论文

聚合离子液体-碳纳米管复合物在线固相萃取分离白蛋白

陈帅^①, 张谦^②, 王晓峰^①, 陈旭伟^{①*}, 王建华^{①*}^① 东北大学分析科学研究中心, 沈阳 110819^② 辽宁大学化学系, 沈阳 110036

*通讯作者, E-mail: chenxuwei@mail.neu.edu.cn; jianhuajrz@mail.neu.edu.cn

收稿日期: 2011-06-21; 接受日期: 2011-08-11; 网络版发表日期: 2011-09-09

doi: 10.1360/032011-400

摘要 合成了聚(1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐)(poly(ViEtIm⁺Br⁻))聚合离子液体, 并通过 π - π 堆积将其固载到多壁碳纳米管上, 得到了聚离子液体-碳纳米管复合物. 以 15 mg 复合物的填充柱为固相吸附剂, 在顺序注射系统中研究了其对白蛋白的在线固相萃取分离纯化. 在 pH 5.2 时, 对 2 mL 溶液(50 μ g mL⁻¹)白蛋白的吸附效率为 91%. 0.04 mol L⁻¹ 柠檬酸盐缓冲溶液可定量洗脱吸附的白蛋白. 整个分离纯化过程耗时 500 s, 富集倍数为 5. 用该法对人全血中的白蛋白进行分离纯化, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳验证, 得到了纯度较好的白蛋白.

关键词聚合离子液体
聚(1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐)
碳纳米管
白蛋白
分离

1 引言

离子液体(ionic liquids, ILs)是一种低熔点、低蒸汽压、稳定的新型溶剂, 由于其对环境相对友好的溶剂性质, 使其在电化学分析、合成和催化等领域中得到了广泛应用^[1-4]. 在蛋白质分离纯化方面, 离子液体也表现出了良好的性能^[5], 如疏水性咪唑离子液体可用于蛋白质的直接萃取分离^[6, 7]; 离子液体包水型反相微乳体系被成功地用于分离全血中的血红蛋白^[8]等. 但目前采用离子液体为分离媒介的液-液萃取分离体系中, 为得到较高的萃取效率均需消耗大量离子液体, 同时离子液体的高黏性和溶解性使蛋白质较难达到有效回收.

聚合离子液体(polymerized ionic liquid, PIL)是一类重复单元上含有离子液体单元的特殊聚电解质. 与离子液体不同的是, PIL 在常温下多为固态^[9]. PIL 同时具备离子液体和聚合物的性能, 离子电导率高、弹性好而且形貌可控^[10], 并可避免液态离子液体带来

的泄漏问题, 因此广泛用作电化学器件中的聚合物电解质^[11-13]和催化剂^[14]. PIL 在分离纯化方面也表现良好的性能, 如聚 1-乙烯-3-己基咪唑牛磺酸钠盐用作固相基质材料的表面涂层用于 CO₂ 的分离检测, 具有良好的选择性和富集能力^[15]. 但迄今为止, 尚无关于 PIL 分离纯化蛋白质的报道.

本文合成了聚合离子液体聚(1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐)(poly(ViEtIm⁺Br⁻)), 并通过 π - π 堆积作用, 将该聚合离子液体非共价包裹到多壁碳纳米管上, 制备了聚合离子液体-碳纳米管复合物(PIL-MWNTs). 将所得复合物填充在微柱中作为固相吸附剂, 在顺序注射系统中建立了白蛋白的在线固相萃取分离纯化方法.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Thermo Nicolet 6700 红外光谱仪(Thermo, 美国);

Zetasizer Nano-S90纳米粒度仪(Malvern公司, 英国); GA/SDTA851e热重分析仪(Mettler-Toledo公司, 瑞士, 在空气中加热速度为 $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$); 756PC型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); FIALab-2500顺序注射系统(FIALab Instruments Inc., 美国); MOS-450圆二色光谱仪(BioLogic公司, 法国); MINI迷你垂直电泳仪(BAYGENE, 北京).

