



УДК 543.544

PLOT-колонки в капиллярной электрохроматографии (обзор)

Потолицына В.Е., Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 5.07.2013 г.

Аннотация

В статье представлен обзор на основании статей зарубежных научных групп за 2004-2011 гг последних направлений в разработке PLOT-колонок для капиллярной электрохроматографии. Рассмотрено использование линейных, цвиттерионных и разветвленных полимеров и их применение для разделения белков, пептидов и нуклеозидов.

Ключевые слова: капиллярная электрохроматография, PLOT-колонки, белки, обзор.

In this paper gives a review of the articles from different scientific groups (2004-2011) and describes trends in the PLOT-columns development for capillary electrochromatography. The using of linear, zwitterionic and branched polymers for separation of proteins, peptides and nucleosides is discussed.

Keywords: capillary electrochromatography, PLOT-column, proteins, review

В настоящее время для разделения компонентов сложных смесей в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ) активно используются полые колонки с иммобилизованным пористым слоем монолитного полимера, так называемые *PLOT*-колонки (*porous-layer open-tubular*).

Несмотря на то, что электрохроматография была предложена Преториусом более 30 лет назад [1], лишь недавно удалось оценить по-настоящему достоинства этого метода. Поскольку колонки – наиболее важная часть КЭХ-разделительной системы, особое внимание уделено технологии их изготовления. Метод КЭХ сочетает достоинства высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ). Опыт, имеющийся в ВЭЖХ, востребован и при изготовлении колонок, заполненных частицами или монолитной стационарной фазой; развитие метода КЗЭ инициировало создание полых колонок (*open-tubular column* (OT)) [2].

Впервые *OT*-колонки для КЭХ описаны Tsuda и др. в 1982 г. [3]. Полые колонки с пористым слоем (*PLOT*- колонки) представляют подгруппу капиллярных колонок, на стенках которых иммобилизован пористый полимерный материал. Они стали активно использоваться в газовой хроматографии (ГХ) [4]. В жидкостной хроматографии из-за низкой диффузии аналитов к функционализированным стенкам кварцевого капилляра, приводящей к заметному размыванию хроматографической зоны и, соответственно, снижению эффективности, они не получили достаточно широкого распространения[5].

Теоретические расчеты показали, что влияние диффузии становится незначительным в капиллярах с диаметром $< 15\text{ мкм}$ [6]. В условиях КЭХ использование высоких давлений не требуется: подвижная фаза мигрирует за счет электроосмотического потока (ЭОП). Слой пористого полимера в *PLOT*-колонок обеспечивает более высокую площадь поверхности, чем в обычных капиллярах, хотя в сравнении с набивными и монолитными аналогами площадь поверхности в слое полимера несколько ниже. Несмотря на высокую проницаемость капиллярных *PLOT*-колонок, их получение и применение в КЭХ менее распространено и ограничивается лишь рядом сообщений [7]. В принципе, полимерные монолитные слои имеют много общего с монолитными КЭХ-колонками [8]. Единственное различие состоит в том, что пористый материал не полностью заполняет весь внутренний объем капилляра.

Важным направлением в активно развивающейся области протеомики является электрофоретическое определение белков в сложных биологических матрицах. Перспективным для решения этой задачи стало использование полых колонок благодаря их высокой эффективности, легкости автоматизации, малым расходом реагентов и образцов [9-12]. Однако в протеомическом анализе использование КЭХ с полыми колонками ограничено необратимой сорбцией белков стенками непокрытого кварцевого капилляра и возможными электростатическими взаимодействиями между белками и ионогенными функциональными группами сорбента, обеспечивающими электроосмотический поток (ЭОП) [13].

Рекомендуется использование неподвижных фаз, модифицированных объемными группами во избежание контакта белков с заряженными функциональными группами сорбента или отрицательно заряженными силанольными группами на внутренней поверхности стенок капилляра [14-15].

В [16] для этой цели применяли разветвленный полиэтиленмин (PEI) – разветвленный катионный полимер с полярными первичными, вторичными и третичными аминогруппами (рис. 1) [17]. Большое число аминогрупп обеспечивает значительный ($1.98 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2/\text{с} \cdot \text{В}$) отрицательный ЭОП и селективное взаимодействие с аналитами.

Недостатком ОТ-КЭХ является небольшое число функциональных групп, ковалентно связанных с внутренней стенкой кварцевого капилляра и доступных для модификации [18-19]. Одним из интересных способов увеличения лигандной емкости при химической модификации внутренней поверхности капилляра является *графтинг* [20]: функциональные цепи, называемые «щетками» или «щупальцами», формируются на активных центрах поверхности.

Активный интерес проявляется к стационарным фазам на основе полимеров-«щеток», модифицированных металл-хелатными или фенилаланиновыми группами для увеличения площади поверхности, что подтверждено большими значениями факторов удерживания аналитов в сравнении с монослойными лиганд-модифицированными колонками [21-23].

