

## Формирование двухслойных покрытий на основе наноразмерных ионитов и их применение для определения биогенных аминов и аминокислот методом капиллярной электрохроматографии

**\*Д.В. Макеева, Д.А. Поликарпова, Л.А. Карцова**

Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, Петродворец,  
Университетский пр., 26

\*Адрес для переписки: Макеева Дарья Валерьевна, E-mail: [dasha.dzema@gmail.com](mailto:dasha.dzema@gmail.com)

Поступила в редакцию 19 августа 2021 г., после доработки – 6 сентября 2021 г.

Наночастицы активно используются в капиллярном электрофорезе в качестве стационарных фаз, адсорбированных на поверхности кварцевого капилляра, в целях улучшения электрофоретического разделения аналитов в режиме капиллярной электрохроматографии. Формирование покрытий за счет физической адсорбции полимерных наночастиц – наиболее быстрый и простой в исполнении метод. Однако полученные покрытия зачастую характеризуются низкой стабильностью. В работе предложен подход к формированию плотного и стабильного покрытия стенок кварцевого капилляра с внешним отрицательно-заряженным слоем нанокатионита, заключающийся в последовательном нанесении за счет физической адсорбции противоположно-заряженных слоев наноразмерных ионообменников. Сформировано двухслойное покрытие «наноанионит-нанокатионит», отличающееся высокой стабильностью в диапазоне pH от 2 до 10, и позволяющее проводить до 120 циклов анализа без обновления покрытия. Полученные снимки внутренней поверхности капилляров на сканирующем электронном микроскопе позволили провести сравнение плотности и равномерности одно- и двухслойных покрытий на основе наноионитов. Аналитические возможности двухслойного покрытия продемонстрированы при анализе смесей биогенных аминов и аминокислот в режиме капиллярной электрохроматографии. Достигнуты высокие значения эффективности ( $N = 450-720$  тыс. т.т./м и  $N = 400-520$  тыс. т.т./м для катехоламинов и аминокислот, соответственно). Высокая концентрация отрицательно заряженных ионогенных групп на поверхности капилляра способствует увеличению степеней концентрирования, достигаемых в результате электростэкинга, поскольку к общему механизму концентрирования добавляется взаимодействие аналита с функциональными центрами поверхности капилляра. Это позволило снизить пределы обнаружения аналитов в 2-4 раза по сравнению с однослойным НИК-покрытием (3-4 нг/мл в случае катехоламинов и 40-100 нг/мл для аминокислот).

**Ключевые слова:** наноанионит, нанокатионит, двухслойные покрытия, капиллярная электрохроматография, биогенные амины, аминокислоты, концентрирование.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2021, vol. 25, no. 3, pp. 230-240

DOI: 10.15826/analitika.2021.25.3.004

## Bilayer capillary coatings based on nanosized ion-exchangers for the capillary electrochromatography analyses of biogenic amines and amino acids

**\* D.V. Makeeva, D.A. Polikarpova, L.A. Kartsova**

Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry  
7/9 Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

\*Corresponding author: Dar'ia V. Makeeva, e-mail: [dasha.dzema@gmail.com](mailto:dasha.dzema@gmail.com)

Submitted 19 August 2021, received in revised form 6 September 2021

Nanoparticles are widely used in capillary electrophoresis as stationary phases adsorbed on the internal capillary walls for the separation and concentration of analytes in capillary electrochromatography. The fastest and simplest approach for the formation of coatings is a physical adsorption of nanoparticles. Nevertheless, the formed coatings frequently possess low stability. The layer-by-layer approach for the formation of stable and dense coating of internal capillary walls based on negatively charged nanosized cation-exchanger was proposed. The method included the sequential alteration of oppositely charged layers of nanosized ion-exchangers. The proposed "anion-exchanger – cation-exchanger" bilayer coating possesses high stability in wide pH range (2-10) and provides up to 120 analyses without the need of re-coating. The coating was applied for the separation and on-line concentration of catecholamines and amino acids in capillary electrochromatography mode. High efficiencies were achieved ( $N = 450-720$  th. t.p./m and  $N = 400-520$  th. t.p./m for catecholamines and amino acids, respectively), while the analysis time was significantly decreased. It was established, that high concentration of negatively charged functional groups on the capillary surface led to the increase of stacking efficiency factors due to the interactions between analytes and functional groups of the modifier on the capillary walls. It contributed to the 2-4 times reduced detection limits (LODs) of analytes compared to the mono-layer coatings (LODs of catecholamines = 3-4 ng/mL, LODs of amino acids = 40-100 ng/mL).

**Keywords:** nano-sized anion-exchanger, nano-sized cation-exchanger, bilayer coatings, capillary electrochromatography, biogenic amines, amino acids, on-line concentration.

## ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы (НЧ) активно используются в капиллярном электрофорезе (КЭ) благодаря их способности формировать стабильные покрытия стенок кварцевого капилляра, а также совместимости с органическими растворителями и МС-детектированием [1]. Развитая поверхность НЧ обеспечивает большое количество сайтов для взаимодействия с аналитами, что приводит к росту селективности разделения, положительно влияет на эффективность и форму пика, а также увеличивает емкость полученных покрытий, что принципиально при определении аналитов в условиях капиллярной электрохроматографии (КЭХ). Применение НЧ для модификации стенок кварцевого капилляра и фонового электролита позволяет одновременно решать проблему недостаточной селективности метода КЭ по отношению к аналитам с близкими электрофоретическими подвижностями [2] и влиять на величину и направление электроосмотического потока (ЭОП) [2, 3].

Полимерные наночастицы (ПНЧ) в отличие от НЧ на неорганической основе образуют стабильные суспензии в воде и большинстве фоновых электролитах и могут храниться в неизменном состоянии годами. Интересной особенностью ПНЧ является наличие внутримолекулярных полостей, доступных для взаимодействия с аналитами [4]. Основным способом формирования таких покрытий является физическая адсорбция, поскольку ПНЧ обладают высокой адгезией к внутренней поверхности стенок кварцевого капилляра.

Исследуемые в данной работе наноиониты на основе сополимеров стирола и дивинилбензола с терминальными четвертичными аммонийными (наноанионит) и сульфо-группами (нанокатионит) [5] характеризуются независимым от pH зарядом и высокой ионообменной емкостью. Наноанионит (НИА) нашел применение для формирования устойчивого положительно заряженного покрытия стенок кварцевого капилляра при высокоэффективном и

селективном разделении неорганических анионов ( $N = 112-1500$  тыс т.т./м; пределы обнаружения (ПО) с использованием электростэкинга составляют 1 пкг/мл – 7 нг/мл) и карбоновых кислот ( $N = 360-600$  тыс т.т./м; ПО с электростэкингом – 1-3 нг/мл) [6]. Нанокатионит (НИК) успешно применен при разделении и концентрировании катехоламинов и аминокислот [7]. Показано, что несмотря на отрицательный заряд терминальных групп данного модификатора, одноименный заряду стенок кварцевого капилляра, нанокатиониты способны сорбироваться на последних, способствуя увеличению селективности разделения аналитов за счет вклада ионного обмена в общий механизм разделения. Тем не менее созданное покрытие характеризовалось низкой плотностью, неполным экранированием силанольных групп, а также низкой устойчивостью, что требовало постоянного присутствия модификатора в фоновом электролите для увеличения воспроизводимости времен миграции аналитов.