牛血清白蛋白(BSA, >98%, 华美生物工程技术公司, 北京); 血红蛋白(Hb, Sigma, 美国); 蛋白质Marker(宝生物工程大连有限公司, 6种蛋白标准混合物的摩尔分子量kDa分别为: 磷酸酶B, 97.2; 牛血清蛋白, 66.4; 卵清蛋白, 44.3; 碳酸酐酶, 29; 胰蛋白酶抑制剂, 20.1; 溶菌酶, 14.3); 多壁碳纳米管(深圳纳米港有限公司); 1-溴乙烷、1-乙烯基咪唑(阿拉丁试剂公司, 北京); 乙醇、氯化钠、盐酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、柠檬酸钠、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝、冰醋酸、偶氮二异丁腈(AIBN)、三氯甲烷等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司沈阳分公司, 除特别声明外皆为分析纯, 实验用水为二次去离子水($18\text{ M}\Omega\text{ cm}$).

2.2 聚1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐 Poly(ViEtIm⁺Br⁻) 的制备

参考文献方法^[16]制备聚1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐, 流程如图1所示. 具体制备过程如下:

将30.0 mL *N*-乙烯基咪唑(0.33 mol)和42.8 mL 溴乙烷(0.57 mol)依次加入100 mL的圆底烧瓶中, 在80 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中回流反应至出现白色浑浊, 保持反应使白色浑浊消失至反应产物变成固体; 然后继续回流反应, 待回流不明显时, 停止加热. 采用乙腈-乙酸乙酯对所得产物进行重结晶, 真空干燥后, 得黄白色晶

图1 聚1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐的合成

体1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐.

取0.04 g 偶氮二异丁腈(AIBN)加入到盛有1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐(2 g)的50 mL单口烧瓶中, 以三氯甲烷为溶剂, 在氮气保护下, 80 $^{\circ}\text{C}$ 油浴中回流反应5 h. 将所得产物用三氯甲烷洗涤3次, 得到黄色固体聚合离子液体聚1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐 poly(ViEtIm⁺Br⁻).

2.3 PIL-MWNTs 复合物的制备

将1.0 g 聚1-乙烯-3-乙基咪唑溴代盐溶于20 mL去离子水中, 加入20 mg 多壁碳纳米管后在60 $^{\circ}\text{C}$ 和400 r min^{-1} 的速度下超声搅拌20 h. 将所得黑色悬浮液在15000 r min^{-1} 条件下离心30 min, 去除上清液, 收集黑色产物, 先用去离子水洗涤3次, 再用无水乙醇洗涤1次后真空干燥24 h, 得聚合离子液体-碳纳米管复合物(PIL-MWNTs).

将15 mg PIL-MWNTs装填到内径为2.2 mm的PTFE管中, 管两端均用少量玻璃棉堵住以防填充物流失(填充柱的有效长度为12 mm). 固相萃取微柱在使用前用二次去离子水以20 $\mu\text{L s}^{-1}$ 的流速反复两个方向交替冲洗3次, 以去除柱表面的残留污染.

2.4 实验流程

PIL-MWNTs 微填充柱-顺序注射固相萃取分离白蛋白的流路如图2所示. 在线分离过程包括吸附和洗脱两个步骤, 分述如下:

吸附: 从1号阀位以100 $\mu\text{L s}^{-1}$ 的流速向储液环中吸入500 μL 二次去离子水作为载流, 再从6号阀位以100 $\mu\text{L s}^{-1}$ 的流速吸入2 mL样品溶液. 然后将样

图2 顺序注射在线固相萃取流路图

品和载流区带由 3 号阀位以 $20 \mu\text{L s}^{-1}$ 的流速推出, 流过固相萃取微柱时白蛋白被微填充柱吸附. 富集过程由光度法在线检测, 检测波长为 280 nm.

