kolonnu savstarpējais salīdzinājums

Iegūtie dati savstarpējai kolonnu salīdzināšanai ir apskatāmi četrās diagrammās (attēli 3.4., 3.5., 3.6., 3.7.). Ņemot vērā, ka kolonnu garums variē, visi parametri ir pārrēķināti uz metru kolonnas garuma.

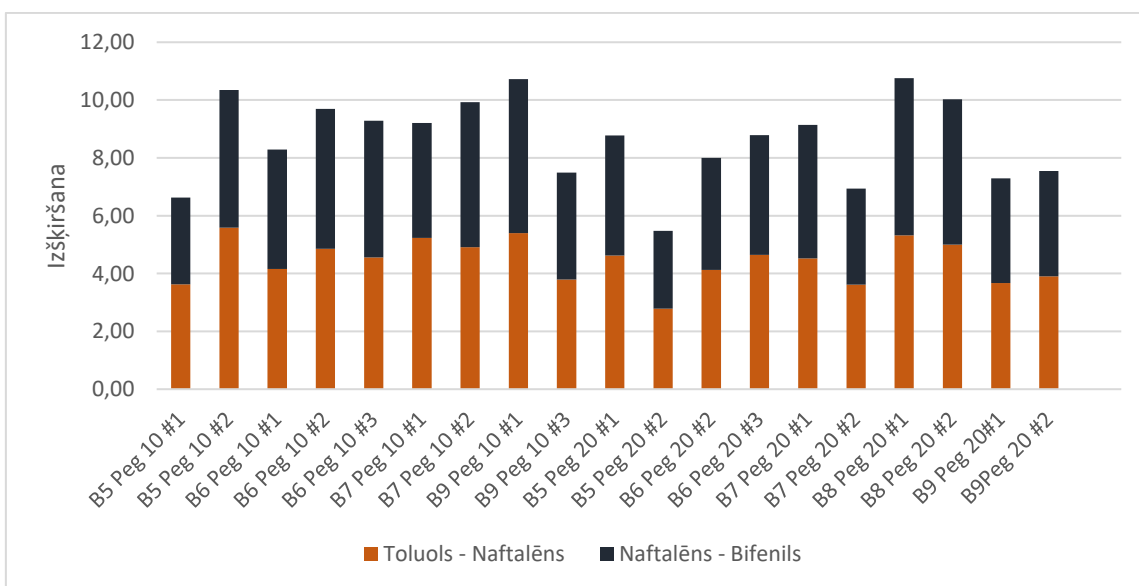
Diagrammās attēlotas tikai tās kolonnas, kas spēja nodrošināt testa izpildi – tātad, kuru pretspiediens bija sūkņa normālās darbības robežās. Diagrammās neparādās pirmās trīs sērijas, jo tās nespēja nodrošināt atbilstošu pretspiedienu. Jāatzīmē, ka kolonnu identifikācijai tiek izmantots partijas numurs, kas seko pēc burta “B” un tad tiek norādīts izmantotais porogēns, visbeidzot tiek norādīta, kura no sērijas kolonnām tā ir.



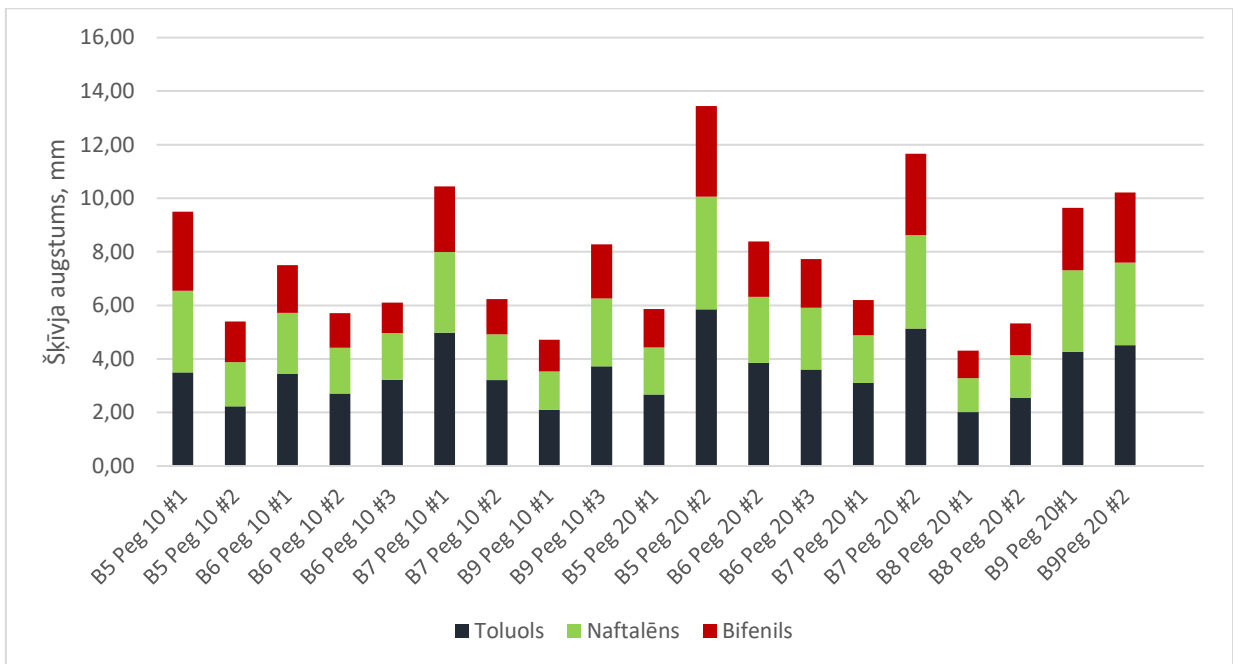
3.4. att. Izšķiršanas faktors “K”, katrai no testētajām kolonnām



3.5. att. Spiediens, kas pārrēķināts uz metru kolonnas, katrai no testētajām kolonnām

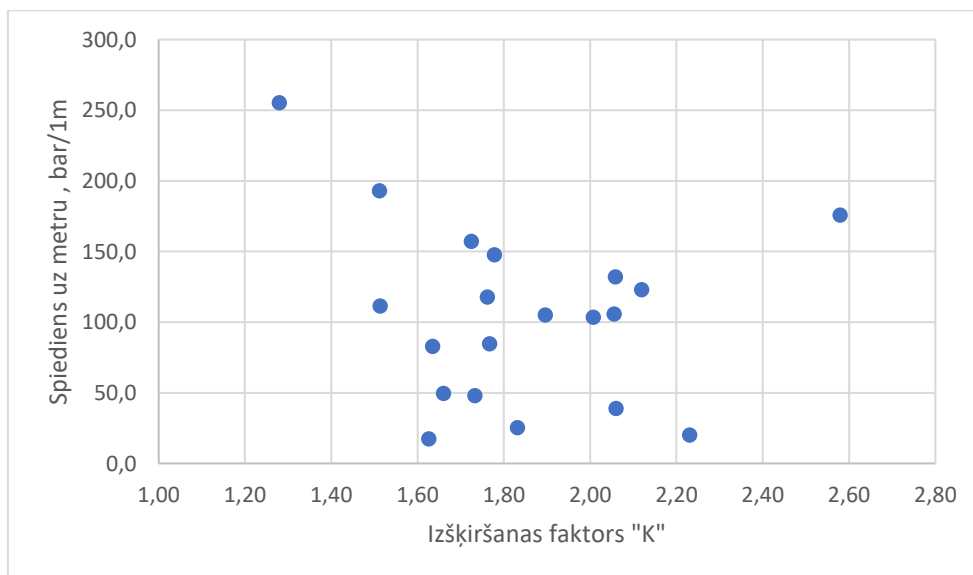


3.6. att. Izšķiršana starp toluolu – naftalēnu un naftalēnu – bifenilu katrai no testētajām kolonnām



3.7. att. Teorētisko šķīvju augstums testā izmantotajiem savienojumiem katrai no testētajām kolonnām

Apskatot diagrammas nav iespējams saskatīt izteiktas tendences. Nav pierādījumu, ka būtiski būtu uzlabojies kolonnu kvalitāte, turklāt nav novērojama tendence, ka kolonnas izšķiršanas faktors “K” korelētu ar spiedienu (attēls 3.8.), kā tas būtu gadījumā, ja poras būtu šaurākas, ļaujot analizējamajam paraugam veiksmīgāk mijiedarboties ar stacionāro fāzi.