Проблема недостаточной стабильности физически-адсорбированных покрытий на основе НЧ может решаться созданием многослойных покрытий, которые в большинстве случаев проявляют значительно большую стабильность в широком диапазоне pH. Такие покрытия могут выполнять сразу несколько функций (обращение ЭОП, предотвращение сорбции определяемых соединений, разделение нейтральных аналитов и т.д.) [8-10]. Так, в [11] рассмотрен пример полифункционального многослойного покрытия на основе имидазола и  $\beta$ -циклодекстрина, обеспечившего в одном аналитическом цикле предотвращение сорбции катехоламинов и аминокислот, разделение нейтральных аналитов (стероидных гормонов) и энантиомеров кетопрофена. В [12] предложен вариант получения многослойных покрытий на основе наночастиц диоксида кремния и поли(L-лизина). Варьирование состава внешнего слоя позволило влиять на свойства получаемого покрытия. Например, использование поли(L-лизина) в качестве внешнего слоя при определении анион-

ных анализатов способствовало обращению ЭОП; при этом внешний слой на основе НЧ диоксида кремния обеспечил разделение биогенных аминов с высокой селективностью.

На основе ионообменных наночастиц возможно и формирование многослойных покрытий. В [13] обсуждаются пути формирования двухслойного покрытия с применением латексных НЧ. Первый слой сформирован на основе анионообменных НЧ Dionex AS5A (60 нм), второй – представлял собой катионообменные НЧ CS3 (300 нм). Подобное двухслойное покрытие обеспечило стабильный рН-независимый ЭОП. Предложенное покрытие использовано при электрофоретическом определении катионов щелочных и щелочноземельных металлов и органических оснований. Позднее эти же авторы показали возможность увеличения ионообменной емкости покрытий на основе латексных частиц за счет формирования анионообменного слоя на поверхности монолитного сорбента диоксида кремния, заполнившего кварцевый капилляр [14]. Однако электрофоретические эксперименты в сильноокислых и сильнощелочных средах с использованием подобных капилляров оказались затруднительны.

Покрытия на основе исследуемого в работе наноанионита характеризовались высокой стабильностью в широком диапазоне рН и легкостью прививки к стенкам капилляра. Таким образом, слой НИА на стенках капилляра мог бы служить идеальной подложкой для формирования новых слоев на поверхности капилляра в целях варьирования заряда поверхности, природы активных центров, удельной поверхности и области применения полученных полислойных покрытий.

Данная работа посвящена поиску условий формирования двухслойных покрытий с использованием наноразмерных ионообменников (НИА и НИК) с целью создания прочного отрицательно заряженного покрытия с внешним слоем нанокатионита и выявления возможности его применения для анализа смесей биогенных аминов и их метаболитов.

Работа включала следующие этапы: оптимизация условий модификации стенок капилляра наноанионитом в целях создания основы для последующей прививки слоя нанокатионита; поиск условий последовательной прививки второго слоя противоположно заряженных наночастиц (НИК) на НИА-модифицированном капилляре; получение оценочных характеристик сформированных покрытий (условия стабильности, рабочий диапазон рН фоновых электролитов); выявление возможностей полученного двухслойного НИА-НИК покрытия при разделении и концентрировании катехоламинов и их метаболитов, а также сравнение аналитических характеристик разделения с использованием однослойного НИК и двухслойного НИА-НИК-модифицированного капилляра.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты и приготовление стандартных растворов

Концентрированная соляная кислота, ацетат аммония («Вектон»); фосфорная и уксусная кислоты («х.ч.») («Реахим»); борная кислота («х.ч.») («Реахим»); гидроксид натрия («ч.д.а.») («Химреактив»); дигидрофосфат натрия двуводный («х.ч.») («Реахим»); ацетат аммония («Вектон»); диэтанолламин (ДЭА) («х.ч.»), «Biochem»), бензойная кислота («ч.д.а.»), «Sigma»), ацетон («ч.д.а.») («Вектон»), ацетонитрил, метанол.

Стандарты катехоламинов и их метаболитов: дофамин (**DA**), эpineфрин (**E**), норэpineфрин (**NE**), норметанефрин (**NMN**), метанефрин (**MN**), 3-метокситирамин (**MTA**) и внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин гидробромид (**DHBA**) (≥97 %, «Sigma»). Стандарты аминокислот: фенилаланин (**Phe**), тирозин (**Tyr**), триптофан (**Trp**), 3,4-дигидрокси-фенилаланин (**DOPA**) (≥98 % (ВЭЖХ), «Sigma»).

Стандартные растворы катехоламинов и аминокислот (1 мг/мл) готовили растворением соответствующих навесок в 0.1 М растворе HCl. В случае триптофана для улучшения растворимости использовалась добавка метанола (10 % об.). Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных деионизованной водой. Концентрации рабочих растворов катехоламинов и аминокислот составляли 25 мкг/мл, за исключением триптофана – 12,5 мкг/мл. При изучении возможностей он-лайн концентрирования использовали рабочие растворы с концентрациями 2.5 мкг/мл; 0.25 мкг/мл; 0.05 мкг/мл и 0.025 мкг/мл.

Для создания покрытий стенок кварцевого капилляра использовали:

1. Водную безэлектролитную суспензию наноанионита типа АВ-17х8 в ОН-форме (НИА). Матрица – сополимер стирола и 8 % (мас.) дивинилбензола. Ионообменные группы – четвертичные аммонийные. Размеры частиц 50-250 нм. Концентрация по функциональным группам – 43 мМ. Концентрация по твердой фазе – 17 г/л;
2. Водную безэлектролитную суспензию нанокатионита типа КУ- 2/Н в Н-форме (НИК). Матрица – сополимер стирола и 8 % дивинилбензола. Ионообменные группы – сульфо-группы. Размеры частиц 50-250 нм. Концентрация по функциональным группам – 15.4 мМ. Концентрация по твердой фазе – 3.3 г/л.

Данные наноразмерные модификаторы получены сотрудниками ГЕОХИ РАН по схеме, описанной в [5].

