

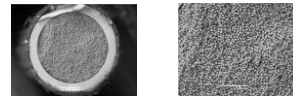
Monolity v separačních technikách

Dana Moravcová
Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Brno

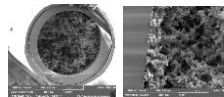
??? monolitické materiály

- Alternativa k náplňovým kolonám

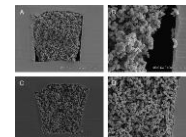
Kolona plněná 5 μm částicemi



- Charakteristická struktura
- zcela zaplňuje vnitřek separačního prostoru



Silikagelový monolit



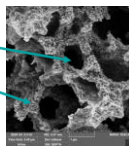
Monolit v čipu - (A, B) - nemodifikovaná a (C, D) modifikovaná stěna čipu.

D. A. Mair, Lab. Chip 9 (2009) 877-88.

Charakterizace monolitických materiálů

- Monolit - porézní materiál - bimodální distribuce pórů

- Makropóry > 50 nm, průtokové póry
- Mezopóry 2-50 nm, plocha pórů
- Mikropóry < 2 nm



- Materiálové inženýrství

- Průměrná velikost pórů - rtuťová porozimetrie
- Specifický povrch - adsorpční/desorpční izoterma dusíku
- Infračervená spektroskopie - přítomnost funkčních skupin

- Elementární analýza
- Fotografie - elektronový mikroskop

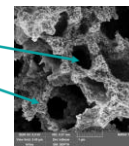
- Chromatografie

- Permeabilita, porozita
- Účinnost
- Selektivita
- Doba analýzy

Charakterizace monolitických materiálů

- Monolit - porézní materiál - bimodální distribuce pórů

- Makropóry > 50 nm, průtokové póry
- Mezopóry 2-50 nm, plocha pórů
- Mikropóry < 2 nm



- Permeabilita kolony

- Kozeny-Carmanova rovnice

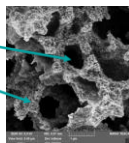
$$K_f = \frac{F \cdot \eta \cdot L}{\Delta p \cdot \pi \cdot r^2} \quad d_p = (1 - \epsilon_0) \sqrt{\frac{180 K_f}{\epsilon_0^3}} \quad d_p = \sqrt{1000 \cdot K_f} \quad (ODS, \epsilon_0 \approx 0.4)$$

F_m - objemový průtok mobilní fáze kolonou, η - viskozita mobilní fáze, Δp - tlak na koloně, L - délka kolony, ϵ_0 - mezičásticová (průtoková) porozita, r - poloměr kolony, d_p - průměr zdnívané částice kolony

Charakterizace monolitických materiálů

- Monolit - porézní materiál - bimodální distribuce pórů

- Makropóry > 50 nm, průtokové póry
- Mezopóry 2-50 nm, plocha pórů
- Mikropóry < 2 nm



- Porozita

- Celková porozita $\epsilon_T = \frac{V_{T0}}{V_C}$

- Mezičásticová porozita (makropóry) $\epsilon_0 = \frac{V_0}{V_C}$

- Vnitřní porozita (mezopóry) $\epsilon_i = \frac{V_{T0} - V_0}{V_C} = \epsilon_T - \epsilon_0$

V_{T0} - mrtvý objem kolony (toluen - ISEC), V_0 - eluční objem polystyrenového standardu s nejvyšší molekulovou hmotností, V_C - geometrický objem kolony.

Účinnost kolony, retenční faktory

- Účinnost kolony
- počet teoretických pater (n)

$$n = 5.545 \cdot \left(\frac{t_{R,j}}{W_{1/2,j}} \right)^2$$

- N - počet teoretických pater na metr kolony

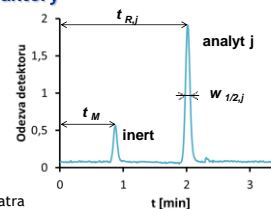
- Výškový ekvivalent teoretického patra

$$H = \frac{N}{l}$$

l - délka kolony

- Retenční faktor k


$$k = \frac{t_{R,j} - t_M}{t_M}$$



Historie

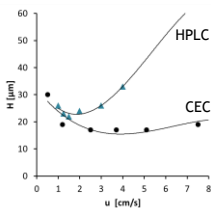
- 1967 - separace proteinů na koloně plněné poly(etylen glykol metakrylátem) - elastický gel - gelová filtrace, malá průchodnost gelu a nízká účinnost (M. Kubín).
- 70. léta - kolony obsahující polyuretanové pěny - použití v GC a LC, nedosahují kvalit v té době používaných chromatografických médií (W. D. Ross, R. E. Sievers).
- 80. léta - stlačené hydrofilní polyakrylamidové gely - separace proteinů - iontová výměna (Hjertén).
- 90. léta - makroporézní rigidní monolitické materiály na bázi metakrylátů a polystyren-divinybenzenu (F. Švec, J. M. J. Fréchet) - separace proteinů; monolitické kolony na bázi silikagetu (K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka).