3.8. att. Grafiks, kur atzīmēts katras kolonnas spiediens, kas pārrēķināts uz metru kolonnas garuma, un izšķiršanas faktors “K”.

Apskatot diagrammas (attēli 3.4, 3.5., 3.6. un 3.7.), un grafiku (attēls 3.8.) var secināt, ka kolonnas pretspiediens nerezultējas labākā kolonnas efektivitātē. Tātad monolīta struktūrās ir novērojamas īpatnības, kas ietekmē spiedienu, bet neietekmē kolonnas veiktspēju –

sašaurinājumi, plaisas un citi defekti. Turklāt šie defekti, acīmredzot, ir pietiekami regulāri un bieži viscaur kolonnām, ka starp dažādām partijām netiek novērota būtiska atšķirība.

3.4 PEG ietekme uz iegūto monolītu kolonnu kvalitāti

Salīdzinot iegūtos parametrus kolonnām, kas sintezētas izmantojot PEG 10 vai PEG 20 netiek iegūti viennozīmīgi rezultāti. Salīdzinot aiztures faktoru "K" ir novēro, ka PEG 20 kolonnām šī parametra vidējā vērtība ir augstāka, taču, ņemot vērā datu izkliedi, skaitliskā starpība ir maznozīmīga.

Lielāka atšķirība novērojama, apskatot kolonnas pretspiedienu uz metru. Šajā gadījumā kolonnām, kuru sintēzē izmantot PEG 20 tas ir būtiski mazāks, taču arī šoreiz jāizceļ lielā rezultātu izkliede, kas izsakāma relatīvajā standartnovirzē 41 procenta apmērā.

3.2 tabula

Vidējie parametri kolonnām, kas sintezētas izmantojot PEG 20 vai PEG 10 porogēnu

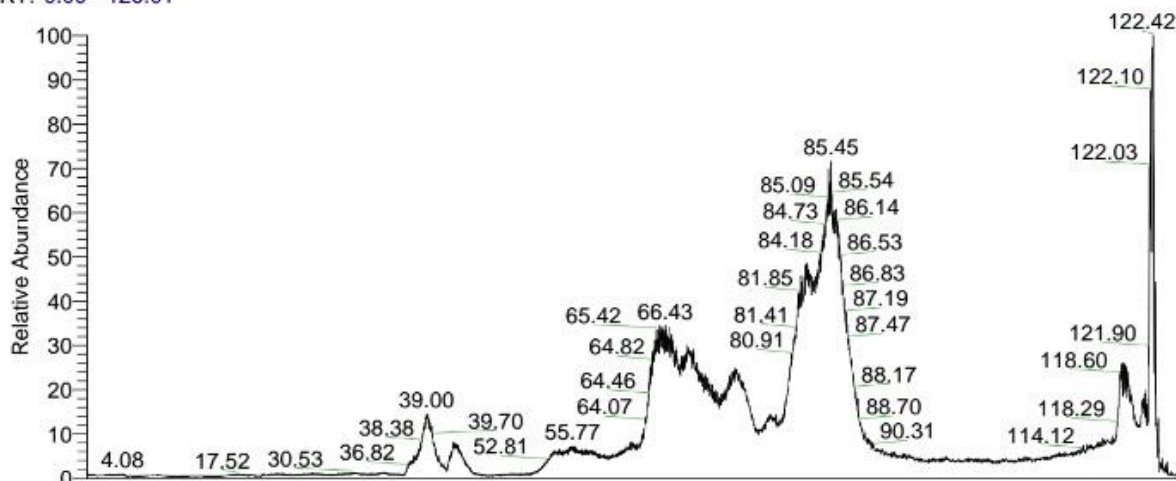
Parametrs	PEG 20	PEG 10
Vidējais izšķiršanas faktors "K"	1,87	1,86
RSN izšķiršanas faktoram, %	13	19
Spiediens, bar/1m	85	135
RSN spiedienam, %	41	51

Lai arī iegūtie dati netieši norāda, ka ar PEG 20 sintezēto monolītu poru izmēru kvalitāte ir labāka, kopumā dati nav viennozīmīgi. Lai ticami apstiprinātu vai noraidītu šo novērojumu būtu nepieciešams izmantot dzīvsudraba iespīšanas porometriju.

3.5 Monolītu kolonnu izmantošana proteīnu analīzē

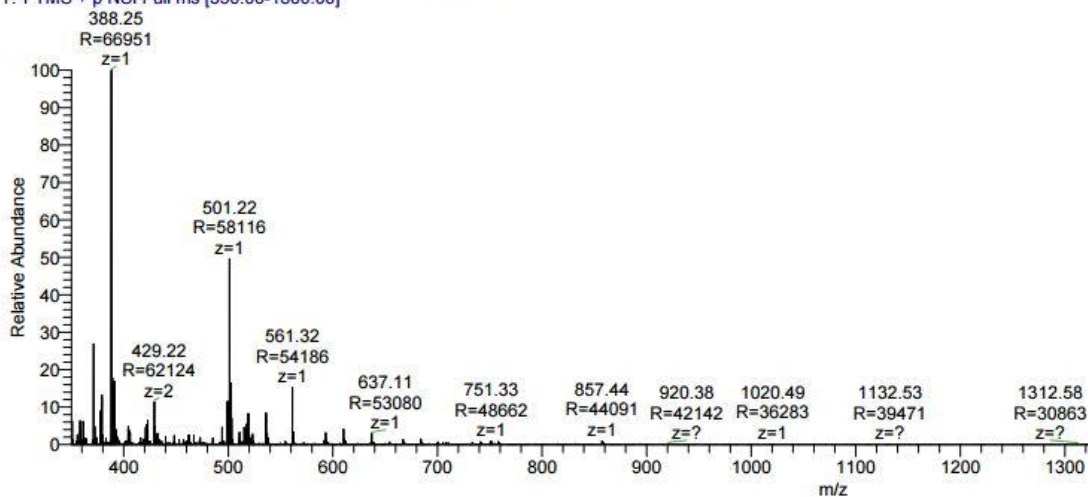
Izmantojot monolītu kolonnas kā analītiskās kolonnas, atbilstoši aprakstam nodaļā 2.9, nevienā no grādienta režīmiem neizdevās iegūt apmierinošu izšķiršanu starp izdalītajiem peptīdiem (3.9. attēls). Kolonna slikti atdalīja proteīnus, turklāt visas analīzes laikā MS iekārta detektēja jonu ar m/z attiecību 501,22, kas norāda uz iespējamu kolonnas degradēšanos analīzes laikā (3.10 attēls).