### Оборудование

Электрофоретические эксперименты проводились с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105М» со спектрофотометрическим детектором (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург). Источник света – дейтериевая лампа (190-380 нм). Охлаждение капилляра – жидкостное с

заданием и контролем температуры теплоносителя (10–50 °С). Способ ввода пробы: гидродинамический или электрокинетический. Промывка капилляра – автоматическая, под давлением (1000 или 2000 мбар). В работе использовали капилляры из плавленного кварца с внешним полиимидным покрытием (внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см). Обработка результатов электрофоретических экспериментов проводилась с помощью программного обеспечения «Эльфوران» («Люмэкс», КЭ). Снимки внутренней поверхности кварцевых капилляров были выполнены на сканирующем электронном микроскопе Zeiss Merlin.

В работе использовали: микродозаторы переменного объема вместимостью 200–1000, 10–100 и 20–200 мм<sup>3</sup>; предел допускаемой погрешности измерения не более ±5 %; лабораторный рН-метр рН 211, Hanna Instruments; аналитические весы «Sartorius» ( $d = 0.001$  мм (0.5 г)); деионизатор Д-301 (Аквилон, Россия).

### Приготовление фоновых электролитов

Для приготовления 0.3 М боратных буферных растворов рН 8.0; 9.5 и 10.0 в 45 мл деионизированной

воды растворяли 0.95 г  $H_3BO_3$  и доводили рН до требуемого значения по рН-метру с помощью 2М раствора NaOH. Затем объем доводили деионизованной водой до 50 мл в мерной колбе.

Для приготовления 50 мМ фосфатных буферных растворов рН 2.0; 2.3; 3.3 и 4.4 в 45 мл деионизованной воды растворяли 0.39 г  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , доводили 0.1 М раствором  $H_3PO_4$  до соответствующего значения рН и затем доводили объем деионизованной водой до 50 мл в мерной колбе; 50 мМ фосфатные буферные растворы со значением рН 5.4 и 6.4 готовили растворением навески 0.39 г  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  в 45 мл деионизованной воды с последующим доведением до требуемого рН 2М раствором NaOH. Далее объем доводили деионизованной водой до 50 мл.

Ацетатно-аммонийные буферные растворы разных концентраций (100; 80; 20 и 5 мМ) с различными значениями рН (2.0, 3.0 и 5.0) готовили растворением требуемой навески ацетата аммония в 90 мл деионизованной воды, доводили до нужного значения рН уксусной кислотой и затем доводили объем деионизованной водой до 100 мл.

Буферные растворы непосредственно перед проведением электрофоретических экспериментов

Таблица 1

Условия формирования одно- и двух-слойных покрытий (НИА, НИК, НИА-НИК)

Table 1

Conditions of the formation of mono- and bi-layer coatings based on NIA, NIK and NIA-NIK nanoparticles

Тип покрытия	Предварительная подготовка капилляра	Варьирование условий модификации	Контроль ЭОП	Оценка стабильности покрытия
НИА	Последовательная промывка капилляра: $H_2O$ деион. (5 мин); 0.1 М HCl (10 мин); $H_2O$ деион. (5 мин); 0.5 М NaOH (2 ч); $H_2O$ деион. (10 мин); фоновым электролитом.	1. Промывка капилляра водной суспензией НИА в концентрациях 0.05; 0.01; 0.1; <b>0.2</b> ; 0.5 мМ (по функциональным группам) в течение 5, 10, <b>15</b> , 30 и 45 мин; 2. $H_2O$ деион. (10 мин) и фоновым электролитом	Маркер ЭОП – ацетон, ФЭ: 10 мМ фосфатный фоновый электролит, рН 2; напряжение + 20 кВ/-20 кВ, детектирование прямое; 254 нм, термостатирование капилляра при 20 °С	Измерение ЭОП последовательно в ацетатных ФЭ (рН 2, 3 и 5) и ФЭ состава 10 мМ бензойной кислоты и 10, 20, 30, 40 мМ ДЭА (рН 5.0, 6.5, 8.0, 10.0); затем - в обратной последовательности
НИК	Последовательная промывка капилляра: $H_2O$ деион. (5 мин); 0.1 М HCl (10 мин); $H_2O$ деион. (5 мин); 0.5 М NaOH (30 мин.); $H_2O$ деион. (10 мин); фоновым электролитом.	1. Промывка капилляра водной суспензией НИК 0.005; 0.05; 0.1; 3.0 мМ в течение 5, 15 и 30 мин или промывка капилляра суспензией <b>0.05</b> ; 0.1; 3.0 мМ НИК <b>в 0.1 М HCl</b> в течение 5, 10 и <b>20 мин</b> . 2. $H_2O$ деион. (10 мин) и фоновым электролитом		Измерение ЭОП последовательно в фосфатных ФЭ (рН 2.3; 3.3; 4.4; 5.4; 6.4) с концентрацией 2, 20, 27 и 30 мМ; боратные ФЭ (рН 8.0 и 10.0) с концентрацией 200, 70 и 35 мМ, соответственно. ФЭ также содержали 0.005 мМ НИК
НИА-НИК	также как для НИА-покрытия	1. Промывка капилляра водной суспензией НИА <b>0.2</b> течение 5, 10, <b>15</b> , 30 и 45 мин; 2. $H_2O$ деион. (10 мин), ФЭ, проверка ЭОП, $H_2O$ деион. (10 мин) 3. Промывка капилляра водной суспензией НИК 0.005; 0.05; 0.1; <b>3.0</b> ; 5.0 мМ в течение 5, 15 и <b>20 мин</b>		Также, как для НИА-покрытия, фоновые электролиты не содержали добавок модификатора

Примечание: жирным шрифтом отмечены выбранные условия формирования покрытий.



отфильтровывали через бумажный фильтр и дегазировали на ультразвуковой бане.

### **Формирование одно- и двухслойных покрытий стенок кварцевого капилляра наноразмерными ионами (НИА, НИК, НИА-НИК). Оценка стабильности**

Процедура формирования однослойных (НИА и НИК) и двухслойных покрытий с последовательным нанесением слоев наноанионита и нанокатионита (НИА-НИК) представлены в табл. 1.

Модификация стенок кварцевого капилляра включала следующие стадии:

- подготовка капилляра;
- промывка капилляра водной суспензией модификатора определенной концентрацией в течение определенного времени;
- контроль формирования покрытия по величине ЭОПа;
- оценка стабильности покрытия по измерению ЭОПа последовательно при разных значениях pH фонового электролита (ФЭ).

В случае многослойного покрытия после формирования первого слоя (НИА) проводилась проверка полученного покрытия путем измерения ЭОП на обращенной полярности; затем - формирование следующего слоя (см. табл. 1). Для дополнительного подтверждения факта формирования покрытия, а также выявления морфологии поверхности модифицированных капилляров получены снимки внутренней поверхности с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ).