洗脱: 分别由 1 号和 2 号阀位以 $100 \mu\text{L s}^{-1}$ 的流速依次吸入 2100 μL 二次去离子水(载流)和 400 μL 洗脱剂(柠檬酸盐缓冲溶液, 0.04 mol L^{-1}), 然后将洗脱剂和载流以 $20 \mu\text{L s}^{-1}$ 的流速经 3 号阀位流过 PIL-MWNTs 固相微填充柱. 洗脱剂将吸附在微柱上的蛋白质洗脱并载入流通池中进行检测. 去离子水载流在将洗出液载入检测器的同时对微填充柱进行清洗.

3 结果与讨论

3.1 PIL-MWNTs 复合物的表征

Poly(ViEtIm⁺Br⁻)是一种亲水聚合物, 在水相中具有一定溶胀性, 以这种复合物直接填充微柱在流动系统中极易造成流路堵塞. 因此, 本文尝试将 PIL 固载于具有较大比表面积和一定刚性支撑能力的碳纳米管上. 由于聚合离子液体中的咪唑阳离子与碳纳米管的苯环上均含有 π -电子结构, 两者之间存在强烈的 π - π 堆积作用^[17, 18]. 超声和搅拌过程中, π - π 堆积作用促使聚合离子液体负载到碳纳米管表面, 得到固载有聚合离子液体的碳纳米管 PIL-MWNTs^[19, 20].

对比碳纳米管、poly(ViEtIm⁺Br⁻)和 PIL-MWNTs 复合物的红外光谱发现, 对于 poly(ViEtIm⁺Br⁻), $1680\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ 处没有烯烃的伸缩振动吸收峰, 表明所得聚合离子液体中已无双键存在; 在 PIL-MWNTs 复合物的红外光谱中可明显观察到 $3200\sim 3050 \text{ cm}^{-1}$ 处咪唑环上 C-H 的伸缩振动吸收峰、 $2960\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ 处咪唑环侧链上烷基饱和 C-H 的伸缩振动吸收峰以及 1551 cm^{-1} 处咪唑环上 C-N 的伸缩振动吸收峰, 这些咪唑环的特征峰表明 poly(ViEtIm⁺Br⁻)已成功地固载于多壁碳纳米管上.

在本实验条件下, poly(ViEtIm⁺Br⁻)均匀地覆盖在碳纳米管表面, 改变了碳纳米管的疏水性能, 所得复合物能有效地分散在水中形成均一稳定的黑色溶液, 如图 3 所示. 表面电荷分析表明, 所制得的 PIL-MWNTs 复合物水溶液的 Zeta 电位值为 +49.4 mV. 热重分析结果表明, 当温度达到 300°C 时, PIL-MWNTs 复合物出现明显失重, 这是固载在碳纳米管表面的聚合离子液体发生热分解而致. 由热重分析结果可得聚合离子液体 poly(ViEtIm⁺Br⁻)在 PIL-

图 3 PIL-MWNTs 复合物(左)与 MWNTs(右)在水相中的分散情况对比

MWNTs 复合物中的重量比约为 30%.

3.2 白蛋白的在线萃取分离

3.2.1 PIL-MWNTs 复合物对蛋白质的选择性吸附

在 pH 4~8 范围内考察了 PIL-MWNTs 复合物对酸性蛋白(白蛋白 BSA)及中性蛋白(血红蛋白 Hb)的吸附情况(图 4). 在 pH 4.0~5.5 范围内, BSA 的吸附效率迅速增加, 在 pH 5.5 时已达到最大值并随着 pH 的继续升高而保持基本不变. 对于 Hb 来说, 在 pH 小于 5.5 的范围内基本没有吸附; 在 pH 5.5~7.0 范围内, 随 pH 增加吸附效率略有提高, 但总体吸附不超过 20%; 当 pH 大于 7.5 时, Hb 的吸附效率显著提高. 由于 PIL-MWNTs 复合物表面呈正电性, 而蛋白质在其等电点附近会发生电荷性质转变, 如 BSA 的等电点为 4.6, 当溶液 pH 小于 4.6 时, BSA 呈正电性; 溶液 pH 大于 BSA 等电点时, BSA 呈负电性. 因此在 pH 4.0~5.5 范围内, BSA 分子表面电荷由正转负,

