



УДК 543.545

## Синтез метакрилатного монолитного сорбента для капиллярной электрохроматографии

Карцова Л.А., Бессонова Е.А., Поликарпов Н.А.

*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург*

*Институт Аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

### Аннотация

Получен монолитный сорбент на основе полиметакрилата с последующей постфункционализацией бутилэтиламиноом для формирования положительного заряда на поверхности монолита. Изучены закономерности влияния состава порогенного растворителя и инициатора (от 0,1% до 3%) на пористость сорбента на примере пяти систем: пропанол-1 – формамид; пропанол-1 – бутандиол-1,4; пропанол-1 – этанол; пропанол-1 – циклогексанол; циклогексанол – н-деканол; с различным соотношением компонентов. Полученный сорбент содержит микропоры диаметром от 300 до 600 нм, необходимые для высокой эффективности разделения аналитов, и макропоры (>1 мкм), обеспечивающие проницаемость колонки. Исследованы свойства синтезированных колонок заполненных *in-situ* монолитным сорбентом в режимах капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Предложен способ получения окна детектирования в подготовленной монолитной колонке. Обсуждаются возможности разделения белков на подготовленной монолитной капиллярной колонке в условиях КЭХ.

**Ключевые слова:** сорбент, капиллярная электрохроматография, разделение

Monolith columns for capillary electrochromatography (CEC) were prepared from silanized fused-silica capillaries of 75  $\mu\text{m}$  I.D. by *in situ* polymerization of methylmethacrylate, glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate in the presence of porogenic mixture with the consequent reaction of postfunctionalization with *N*-ethylbutylamine to form positive surface. Influence of the compound of porogenic mixture on the sorbent's porosity and its bimodal pore distribution was investigated using propanol – formamide, propanol – butandiol-1,4, propanol – ethanol, propanol – cyclohexanol, and cyclohexanol – decanol mixtures. The technique for preparation of the detection window is suggested. Separation of the model peptide mixture by CEC is discussed.

### Введение

Монолитные сорбенты используются в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), при проведении твердофазной экстракции, а также в капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Они характеризуются быстрым конвективным массообменом и хорошей гидравлической проницаемостью, обеспечивая высокую эффективность разделения сложных смесей биополимеров.

Метод КЭХ сочетает достоинства капиллярного электрофореза (высокая эффективность) и ВЭЖХ (высокая селективность), что делает его одним из

перспективных – при анализе сложных биологических объектов – белков и полипептидов.

При их разделении методом КЭХ обычно используют колонки трех типов: полые, насадочные и монолитные.

Роль сорбента в КЭХ заключается в формировании электроосмотического потока, хроматографическом разделении компонентов пробы и обеспечении проницаемости для подвижной фазы.

Вследствие небольшой площади поверхности сорбента главными недостатками полых колонок являются малый коэффициент распределения и низкая емкость [1], и как следствие – низкая селективность. Серьезным ограничением насадочных колонок является адсорбция на поверхности сорбента основных соединений [2].

Монолитные капиллярные колонки лишены этих недостатков и способствуют ускорению конвективного массообмена, что принципиально при анализе биополимеров. Они представляют собой непрерывные однородные пористые структуры, полученные полимеризацией *in situ* непосредственно в колонке и, если необходимо, функционализированные для достижения требуемых хроматографических свойств.

Основные проблемы, возникающие при электрофоретическом определении белков заключаются в необратимой адсорбции пептидов и белков на стенках кварцевого капилляров без покрытия и электростатическом взаимодействии заряженных функциональных групп пептидов и белков с заряженными группами сорбента. В связи с этим целью данного исследования явилась разработка способа синтеза монолитных капиллярных колонок на основе метакрилата с последующей постфункционализацией с бутилэтиламином для формирования положительного заряда на поверхности монолита.

## Эксперимент

**Реагенты и материалы.** Использовались кварцевые капилляры с внешним полиимидным покрытием; внешний диаметр – 360 мкм, внутренний – 75 мкм, длина – 45 см.