Условия электрофоретического анализа и on-line концентрирования аминокислот и катехоламинов

При выборе условий разделения катехоламинов и аминокислот на модифицированных НИК и НИА-НИК варьировались природа ФЭ (ацетатный и фосфатный буферные растворы) и его концентрация (10, 25, 50 и 75 мМ); pH ФЭ (2.0; 3.0 и 4.0). После серии предварительных экспериментов выбран 50 мМ фосфатный буферный раствор pH 2.0. В случае однослойного покрытия на основе НИК в фоновый электролит вводилась добавка (5 мкМ НИК) для обеспечения стабильности покрытия. Ввод пробы гидродинамический (2 с × 30 мбар), прямое фотометрическое детектирование (220 нм); напряжение +20 кВ; термостатирование капилляра при 20°C; концентрация триптофана – 12,5 мкг/мл, всех остальных аналитов – 25 мкг/мл.

On-line концентрирование катехоламинов и аминокислот на модифицированных НИК и НИА-НИК капиллярах:

#### **1. Стэкинг с усилением поля**

Рабочие растворы аналитов 50, 5, 0.5 и 0.25 мкг/мл гидродинамически вводили в капилляр (30 мбар × 2, 10, 15, 25, 40 с; 60 мбар × 35, 50, 60 с).

#### **2. Электростэкинг**

Рабочие растворы катехоламинов и аминокислот с концентрацией 50, 0.5, 0.25, 0.05 и 0.025 мкг/мл

вводили в капилляр электрокинетически (10 кВ × 2, 5, 10 с; 15 кВ × 2, 5, 10 с; 20 кВ × 5, 10, 15, 20 с).

## **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

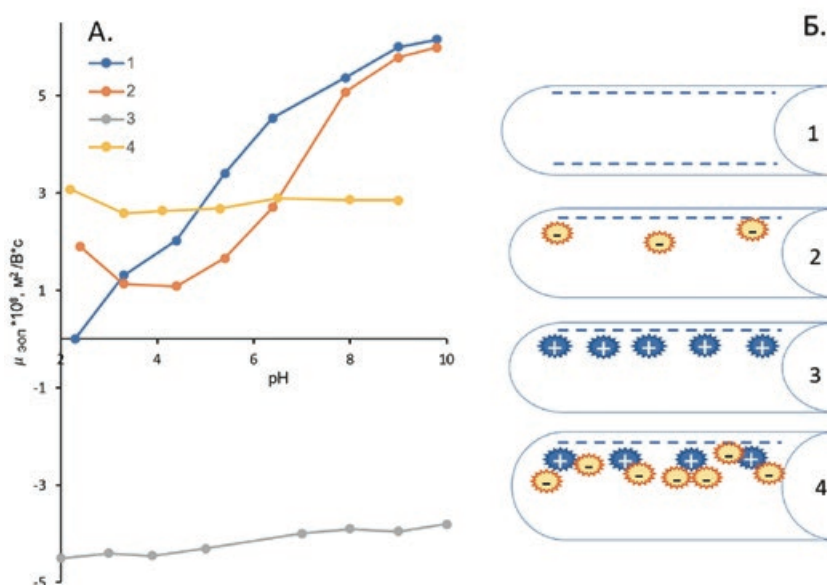
Полимерные наночастицы с ионогенными группами крайне перспективны для применения в качестве стационарной фазы с реализацией режима капиллярной электрохроматографии за счет развитой поверхности, большого количества функциональных групп и возможности совмещения с масс-спектрометрическим детектированием. Простым, экспрессным и хорошо воспроизводимым методом формирования таких покрытий является физическая адсорбция, которая, тем не менее, зачастую характеризуется низкой стабильностью сформированных покрытий. Многослойные покрытия стенок кварцевого капилляра практически лишены данного недостатка.

В настоящей работе описан экспрессный способ формирования плотной стационарной фазы наноразмерного катионита на стенках кварцевого капилляра с использованием слоя наноанионита в качестве подложки, увеличивающей адгезию НЧ к поверхности кварца. Полученные покрытия применены при анализе смесей катехоламинов и аминокислот, участвующих в их биосинтезе, что позволило разработать селективный и высокочувствительный электрофоретический метод одновременного определения указанных аналитов.

### **Формирование двухслойных «НИА-НИК» покрытий стенок кварцевого капилляра. Оценка стабильности**

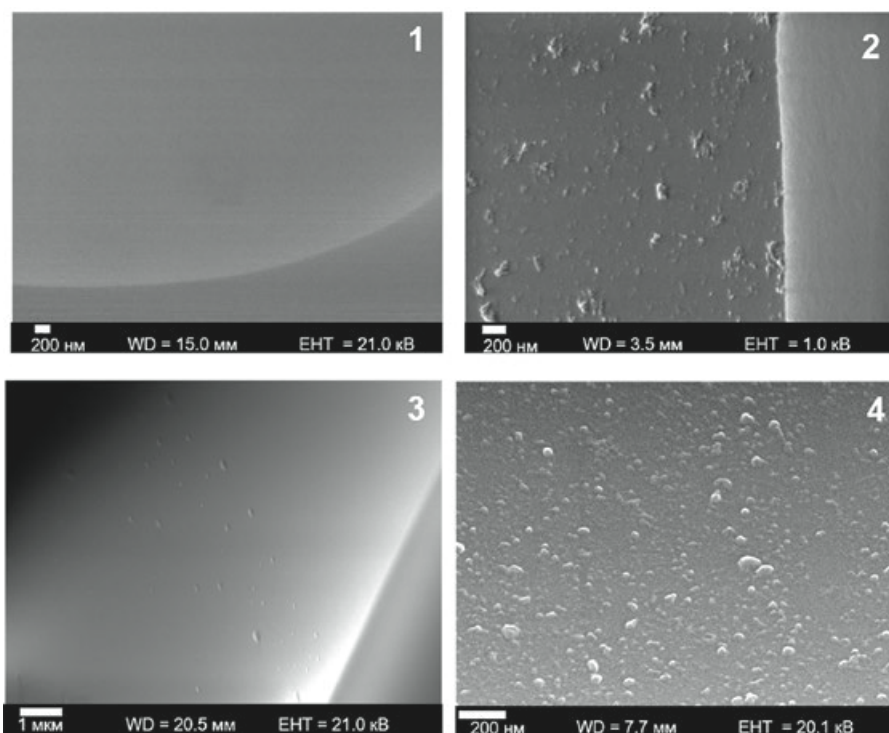
Ранее разработанные условия формирования однослойных покрытий на основе наноанионита и нанокатионита представлены в табл. 1. Модификация капилляра состояла из этапов подготовки поверхности капилляра и промывки суспензией модификатора определенной концентрации в течение определенного времени. При этом этап подготовки капилляра отличается для НИА- и НИК-покрытий. В первом случае применяется более длительная процедура травления капилляра (0.5 М раствор NaOH, 2 ч.) для улучшения адгезии положительно заряженных частиц модификатора, в то время как для НИК- время травления капилляра меньше (0.5 М раствор NaOH, 30 минут), а формирование покрытия проводится суспензией модификатора в 0.1М растворе HCl. Такие условия позволяют минимизировать влияние электростатического отталкивания одноименно заряженных поверхностей стенок кварцевого капилляра и частиц наноанионита при формировании покрытия.