图 4 样品溶液 pH 值对 BSA 和 Hb 吸附效率的影响. 蛋白质浓度, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; 进样体积, $2000 \mu\text{L}$; 样品流速, $20 \mu\text{L s}^{-1}$ (BSA 在 280 nm 处检测; Hb 在 410 nm 处检测)

其与 PIL-MWNTs 复合物之间的静电作用力发生根本转变, 从静电斥力到静电引力, 从而导致吸附效率急剧上升; 而 Hb 的等电点为 6.9, 因此在溶液 pH 小于 6.9 时, 由于静电斥力导致 Hb 吸附较少, 而当溶液 pH 升高至大于 Hb 的等电点时, 静电引力导致吸附效率快速上升。

在采用咪唑基离子液体直接萃取分离血红蛋白时, 离子液体中的咪唑基团可与血红蛋白中的血红素基团发生配位作用, 促使血红蛋白转移至离子液体相中, 从而可实现血红蛋白的选择性吸附(图 5(A))^[8]。而本文研究中采用的聚合离子液体 poly(ViEtIm⁺Br⁻), 其结构中虽然含有咪唑基团, 但由于咪唑基团被固定到聚合物长链上, 无法自由移动, 使其与血红素基团之间的配位效率大大降低; 另一方面, 由于咪唑基团在聚合物长链上排列非常密集, 其与血红素基团发生配位的空间位阻大大增加, 进一步抑制了配位作用的发生。然而此时聚合物链上大量的咪唑基团呈现出较强的正电性, 从而使静电作用力成为聚合离子液体吸附蛋白质的主导作用力(图 5(B))。

由此可知, 在样品 pH 5.0 附近, PIL-MWNTs 复合物对 BSA 的吸附效率很高, 而此时其对 Hb 基本不吸附, 从而可达到两种蛋白质分离的效果。本文在后续研究中采用 pH 5.2 的磷酸盐缓冲溶液配制样品。

在上述实验条件下, 考察了样品溶液中离子强度对蛋白质吸附效率的影响。结果表明, 随离子强度的增加, 蛋白质的吸附效率降低。这是由于溶液中阴阳离子屏蔽了微填充柱上正电荷与蛋白质负电荷之间的静电吸引力, 从而导致吸附效率降低^[21]。此实验

结果进一步表明静电作用力是 PIL-MWNTs 复合物表面对蛋白质吸附的主导作用力。

3.2.2 白蛋白的洗脱回收

由于静电作用力是白蛋白在 PIL-MWNTs 复合物表面吸附的主要作用力, 因此可以通过调节 pH 和离子强度达到洗脱蛋白质的目的。虽然采用较低 pH 值的洗脱剂能改变白蛋白表面电荷性质取得一定的洗脱效果, 但低 pH 值易引起蛋白质失活以及结构变化。考虑到离子强度对静电作用的显著影响, 本实验选择通过改变洗脱液的离子强度以实现蛋白质的洗脱回收。在 0.005~0.1 mol L⁻¹ 浓度范围内, 考察了 pH 5.0 的柠檬酸盐缓冲溶液作为洗脱剂的洗脱回收效果。实验结果表明洗脱效率开始随缓冲溶液中离子强度的增加而明显提高, 当柠檬酸盐缓冲溶液浓度大于 0.04 mol L⁻¹ 后, 洗脱效率基本保持稳定不变, 可实现对吸附在 PIL-MWNTs 复合物表面上蛋白的定量洗脱。本文在后续实验中即选择洗脱剂为 0.04 mol L⁻¹ 的柠檬酸盐缓冲溶液。