RT: 0.00 - 126.01



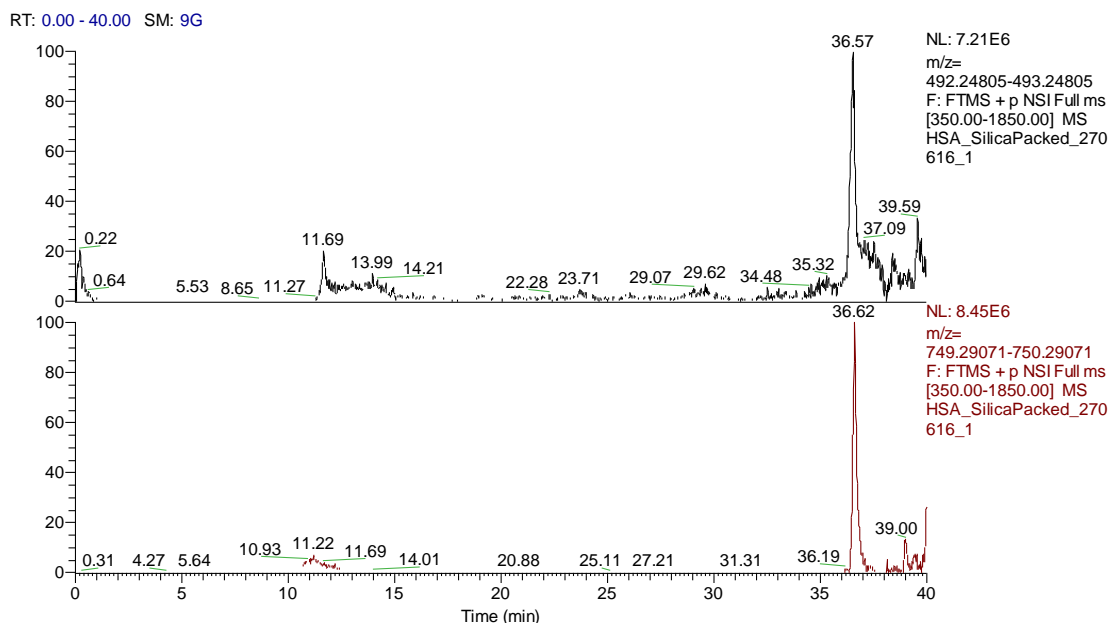
3.9. att. Hromatogramma peptīdu maisījuma analīzei ar monolītu kolonnu

170428_07_Orbi1_LP_QC_G30_T73_Rudolfs-monolith_coli-QC #1835-1839 RT: 39.17-39.18 AV: 2 NL: 1.99E6
T: FTMS + p NSI Full ms [350.00-1800.00]

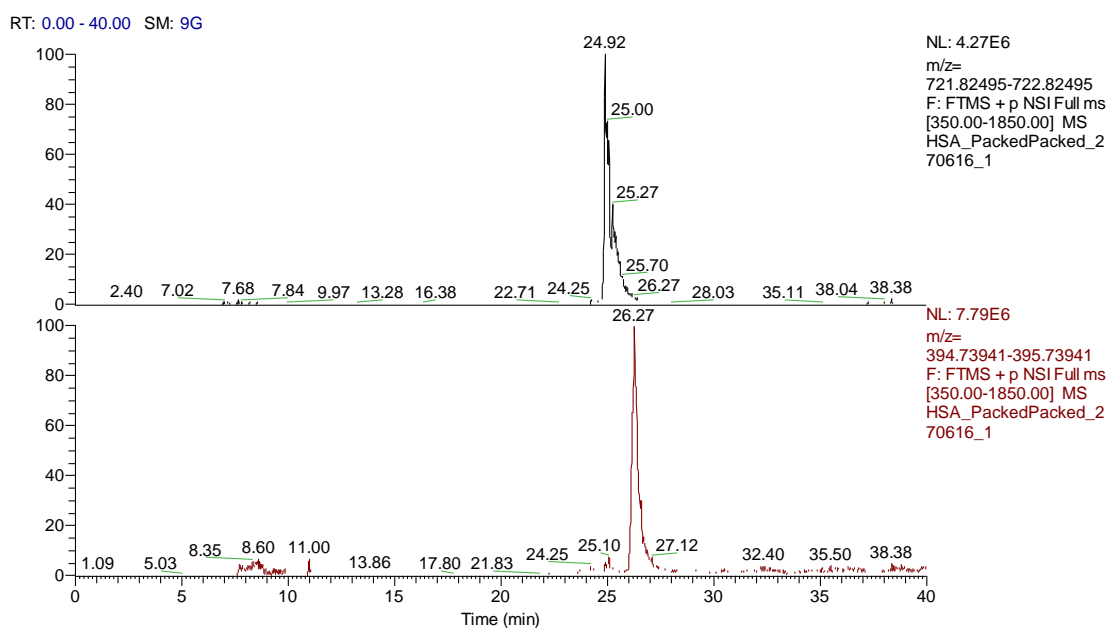


3.10. att. Ar MS konstatētais kolonnas degradācijas produkts ar m/z 501,22 *full-scan* režīmā.

Tiesa, monolītu kolonnas uzrādīja krietni labākus rezultātus, ja tās tiek izmantotas kā priekškolonnas. Salīdzinājumam jāmin, ka identiskā sistēmā izmantojot sintezētās nanokolonnas, iegūtās peptīdu smailes ir ar labāku simetriju (attēls 3.11) nekā tās, kas iegūtas ar komerciāli pieejamo monolītu priekškolonnām (attēls 3.12.).



3.11. att. Ar MS iegūtā hromatogramma peptīdam, kura izdalīšanās laiks ir aptuveni 36.6 min.



3.12. att. Ar MS iegūtā hromatogramma peptīdam, kura izdalīšanās laiks ir aptuveni 24,9 min un 26,3 min.

Jāatzīmē, ka par paraugu tiek izmantots proteīnu maisījums, kurā proteīni tiek sadalīti peptīdos, pateicoties pievienotajam enzīmam. Rezultātā ne katrā analizē būs iespējams ieraudzīt vienus un tos pašus peptīdus, kas ir novērojams arī šajā gadījumā. Tiesa, ņemot vērā, ka analīze tiek veikta gradienta režīmā, smailes izdalīšanās laikam nevajadzētu atstāt būtisku iespaidu uz smailes simetriju, tādēļ šajā gadījumā ir objektīvi salīdzināt smailes, kas izdalās dažādos laikos.