Для разработки двухслойного покрытия необходимо было подобрать условия формирования как первого слоя – наноанионита, так и последующего – нанокатионита. Для первого слоя модификатора основным требованием являлась прочность и вы-



**Рис. 1. А.** Зависимость скорости ЭОП от величины рН на: (1) немодифицированном капилляре; (2) покрытии на основе НИК; (3) покрытии на основе НИА; (4) двухслойном покрытии НИА-НИК. В случае покрытия, модифицированного НИК, фоновый электролит содержал 0.005 мМ НИК. Детектирование: прямое, 220нм. Ввод пробы гидродинамический 2 с × 30 мбар; +20 кВ/-20 кВ. **Б.** Схематическое изображение: (1) немодифицированной поверхности капилляра; (2) модифицированной НИК; (3) модифицированной НИА; (4) двухслойном покрытии НИА-НИК.

**Fig. 1. A.** Dependence of EOF on pH when using: (1) uncoated capillary; (2) NIK -modified capillary; (3) NIA-modified capillary; (4) bilayer NIA-NIK-modified capillary. In case of NIK-modified capillary, the background electrolytes contained 0.005 mM of NIK additive. Direct detection at 220 nm. Hydrodynamic sample injection 2 s × 30 mbar; +20 kV/-20 kV. **Б.** Schematic image of: (1) uncoated capillary; (2) NIK -modified capillary; (3) NIA-modified capillary; (4) bilayer NIA-NIK-modified capillary.



**Рис. 2.** СЭМ-снимки внутренней поверхности кварцевого капилляра: (1) – немодифицированный; (2) – модифицированный НИА; (3) – модифицированный НИК; (4) – капилляр с двухслойным покрытием НИА-НИК.

**Fig. 2.** SEM-images of the internal capillary surface: (1) uncoated capillary; (2) NIA–modified capillary; (3) NIK-modified capillary; (4) bilayer NIA-NIK-modified capillary.

сокая плотность покрытия с целью максимальной блокировки силанольных групп капилляра с участием модификатора. В случае второго слоя первостепенным фактором являлось обеспечение максимальной насыщенности покрытия наночастицами, а именно, полное экранирование положительно заряженных групп первого слоя модификатора (НИА) отрицательно заряженными частицами нанокатионита (НИК). Схематичное изображение модифицированной наноанионитами и немодифицированной поверхности капилляра приведено на рис. 1Б.

При формировании первого слоя выбран апробированный ранее вариант промывки кварцевого капилляра 0.2 мМ раствором НИА [6]. Данное покрытие обладает высокой устойчивостью в диапазоне рН 2-10, при этом промывка капилляра более высокой концентрацией модификатора уже не влияла на величину ЭОП, что явилось подтверждением максимальной плотности наноанионита на поверхности капилляра. Это, в свою очередь, обеспечило и максимальный положительный заряд на поверхности сформированного покрытия.

При выборе условий формирования второго слоя варьировали концентрацию раствора НИК и время промывки кварцевого капилляра (табл. 1). Контроль насыщенности поверхности капилляра слоем нанокатионита проводился по величине и направлению ЭОП. После формирования второго слоя модификатора происходила повторная перезарядка поверхности капилляра (с положительного за счет слоя НИК на отрицательный заряд НИА-НИК). Таким образом, найденные условия модифицирования, позволяющие достичь максимального насыщения поверхности капилляра нанокатионитом следующие: концентрация модификатора – 3 мМ по функциональным группам; время промывки капилляра 20 мин.

На сформированном двухслойном покрытии изучена зависимость величины ЭОП от значения рН фонового электролита. Результаты сопоставлены с аналогичной зависимостью для однослойных покрытий. Из рис. 1А видно, что для однослойного

покрытия на основе наноанионита величина ЭОП не зависит от рН, что указывает на высокую плотность сформированного покрытия и фактически полное экранирование остаточных силанольных групп на поверхности капилляра. В случае однослойного покрытия на основе НИК заряд поверхности зависел от рН фонового электролита, что указывало на неплотное сформированное покрытие.

Справедливость подобного заключения подтверждена снимками СЭМ внутренней поверхности капилляра, демонстрирующими различную плотность покрытий на основе НИА и НИК (рис. 2.2 и 2.3, соответственно).

При этом, в случае двухслойного покрытия, где роль внешнего слоя выполняет нанокатионит, наблюдался независимый от рН катодный ЭОП: плотный первый слой на основе наночастиц (НИА) блокирует большую часть силанольных групп; второй слой (НИК) характеризуется также высокой плотностью и экранированием положительно заряженных терминальных групп первого модификатора собственными отрицательно заряженными сульфогруппами (рис. 2.4).

В отличие от однослойного покрытия на основе НИК, двухслойное отличается высокой стабильностью и не требует наличия модификатора в составе ФЭ. Показано, что возможно проводить до 120 анализов без обновления покрытия: СКО времен миграции аналитов на НИА-НИК покрытии < 2 % ( $n = 120$ ), СКО площадей пиков аналитов < 1.5 % ( $n = 120$ ).

Проведено сопоставление основных характеристик стационарных фаз на основе наноионитов с внешним отрицательно-заряженным слоем: однослойное НИК-покрытие, двухслойное покрытие НИК-НИК. Однослойные покрытия отличаются экспрессностью формирования (20-минутная промывка капилляра суспензией наночастиц в 0.1 М растворе HCl) и меньшей концентрацией модификатора, необходимой для создания покрытия (0.05 мМ по функциональным группам). Однако в случае двухслойного покрытия не требуется наличие модификатора в составе ФЭ для поддержания воспроизводимости времен миграции

**Таблица 2**

Сопоставление основных характеристик стационарных фаз на основе наноионитов: однослойные НИА- и НИК- и двухслойное покрытие НИА-НИК

**Table 2**

Main characteristics of the stationary phases based on nano-sized ion-exchangers: monolayer coatings (NIA- and NIK-) and bilayer coating (NIA-NIK)

	НИА	НИК	НИА-НИК
Требуемое время модификации	15 мин	20 мин	35 мин
Концентрация наночастиц для модификации (по функц. группам)	0.2 мМ	0.05 мМ	0.2 мМ НИА и 3.0 мМ НИК
Наличие модификатора в ФЭ	Не требуется	Требуется (0.005 мМ)	Не требуется
Диапазон возможных рН ФЭ	2 - 10	2 – 8	2 – 10
СКО <sub>эоп</sub> , % ( $n = 100$ ) на одном капилляре	1.5	3.1	2.0
СКО <sub>эоп</sub> , % ( $n = 3$ ) от капилляра к капилляру	5.0	4.0	3.5

аналитов. Кроме того, рабочий диапазон pH фонового электролита выше (pH = 2-10) по сравнению с однослойным покрытием (pH = 2-8). Это связано с большей стабильностью связующего покрытия на основе наноанионита, а также с сильными электростатическими взаимодействиями, вносящими основной вклад в формирование второго слоя модификатора.