Současnost

- Techniky - HPLC, CEC, GC, mikrofluidní systémy, extrakce, enzymové reaktory, heterogenní katalýza
 - Separční módy - RP, IEC, NP, HILIC, chirální separace, bioafinitní chromatografie
 - Stlačené hydrofilní gely (UNO, BioRad)
 - Kolony (Chromolith, Merck; Monoliths, LC Packings; Swift, ISCO)
 - Polymerní makroporézní disky, tubulární kolony (CIM Disk, CIM Tube, BIA Separations)
- 
- 12 mm x 3 mm
- Kapiláry - C18-silikagel (Merck, Phenomenex), PS-DVB (Thermo Fisher Scientific)

Kolony pro kapilární separační techniky

- cLC - laminární tok
- CEC - elektroosmotický tok



- Monolity účinnost
- 10 000-40 000 ptp/m v LC
- přes 100 000 ptp/m v CEC

Kolony pro kapilární separační techniky

- Náplňové
 - Silikagelové částice; modifikace
- Monolitické
 - Anorganické monolity
 - Modifikovaný silikagel
 - TiO₂, ZrO₂, HfO₂
 - Polymerní monolity
 - Vodné prostředí
 - Stlačené hydrofilní gely (akrylamid)
 - Hydrofilní gely (akrylamid)
 - Prostředí organického rozpouštědla
 - Polystyrenové monolity
 - Akrylátové a metakrylátové monolity

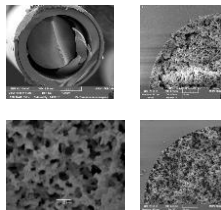
Ideální monolitický sorbent - rigidní materiál, vhodné chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti, permanentní porozita, stabilní v suchém stavu, odolává vysokým a nízkým hodnotám pH.

Monolitické materiály

- Silikagelové monolity

- Tetraalkoxysilan - tetramethoxysilan
- Polyetylenoxid (Mr 10 000)
- Kyselina octová

- Hydrolyza
 - $\equiv\text{Si-OR} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \equiv\text{Si-OH} + \text{ROH}$
 - Kondenzace alkoholu
 - $\equiv\text{Si-OH} + \text{RO-Si}\equiv \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}\equiv + \text{ROH}$
 - Kondenzace vody
 - $\equiv\text{Si-OH} + \text{HO-Si}\equiv \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}\equiv + \text{H}_2\text{O}$



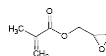
Silikagelový monolit

Několik kroků přípravy - polymerace, promývání, sušení, kalcinace + modifikace na požadovanou stacionární fázi.

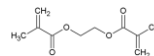
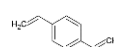
Monolitické materiály

- Polymerní monolity
 - Monomery (styren; GMA, BMA, LMA)
 - Síťovací činidlo (divinybenzen; EDMA)
 - Porogen (organická rozpouštědla)
 - Iniciátor polymerace - termální (AIBN) x UV (AIBN, 2,2-dimetoxy-2-fenylacetofenon)

Monomery



Síťovací činidlo

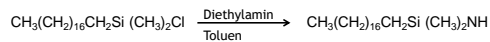


Monolitické stacionární fáze - příprava

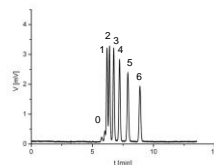
- Modifikace základního monolitu - morfologie kolony zachována
 - Chemická modifikace - derivatizace funkčních skupin na povrchu monolitu
 - „Grafting“ - na povrch monolitu se radikálovou polymerací navazují řetězce funkčních monomerů
 - Imobilizace nanoobjektů - ovlivnění selektivity, zvýšení povrchu stacionární fáze
- Použití vhodného prekurzoru pro přípravu monolitu - „one pot“
 - Optimalizace složení směsi a podmínek přípravy

Modifikace monolitu - chemická

- C18 - silikagelový monolit



Dimethyl-octadecylchlorosilane



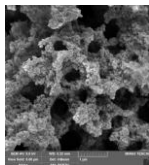
Izokratická separace alkybenzenů (benzen - hexylbenzen, n = 0-6).
 Mobilní fáze 80% ACN/voda, Fc 500 nl/min,
 UV detekce 254 nm.
 Kolona: silikagelový monolit - C18 (150 x 0,1mm).