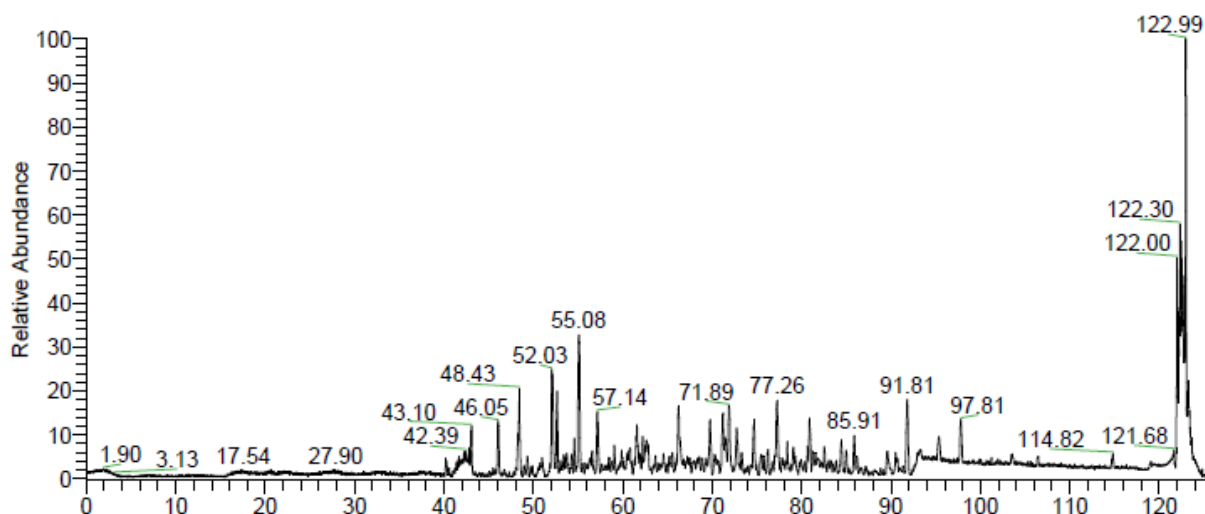
Iegūtie dati liek domāt, ka monolītu kolonnas spēja veikt hromatogrāfisko atdalīšanu pasliktinās, ja paraugs sastāv no lielākām molekulām – šajā gadījumā – peptīdiem. To varētu

skaidrot ar monolīta poru izmēru un sadalījumu. Iespējams, ka vairākas poras ir pārāk mazas, bet to sadalījums – pārāk nevienmērīgs, lai nodrošinātu lielu molekulu analīzi. Tiesa, monolītu struktūras defekti, kas traucē sasniegt atbilstošu peptīdu parauga hromatogrāfisko sadalīšanu, neietekmē monolītu kolonnas veikumu kā priekškolonnai. Tieši otrādi – tās sniegums smaīļu simetrijas ziņā ir labāks nekā komerciāli pieejamai priekškolonnai.

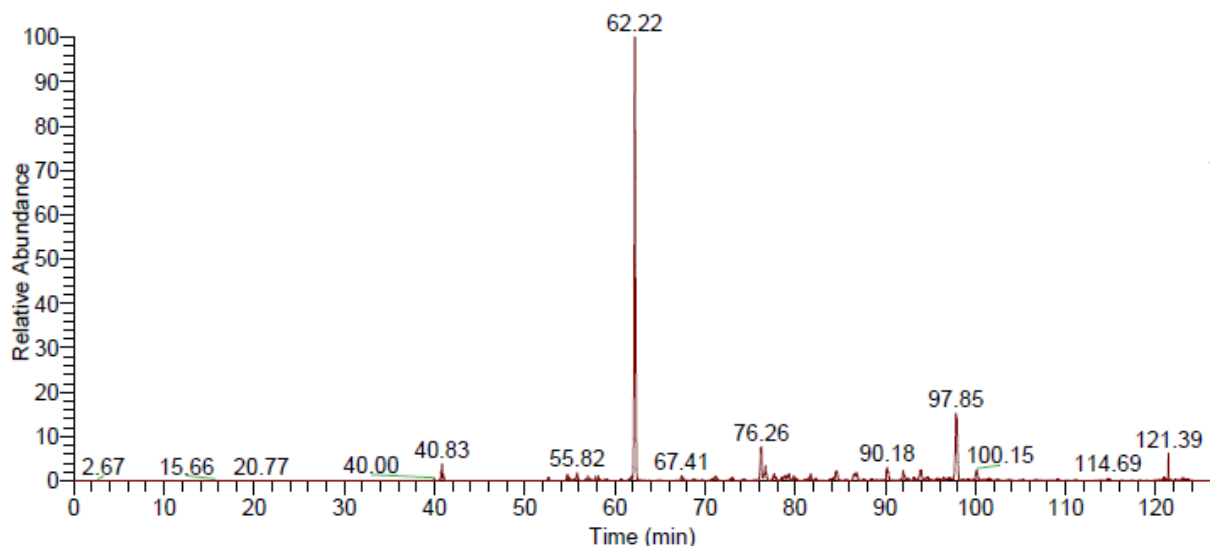
Iespējams, ka struktūras defekti, kas vienā gadījumā traucē molekulām normāli kustēties kustīgās fāzes plūsmas virzienā, iespējams pat fiziski aizturot molekulas, darbojas pozitīvi priekškolonnas gadījumā, jo neļauj lielajām molekulām izretoties kolonnas garumā, bet gan aiztur tās tuvāk sākumam, kā rezultātā paraugs ir sakoncentrējies kompaktāk un tuvāk analītiskajai kolonnai. Šis arī ir iespējama skaidrojums, kādēļ monolītu kolonnas kalpo kā labas priekškolonnas peptīdu analīzē, taču to sniegums peptīdu hromatogrāfiskā sadalīšanā ir vājš. Vienlaikus gan jānorāda, ka kolonnas apmierinoši veica nelielu molekulu (uracila, naftalēna, bifenila, toluola) hromatogrāfisko sadalīšanu.

3.6 Ar daļiņām pakoto kolonnu izmantošana proteīnu analīzē

Ar sorbenta daļiņām pakotās 150 mm nanokolonnas uzrādīja labu veikumu peptīdu analīzē, veicot peptīdu apmierinošu atdalīšanu, savukārt peptīdu smaīles forma bija simetriska, kas nozīmē, ka kolonnas ir uzpildītas kvalitatīvi, turklāt uzpildīšanas procesā nav traumēts kapilāra sašaurinājums.



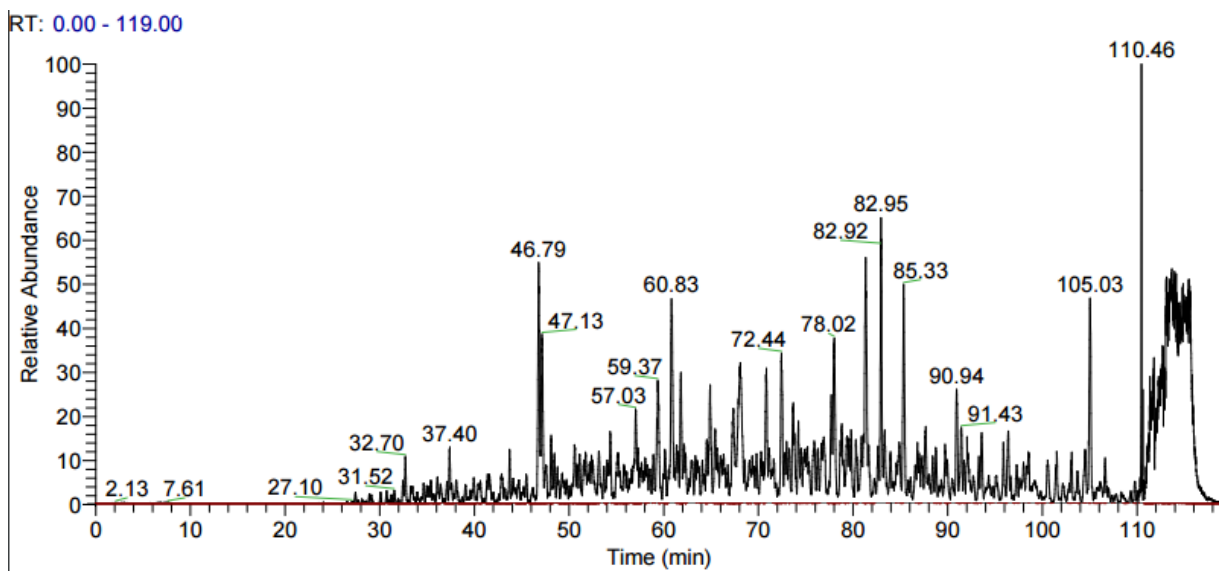
3.13. att. Ar MS iegūtā hromatogramma peptīdu maisījumam, kas analizēts ar 150 mm pakoto nanokolonnu.