В табл. 2 приведены основные сравнительные характеристики одно- и двухслойных покрытий, полученных на основе наноразмерных ионитов.

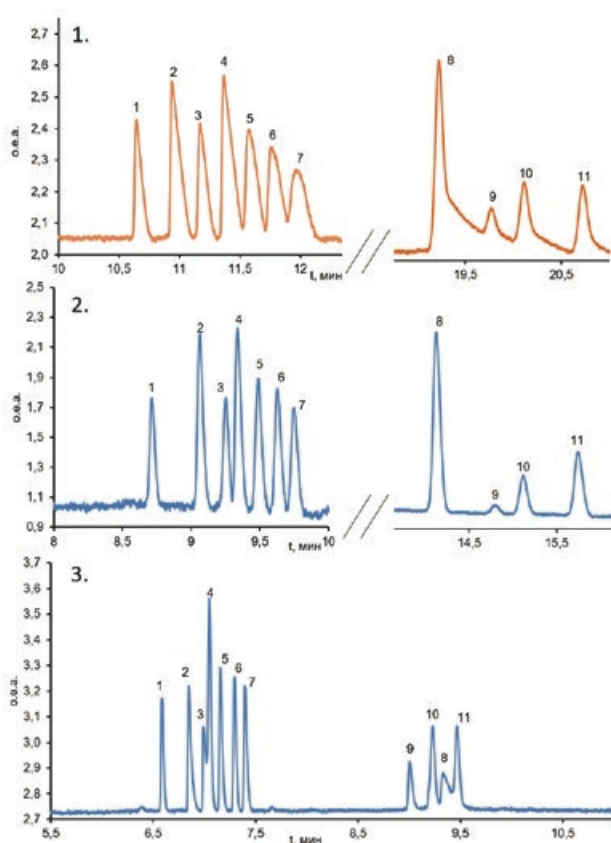
### Применение «НИА-НИК»-модифицированных капилляров для разделения и концентрирования катехоламинов и их метаболитов

В качестве модельных систем для выявления возможностей применения одно- и двухслойных покрытий с отрицательно-заряженным внешним слоем (НИК и НИА-НИК, соответственно), выбраны катехоламины (DA, MTA, NE, NMN, E, MN и DHBA

в качестве внутреннего стандарта), и участвующие в их биосинтезе аминокислоты (Trp, Tyr, Phe, DOPA). Определение основных катехоламинов осложняется их сорбцией на стенках капилляра, что приводит к низкой эффективностью при их электрофоретическом определении (рис. 3.1). При поиске условий необходимо учитывать, что данные аналиты находятся в ионной форме только ниже значений pH 8.5, а при pH фонового электролита больше 7 они претерпевают окисление.

Ранее показано, что электрофоретический анализ на модифицированных НИК капиллярах позволяет значительно улучшить форму пиков (рис. 3.2) и разделять катехоламины и аминокислоты с высокой эффективностью и селективностью разделения ( $N = 480 - 520$  тыс. т.т./м,  $R_s = 0.9-2.2$  и  $N = 330 - 350$  тыс. т.т./м,  $R_s = 0.9 - 2.0$ , соответственно) [7].

Определение катехоламинов и аминокислот в аналогичных условиях на НИА-НИК двухслойном покрытии характеризуются высокими значениями параметров эффективности и селективности ( $N = 450 - 720$  тыс. т.т./м;  $\alpha = 1.02-1.03$  для катехоламинов;



**Рис. 3.** Электрофореграммы модельной смеси катехоламинов и аминокислот на (1) непокрытом капилляре, (2) однослойной покрытии НИК и (3) двухслойном НИА-НИК покрытии. 1 – DHBA, 2 – DA, 3 – MTA, 4 – NE, 5 – NMN, 6 – E, 7 – MN, 8 – Trp, 9 – Tyr, 10 – Phe, 11 – DOPA (Trp (1,2) – 12.5 мкг/мл, Trp (3) – 6.0 мкг/мл, остальные – 25.0 мкг/мл). Фоновый электролит: 50 мМ фосфатный буферный раствор pH 2. Детектирование: прямое, 220 нм. Ввод пробы гидродинамический 2с × 30 мбар; +20 кВ.

**Fig. 3.** Electrophoregrams of catecholamines and amino acids on (1) uncoated capillary, (2) NIA-modified capillary and (3) bilayer NIA-NIK-modified capillary. 1 – DHBA, 2 – DA, 3 – MTA, 4 – NE, 5 – NMN, 6 – E, 7 – MN, 8 – Trp, 9 – Tyr, 10 – Phe, 11 – DOPA (Trp (1,2) – 12.5 μg/mL, Trp (3) – 6.0 μg/mL, the others – 25.0 μg/mL). Background electrolyte: 50 mM phosphate buffer solution pH 2. Direct UV-detection at 220 nm. Hydrodynamic sample injection 2 s × 30 mbar, +20 kV.



$N = 400 - 520$  тыс т.т./м;  $\alpha = 1.01-1.03$  для аминокислот). Кроме того, отмечено заметное снижение времени электрофоретического определения аналитов по сравнению с НИК-модифицированным и немодифицированным капилляром, что связано с большей величиной катодного ЭОП, сонаправленного с миграцией аналитов (рис. 3). Однако большое количество противоположно заряженных групп на поверхности капилляра негативно сказалось на форме пиков наиболее основных аналитов – Трп ( $N = 140$  т.т./м) и МТА ( $N = 400$  т.т./м) и привело к снижению селективности разделения в таких парах аналитов как МТА/NE и Трп/DOPA.