В качестве таких функциональных групп предложены разветвленные полиэтиленмины (PEI), ковалентно связанные с полимерными цепями типа «щупалец» и выполняющие функции стационарной фазы при разделении пептидов и белков в режиме ОТ-КЭХ.

В [16] с использованием сканирующего электронного микроскопа (рис. 2) исследовано покрытие на основе разветвленного PEI-полимера «щеточного» типа. Изучена зависимость ЭОП от pH и концентрации полимера. Воспроизводимость ОТ-колонок в кислой среде устанавливалась по маркеру ЭОП и составила 4,8%.

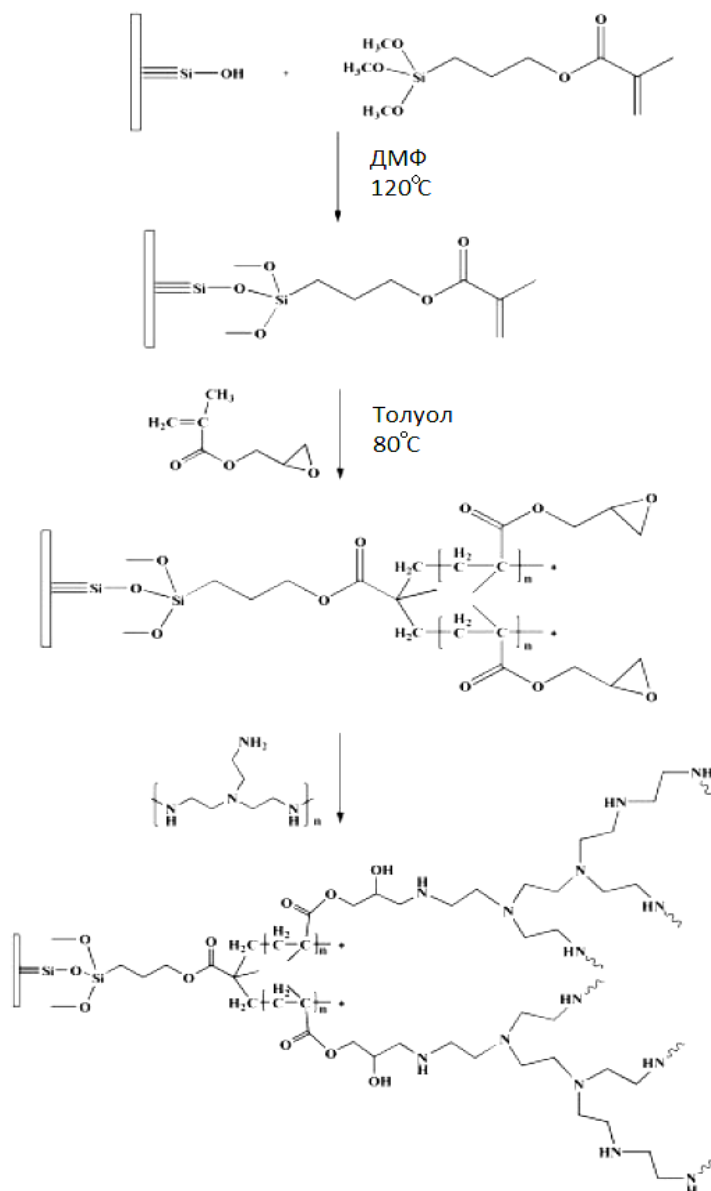


Рис. 1. Схема получения стационарной фазы на основе разветвленного полиэтиленамина щеточного типа [17]

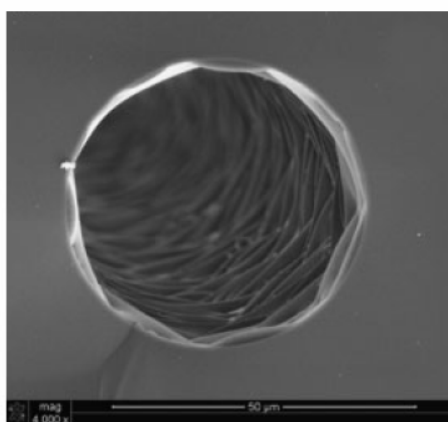


Рис. 2. Фотография внутренней поверхности ОТ-колонки, покрытой разветвленным PEI-полимером [16]

Для взаимодействия с аналитами в таких колонках доступна большая площадь поверхности стационарной фазы. При содержании 20% (объемн.) раствора РЕИ в составе неподвижной фазы генерировался отрицательный ЭОП (рН подвижной фазы <7,5). Подготовленные ОТ-колонки обеспечили высокую разрешающую способность при разделении пептидов и белков (рис. 3).