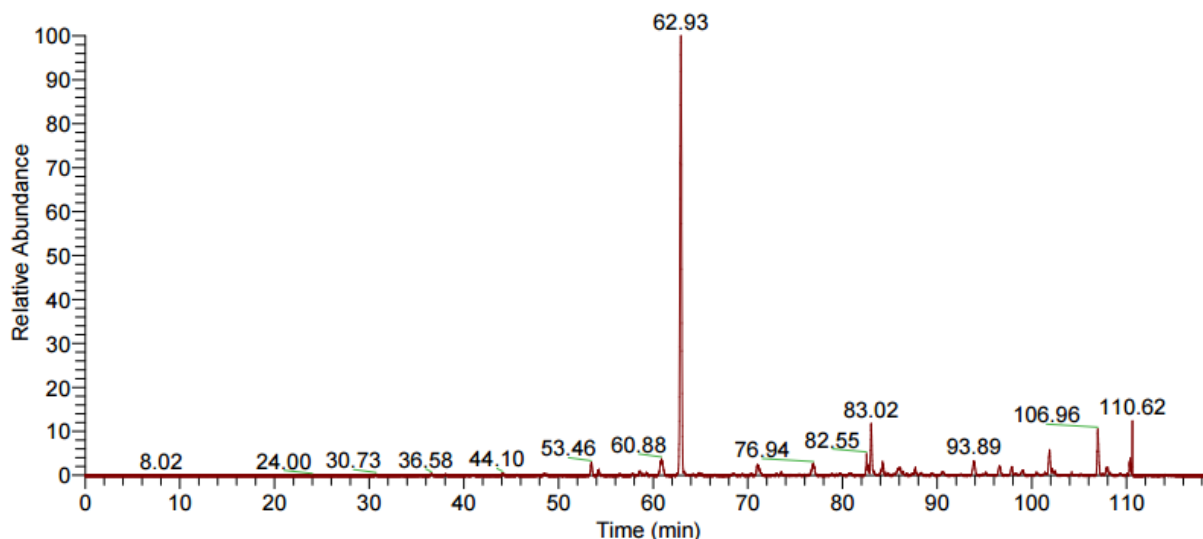
3.14. att. Ar MS iegūtā hromatogramma smailei, kas parādās skenējot apgabalu ar m/z attiecību 710,01553-710,71605 un iegūta ar 150 mm pakoto nanokolonnū.

Tāpat jāatzīmē, ka analīzes laikā, pēc sorbenta sablīvēšanas, netika konstatētas krāsas pretspiediena izmaiņas, kas liecina, ka no daļiņām izveidojusies arkveida struktūra bija pietiekami izturīga, lai nodrošinātu sorbenta neizkļūšanu no kolonnas.

Vēl labāku sniegumu uzrādīja 500 mm pakotās kolonnas (hromatogrammas redzamas 3.15. un 3.16. attēlos). Peptīdu izdalīšana bija apmierinoša, turklāt iegūtās smailes – šauras un simetriskas.



3.15. att. Ar MS iegūtā hromatogramma peptīdu maisījumam, kas analizēts ar 500 mm pakoto nanokolonnū.



3.16. att. Ar MS iegūtā hromatogramma smailei, kas parādās skenējot apgabalu ar m/z attiecību 710,01553-710,71605 un iegūta ar 500 mm pakoto nanokolonnū.

Atbilstoši gaidītajam, ar daļiņām pakoto kolonnū iegūtie rezultāti bija prognozējamāki un kopumā veiksmīgi. Pamatojams galvenokārt tam ir tāds, ka pieejamās daļiņas jau tiek komerciāli ražotas, savukārt pakošanas laikā radušos defektus var pamanīt un nekavējoties labot. Tiesa, ar monolītu kolonnām situācija ir sarežģītāka – apjaust var tikai būtiskākos defektus un galvenais rādītājs ir kolonnas spēja sadalīt savienojumus, kas nelielu molekulu gadījumā bija apmierinoša, bet neapmierinoša peptīdu analīzē. Vienlaikus gan jāatzīmē, ka, neraugoties uz vājo peptīdu sadalīšanas spēju, monolītu kolonnas kalpo par labāk priekškolonnām paraugu sakoncentrēšanai.

Domājams, ka monolītu kolonnas vājo veiktspēju peptīdu sadalīšanā var labot, mainot monolīta struktūras īpašības. Šajā gadījumā nepieciešami papildus eksperimenti ar monolīta struktūras veidojošā šķīduma sastāvu un koncentrāciju, kas ir arī šī pētījuma nākošais plānotais solis.

Nobeigumā jāmin, ka ir grūti saskatīt nepieciešamību veidot 500 mm pakotās kolonnas, jo to veiktspēja ir tikai nedaudz labāka par 150 mm pakoto kolonnū veiktspēju, savukārt garo kolonnū veidošana ir krietni laikietilpīgāka, turklāt arī dārgāka.

SECINĀJUMI

1. Uzlabojot monolītu sintēzes metodi, iegūtas nanokolonnas, kuru veikspēja nelielu molekulu sadalīšanā ir apmierinoša.
2. Peptīdu analīzē uzsintezēto monolītu nanokolonnu hromatogrāfiskā veikspēja ir neapmierinoša, bet tās uzrāda labu sniegumu, ja tiek izmantotas kā priekškolonnas parauga sakoncentrēšanai.
3. Izveidotās ar daļiņām pakotās nanokolonnas ir daudz piemērotākas peptīdu hromatogrāfiskai sadalīšanai, tātad arī proteīnu paraugu analīzē.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Wilson S.R., Vehus T., Berg S.H., Lundanes E., Nano-LC in proteomics: recent advances and approaches, *Bioanalysis*, **2015**, *14*, 1799-1815
2. Saito, Y., K. Jinno, and T. Greibrokk, Capillary columns in liquid chromatography: Between conventional columns and microchips, *Journal of Separation Science*, **2004**, *24*, 1379-1390.
3. <http://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-pumps-vacuum-degassers/1260-infinity-nanoflow-pump> [skatīts 20.01.2017.]°
4. Stephen R. Pennington, *Advanced LC-MS Applications for Proteomics*, Future Science Ltd., 2013.
5. Danilo Corradini,, *Handbook of HPLC*, Second edition, CRC Press 2016, 715 lpp, 5. lpp
6. Svec F., Frechet M.J., Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media, *Analytical Chemistry*, **1992.**, *64*, 820-822
7. Svec F., Yongqin. L, Advances and Recent Trandes in the Field of Monolithic Columns for Chromatography, *Analytical Chemistry*,**2014**, *87*, 260-273
8. Svec F., New Developments in the Field of Monoliths for Chromatography, *LCGC*, **2010.**, *28*, 18-23,
9. Walsh Z., Paull B., Macka M., Inorganic monolith is separation science: A rievew, *Analytica Chimica Acta*, **2012**, *750*, 28-47
10. Minakuchi, H., K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, and N. Tanaka, Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*, 3498-3501.
11. Hara T., Desmet G., Baron G.V., Minakuchi H., Eeltink S., Effect of polyethylene glycol on pore structure and separation efficiency of silica-based monolithic capillary columns, *Journal of Chromatography A*, **2016**, *1442*, 42-52
12. Brinker, C.J, Scherer G.W, *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, ed (**1990**),Academic Press. 357-385.
13. Cabrera, K., *Applications of silica-based monolithic HPLC columns*. *Journal of Separation Science*. *27*(**2004**) 843-852.
14. Alessio Maiolica, Dario Borsotti, Juri Rappsilber, Self-made frits for nanoscale columns in proteomics, *Proteomics*, **2005.**, *5*, 3847-3850.