Увеличение концентрации наночастиц на поверхности капилляра в наибольшей степени влияет на миграционные характеристики триптофана. В случае однослойного покрытия с концентрацией НИК в фоновом электролите 5 мкМ триптофан мигрировал первым из всех исследуемых аминокислот. На двухслойном покрытии, наоборот, триптофан мигрирует предпоследним и при этом его зона значительно уширена. Подобный результат также указывает на значительно большую плотность НЧ на двухслойном покрытии, чем на однослойном.

Таким образом, большая плотность частиц НИА приводит к снижению эффективности сильно

основных аналитов, что указывает на ограничения использования такого покрытия для их разделения. Тем не менее формируемые комбинированные покрытия НИА-НИК демонстрируют большую стабильность по сравнению с однослойным покрытием на основе НИК и гарантируют высокую эффективность разделения катехоламинов и аминокислот.

На модифицированных наноионитами капиллярах опробованы различные варианты он-лайн концентрирования, наиболее эффективными из которых оказались стэкинг с усилением поля и электростэкинг. В табл. 3 (приведены пределы обнаружения и факторы концентрирования для катехоламинов и аминокислот, достигнутые с использованием однослойного покрытия на основе НИК и двухслойного покрытия НИА-НИК).

В случае стандартного гидродинамического ввода пробы ПО катехоламинов и аминокислот имеют близкие значения для одно- и двухслойного покрытия. При этом для двухслойного покрытия ПО незначительно больше, что вероятно связано и с большей концентрацией наночастиц на поверхности капилляра и рассеиванием ими света в области детектирования. Это приводит к снижению чувствительности определения аналитов. Кроме того, пределы обнаружения Трп и МТА выше в случае

**Таблица 3**

Сопоставление аналитических характеристик различных вариантов он-лайн концентрирования с использованием НИК и НИА-НИК модифицированных капилляров

**Table 3**

Analytical characteristics of the various on-line concentration techniques on the NIK- and NIA-NIK-modified capillaries

	Он-лайн концентрирование	Характеристики, ввод пробы	Аналиты				
			Катехоламины*	Аминокислоты**			
				Трп	Phe	Tyr	DOPA
Однослойное покрытие НИК [8]	– проба в ФЭ	ПО, нг/мл 2 с × 30 мбар	2900-3200	1300	9600	3900	3500
	Стэкинг с усилением поля	ПО, нг/мл *35 с × 60 мбар **50 с × 60 мбар	68-72	72	630	250	230
		SEF <sub>h</sub>	42-46	15	15	15	15
	– проба в ФЭ	ПО, нг/мл 2 с × 15 кВ	1700-2000	1300	9600	3800	3500
	Электростэкинг	ПО, нг/мл *6 с × 20 кВ **15 с × 20 кВ	6-7	80	500	260	210
SEF <sub>h</sub>		250-290	16	19	15	18	
Двухслойное покрытие НИА-НИК	– проба в ФЭ	ПО, нг/мл 2 с × 30 мбар	3200-3300 (MTA - 4000)	3559	10700	4460	3680
	Стэкинг с усилением поля	ПО, нг/мл 35 с × 60 мбар	89-97 (MTA - 670)	385	890	318	306
		SEF <sub>h</sub>	32-34	8	12	14	12
	– проба в ФЭ	ПО, нг/мл 2 с × 15 кВ	1300-1500 (MTA - 2000)	4550	7280	2900	2850
	Электростэкинг	ПО, нг/мл *25 с × 20 кВ **15 с × 20 кВ	3-4 (MTA - 9)	50	100	55	40
SEF <sub>h</sub>		430-500	90	72	52	71	

**Примечание:** SEF<sub>h</sub> (фактор концентрирования) =  $h_2/h_1 \times \Delta$ , где  $h_1$  – высота пика при стандартном вводе пробы,  $h_2$  – высота пика при концентрировании,  $\Delta$  - фактор разбавления.

двухслойного покрытия, что связано с меньшей эффективностью при их определении (табл. 2) за счет более сильного взаимодействия с нанокатионом на поверхности капилляра.

Стэкинг с усилением поля оказался также более эффективным для однослойного покрытия: достигнутые факторы концентрирования ( $SEF_n$ ) в 1.3 раза меньше для НИА-НИК модифицированного капилляра. Для двухслойного покрытия увеличения объема вводимой пробы сопровождалось размыванием и перекрыванием зон аналитов. Причиной этого может быть большая концентрация активных центров на поверхности капилляра и более сильное взаимодействие аналитов с модификатором.

Противоположная ситуация наблюдалась в случае электростэкинга. ПО для стандартного электрокинетического ввода пробы в случае двухслойного покрытия ниже, чем для НИК-модифицированного капилляра. Более того, в результате электростэкинга удалось снизить пределы обнаружения катехоламинов и аминокислот в 2-8 раз для двухслойного покрытия по сравнению с однослойным. Основное отличие примененных техник концентрирования в том, что в случае электростэкинга в капилляр вводятся молекулы, имеющие ненулевую электрофоретическую подвижность, концентрируясь также как и в случае стэкинга с усилением поля в процессе торможения аналитов на границе зон с низкой и высокой проводимостью. При этом матрица пробы в капилляр не вводится.

В случае двухслойного НИА-НИК покрытия, характеризующегося большим количеством функциональных сульфогрупп на поверхности капилляра, к общему механизму концентрирования, присущему электростэкингу, добавляется концентрирование за счет взаимодействия аналита с функциональными центрами поверхности капилляра. Следует отметить, что в случае электростэкинга не происходит размывания зон аналитов, поскольку большое количество ко-ионов фонового электролита способствуют элюированию в процессе электрофоретического анализа сконцентрированных на поверхности аналитов. В то время как стэкинг с усилением поля сопровождается введением большого количества низкопроводящей матрицы пробы, которая, в отличие от ФЭ, не способна составить конкуренцию аналитам за адсорбцию на ионообменных центрах модификатора. Это отрицательно сказывается и на форме пиков, и приводит к меньшим факторам концентрирования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследованы возможности формирования двухслойных покрытий на основе противоположно заряженных наноразмерных ионитов с внешним слоем нанокатионита: оптимизированы условия нанесения слоев на внутреннюю поверхность кварцевого капилляра, проведена оценка стабильности полученного покрытия. Показано, что двухслойное покрытие отличается от однослойного на основе НИК высокой стабильностью в широком диапазоне pH (2-10), отсутствием необходимости присутствия модификатора в ФЭ и возможностью проведения до 120 циклов анализа с высокой воспроизводимостью времен миграции аналитов без обновления. Возможности НИА-НИК покрытия апробированы при разделении и концентрировании катехоламинов и аминокислот в режиме КЭХ. Достигнуты высокие значения эффективности ( $N = 450 - 720$  тыс т.т./м и  $N = 400 - 520$  тыс т.т./м для катехоламинов и аминокислот, соответственно). Показано, что высокая концентрация отрицательно заряженных ионогенных групп на поверхности капилляра способствует увеличению степеней концентрирования, достигаемых в результате электростэкинга, что позволило снизить пределы обнаружения аналитов в 2-4 раза по сравнению с однослойным НИК-покрытием.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-73-00211, <https://rscf.ru/project/21-73-00211>. Эксперименты проведены с использованием оборудования Междисциплинарного ресурсного центра по направлению «Нанотехнологии», Научный парк СПбГУ.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Current work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 21-73-00211, <https://rscf.ru/project/21-73-00211>). The authors are grateful for the assistance of the Interdisciplinary Resource Center for Nanotechnology of Saint Petersburg State University.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography / W. Hu [et al.] // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 61. P. 29-39.
2. Nanoparticle: Is it promising in capillary electrophoresis? / Z. Zhang [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. P. 925-927.
3. Nilsson C., Birnbaum S., Nilsson S. Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography // *J. Chrom. A.* 2007. V. 1168. P.212-224.
4. Kartsova L.A., Makeeva D.V., Davankov V.A. Nanosized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 120. 115656.
5. Получение, свойства и применение коллоидных растворов наноразмерных ионитов / А.М. Долгонос