Гидроксид натрия (ч.д.а.) («Химреактив»), этанол (х.ч.) («Реахим»), ацетонитрил (х.ч.) («Реахим»), соляная кислота (х.ч.) («Реахим»), диметилформамид (ч.) («Реахим»), диметилсульфоксид (ч.д.а.) («Sigma»), (триметоксисилил)пропиловый эфир метакриловой кислоты (MTS) («Aldrich»), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) («Sigma»), ацетон («Реахим»), метанол («Реахим»), пропанол-1 (ч.д.а.) («Реахим»), циклогексанол (х.ч.) («Merck»), глицидилметакрилат (GMA) («Merck»), метилметакрилат (MA) («Merck»), этиленгликольдиметакрилат (EGDMA) («Merck»), азо-*бис*-изобутиронитрил (AIBN) («Merck»), бутилэтиламин (х.ч.) («Merck»), уксусная кислота (х.ч.) («Реахим»), дистиллированная вода, дигидрофосфата натрия (х.ч.) («Реахим»), фосфорная кислота (х.ч.) («Реахим»), борная кислота (х.ч.) («Реахим»).

### Силанизация капилляра

Для обеспечения максимального количества гидроксильных групп на кварцевой поверхности капилляра проводили реакцию гидролиза.

Капилляр промывали 1М раствором NaOH в течение 30 мин, герметизировали и помещали в термостат при температуре 120 °С на 2 ч; затем промывали водой (15 мин); 0,1М раствором HCl (15 мин); водой (15 мин); ацетоном

(15 мин) и сушили в токе азота под давлением 2 атм в течение 1 часа при температуре 120 °С.

Протравленный капилляр промывали водным раствором, содержащим (по объему) 20% триметоксисилилпропилового эфира метакриловой кислоты, 30% уксусной кислоты (1%-ный раствор). Далее заклеивали концы капилляра и оставляли на сутки при комнатной температуре. На следующий день капилляр промывали ацетоном (15 мин) и продували азотом (30 мин).

#### Синтез полиметакрилата *in situ*

Реакция полимеризации проводилась в присутствии смеси порогенных растворителей. Варьируя их соотношение (т.о. изменяя полярность системы), можно влиять на пористость колонки и оптимизировать ее проницаемость. Считается, что использование смеси двух растворителей позволяет синтезировать монолит с бимодальным распределением пор [3].

В эппендорфы на 1 мл добавляли 100 мкл глицидилметакрилата, 100 мкл метилметакрилата и 200 мкл этиленгликольдиметакрилата, а затем растворяли указанное количество (0,4 – 12 мг) азо-бис-изобутиронитрила (схема 1). Далее прибавляли 400 мкл заданной смеси растворителей (см. табл.1).

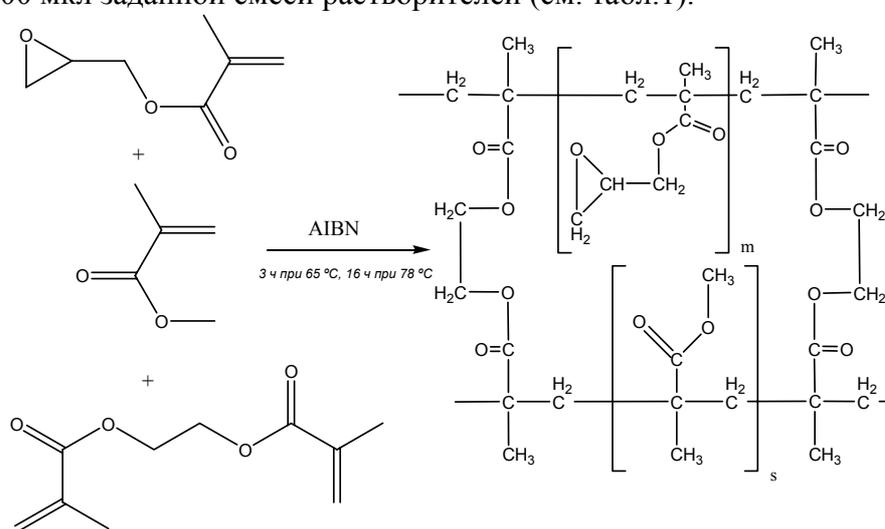


Схема 1. Реакция полимеризации

Таблица 1. Исследуемые смеси порогенных растворителей

	Система	Концентрация
1	пропанол-1	0-20%
	формамид	60-40%
2	пропанол-1	0-20%
	бутандиол-1,4	60-40%
3	пропанол-1	0-20%
	этанол	60-40%
4	пропанол-1	0-20%
	циклогексанол	60-40%
5	деканол-1	0-40%
	циклогексанол	60-20%

Кварцевый капилляр промывали полимеризационным раствором в течение 30 мин, заклеивали концы капилляра и помещали в термостат при 65 °С на 3 ч и при 78 °С на 16 ч. Затем капилляр промывали ацетоном (скорость потока – 150 мкл/мин, давление – 200-300 атм) в течение 30 мин, сушили в токе азота (2 атм) в течение 2 ч.