Modifikace monolitu - „grafting“

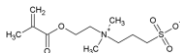
- HILIC - A. J. Alpert, J. Chromatogr. A 499 (1990) 177.
 - Mobilní fáze: 40-97% ACN - voda nebo pufr.
 - Separace vysoce polárních látek - léčiva, peptidy, karbohydráty, nukleové báze, nukleosidy, nukleotidy, atd.

Příprava kolony

- monolitická silika - tetramethoxysilan, PEG 10 000, močovina, kyselina octová.
- modifikace 3-trimethoxysilylpropyl methakrylátem
- modifikace [2-(methacryloyloxy)ethyl]-dimethyl-(3-sulfopropyl)-hydroxidem amonným - polymerace, 80°C, 3 hod.

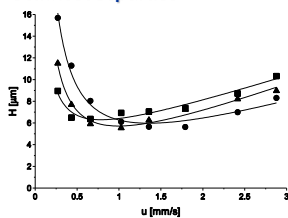


Připravená stacionární fáze.



D. Moravcová et al., J. Chromatogr. A 1270 (2012) 178- 185.

Účinnost separace



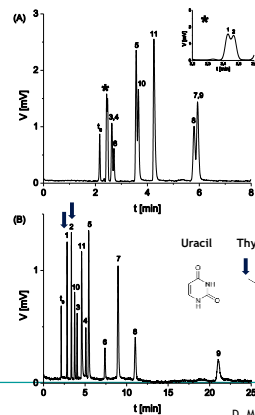
H-u křivka - monolitická kapilární kolona (150 mm x 0.1 mm).
 Mobilní fáze: 90% (v/v) ACN/ 10% 5mM octan amonný pH=6;
 detekce UV 210 nm.

- - toluen
- - uracil
- ▲ - cytosin

Látka	H [µm]	N [tp/m]	k	u [mm/s]
Toluén	5.7	175 500	---	1.5
Uracil	6.4	156 000	0.29	0.7
Cytosin	5.5	182 000	1.01	1.0

Tabulka 1: Separační účinnost monolitické kapilární kolony.

D. Moravcová et al., J. Chromatogr. A 1270 (2012) 178- 185.



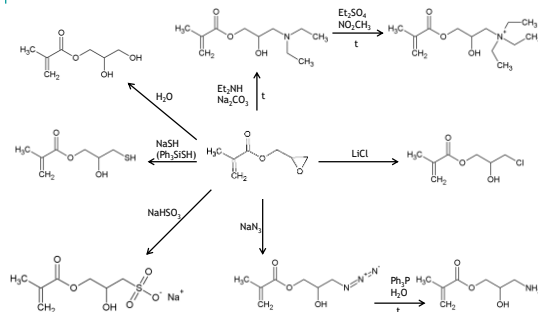
Porovnání HILIC separace nukleových bází, nukleosidů a deoxynukleosidů na silikagelové (A) a modifikované (B) kapilární koloně.

Mobilní fáze: 95% (v/v) ACN/ 50 mM mravenčan amonný, pH = 4.5, Fc = 0.5 µl/min; detekce UV 210 nm.

- Látky:
 toluén (t₀)
 (1) Thymin
 (2) Uracil
 (3) 2-Deoxyuridin
 (4) 5-Methyluridin
 (5) Adenosin
 (6) Uridin
 (7) Cytosin
 (8) 2-Deoxycytidin
 (9) Cytidin
 (10) 2-Deoxyadenosin
 (11) Adenin

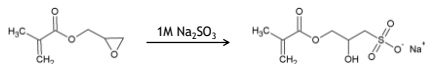
D. Moravcová et al., J. Chromatogr. A 1270 (2012) 178- 185.

Modifikace monolitu - chemická



Modifikace monolitu - chemická

- Iontové výměnná chromatografie - poly(GMA-EDMA) monolit

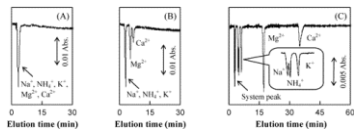


Kapacita kolony

5,5 µequiv/mL

25,4 µequiv/mL

151 µequiv/mL

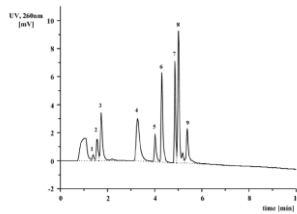
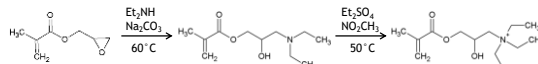


Separace kationtů
Kolona 150 x 0,25 mm;
mobilní fáze 10 mM CuSO₄;
Fc 3 µL/min;
nepřímá UV detekce 210 nm.