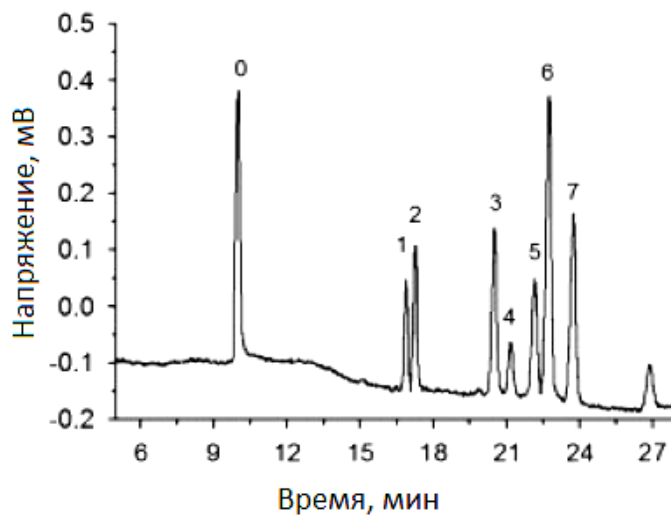


Рис. 3. Электрохроматограмма энкефалин-связанных пептидов на РЕИ-колонке; 30 мМ фосфатный буфер (рН 2,5), 25% ацетонитрила [16]

В [24] PLOT-колонки на основе полистирола и дивинилбензола использованы для разделения интактных белков. При использовании более коротких колонок ширина пика заметно возрастала (рис.4).

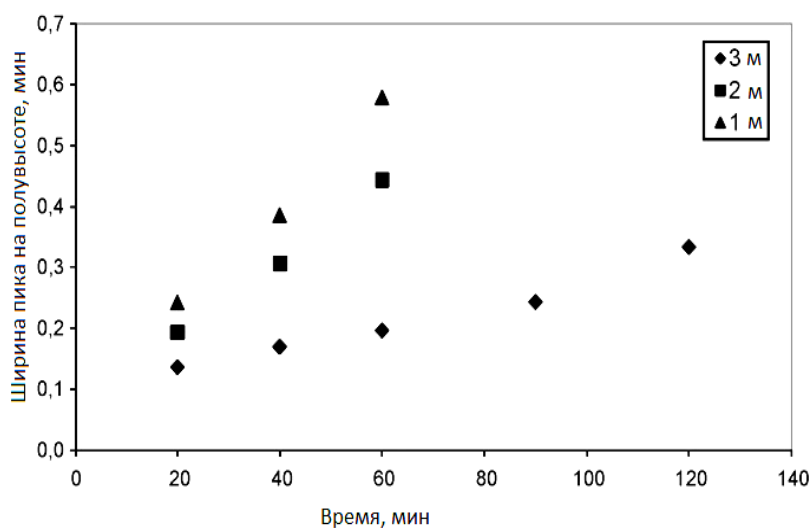


Рис. 4. График зависимости средней ширины пика на полувысоте от времени для колонок различной длины: 1, 2 и 3 м [24]

В [24] исследована зависимость времени удерживания белков в образцах обезжиренного молока от температуры в диапазоне 20-50⁰С (рис.5).

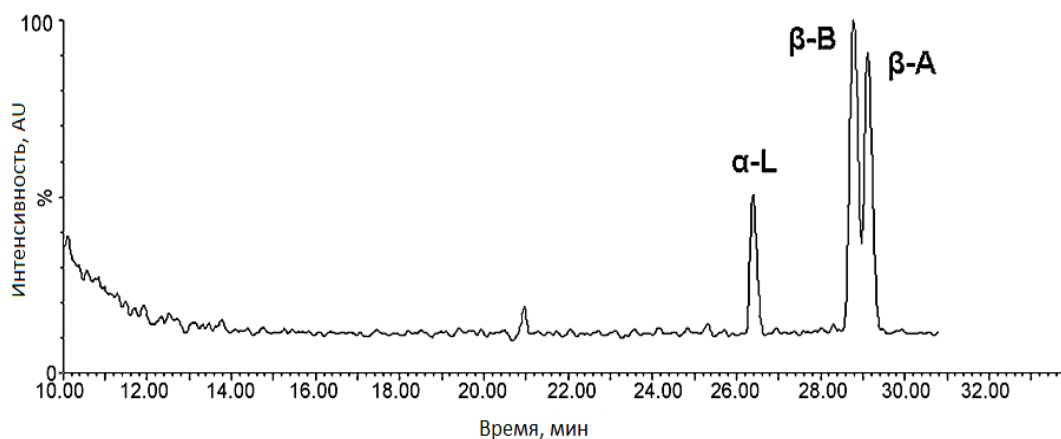


Рис. 5. Хроматограмма белков (α -лактоглобулин, β -лактоглобулин В, β -лактоглобулин А) в образце обезжиренного молока.