15. Yasushi Ishihama, Juri Rappsilber, Jens S. Andersen, Matthias Mann, Microcolumns with self assembled particle frits for proteomics, *Journal of Chromatography A*, **2002.**, 979, 233.-239.
16. Klaus K. Unger, Romas Skudas, Michael M. Schulte, Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, *Journal of Chromatography A.*, **2008.**, 1184, 393-415.
17. Nabuo Tanaka, David V. McCalley, Core-Shell, ultra-small particles, monoliths and other support materials in high performance liquid chromatography, *Analytical chemistry*, **2016.**, 88 (1), 279-298.
18. Fast Protein and Peptide Separations Using Monolithic Nanocolumns and Capillary Columns, ražotāja Dionex produkta apraksts, pieejams tiešsaistē: http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Biocolumnas/Peptidos/11794-AN523_V23.pdf [skatīts 20.04.2017.]
19. H.S. Berg, K.E. Seterdal, T. Smetop, R.Rozenvalds, O.K. Brandtzaeg, T.Vehus, E. Lundanes, S.R. Wilson, Self-packed core shell nano liquid chromatography columns and silica-based monolithic trap columns for targeted proteomics, *Journal of Chromatography A*, **2017.**, 1498., 111-119.

Pateicības

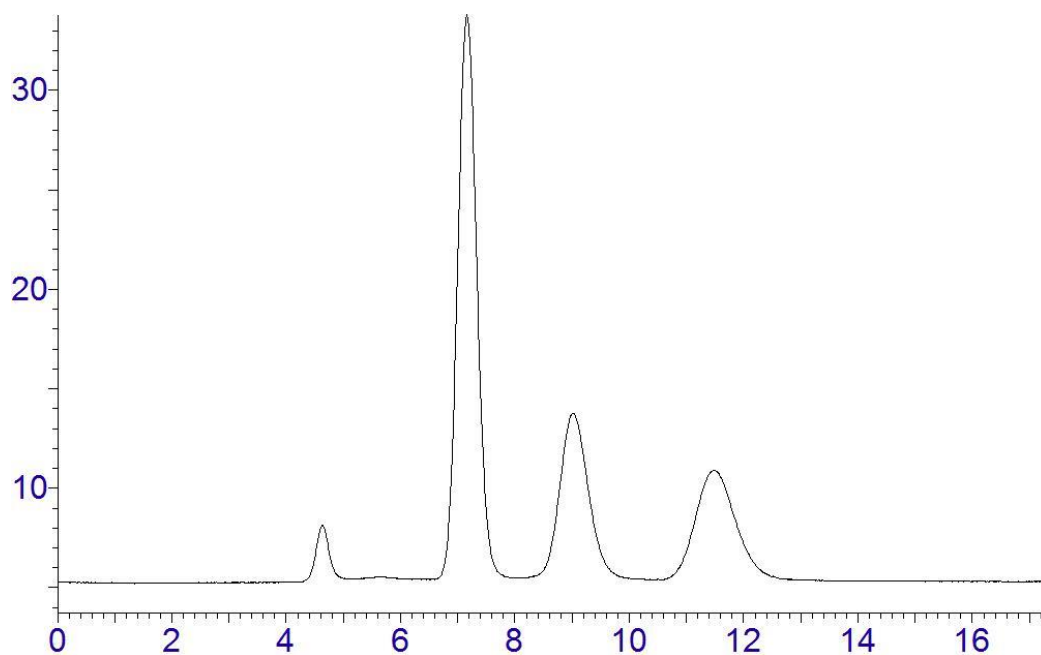
Pirmkārt un galvenokārt, vēlos izteikt pateicību pasniedzējai, manu vairāku kursa darbu, bakalaura darba un maģistra darba vadītājai vadošajai pētniecei Dr.chem. Ilvai Nakurtei, kuras padoms, sniegtā informācija un iedrošinājums ir ne tikai pavēris hromatogrāfijas pasaules durvis un ievadījis manas profesionālās gaitas ķīmijas nozarē, bet arī iedrošinājis jauniem izaicinājumiem Norvēģijā un Igaunijā.

Vēlos izteikt pateicību Norvēģijas Matemātikas un dabaszinātņu fakultātes Analītiskās bioķīmijas nodaļas vadītājai Elsai Lundanes (Elsa Lundanes), asociētajam profesoram Stīvenam Raj Vilsonam (Steven Ray Wilson), doktorantūras studentam Ole Kristian Brandtzæg, Dr. chem. Silvijai Ābelei un visai Elsas komandai par laipno uzņemšanu, sniegtajām iespējām un zināšanām.

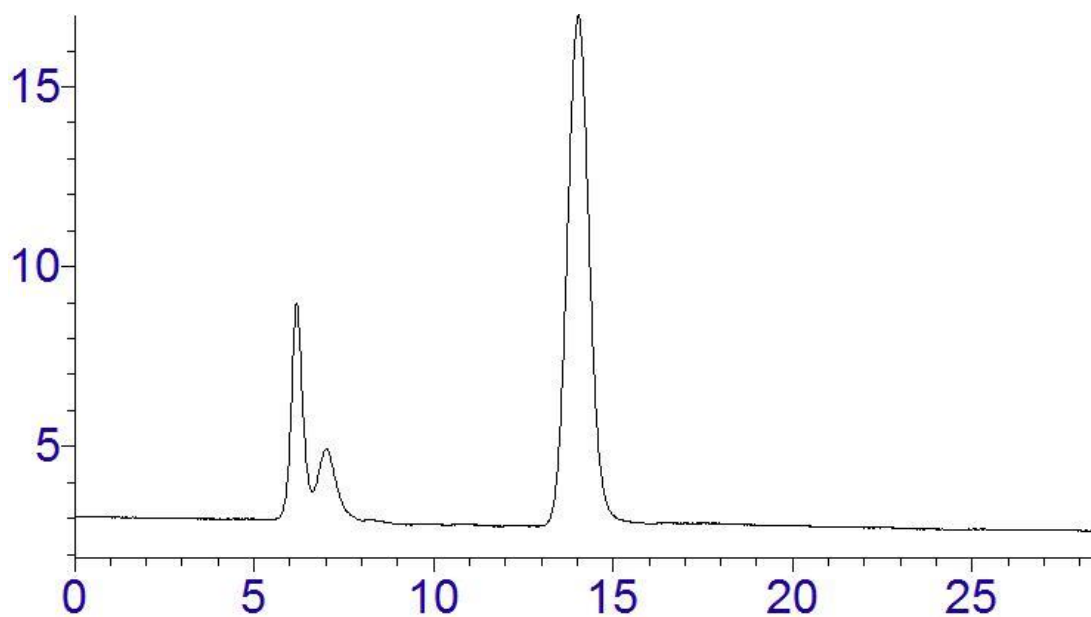
Tāpat vēlos pateikties Tartu Universitātes Tehnoloģiju institūta galvenajam pētniekam Dr. biol. Lauri Peil par izrādīto pretimnākšanu, atsaucību un laipno uzņemšanu. Vienlaikus izsaku lielu paldies Tehnoloģiju institūta Proteomics laboratorijas speciālistei Merilīnai Saarmai (Merilin Saarma) par dalīšanos pieredzē un sniegtajiem padomiem pakoto kolonnu izveidē.