### Постфункционализация монолитного сорбента

Стадия функционализации поверхности монолита бутилэтиламином должна обеспечивать формирование электроосмотического потока и селективное хроматографическое разделение компонентов пробы [4] (схема 2).

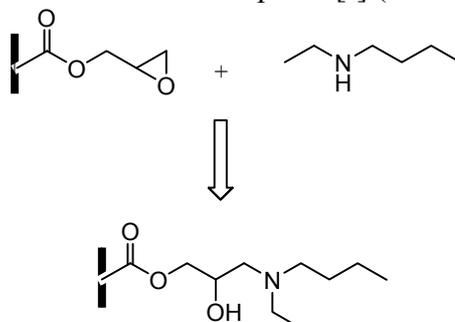


Схема 2. Реакция постфункционализации

Капилляр с монолитным сорбентом промывали бутилэтиламином в течение 30 мин (скорость потока – 100 мкл/мин, давление – 150-200 атм), герметизировали и нагревали в термостате при 70°С в течение 8 ч (рис.12). Полученные капилляры промывали ацетоном 30 мин (скорость потока – 100 мкл/мин, давление – 150-200 атм), водой 30 мин (скорость потока – 100 мкл/мин, давление – 150-200 атм), заполняли фосфатным буферным раствором (скорость потока – 100 мкл/мин, давление – 150-200 атм).

### Получение окна детектирования

В монолитном капилляре, заполненном фосфатным буферным раствором, пропан-бутановым пламенем прожигали окно детектирования. Капилляр промывали буферным раствором в течение 1 ч гидродинамически с использованием насоса «Jasco 880-PU» (50 мкл/мин; 150-200 атм), далее в течение 3 ч электрокинетически на приборе «Нанофор-1» (рабочее напряжение -15кВ).

### Определение пористости колонки

Пористость колонок определяли следующими методами.

*Гравиметрический метод.*

Сухие монолитные колонки известной длины взвешивали на аналитических весах, заполняли ацетоном и проводили повторное взвешивание. По разнице масс определяли общую пористость колонки.

*Определение общей пористости колонки по методу измерения электропроводности.*

Пустой кварцевый капилляр заполняли 55 мМ фосфатным буферным раствором с помощью шприца и 10 мин электрокинетически промывали в приборе «Нанофор-1» для определения средней силы тока в капилляре (рабочее напряжение – 15кВ). Электрическая проводимость ( $\sigma$ ) определялась по закону Ома

$$\sigma = \frac{I}{U},$$

где  $I$  – сила тока, А;  $U$  – напряжение, В.

Аналогично определялась электрическая проводимость в монолитном капилляре.

Далее по уравнению Archie [5]

$$\varepsilon_T^{1.3} = \frac{\sigma_{\text{капилляр}}}{\sigma_{\text{монолит}}}, \quad (16)$$

где  $\varepsilon_T$  – общая пористость;  $\sigma_{\text{капилляр}}$  – электрическая проводимость в кварцевом капилляре, См;  $\sigma_{\text{монолит}}$  – электрическая проводимость в монолите, См.

*Оценка пористости по фотографиям среза.*

Фотографии среза поверхности монолитного капилляра получали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Leica TCS SL) при  $\lambda_{\text{возб}}$  488 нм. Для каждой колонки получали минимум 30 фотографий.

Обработка фотографий производилось в пакете прикладных программ для решения задач технических вычислений MATLAB 7.5 с использованием приложения Image Processing Toolbox.

Алгоритм вычисления пористости сорбента включает:

1. Создание бинарного изображения.
2. Определение числа объектов.
3. Построение гистограмм распределения по площадям.

## Обсуждение результатов

К важнейшим характеристикам монолитных колонок относятся пористость (определяет эффективность разделения и проницаемость колонки) и тип покрытия (определяет селективность и скорость потока).

Пористость обеспечивает высокую эффективность и проницаемость колонки, для чего необходимо наличие как *микро*-, так и *макропор* [4]. Пористость колонки можно регулировать, меняя параметры полимеризации: температуру реакции, долю мономеров и сшивающего агента, долю инициатора, состав и количество порожденного растворителя.