Градиентный режим элюирования: от 90% А (0,1% фторуксусная кислота, 0,05% трифторуксусная кислота (объемн.) в воде) до 90% В (0,1% фторуксусная кислота, 0,05% трифторуксусная кислота, 10% воды (объемн.) в ацетонитриле). Колонка 3 м [24]

В [25] впервые синтезированы PLOT-колонок на основе бутилметакрилата (БМА), способного к ионизации мономера (моно-(2-(метакрилоилокси)-этилсукцината) (МЭС) и сшивающего агента (этилендиметакрилата). Группой Chen и сотр. получены фотографии поверхности PLOT-колонок с использованием сканирующего электронного микроскопа (рис.6).

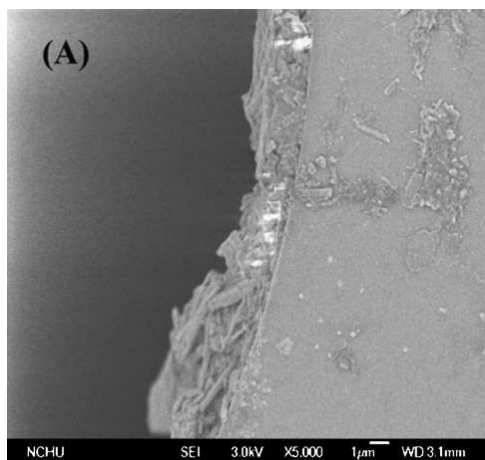


Рис. 6. Фотография внутренней поверхности PLOT-колоники на основе БМА-МЭС полимера [25]

Воспроизводимость покрытия составила от 3,7 до 4,7% для трех различных капилляров. Авторами выявлено влияние рН и ионной силы буфера, а также концентрации органического растворителя на величину ЭОП (рис. 7).

С использованием этих колонок оптимизированы условия разделения различных групп аналитов: смесь нуклеозидов и тимина, флавоноидов и фенольных кислот (рис.8).

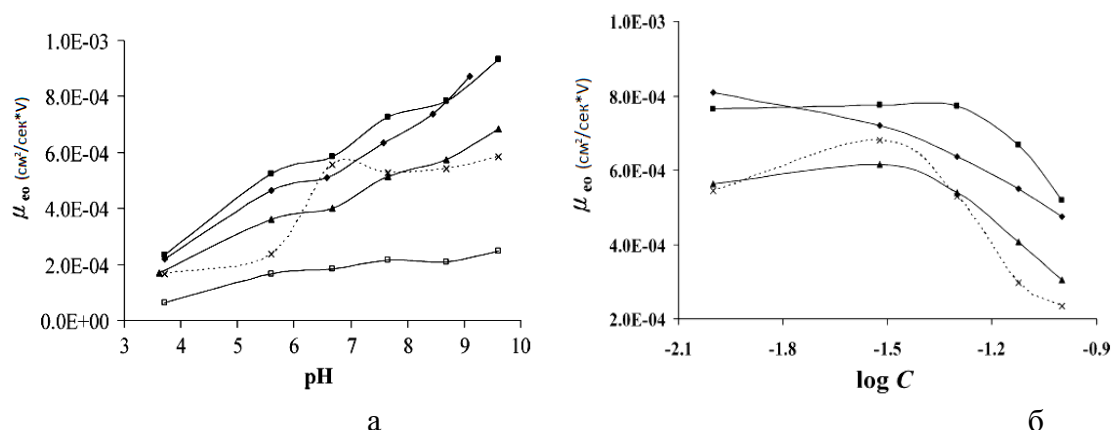


Рис. 7. Зависимость ЭОП от pH буферного электролита (А) и влияние концентрации рабочего буферного электролита на электроосмотическую подвижность (Б).

Колонки: (◆) пустой капилляр; (▲) колонка, силанизированная 3-метоксисилилпропилметакрилатом; (■) покрытие капилляра БМА-МЭС полимером; (×) - SiH-МЭС покрытие капилляра. Рабочий электролит: 50мМ фосфатный буфер; маркер ЭОП - ДМСО; гидростатический ввод 5см, 2с; +15кВ, УФ-детектирование 214нм [25].