Visbeidzot vēlos teikt lielu pateicību uzņēmuma "Grindex" Metožu izstrādes grupas vadītājam Kristapam Markovam, Kvalitātes kontroles laboratorijas vadītājam Jānim Jēkabsonam un Kvalitātes direktoram Dr.chem. Jurim Hmeļņickim par izrādīto pretimnākšanu bakalaura un maģistra studiju laikā, ļaujot apvienot pilnas slodzes darbu ar mācībām un iedrošinot attīstīt sevi gan Latvijā, gan ārzemēs.

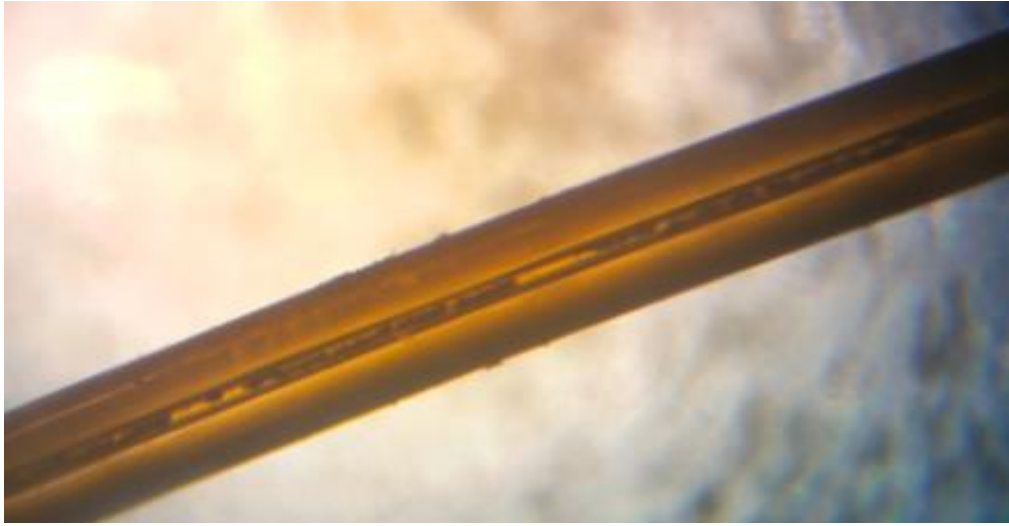
PIELIKUMI



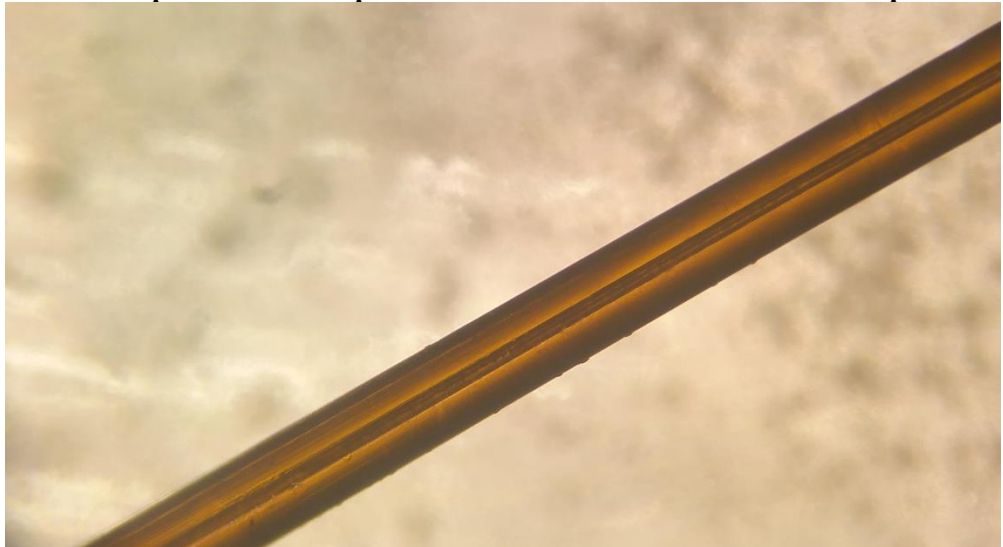
1.att. Hromatogramma, kas iegūta ar 2.4 nodaļā aprakstīto kolonnas testu Nr.2 kolonnai B7PEG20#1.



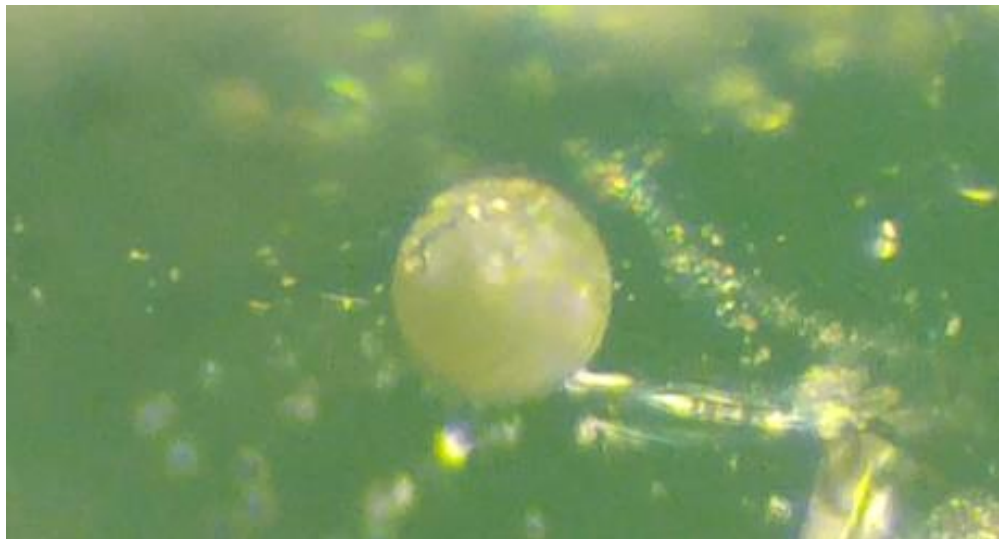
2.att. Hromatogramma, kas iegūta ar 2.4 nodaļā aprakstīto kolonnas testu Nr.1 kolonnai B5PEG10#2