Чем лучше пороженный растворитель растворяет полимер, тем позже в процессе полимеризации произойдет фазовое разделение, и тем меньше будет пористость полученного монолита [4]. Таким образом, в бимодальной системе добавление «хорошего» растворителя уменьшает пористость монолита.

Наиболее распространенным критерием выбора растворителей для высокомолекулярных соединений является полярность растворителя. Согласно [6], ее оценивают по величине диэлектрической проницаемости или по значению дипольного момента. Мы использовали первый из указанных параметров.

Как видно из рис.1, для всех систем с увеличением доли более неполярного растворителя общая пористость снижается.

Диэлектрическая проницаемость и дипольный момент полиметилметакрилата составляют 3.9 и 1.6 Д, метилметакрилата – 6.32, и 1.67 Д, соответственно [7,8]. Поэтому фазовое разделение в процессе полимеризации произойдет тем позже, чем ближе будут значения полярности растворителей к этим величинам и тем меньше будет суммарная пористость монолита.

Максимальная пористость наблюдается в системе формамид – пропанол-1 (рис.1,2), что объясняется высокой полярностью смеси. При увеличении доли пропанола-1 (снижении полярности системы) суммарная пористость уменьшается.

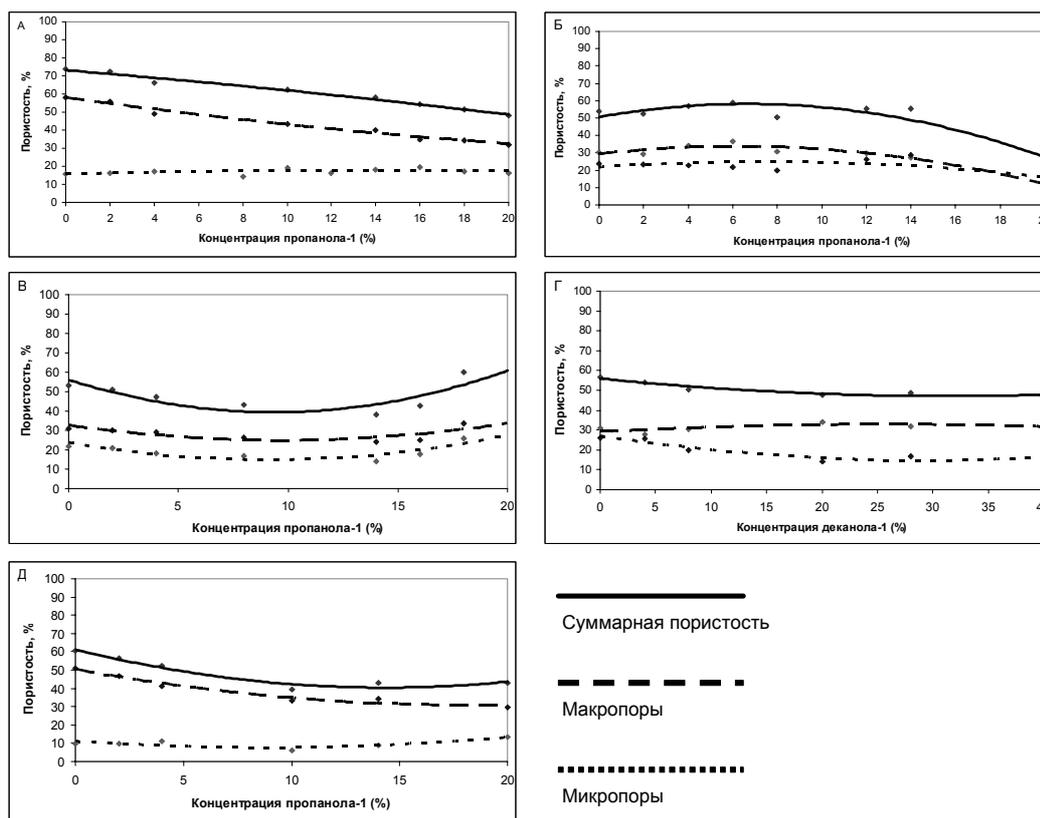


Рис. 1. Влияние состава порожденного растворителя на пористость. А: пропанол-1 – формамид; Б: пропанол-1 – бутандиол-1,4; В: пропанол-1 – этанол; Г: пропанол-1 – циклогексанол; Д: циклогексанол – *n*-деканол