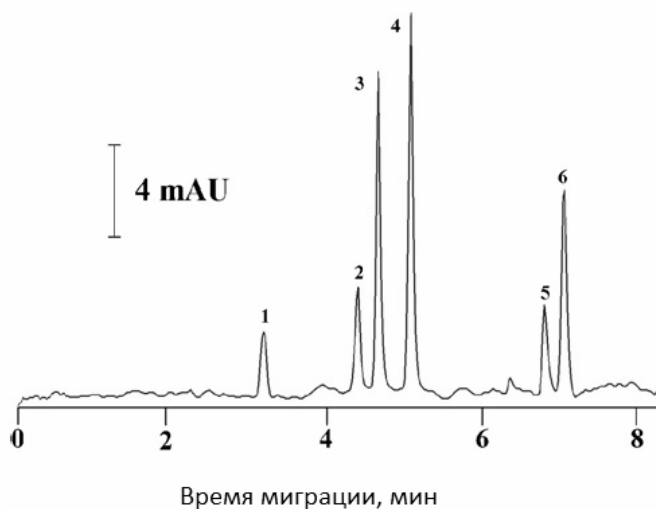


Рис. 8. Электрохроматограмма смеси нуклеозидов и тимина на PLOT-колонке, покрытой БМА-МЭС полимером.

50 мМ боратный буфер; гидростатический ввод 15 см, 5с; +10кВ; капилляр:60 см×75мкм; 1 – тимин, 2 – аденозин, 3 - тимидин, 4 – дезоксиаденозин, 5 – гуанозин, 6 – уридин [25].

В [26] получен *in situ* фотоиницированной сополимеризацией новый пористый монолит на основе бис-фенолдиметакрилата (БФАДМА) (сшивающий агент) и бензилметакрилата; в качестве порогенного растворителя использовалась бинарная система циклогексанол и 1-деканол. Полученные колонки для КЭХ характеризуются хорошей проницаемостью, механической и гидролитической стабильностью, а также высокой селективностью к ароматическим анализам: успешно разделены смеси алкилбензолов, ПАУ и фенольных соединений [26]. Воспроизводимость (RSD) от анализа к анализу и от колонки к колонке составила ~ 2,2% - 5,6%.

В [27] синтезированы цвиттерионные молекулярные мицеллы поли-ε-натрий-ундеcanoиллизината (поли-ε-НУЛ) (рис. 9), используемые в качестве покрытия внутренней поверхности капилляра в условиях ОТ-КЭХ для разделения белков.

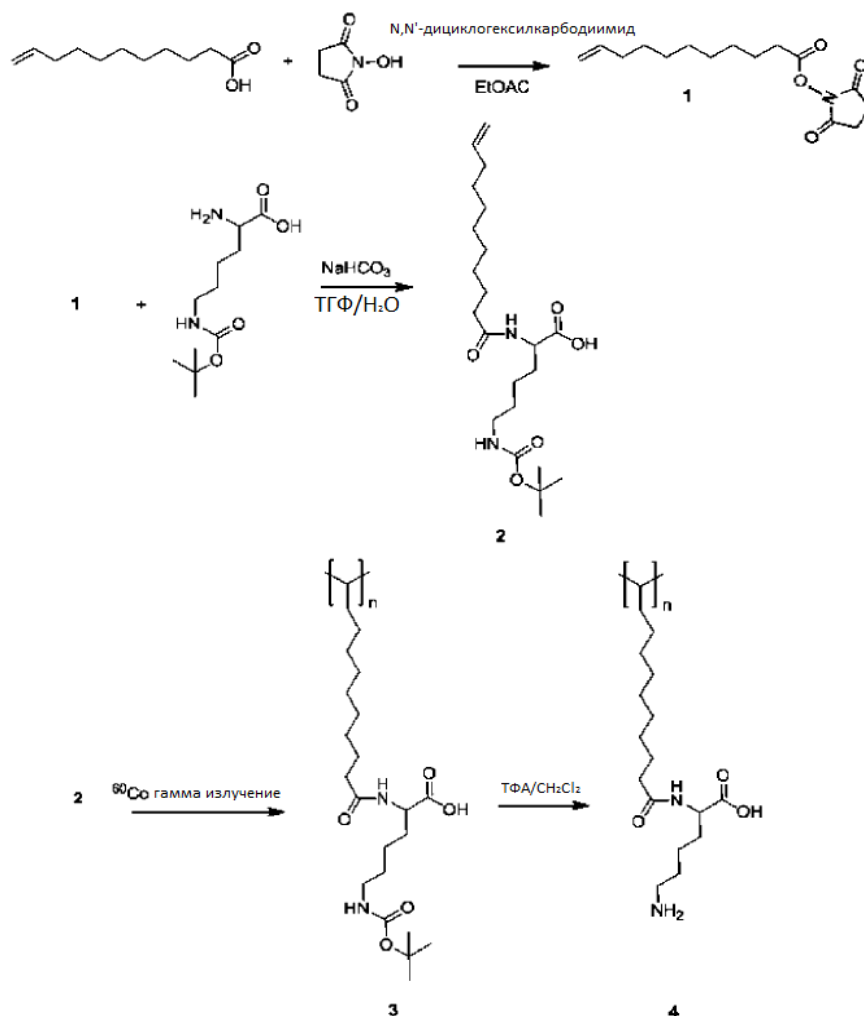


Рис. 9. Схема синтеза поли- ε-НУЛ [27]