Y. Ueki et al., Anal. Chem., 2004, 76 (23), pp 7007-7012.

Modifikace monolitu - chemická

- Iontové výměnná chromatografie - poly(GMA-DVB) monolit



Separace nukleotidů

Kolona 65 x 0,2 mm; mobilní fáze, (A) 20 mM KH₂PO₄, 20% ACN, pH 8,0, (B) 1 M NaCl v A; gradient, 0-4% B v 1 min, 4-15% B v 2 min, 15-25% B v 3 min, 25-50% B v 4 min; UV detekce 260 nm; Fc 2,0 µL/min.

Látky:

1 - CMP; 2 - AMP; 3 - ADP; 4 - GMP; 5 - CDP;
6 - UTP; 7 - CTP; 8 - ATP; 9 - GTP.

W. Wiedler et al., J. Sep. Sci. 2006, 29, 2478 - 2484.

Modifikace monolitu

- Použití vhodného prekurzoru při přípravě - „one pot“

- RP separace (BMA, LMA)
- HILIC
- Chirální stacionární fáze

Ovlivnění struktury a chromatografických vlastností monolitu

- Podmínky polymerace - UV iniciace (vlnová délka, čas, teplota); termální iniciace (teplota, čas).

- Složení polymerační směsi

- Monomer / Porogen
- Monomerní část - EDMA / BMA
- Porogenní část - BuOH / PrOH

Kolona	1	2	3
Porogen	60	60	60
Monomer	40	40	40
BMA	44,5	44,5	44,5
EDMA	54,5	54,5	54,5
PrOH	60	62	64
BuOH	30	28	26
Voda	10	10	10

Iniciátor - azobisisobutyronitril,
1% hm. z monomerní části směsi

% hm.

D. Moravcová et al., J. Sep. Sci. 2004, 27, 789-800.

Porozita a permeabilita připravených kolon

- Porozita

Kolona	1	2	3	A	B	C
ϵ_T	0.710	0.680	0.650	0.590	0.650	0.847
ϵ_D	0.490	0.470	0.410	0.310	0.290	0.680
ϵ_i	0.220	0.210	0.240	0.280	0.360	0.167

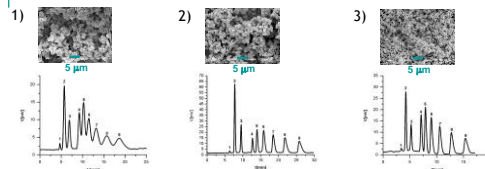
- Permeabilita

Kolona	1	2	3	A	B	C
k_p [cm ²]	7.79E-10	2.38E-10	3.52E-11	2.25E-10	1.47E-10	8.66E-10
d_{perm} [µm]	7.6	3.8	1.9	7.2	5.6	5.1

A - Inertsil ODS-2, 5 mm, 150 x 0,32 mm, Metachem, Torrance, USA
B - Biospher C18E, 5 mm, 141 x 0,32 mm, Labio Praha, Česká republika
C - Chromolith CapRod RP-18e, 150 x 0,1 mm, Merck, Darmstadt, Německo

D. Moravcová et al., J. Sep. Sci. 2004, 27, 789-800.

Separace nízkomolekulárních látek



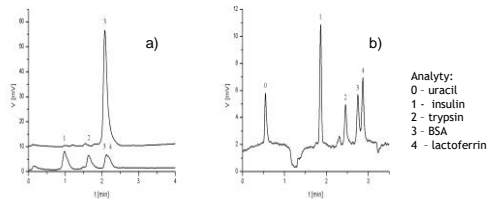
Podmínky separace: 70% ACN, 30% voda, UV detekce 254 nm, Fc = 2 µL/min, kolony 0,32 mm I.D., $l_1, l_2 = 240$ mm, $l_3 = 140$ mm.