在咪唑离子液体萃取分离蛋白的研究中, 虽然以配位作用为主要作用力的情况下可得到较好的吸附选择性, 但在洗脱时需采用与蛋白质存在更强配位能力的表面活性剂如十二烷基硫酸钠(SDS)以取代咪唑基团而达到洗脱目的^[6, 8]。由于 SDS 易引起蛋白质变性和失活^[22], 因此可能对蛋白质的后续分析及生命科学研究带来不利影响。若采用聚合离子液体为固相吸附剂, 其吸附作用力为静电吸附, 吸附和洗脱均可在温和的缓冲溶液环境中进行, 有效地减少了分离纯化过程对蛋白质性质的影响, 有利于后续进一步的生命科学研究。

图 6 为固相萃取分离前后白蛋白的圆二色(CD)光谱。萃取分离前后, 白蛋白在 208 nm 和 222 nm 处均出现了蛋白质二级结构 α -螺旋的特征峰, 但萃取分离后得到的蛋白样品在此两处的峰值略微降低, 这可能是由于蛋白质吸附到 PIL-MWNTs 复合物表面时会一定程度的引起蛋白质的二级结构发生变化^[23]。采用 Greenfield 方法^[24]计算蛋白质中 α -螺旋的含量, 结果表明固相萃取分离后 BSA 中 α -螺旋的含量降低约为 5%。

图 7(A)为纯 BSA 溶液以及洗脱剂直接顺序流经检测器的信号, 而图 7(B)为 BSA 溶液经 PIL-MWNTs 复合物固相萃取后并洗脱回收的信号。很显然, BSA

图 5 离子液体(A)与聚合离子液体-碳纳米管复合物(B)吸附蛋白质的原理

图 6 经 PIL-MWNTs 复合物固相萃取前后 BSA 的 CD 光谱. A, 萃取前; B, 萃取后

图 7 BSA 在 PIL-MWNTs 复合物上的吸附和解吸情况比较. A, 纯 BSA 溶液(未流经 PIL-MWNTs 微填充柱); B, BSA 溶液经 PIL-MWNTs 复合物固相萃取后洗脱回收. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ BSA, 样品体积, $2000 \mu\text{L}$; 样品流速, $20 \mu\text{L s}^{-1}$; 洗脱剂, 0.04 mol L^{-1} 柠檬酸盐缓冲溶液(pH 5.2); 洗脱剂体积, $400 \mu\text{L}$; 洗脱流速, $20 \mu\text{L s}^{-1}$ (280 nm 检测)

被 PIL-MWNTs 复合物吸附得较完全, 并较易用 0.04 mol L^{-1} 柠檬酸盐缓冲溶液洗脱回收. 洗脱峰后面的尾峰是由于 Schlieren 效应所引起的假峰(由试样和载流抛物面形界面处折光率的差异而引起的). 经 PIL-MWNTs 复合物固相萃取后, 白蛋白得到了适度富集. 整个吸附/解吸过程包括在线吸附和洗脱, 历时约 500 s, 白蛋白的富集倍率为 5.

3.3 全血样品中白蛋白的分离

本实验所用的全血样品由东北大学医院提供. 新鲜抗凝全血用 pH 5.2 的磷酸盐缓冲溶液稀释 100 倍, 离心分离收集上清液. 采用本文实验方法对上清液中的白蛋白进行在线分离纯化, 收集在线吸附后

图 8 SDS-PAGE 凝胶电泳图. 1, 蛋白 Marker(kDa); 2, 稀释 100 倍的未经处理的全血血样; 3, 全血吸附后的流出液; 4, 稀释 100 倍的全血中提纯的白蛋白; 5, 白蛋白标准样品($500 \mu\text{g mL}^{-1}$)

的流出液和洗脱液进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 8 所示.