Данный вид мицелл содержит кислотные карбоксильные и основные аминогруппы, которые могут быть протонированы или депротонированы в зависимости от pH рабочего электролита. Таким образом, заряд поверхности полимера может быть как положительный, так и отрицательный. Подобное цвиттерионное покрытие обеспечило разделение смеси 4-х основных (*лизоцим, цитохром, α-химотрипсиноген А и рибонуклеаза А*) шести кислотных белков (*миоглобин, дезоксирибонуклеаза I, β-лактоглобулин А, β-лактоглобулин В, α-лактальбумин и альбумин*) в нормальном и обращенном режимах (рис.10). Установлена высокая стабильность покрытия: до 50 анализов на одном и том же капилляре.

В [28] осуществлено хиральное разделение энантиомеров кетопрофена в условиях КЭХ с ОТ-колонками, содержащими в качестве покрытия полимеры с молекулярными отпечатками на внутренней поверхности кварцевого капилляра. Колонки подготовлены *in situ* термополимеризацией. Мономерная смесь содержала S-кетопрофен, метакриловую кислоту (функциональный мономер), этиленгликоль диметакрилат (сшивающий агент) и 4-стиролсульфоновую кислоту в смеси ацетонитрил/пропанол-2 (рис. 11).

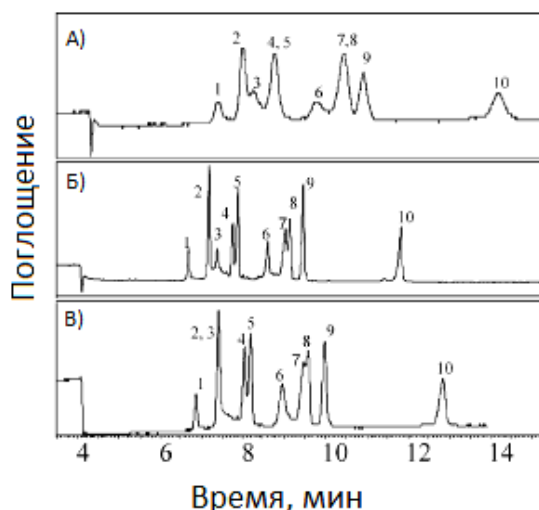


Рис. 10. Влияние концентрации NaCl на разделение 10 кислотных и основных белков

Условия: 0,4% (масс.) поли-ε-НУЛ; концентрация NaCl А) 25 мМ; Б) 20 мМ; В) 15 мМ; рабочий электролит: 20 мМ раствор гидрофосфата натрия (рН 3), 25кВ, 15°С; капилляр: внутренний диаметр 50 мкм; эффективная длина 40см; электрокинетический ввод 5кВ, 5с; УФ-детектирование 200 нм. 1 – дезоксирибонуклеаза I, 2 – α-хемотрипсиноген А, 3 – альбумин, 4 – α-лактоглобулин, 5 – рибонуклеаза, 6 – миоглобин, 7 – β-лактоглобулин А, 8 – β-лактоглобулин В, 9 – лизоцим, 10 – цитохром С [27].

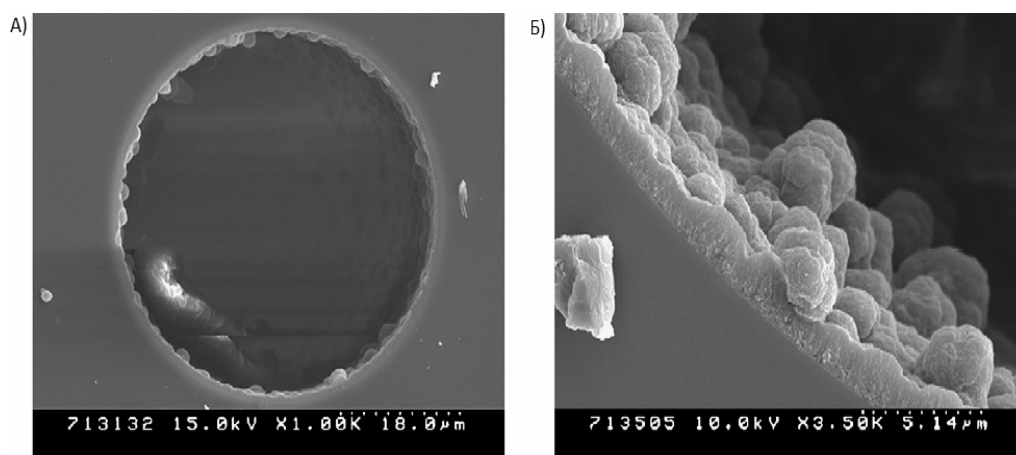


Рис. 11. Фотография внутренней поверхности ОТ-колоники с «отпечатками» S-кетопрофена, полученная с помощью электронного сканирующего микроскопа: А) срез ОТ-колоники; Б) увеличенный фрагмент полимера между полимерным слоем и внутренней стенкой капилляра [28]

Отмечена высокая эффективность (156 000г.т./м) и селективность разделения (10,5) энантимеров кетопрофена.