[и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т.16, №4. С.400-414.

6. Makeeva D.V., Karsova L.A., Polikarpova D.A. Nanorазмерные иониты – стационарные фазы для капиллярной электрохроматографии // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22, № 3. С. 273-283.

7. Nano-sized cation exchanger for the electrophoretic separation and preconcentration of catecholamines and amino acids / D. Polikarpova [et al.] // *Electrophoresis*. 2020. V. 41. P. 1031-1038

8. Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis / L. Leclercq [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1057. P. 152-161.

9. Development of a fast method for simultaneous determination of hippuric acid, mandelic acid, and creatinine in urine by capillary zone electrophoresis using polymer multilayer-coated capillary / L. Vitali [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 409. P. 1943–1950.

10. Layer-by-layer self-assembly of gold nanoparticles/thiols  $\beta$ -cyclodextrin coating as the stationary phase for enhanced chiral differentiation in open tubular capillary electrochromatography / L. Fang L. [et al.] // *Talanta*. 2017. V. 167. P. 158–165.

11. Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L. Multifunction covalent coatings for separation of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography // *Sep. Sci. plus*. 2020. V. 3. P. 1-10.

12. Capillary electrophoretic separation of biologically active amines and acids using nanoparticle-coated capillaries / Y. Huang [et al.] // *Electrophoresis*. 2008. V. 29. P. 1942-1951.

13. Zhang S., Macka M., Haddad P. Preparation and characterisation of duallayer latex-coated columns for open-tubular capillary electrochromatographic preconcentration of cations combined in-line with their separation by capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. P. 1069-1077.

14. Preparation and characterisation of anion-exchange latex-coated silica monoliths for capillary electrochromatography / J.P. Hutchinson [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1109. P. 10-18.

## REFERENCES

1. Hu W., Hong T., Ga X., Ji Y. Applications of nanoparticle-modified stationary phases in capillary electrochromatography. *Trends Anal. Chem.*, 2014, vol. 61, pp. 29-39. DOI: 10.1016/j.trac.2014.05.011.

2. Zhang Z., Yan B., Liao Y., Liu H. Nanoparticle: Is it promising in capillary electrophoresis?, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, vol. 391, pp. 925-927. DOI: 10.1007/s00216-008-1930-2.

3. Nilsson C., Birnbaum S., Nilsson S. Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography, *J. Chrom. A*. 2007, vol. 1168, pp. 212-224. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.07.018.

4. Kartsova L.A., Makeeva D.V., Davankov V.A. Nano-sized polymer and polymer-coated particles in electrokinetic separations, *Trends Anal. Chem.* 2019, vol. 120, 115656. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115656.

5. Dolgonosov A., Khamizov R., Kolotilina N., Shayhina S., Yevstigneyeva P. Preparation, properties and application of the colloid solutions of nano-sized ion-exchangers. *Sorption and chromatography processes*, 2016, vol. 16, no.4, pp.400-414.

6. Makeeva D.V., Kartsova L.A., Polikarpova D.A. Nano-sized ion exchangers – stationary phases in capillary electrochromatography. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 3, pp. 273–283. DOI: 10.15826/analitika.2018.22.3.006 (In Russian).

7. Polikarpova D., Makeeva D., Kolotilina N., Dolgonosov A., Peshkova M., Kartsova L., Nano-sized cation exchanger for the electrophoretic separation and preconcentration of catecholamines and amino acids, *Electrophoresis*, 2020, vol. 41, pp. 1031-1038. DOI: 10.1002/elps.201900416.

8. Leclercq L., Morvan M., Koch J., Neusub C., Cottet H., Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis. *Analyt. Chim. Acta*, 2019, vol. 1057, pp. 152-161. DOI: 10.1016/j.aca.2019.01.008.

9. Vitali L., Gonçalves S., Rodrigues V., Fávère V.T., Micke G.A., Development of a fast method for simultaneous determination of hippuric acid, mandelic acid, and creatinine in urine by capillary zone electrophoresis using polymer multilayer-coated capillary. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, vol. 409 (7), pp. 1943–1950. DOI: 10.1007/s00216-016-0142-4.

10. Fang L., Wang P., Wen X., Guo X., Luo L., Yu J., Guo X. Layer-by-layer self-assembly of gold nanoparticles/thiols  $\beta$ -cyclodextrin coating as the stationary phase for enhanced chiral differentiation in open tubular capillary electrochromatography. *Talanta*, 2017, vol. 167, pp.158–165. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.082.

11. Kravchenko A., Kolobova E., Kartsova L., Multifunction covalent coatings for separation of amino acids, biogenic amines, steroid hormones, and ketoprofen enantiomers by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Sep Sci plus*, 2020, vol. 3(4), pp.1–10. DOI: 10.1002/sscp.201900098

12. Huang Y., Chiang C., Lin Y., Liu K., Hu C., Bair M., Chang H., Capillary electrophoretic separation of biologically active amines and acids using nanoparticle-coated capillaries. *Electrophoresis*, 2008, vol. 29, pp. 1942-1951. DOI: 10.1002/elps.200700534.

13. Zhang S., Macka M., Haddad P., Preparation and characterization of duallayer latex-coated columns for open-tubular capillary electrochromatographic preconcentration of cations combined in-line with their separation by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, pp. 1069-1077. DOI: 10.1002/elps.200500674.

14. Hutchinson J.P., Hilder E.F., Macka M., Avdalovic N., Haddad P.R. Preparation and characterization of anion-exchange latex-coated silica monoliths for capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1109, pp. 10-18. DOI:10.1021/ac9806456.