Látky:
0 - uracil (nezadržovaná látka)
1 - benzylalkohol
2 - benzaldehyd
3 - benzen
4 - toluen
5 - ethylbenzen,
6 - propylbenzen
7 - butylbenzen
8 - amylbenzen

Kolona	1	2	3
k_{TOL}	1,19	1,13	1,30
N_{TOL}	4270	21860	30380
k_{AB}	3,03	2,81	3,47
N_{AB}	2090	9680	22110

D. Moravcová et al., J. Sep. Sci. 2004, 27, 789-800.

Separace proteinů



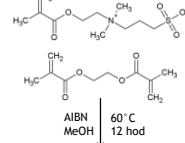
Analyty:
 0 - uracil
 1 - insulin
 2 - trypsin
 3 - BSA
 4 - lactoferrin

Separace proteinů na CIM disku (a) a na monolitické kapilární koloně (b)

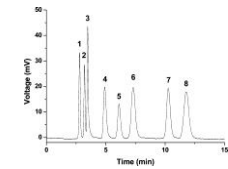
Mobilní fáze: A - voda + 0.15 % TFA, B - ACN + 0.15 %TFA, gradient 20 - 80 % B v 6 min.
 UV detekce 214 nm (ACN - acetonitril, TFA - trifluoroctová kyselina)

CIM disk (styren-divinylbenzen): 3 x 16 mm, $F_c = 3$ ml/min
 Monolitická kapilární kolona poly(BMA-EDMA): 170 x 0.32 mm, $F_c = 25$ µl/min

Modifikace monlitu - „one pot“



HILIC separace bází a neutrálních látek

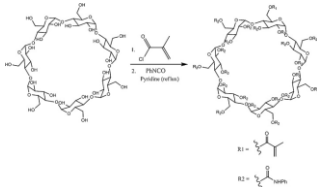


Kolona	SB	EDMA	Monomery	Porogén	ϵ_T
1	43	57	30	70	0.840
2	43	57	32.5	67.5	0.762
3	43	57	33.25	66.75	0.740
4	43	57	34	66	0.713
5	43	57	35	65	No
6	43	57	50	50	No
7	53	47	33.25	66.75	0.775
8	33	67	33.25	66.75	0.724

Mobilní fáze: 5 mM mravenčan amonny pH 3.0 v ACN/H₂O (95/5, v/v). Poly(SPE-co-EDMA) kolona 285 x 0,1mm, F_c 800 nl/min; UV detekce 214 nm.
 Látky: (1) toluen; (2) metakrylamid (3) akrylamid; (4) thymin; (5) uracil; (6) adenin; (7) thiomocovina; (8) cytosin.

J. Zhengjin et al.; Anal. Chem. 2007, 79, 1243-1250.

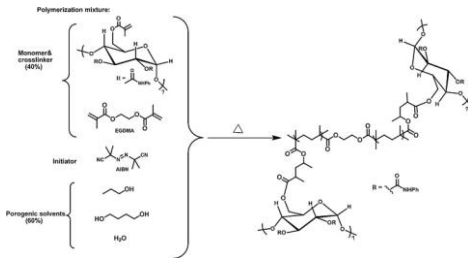
Chirální stacionární fáze - příprava monomeru



Příprava 2,3,6-tris(phenylcarbamoyl)-B-CD-6-methakrylátu

M. Ahmed, A. Ghanem, J. Chromatogr. A 1345 (2014) 115-127.

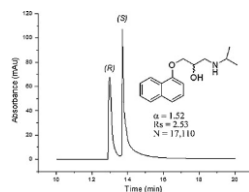
Chirální stacionární fáze - syntéza



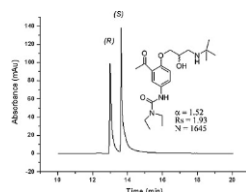
M. Ahmed, A. Ghanem, J. Chromatogr. A 1345 (2014) 115-127.

Chirální separace racemátů

Propranolol



Celiprolol



Kolona 250 x 0,150 mm; mobilní fáze: metanol/voda (0.1% TFA) 10:90 v/v, UV detekce 254 nm, F_c 0.3 µL/min.

M. Ahmed, A. Ghanem, J. Chromatogr. A 1345 (2014) 115-127.

Nanoparticle modified organic polymer-based monolithic materials

Mgr. Jana Krenkova, Ph.D.