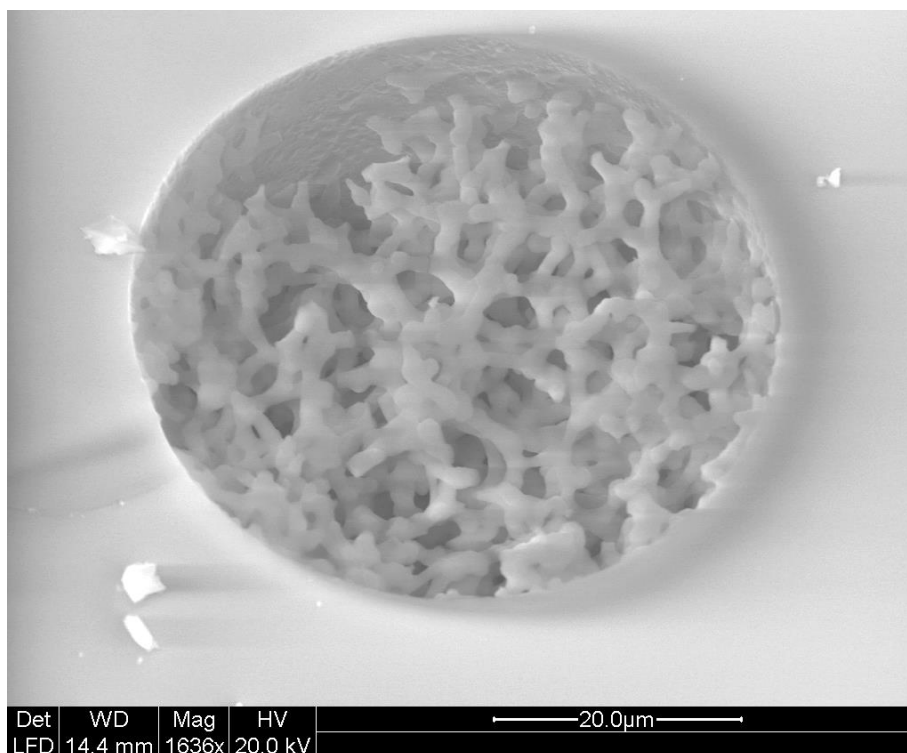
3.att. Ar Motic optisko mikroskopu novērotais kolonnas defekts – monolīta pārrāvums.



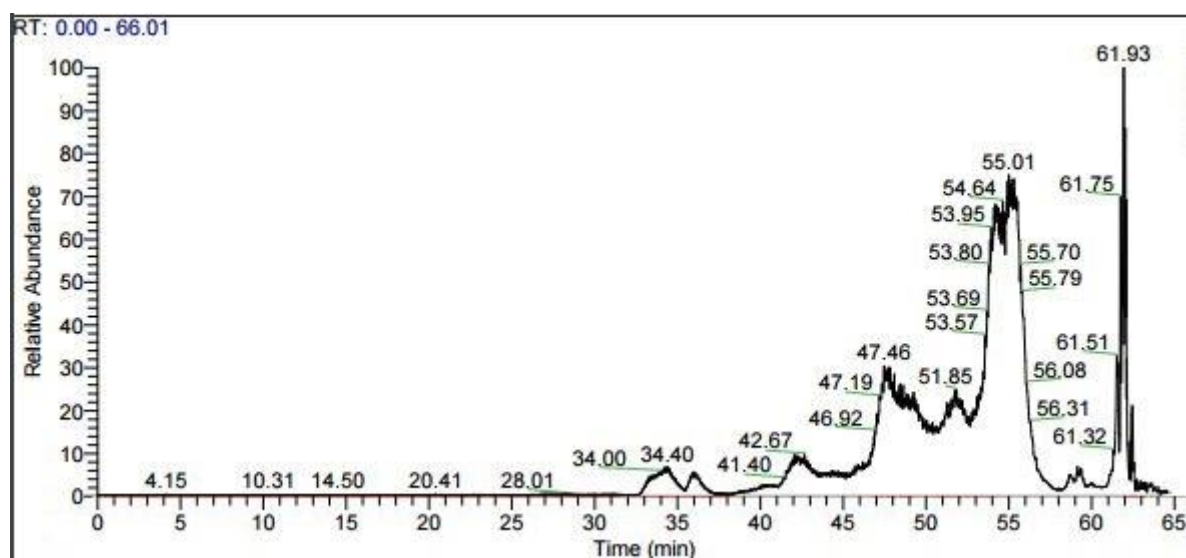
4.att. Ar Motic optisko mikroskopu novērotā monolītu kolonna bez defektiem



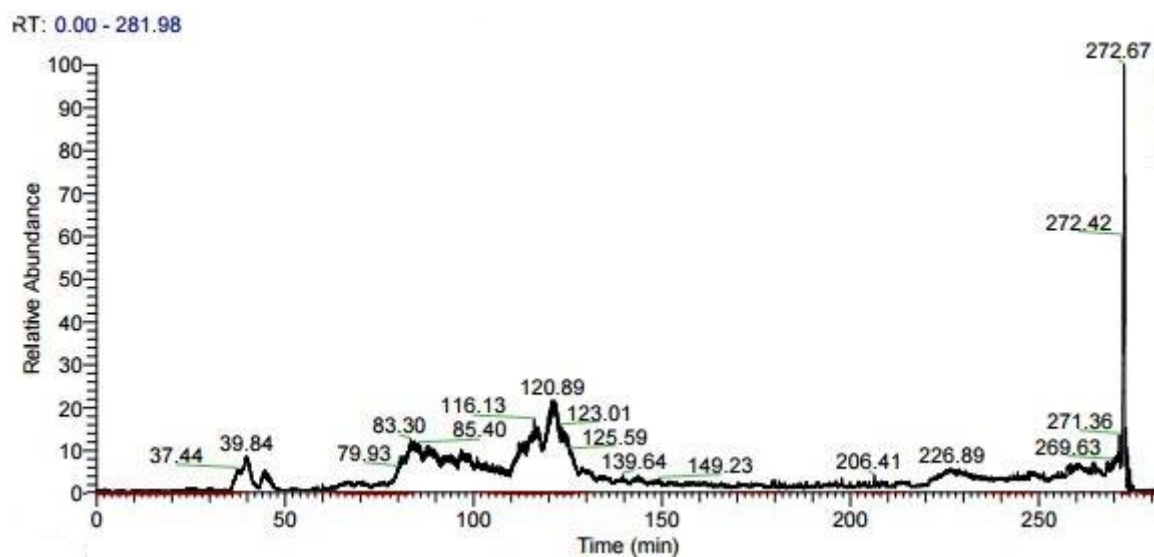
5.att. Ar Olympus optisko mikroskopu novērotais kolonnas defekts – monolīts nav pilnībā piepildījis kapilāru.



6.att. Ar SEM novērotā monolīta struktūru kolonnai B6PEG20_#2



7.att. 2.9. nodaļā aprakstītā eksperimenta hromatogramma, izmantojot 30 minūšu gradienta ciklu.



8.att. 2.9. nodaļā aprakstītā eksperimenta hromatogramma, izmantojot 240 minūšu gradienta ciklu.

Bakalaura darbs „Proteīnu analizēšanas iespējas izmantojot pašgatavotas nanokolonnas” izstrādāts Olso Universitātē Matemātikas un dabaszinātņu fakultātes Analītiskās bioķīmijas laboratorijā un Tartu Universitātes Tehnoloģiju institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja, Dr. chem. Ilva Nakurte: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, Dr. biol. Lauri Peil: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents, Dr.chem. Dzintars Začs: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)