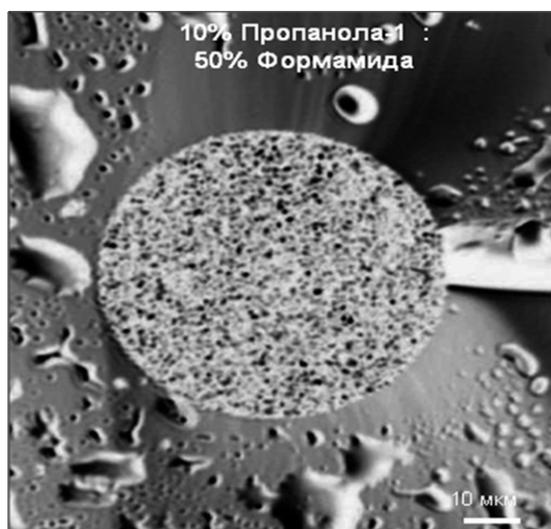


Рис. 2. Фотография монолитного сорбента, полученная на лазерном микроскопе Leica TCS SL

Обзор литературных данных показал, что при изучении пористости монолитов не учитывается влияние доли инициатора в реакционной смеси. Нам представлялось важным выяснить степень этого воздействия.

В качестве инициатора был взят азо-*бис*-изобутиронитрил (AIBN). Исследованы две системы растворителей: пропанол-1 – формамид (10:50, объемн. %) и деканол – циклогексанол (10:50, объемн. %).

Показано, что зависимость пористости монолита от доли инициатора носит параболический характер, достигая минимума для системы пропанол/формаид при концентрации инициатора 1%, а для системы деканол/циклогексанол – при 0,3% (рис.3).

С ростом доли инициатора образуется больше радикалов, следовательно, и большее число полимерных зародышей. Поскольку начальная концентрация мономеров постоянна, увеличение количества полимерных зародышей и глобул приводит к уменьшению их среднего размера и, соответственно – к уменьшению общей пористости.

Таким образом, влияние концентрации инициатора на пористость аналогично эффекту изменения температуры полимеризации.

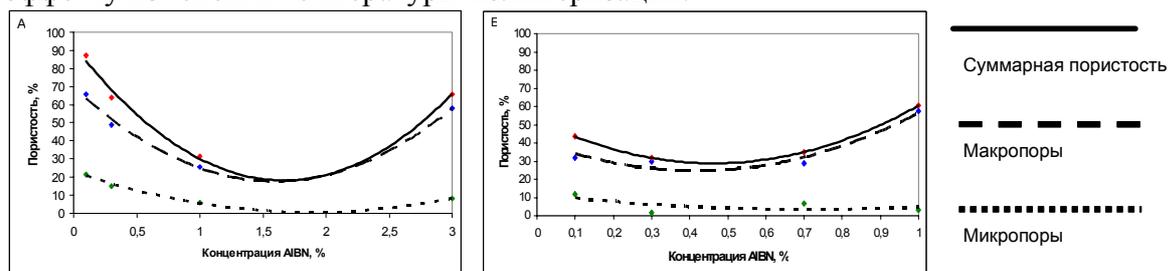


Рис. 3. Зависимость пористости от доли инициатора AIBN (А) в системе пропанол-1 – формаид (10:50, объемн.%), (Б) в системе деканол-1 – циклогексанол (10:50, объемн.%)

Поскольку детектирование осуществляется в потоке, требуется наличие окна детектора непосредственно в колонке. Использование методик, описанных в литературе, не позволило получить окно детектирования: сгоревший монолит не вымывался из колонки, что делало невозможным использование спектрофотометрического детектора. Нами предложен способ его получения непосредственно в монолитной колонке с использованием электрофоретического промывания буферным раствором.

Одна из проблем использования монолитных колонок – образование пузырьков воздуха в капилляре в процессе анализа, что приводит к уменьшению величины ЭОП, скорости анализа и невоспроизводимости результатов.

Мы предлагаем следующие решения:

- Создание давление на одном или обоих концах капилляра. (работа в режиме *pressure-assisted* КЭХ).

- Промывание колонки между анализами ацетонитрилом.

- Использование водно-ацетонитрильных буферных растворов.

Это позволило получить воспроизводимый ЭОП.