Brno, 2. 12. 2015

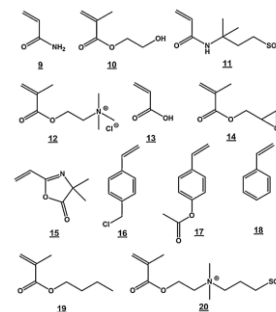


Control of surface chemistry



Preparation from functional monomers

- polymerization
- grafting

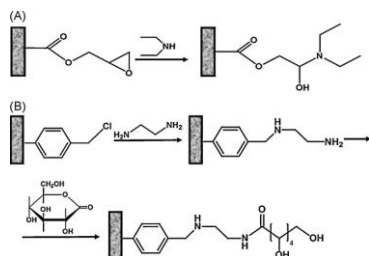


F. Svec, J. Chromatogr. A 2010, 1217, 902–924

Control of surface chemistry



Modification of reactive monoliths



F. Svec, J. Chromatogr. A 2010, 1217, 902–924

Control of surface chemistry



Attachment of nanomaterials

Nanomaterials

materials of which a single unit is sized (in at least one dimension) between 1 and 100 nanometers

Why nanomaterials?

selectivity – chromatography, sample preparation
surface area
ligands for immobilization of bioactive molecules

Modification of monoliths with nanoparticles



embedding (encapsulation) of NPs in the monolithic matrix

- 😊 simple and straightforward approach
- 😞 distribution of NPs throughout the monolithic matrix
limited accessibility of NPs for desired interactions

attachment of nanoparticles to the surface of preformed monoliths

- 😞 multistep approach
- 😊 independent optimization of individual steps
improved accessibility of NPs for desired interactions

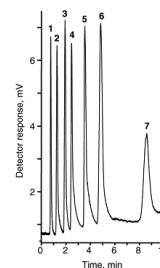
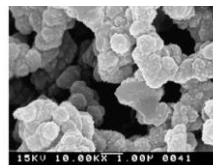
Latex nanoparticles



Ion exchange chromatography - carbohydrates

monolith:
poly(BMA-co-EDMA-co-AMPS)

latex particles (60 nm diameter) with
tertiary amine functionality



Peaks: d(+)-galactose (1), d(+)-glucose (2), d(+)-xylose (3), d(+)-mannose (4), maltose (5), d(-)-fructose (6), sucrose (7).

BMA – butyl methacrylate, EDMA – ethylene dimethacrylate,
AMPS – 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid

Hilder et al., J. Chrom. A 2004 1053, 101

Gold nanoparticles

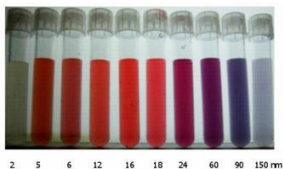
Citrate synthesis

HAuCl_4 + trisodium citrate dihydrate

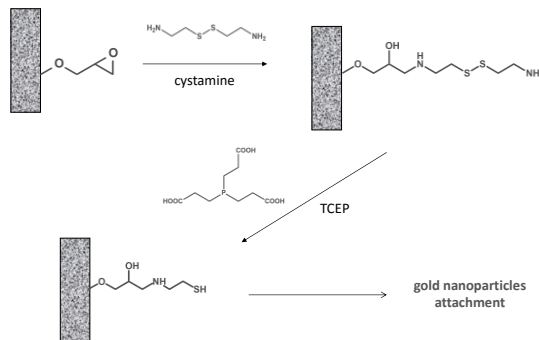
Au^{+3} ions are reduced to neutral gold atoms, where citrate ions act as both a reducing agent and a capping agent.



Colors of various sized monodispersed gold nanoparticles



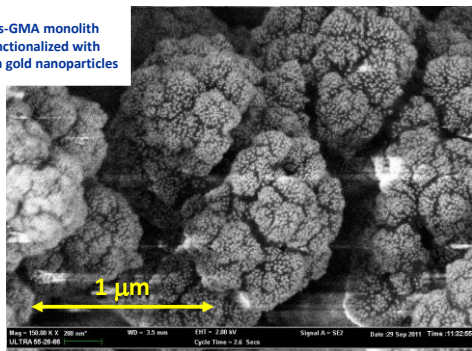
Gold nanoparticles



Y. Lv et al., J. Chromatogr. 2015, 1261, 121

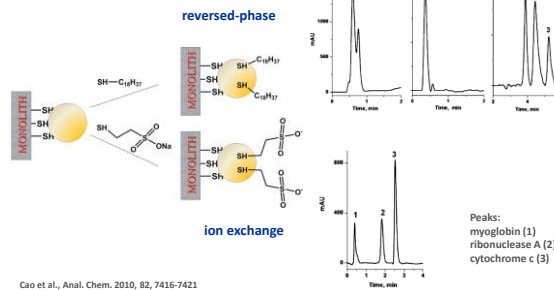
Gold nanoparticles

Cys-GMA monolith functionalized with 15 nm gold nanoparticles



Gold nanoparticles

Thiol-containing peptide enrichment
Ligand exchange - various chromatographic modes