В [29] синтезированы ОТ-колоники с полимерным покрытием типа «щупальцев», модифицированного фенилаланином, для синтеза которого использовалась графт-полимеризация глицидилметакрилата с последующей постфункционализацией фенилаланином (рис. 12)

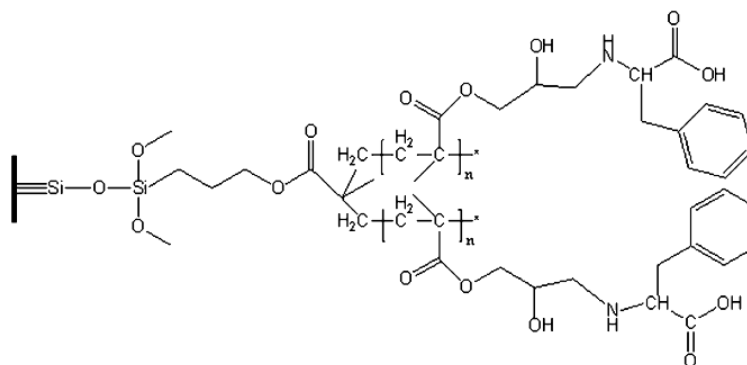


Рис. 12. Структура стационарной фазы на основе полимера типа «щупальца», функционализированного фенилаланином [29]

Полученный сорбент, обладая амфотерным характером, обеспечивал разделение как основных, так и кислотных белков при различных значениях рН рабочего буфера (рис. 15). Воспроизводимость времен миграции белков не превысила 5%.

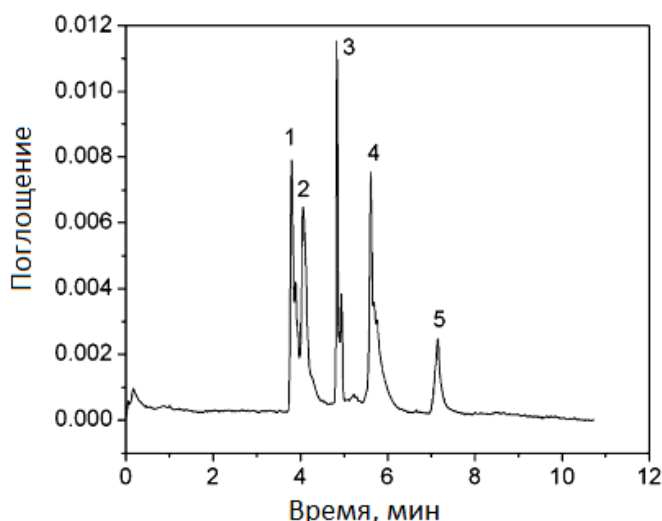


Рис. 15. Электрохроматограмма смеси стандартов белков.

Эффективная длина колонки: 40 см, внутр. диаметр 50 мкм. Подвижная фаза: 50мМ боратный буфер, УФ-детектирование 200 нм, 18 кВ. 1 – ДМСО, 2 – рибонуклеаза А, 3 – миоглобин, 4 – трансферин, 5 – инсулин [29].

КЭХ с использованием ОТ-колонок в настоящее время не является основным направлением развития, однако можно четко проследить достижения в этом направлении. Многообразие задач и широкий спектр аналитов способствуют поиску альтернативных, ранее не изученных в данной области материалов.

Список литературы

1. Pretorius V., Hopkins B.J., Schieke J.D. Electroosmosis. New concept for high speed liquid chromatography // J. Chromatogr. 1974. V 99. P. 23-30.
2. Deyl Z., Svec F. Capillary Electrochromatography // Elsevier. Amsterdam. 2001.
3. Tsuda T., Nomura K., Nakagawa G. Open-tubular microcapillary liquid chromatography with electro osmosis flow using a UV detector // J. Chromatogr. 1982. V. 248. P. 241–247.