人全血样品中除白蛋白条带外, 还可以观察到其他蛋白条带, 如 14.3 KDa 处的血红蛋白, 29.0 KDa 处的免疫球蛋白轻链, 50~60 KDa 处的免疫球蛋白重链和 80 KDa 处的转铁蛋白条带. 经过在线固相萃取分离后的样品仅存在白蛋白条带, 其他蛋白条带消失. 这表明用 PIL-MWNTs 复合物为吸附剂可以有效地将全血样品中的白蛋白与其他大部分共存蛋白分离.

4 结论

采用聚离子液体-多壁碳纳米管复合物(PIL-MWNTs)为固相吸附剂建立了蛋白质的在线固相萃取分离方法, 并实现了全血样品中白蛋白与其他共存蛋白质的有效分离. 经过聚合反应咪唑基团固定到聚合物长链上, 抑制了咪唑基团与含血红素基团的蛋白之间的配位作用, 提高了对白蛋白的选择性. 另外, 聚合离子液体对蛋白质的吸附驱动力为静电引力, 从而使得该材料对蛋白质的吸附和洗脱均可在温和的条件下进行, 有利于保持蛋白质的结构和活性.

聚合离子液体既可通过更换不同种类的阴阳离子改变其表面电荷性能, 亦可通过控制合成方法, 使阴离子(或阳离子)部分固定或分别与其他功能单体

共聚, 将所得聚合物设计成线性或球形粒子, 以适应不同操作过程的需要. 因此聚合离子液体的良好可设计性使其有望在生物大分子的萃取分离方面发挥更大作用.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20805004 & 20901035)、国家杰出青年科学基金(20725517)、国家自然科学基金重大国际合作项目(20821120292)和中央高校基本科研业务费(N090105001, N090605001 & N090405004)以及教育部高校博士学科点专项科研基金(20080145020)的资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Varma RS, Namboodiri VV. An expeditious solvent-free route to ionic liquids using microwaves. *Chem Commun*, 2001, (7): 643–644
- 2 Favre F, Olivier-Bourbigou H, Commereuc D, Saussine L. Hydroformylation of 1-hexene with rhodium in non-aqueous ionic liquids: How to design the solvent and the ligand to the reaction. *Chem Commun*, 2001, (15): 1360–1361
- 3 Handy ST. Greener solvents: Room temperature ionic liquids from biorenewable sources. *Chem Eur J*, 2003, 9(13): 2938–2944
- 4 Poole CF, Poole SK. Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(16): 2268–2286
- 5 Chen XW, Liu JW, Wang JH. Ionic liquids in the assay of proteins. *Anal Methods*, 2010, 2(9): 1222–1226
- 6 Cheng DH, Chen XW, Shu Y, Wang JH. Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF₆). *Talanta*, 2008, 75(7): 1270–1278
- 7 Cheng DH, Chen XW, Shu Y, Wang JH. Extraction of cytochrome c by ionic liquid 1-butyl-3-trimethyl silylimidazolium hexafluorophosphate. *Chin J Anal Chem*, 2008, 36(9): 1187–1190
- 8 Shu Y, Cheng DH, Chen XW, Wang JH. A reverse microemulsion of water/AOT/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate for selective extraction of hemoglobin. *Sep Purif Technol*, 2008, 64(2): 154–159
- 9 Ricks-Laskoski HL, Snow AW. Synthesis and electric field actuation of an ionic liquid polymer. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(38): 12402–12403
- 10 Yuan JY, Antonietti M. Poly(ionic liquid)s: Polymers expanding classical property profiles. *Polymer*, 2011, 52(7): 1469–1482
- 11 Marcilla R, Alcaide F, Sardon H, Pomposo JA, Pozo-Gonzalo C, Mecerreyes D. Tailor-made polymer electrolytes based upon ionic liquids and their application in all-plastic electrochromic devices. *Electrochem Commun*, 2006, 8(3): 482–488
- 12 Zheng YJ, Zheng J, Dou L, Qiao WQ, Wan XH. Synthesis and characterization of a novel kind of near-infrared electrochromic polymers containing an anthraquinone imide group and ionic moieties. *J Mater Chem*, 2009, 19(44): 8470–8477
- 13 Tung TT, Kim TY, Suh KS. Nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for transparent and conductive film. *Org Electron*, 2011, 12(1): 22–28
- 14 Lu J, Yan F, Texter J. Advanced applications of ionic liquids in polymer science. *Prog Polym Sci*, 2009, 34(5): 431–448
- 15 Zhao QC, Wajert JC, Anderson JL. Polymeric ionic liquids as CO₂ selective sorbent coatings for solid-phase microextraction. *Anal Chem*, 2010, 82(2): 707–713
- 16 Marcilla R, Blazquez JA, Rodriguez J, Pomposo JA, Mecerreyes D. Synthesis and characterization of new polymeric ionic liquid microgels. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2006, 44(13): 3958–3965
- 17 Marcilla R, Curri ML, Cozzoli PD, Martinez MT, Loinaz I, Grande H, Pomposo JA, Mecerreyes D. Nano-objects on a round trip from water to organics in a polymeric ionic liquid vehicle. *Small*, 2006, 2(4): 507–512
- 18 Fukushima T, Aida T. Ionic liquids for soft functional materials with carbon nanotubes. *Chem Eur J*, 2007, 13(18): 5048–5058
- 19 Wu BH, Hu D, Kuang YJ, Liu B, Zhang XH, Chen JH. Functionalization of carbon nanotubes by an ionic-liquid polymer: Dispersion of Pt and PtRu nanoparticles on carbon nanotubes and their electrocatalytic oxidation of methanol. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(26): 4751–4754
- 20 Zhang Q, Wu SY, Zhang L, Lu J, Verproot F, Liu Y, Xing ZQ, Li JH, Song XM. Fabrication of polymeric ionic liquid/graphene nanocomposite for glucose oxidase immobilization and direct electrochemistry. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(5): 2632–2637
- 21 McBride MB. A critique of diffuse double layer models applied to colloid and surface chemistry. *Clays Clay Miner*, 1997, 45(4): 598–608
- 22 Michaux C, Pomroy NC, Privé GG. Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. *J Mol Biol*, 2008, 375(5): 1477–1488
- 23 Koutsopoulos S, Patzsch K, Bosker WTE, Norde W. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*, 2007, 23(4): 2000–2006
- 24 Zhang Y, Chen X, Lan J, You J, Chen L. Synthesis and biological applications of imidazolium-based polymerized ionic liquid as a gene delivery vector. *Chem Biol Drug Des*, 2009, 74(3): 282–288