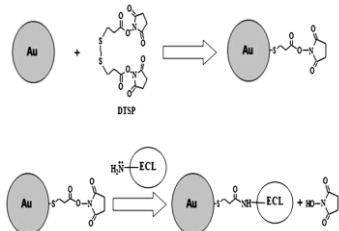


Cao et al., Anal. Chem. 2010, 82, 7416-7421

Gold nanoparticles

Lectin immobilization

Erythrina cristagalli lectin - galactose-selective lectin (ECL)

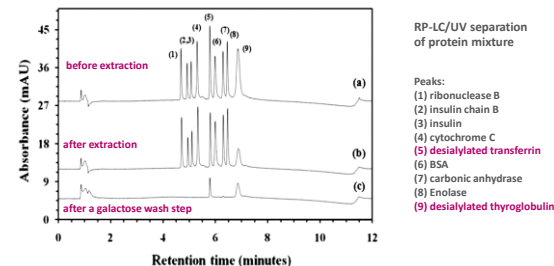


H. Alwael et al., Analyst 2011, 136, 2619

Gold nanoparticles

Lectin immobilization

Erythrina cristagalli lectin - galactose-selective lectin (ECL)



RP-LC/UV separation of protein mixture

Peaks:
(1) ribonuclease B
(2) insulin chain B
(3) insulin
(4) cytochrome C
(5) desialylated transferrin
(6) BSA
(7) carbonic anhydrase
(8) Enolase
(9) desialylated thyroglobulin

H. Alwael et al., Analyst 2011, 136, 2619

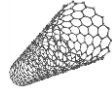
Fullerenes

molecule of carbon in the form of a hollow sphere, ellipsoid, tube, and many other shapes

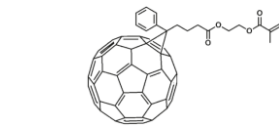
spherical fullerenes - buckyballs



cylindrical fullerenes - carbon nanotubes or buckytubes



C₆₀ in solution

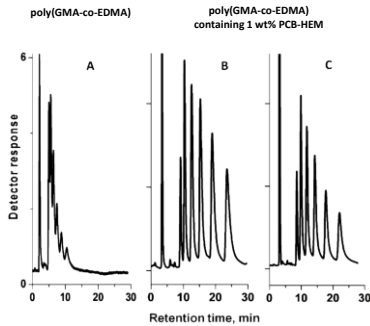


[6,6]-phenyl-C61-butyric acid 2-hydroxyethylmethacrylate ester

Fullerenes

Reversed-phase chromatography

Separation of alkylbenzenes



110 000 plates/m
for the retained
benzene

Conditions: column 53 mm x 100 μm i.d., flow rate 0.15 μL/min, UV detection at 254 nm; (A) mobile phase 50:50 vol % acetonitrile-water; (B) mobile phase 50:50 vol % acetonitrile-water; (C) mobile phase 47.5:2.5:50 vol % acetonitrile-tetrahydrofuran-water; peaks in order of elution: uracil, benzene, toluene, ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene, and amylbenzene

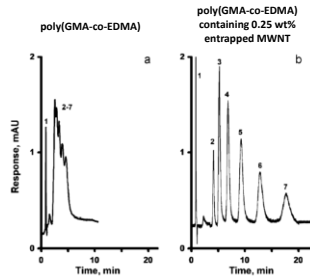
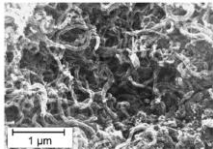
S.D. Chambers et al. Anal. Chem. 2011, 83, 9478

Carbon nanotubes

Reversed-phase chromatography

Separation of alkylbenzenes

Multi-wall nanotubes



Conditions: column, 180mm x 100 μm ID, mobile phase 45% acetonitrile-5% THF-50% water, flow rate 1 μL/min, UV detection at 254 nm; peaks: uracil (1), benzene (2), toluene (3), ethylbenzene (4), propylbenzene (5), butylbenzene (6), and amylbenzene (7).

S.D. Chambers et al. J. Chromatogr. 2011, 1218, 2546

Metal-organic frameworks (MOF)

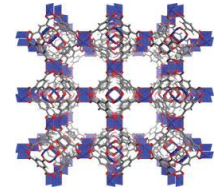
compounds consisting of metal ions or clusters coordinated to organic molecules to form one-, two-, or three-dimensional structures

properties

- superlative porosity
- wide chemical tunability
- high stability

applications

- gas storage
- gas separation
- catalysis



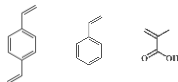
MOFs in monolithic materials

- preparation in situ
- admixing preformed MOFs

Metal-organic frameworks (MOF)

Preparation in situ

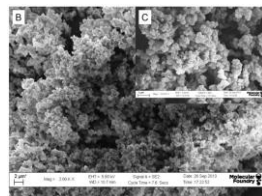
monolith containing carboxylic acid functionalities



synthesis of MIL-100

inorganic metal ions - FeCl₃

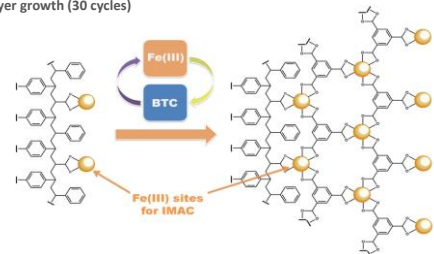
organic ligand - 1,3,5-benzenetricarboxylic acid (BTC)



A. Saeed et al. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 5790

Metal-organic frameworks (MOF)

layer-by-layer growth (30 cycles)



high specific micropore surface area of 389 m²/g

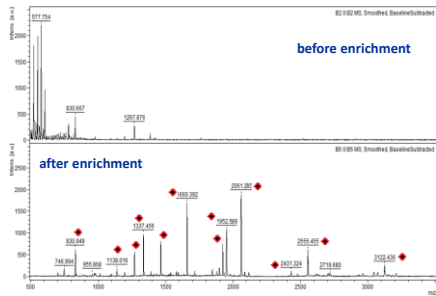
(original polymer monolith – surface area of 106 m²/g)

A. Saeed et al. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 5790

Metal-organic frameworks (MOF)

Phosphopeptide enrichment (IMAC) - MALDI/MS

analysis of nonfat milk

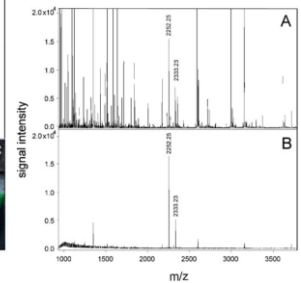
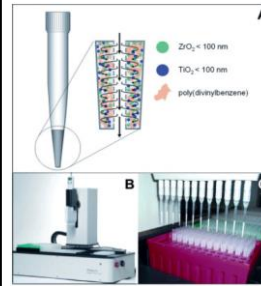


A. Saeed et al. Adv. Funct. Mater. 2014, 24, 5790

Titanium and zirconium oxide nanoparticles

Metal oxide affinity chromatography (MOAC)

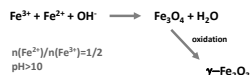
MALDI mass spectrum obtained from *in vitro* phosphorylated ERK1 digest before (A) and after enrichment with poly(DVB)-TiO₂/ZrO₂ microcolumns (B)



M. Ralner et al. Proteomics 2006, 8, 4593

Iron oxide nanoparticles

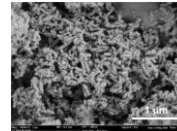
- 200 μ L polypropylene pipette tips
- modification of the inner wall by **methyl methacrylate/ethylene dimethacrylate**
- **poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate)** 5 μ L monolithic bed prepared by UV-initiated polymerization
- UV-photografting of **[3-(methacrylamino)propyl]trimethylammonium chloride** on the pore surface of the monolith
- attachment of **20 nm citrate stabilized iron oxide NPs** on the quaternary amine functionalized monolith



Krenkova J., Foret F. Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 2175-2183

Hydroxyapatite nanoparticles

- 200 μ L polypropylene pipette tips
- modification of the inner wall by **methyl methacrylate/ethylene dimethacrylate**
- **poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate)** with embedded hydroxyapatite NPs (nanorods – 50 x 150 nm) 5 μ L monolithic bed prepared by UV-initiated polymerization

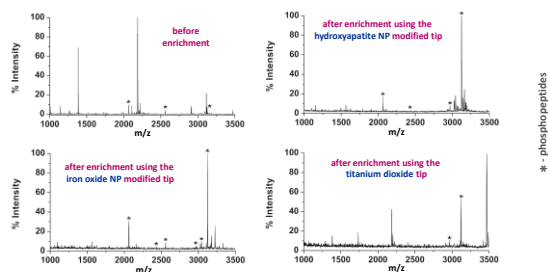


hydroxyapatite nanoparticles
morphology: rods - 50 x 150 nm
surface area: 115 m²/g

Krenkova J., Foret F. Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 2175-2183

Phosphopeptide enrichment – MALDI/MS analysis

β -casein: 224 amino acid residues
5 phosphorylation sites



Krenkova J., Foret F. Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, 2175-2183

Conclusion

The never ending story