В специальных экспериментах показана принципиальная возможность анализа белков (смесь альбумина ( $M_r = 69366.6$  Да) и инсулина ( $M_r = 11980.9$  Да)) на подготовленных монолитах методом капиллярной электрохроматографии с УФ детектированием (25 мМ фосфатный буфер, pH 2.5; -15 кВ, 2 атм,  $\lambda = 214$  нм). Предел обнаружения без концентрирования составил 1 мг/мл.

Таким образом, нами предложен способ синтеза монолитных капиллярных колонок для КЭХ на основе полиметакрилата методом термополимеризации с иницированием азо-(*бис*)-изобутиронитрилом в присутствии 50% пропанола-1 и 10% формаида с последующей функционализацией бутилэтиламинол. Установлено влияние состава порогенного растворителя и показано, что максимальная пористость (~70%) наблюдается в системе пропанол – формаид.

Показано, что с уменьшением полярности растворителя пористость уменьшается. Обнаружено влияние концентрации инициатора азо-(бис)-изобутиронитрила на пористость монолита: зависимость имеет параболический характер.

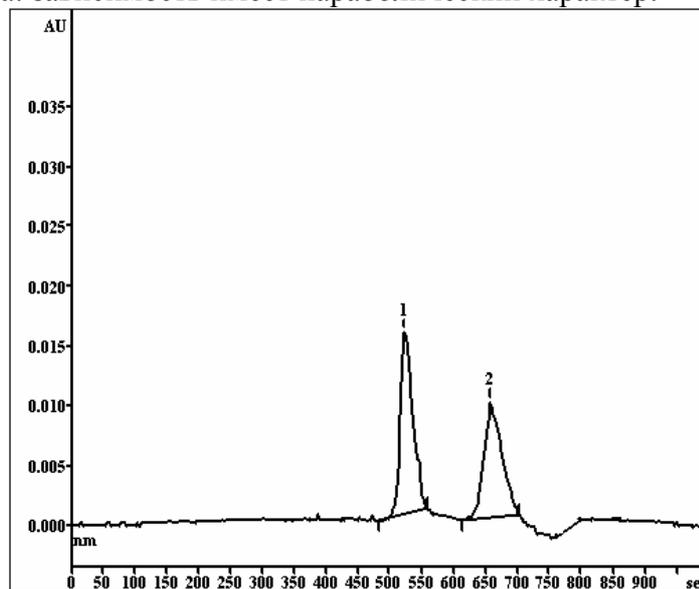


Рис. 4. Электрофореграмма альбумина (3 мг/мл) и инсулин (3 мг/мл). 45 см × 30 мкм кварцевый капилляр. 150 мМ Боратный буфер pH 10,5. Напряжение +15 кВ, детектирование при 214 нм. 1 – инсулин; 2 – альбумин

Показана принципиальная возможность анализа белков на подготовленных монолитах методом капиллярной электрохроматографии (25 мМ фосфатный буфер, pH 2.5; -15 кВ, 2 атм).

### Список литературы

1. Jinno K., Sawada H., Catabay A. P., Watanabe H., Sabli N. B. H., Pesek J. J., Matyska M. T. Comparison of separation behavior of benzodiazepines in packed capillary electrochromatography and open-tubular capillary electrochromatography// J. Chromatogr. A. 2000. V.887. P.479-487.
2. Liu Z., Otsuka K., Terabe S., Motokawa M., Tanaka N. Physically adsorbed chiral stationary phase of avidin on monolithic silica column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography// Electrophoresis. 2002. V.23. P.2973-2981.
3. Gusev I., Huang X., Horvath C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography// J. Chromatogr. A. 1999. V.855. P.273-290.
4. Zhang S., Huang X., Zhang J., Horvath C. Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith// J. Chromatogr. A. 2000. V.887. P.465-477.
5. Archie G.E. The electrical resistivity log as an aid in determining some reservoir characteristics// Trans. Am. Ind. Mining Met. Engrs. 1942. V.146. P.54-61.
6. Тагер А.А. Физикохимия полимеров. М. Химия. 1978. С.544.
7. Shima M., Sato M., Atsumi M., Hatada K.. Dipole moments of isotactic and syndiotactic poly(methyl methacrylate) and their temperature dependence// Polymer. 1994. V.26. P.579-585.
8. Lide D.R. Handbook of Chemistry and Physics, 87<sup>th</sup> Edition. CRC Press. 2003. C.2475.