Polymerized ionic liquid-multiwalled carbon nanotubes composite for the separation of serum albumin

CHEN Shuai¹, ZHANG Qian², WANG XiaoFeng¹, CHEN XuWei¹ & WANG JianHua¹

¹ Research Center for Analytical Sciences, Northeastern University, Shenyang 110819, China

² College of Chemistry, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract: Polymerized ionic liquid (PIL), poly(1-vinyl-3-ethylimidazolium bromide) (poly(ViEtIm⁺Br⁻)), is synthesized and it is immobilized onto the surface of multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) via π - π stacking, giving rise to a PIL-MWNTs composite. 15 mg of the composite is packed into a mini-column for the on-line isolation/purification of bovine serum albumin (BSA) in a sequential injection system. A 91% adsorption of BSA in 2 mL solution (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pH 5.2) is achieved. The retained BSA can afterwards be quantitatively recovered with 0.04 mol L⁻¹ citrate buffer. The entire isolation process takes 500 s giving rise to an enrichment factor of 5. The practical applicability of this on-line protocol is demonstrated by processing human whole blood for the isolation of human serum albumin, and satisfactory results are obtained by assay with SDS-PAGE.

Keywords: polymerized ionic liquid, poly(1-vinyl-3-ethylimidazolium bromide), carbon nanotubes, serum albumin, isolation