4. Zeeuw J., Luong J. Developments in stationary phase technology for gas chromatography // *J. Trends Anal. Chem.* 2002. V. 21. P. 594–607.
5. Knox J. H., Gilbert M. T. Kinetic optimization of straight open-tubular liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1979. V. 186. P. 405-418/
6. Guiochon G., Horváth C. S. *HPLC- Advances and Perspectives* // Academic Press. New York 1980. P. 1–93.
7. Huang X., Zhang J., Horváth C. Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns. // *J. Chromatogr.* 1999. V. 858. P. 91–101.
8. Peters E. C., Petro M., Svec F., Fréchet, J. M. J. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography // *J. Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 3646–3649.
9. Li Y., Xiang R., Wilkins J. A., Horváth C. Capillary electrochromatography of peptides and proteins // *J. Electrophoresis.* 2004. V. 25. P. 2242–2256.
10. Huang Y. F., Huang C. C., Hu C. C., Chang H. T. Capillary electrophoresis-based separation techniques for the analysis of proteins // *J. Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 3503–3522.
11. Bandilla D., Skinner C. D. Capillary electrochromatography of peptides and protein // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 113–129.
12. Ou J. J., Dong J., Dong X. L., Yu Z. Y., Ye M. L., Zou H. F. Recent progress in polar stationary phases for CEC // *J. Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 148–163.
13. Liu Z., Wu R. A., Zou H. F. Recent progress in adsorbed stationary phases for capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 3954–3972.
14. Hilder E.F., Svec F., Fréchet J.J. Shielded stationary phases based on porous polymer monoliths for the capillary electrochromatography of highly basic biomolecules // *J. Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 3887–3892.
15. Miller M. D., Baker G. L., Bruening M. L. Polymer-brush stationary phases for open-tubular capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1044. P. 323–330.
16. Zhang X., Yang J., Liu S., Lin X., Xie Z. Branched polyethyleneimine-bonded tentacle-type polymer stationary phase for peptides and proteins separations by opentubular capillary electrochromatography // *J. Sep. Sci.* 2011. V. 34. P. 3383–3391.
17. Cordova E., Gao J.M., Whitesides G.M. Noncovalent polycationic coatings for capillaries in capillary electrophoresis of proteins // *J. Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 1370–1379.
18. Kapnissi-Christodoulou C. P., Zhu X. F., Warner I. M. Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography. // *J. Electrophoresis.* 2003. V. 24. P. 3917–3934.
19. Dong X. L., Wu R. A., Dong J., Wu M. H., Zhu Y., Zou H. F. Recent progress of polar stationary phases in CEC and capillary liquid chromatography // *J. Electrophoresis.* 2009. V. 30. P. 141–154.
20. Bhattacharya A., Misra B. N. Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications // *J. Prog. Polym. Sci.* 2004. V. 29. P. 767–814.
21. Xu L., Sun Y. Fabrication and characterization of open-tubular CEC modified with tentacle-type metal-chelating polymer chains // *J. Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 1658–1667.
22. Xu L., Sun Y. Novel open tubular CEC with tentacle-type polymer stationary phase functionalized by phenylalanine // *J. Electrophoresis.* 2008. V. 29. P. 880–888.
23. Xu L., Sun Y. Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer

under both cathodic and anodic electroosmotic flows // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1183. P. 129–134.

24. Rogeberg M., Wilson S., Greibrokk T., Lundanes E. Separation of intact proteins on porous layer open tubular (PLOT) columns // J. Chromatography A. 2010. V.1217. P. 2782–2786.

25. Chen J., Lin Y-C. Succinyl methacrylate polymerized in porous-layered phases for open-tubular capillary electrochromatography: comparison with silica hydride monolayered phases // J. Chromatography A. 2010. V. 1217. P. 4328–4336.

26. Ou J., Gibson G., Oleschuk R. Fast preparation of photopolymerized poly(benzyl methacrylate-co-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography // J. Chromatography A. 2010. V. 1217. P. 3628–3634.

27. Moore L.Jr., LeJeune Z.M., Lucas C.A., Gates A.T., Li M., Zahab B., Garno J.C., Warner I.M. Lysine-based zwitterionic molecular micelle for simultaneous separation of acidic and basic proteins using open tubular capillary electrochromatography // J. Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 3997–4005.

28. Zaidi S.A., Cheong W. Preparation of an open-tubular capillary column with a monolithic layer of S-ketoprofen imprinted and 4-styrenesulfonic acid incorporated polymer and its enhanced chiral separation performance in capillary electrochromatography // J. Chromatography A. 2009. V. 1216. P. 2947–2952.

29. Xu L., Sun Y. Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows // J. Chromatography A. 2008. V. 1183. P. 129–134.

30. Miller M. D., Baker G.L., Bruening M. L. Polymer-brush stationary phases for open-tubular capillary electrochromatography // J. Chromatography A. 2004. V. 1044. P. 323–330.

Потолицына Вера Евгеньевна - аспирант химического факультета Санкт-Петербургского государственного Университета, Санкт-Петербург

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н., профессор кафедры органической химии химического факультета Санкт-Петербургского государственного Университета, Санкт-Петербург

Potolitsyna Vera E. - PhD student of Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, potolitsynavera@gmail.com

Kartsova Ludmila A. - professor of Organic chemistry department of Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg