

KARAKTERISASI MONOLITH POLY(MATE-CO-VBC-CO-EDMA) DENGAN INVERSE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY (ISEC) PADA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Eko malis

Program Studi Kimia Fakultas matematika Dan ilmu Pengetahuan Alam
Universitas PGRI Banyuwangi
malisgsn@gmail.com

Abstract

Monolith yang dipreparasi masih didominasi oleh macropores, yang diindikasikan dari nilai porositas eksternal kedua kolom yang masih besar. Kolom monolith dengan %T35 mempunyai porositas lebih berimbang dibandingkan kolom dengan %T30, yaitu masing-masing 44,32 : 24,25 % dan 68,02 : 36,421. Akan tetapi kedua monolith masih mempunyai micropores yang relatif besar yaitu %T35 adalah 12,63 dan %C30 sebesar 17,81. Dari hasil uji distribusi pori kedua kolom monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) Proporsi mesopores dan macropores cukup berimbang. Tujuan utama dari pengembangan kolom monolith untuk pemisahan system kromatografi, adalah praktis, minim sampel, cepat ramah lingkungan dan dapat digunakan untuk berbagai aplikasi yang berbeda. Pada aplikasi kolom monolith poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) untuk sistem KCKT pemisahan sampel biomolekul berdasarkan **interaksi hidrofobik kromatografi (HIC) dan penukar ion** antaranalit dan fasediam monolith.

Keyword : monolithorganik, *flowtroughpore*, Porogen, KCKT

1. Introduction

Dewasa ini terdapat dua jenis teknologi monolith yang telah dikembangkan, yaitu monolith berbasis polimer organik dan monolith berbasis silika. Masing-masing monolith memiliki kelebihan dan kekurangan. Monolith berbasis polimer organik mempunyai keunggulan stabilitas kimia yang tinggi pada range pH yang lebar (antara pH 2-12) dan tidak ada efek silanol. Sedangkan kelemahan monolith polimer organik antara lain adanya *micropore* yang mengurangi efisiensi dalam pemisahan molekul kecil dengan kestabilan yang rendah. Kelemahan tersebut dapat diatasi antara lain dengan pemilihan monomer dan porogen yang tepat, serta optimasi persentase total monomer (%T) dan persentase derajat konsentrasi crosslinker

(%C) (Ueki *et al.*, 2004). Preparasi dan modifikasi monolith berbasis polimer organik lebih mudah dibandingkan monolith berbasis silika. Kolom monolith polimer organik telah banyak diaplikasikan dalam kromatografi cair kapiler (CLC) dan elektrokromatografi kapiler (CEC) karena karakteristiknya yang unik. Karakteristik tersebut antara lain adalah kemudahan dalam preparasi, berbagai monomer yang tersedia secara komersial, dan toleransi pH yang baik (Sabaruddin *et al.*, 2012). Pemisahan secara cepat berbagai molekul kecil, seperti alkilbenzena, amina aril, asam karboksilat, fenol, dan senyawa karbonil, dapat dicapai dengan menggunakan kolom monolith polimer berpori. Selain itu, fragmen DNA (DNA beruntai ganda atau untai tunggal) dapat dipisahkan dengan baik dengan

menggunakan monolith dengan mix mode yaitu fase terbalik penukar ion kuat (Chen *et al.*, 2013).

Beberapa mode pada sistem KCKT telah dikembangkan untuk berbagai aplikasi isolasi dan pemisahan sampel protein dan DNA. Mode tersebut antara lain penukar ion, (*ion-exchange*), fase balik (*reverse phase*), interaksi hidrofobik (*hydrophobic interaction*). Diantara mode tersebut yang banyak diterapkan adalah fase penukar ion, karena adanya ikatan yang relative kuat antara gugus fosfat bermuatan negatif pada DNA dengan fasediam (monolith) (Svec, 2010 dan Sabarudin *et al.*, 2012). Fase penukar ion memerlukan modifikasi lebih lanjut (*post modification*) dengan pembukaan cicincinepoksi dan metode *grafting* rantai polimer pada permukaan monolith. Kedua metode tersebut dapat diinisiasi UV dan thermal inisiasi. Untuk menambahkan gugus-gugus fungsional sesuai dengan sifat yang diharapkan. Modifikasi ini memerlukan beberapa perlakuan lebih lanjut untuk merubah sifat-sifat permukaan monolith sesuai aplikasi yang akan dilakukan. Modifikasi-modifikasi tersebut memerlukan waktu dalam penanganannya, sehingga kurang efisien. Maka dari itu dari segi kepraktisannya dalam penelitian ini akan dikembangkan polimer monolith dengan satu langkah reaksi. Monolith yang dihasilkan diharapkan memiliki luas permukaan spesifik, distribusi ukuran pori yang sempit dan efisiensi tinggi dengan Inverse Size Exclusion Chromatography (ISEC) untuk mengetahui morfologi dan distribusi struktur pori monolith yang dihasilkan (*micropore, mesopore, flow-through pore*). Dalam pembuatan monolith yang sangat

berpengaruh pada komposisi pori adalah porogen. Porogen merupakan pelarut yang digunakan pada proses polimerisasi. Jadi pemilihan porogen merupakan hal yang krusial agar terjadi keseragaman (homogenitas) dan meningkatkan efisiensi kolom monolith dan untuk menghindari *slack, sol state, swelling* dan *shrinking* dari *microglobule* monolith. Pada umumnya komposisi perbandingan optimal akan berubah untuk setiap kombinasi monomer dan crosslinker yang berbeda (Svec, 2010). Beberapa pelarut digunakan dalam pembuatan monolith, tergantung dari sifat monolith yang diinginkan misalnya fase balik, interaksi hidropobik dan penukar ion. Pelarut yang digunakan bias dalam bentuk tunggal, biner maupun tersier. Pelarut dalam bentuk polimer misalnya polietilenglikol (PEG), dimetil formamide (DMF), Dimetil sulfoksida (DMSO) dan lain-lain. Dibandingkan dengan pelarut polimer, pelarut organic seperti decanol, dodecanol, sikloheksanol, 1-propanol, 1,4 butanediol, dan air mempunyai rentang polaritas yang besar. Sehingga pelarut organic lebih banyak digunakan dari pada pelarut polimer. Optimasi campuran pelarut dengan kemampuan solvasi yang beragam dilakukan untuk menghasilkan porositas dari monolith yang diharapkan (Hilder *et al.*, 2004).

2. Methodology

Penentuan distribusi pori dilakukan dengan menentukan total porositas dari kolom (ϵ_T), porositas eksternal/*flow-through pores* (ϵ_e), porositas internal/*mesopore* (ϵ_i). Ketiga persamaan

porositas didefinisikan dengan mengikuti persamaan :

$$\varepsilon_T = \frac{V_T}{V_g} \quad \dots(4.3)$$

$$\varepsilon_e = \frac{V_e}{V_g} \dots(4.4)$$

$$\varepsilon_i = \varepsilon_T - \varepsilon_e = \frac{(V_T - V_e)}{V_g} \dots(4.5)$$

$$V_g = \pi r^2 L$$

....(4.6)

V_T = Volume elusi dari polistirene standar dalam THF sebagai fase gerak, biasanya diasumsikan dengan sebagai molukel kecil yang diinjeksikan (mL)

V_e = Volume elusi dari massa molekul yang dikeluarkan (mL)

V_g = Volume geometrical (volume kosong pemisahan) dari kolom (mL)

L = panjang kolom

r = jari-jari kolom

Untuk mengetahui distribusi pori, dihitung diameter pori yang berhubungan/korelasi langsung dengan berat molekul standar polystyrene standar pada persamaan berikut :

$$M_w = 2.25 \phi_n^{1.7} \quad \dots(4.7)$$

Dimana diameter ukuran pori ϕ , dalam Å atau

$$R = 0.026 M_r^{0.558} \dots(4.8)$$

Dimana

R = diameter pori, dalam nm

M_w = berat molekul

n = bilangan bulat yang menyatakan urutan ukuran pori dari terkecil hingga besar

$$(\phi_{n+1} > \phi_n)$$

Volume yang berkorelasi dengan diameter pori kemudian ditentukan dan dihitung yang menyatakan selisih dari volume retensi 2 berat molekul yang berurutan yang diberikan pada persamaan berikut :

$$\Delta V_{n+1, n} = V_{R, n+1} - V_{R, n} \quad \dots(4.9)$$

Dimana :

V_n = fraksi volume pori yang mempunyai ukuran sama atau lebih besar dari ϕ_n .

Dua jenis pori diperiksa menggunakan polistirene standar dengan massa molekul yang berbeda (500 – 1800.0000).

3. Results and Discussion

Inverse Size-exclusion Chromatography (ISEC), Metode lain yang populer adalah dengan adsorpsi nitrogen menggunakan persamaan Brunauer, Emmett, Teller/BET (S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller.,1938) S. Brunauer, P.H. Emmett dan E. Teller, (1938), Mercury-Intrusion Porosimetry/MIP (H.L. Ritter, et al., 1945) dan *flow methods* (B.P. Semonian dan M. Manes., 1977).

Metode ISEC didasarkan pada pengukuran dari inner pori terhadap makro molekul. Karena volume hidrodinamik dari kebanyakan polimer berada pada range dan area nanometer, formasi dan proporsi kecukupan dari mesopore yang memadai merupakan keadaan yang harus dipenuhi dalam distribusi pori dalam aplikasi SEC untuk kolom monolith-kromatografi. Faktor analisis yang digunakan untuk mengetahui performa dari kolom monolith adalah uji distribusi pori dengan menggunakan ISEC dilakukan untuk seri polistirene standar dari kecil kebesar dalam THF sebagai fase gerak

dan solven. Kalkulasi secara empiris dengan persamaan volume hidrodinamik (Hal'asz, et al., 1980) berikut ini.

$R = 0.0246M_r^{0.588}$, R = volume hidrodinamik (nm)

Volume hidrodinamik dari beberapa polistirene standar dengan BM 2000-500000 (R > 2 nanometer) tidak dapat menerobos/memasuki *micropores* dengan ukuran < 2nm dan hanya menerobos/melewati *mesopores* (2-50 nm) (klasifikasi IUPAC., 1972). Disisi lain *micropores* hanya dapat dilalui/diterobos oleh polistirene series dengan BM kecil, yaitu toluene (BM 92 g/mol) atau benzene (BM 78 g/mol).

Volume elusi toluene diasumsikan sebagai volume total, dikarenakan BM toluene paling kecil dibandingkan dengan polistirene standar yang lain, sehingga toluene bias menerobos seluruh pori-pori dalam kolom yaitu *flow-trough*, *mesopores pores* dan *micropores* (Al-bokhari et al,2002), sehingga diasumsikan sebagai volume total dalam pori-pori monolith. Semakin tinggi berat molekul polistirene yang diinjeksikan dalam kolom waktu retensinya semakin kecil.

Total pori (ϵ_t), eksternal pori (ϵ_e), internal pori (ϵ_e) dari kolom monolith yang diperoleh dari data perhitungan ISEC. Total pori (ϵ_t), interstisial (*flow-through*)

eksternal pori (ϵ_e), internal (ϵ_e) yang menyatakan *mesopores*, porositas dari kolom monolith yang ditentukan volume hidrodinamik dari toluene (massa molekul =92 g/mol) dan polistirene standard dengan BM berurutan dari kecil sampai besar yaitu dengan berat molekul 500, 2000, 3000, 10000, 20000, 30000, 70000, 15000, 30000, 70000, 150000, 300000, 560000, 1000000, dan 1800000. Polistirene standar ditimbang sejumlah 0,002 gram dilarutkan dalam 5 mL THF.

Pemilihan kolom didasarkan pada duanilai DBC paling tinggi, sehingga kolom yang diuji dengan metode ISEC adalah monolith dengan variasi %T30, 35 dan %C50.

Pembuatan monolith menitik beratkan pada penekanan proporsi mesopore dan memaksimalkan proporsi *macropore*. Agar memberikan kinetika transfer massa secara konvektif. Akan tetapi keberadaan *mesopore* dan micropore harus dipertimbangkan juga karena dapat menyediakan luas permukaan yang besar untuk interaksi antarfasediam dan molekul analit. *Micropore* dapat menyebabkan adsorpsi *irreversible* yang tidak diinginkan dan resistansi transfer massa. Oleh karena itu, idealnya monolith keseimbangan antara proporsi *flow-through pores* (untuk transfer massa secara konvektif) dan luas permukaan yang

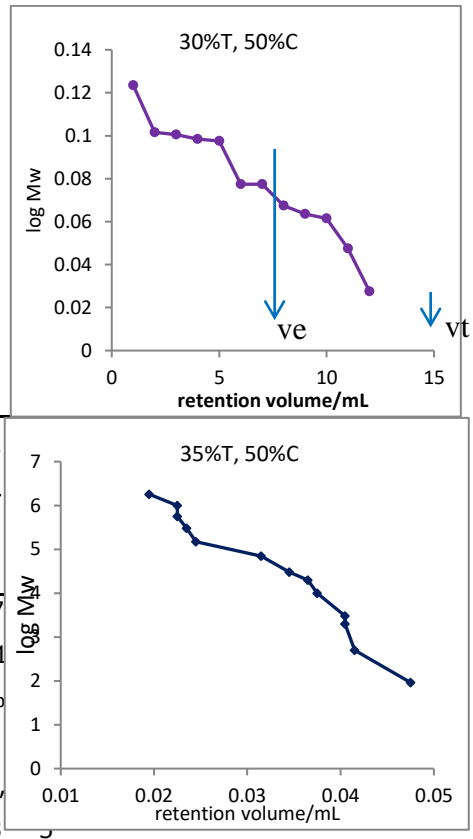
memadai (ditandai dengan proporsi *mesopore*) sehingga mendapatkan *binding capacity* yang baik dan pemisahan secara kromatografi untuk aplikasi yang diinginkan (Sabarudin et al, 2012).

Tabel 5.5 Total (ϵ_t), eksternal (ϵ_e), internal (ϵ_i), porositas dari kolom monolith

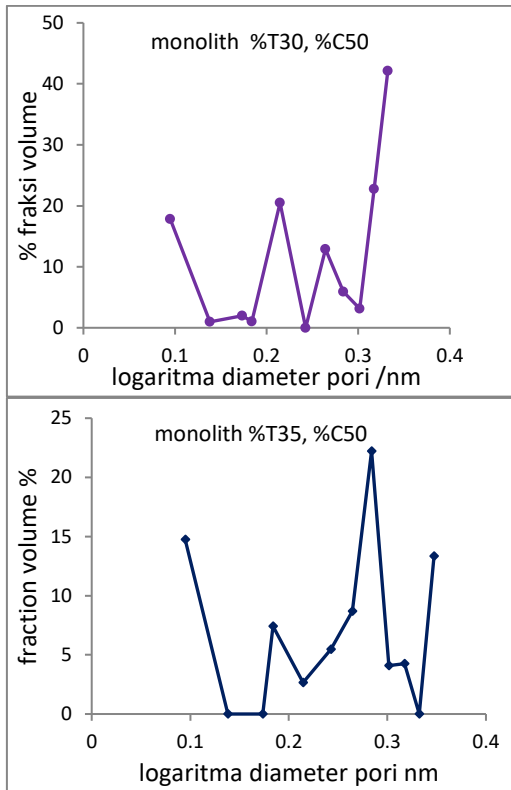
% T	%C	v_e	v_t	Porositas total	Porositas eksternal	Porositas internal	micropores
30	50	0,0198	0,125	6,225	4,875	1,350	17,81
35	50	0,149	0,108	2,375	1,225	1,150	12,63

Lajualir THF 0,05 ml/min, volume sampel polistirene 2 μ L.

Berdasarkan Tabel 5.4 dapat diketahui distribusi pori yaitu total pori (ϵ_t), eksternal pori (ϵ_e), internal pori (ϵ_i) dari monolith Kolom monolith.



Gambar 5.7 Kurva ISEC Logaritma massa molekul (**Mw**) dari polistirene standard vs volume retensi . monolith %T30 dan %C50 a), monolith %T35 dan %C50 b) suhu polimerisasi 60°C, 24 jam

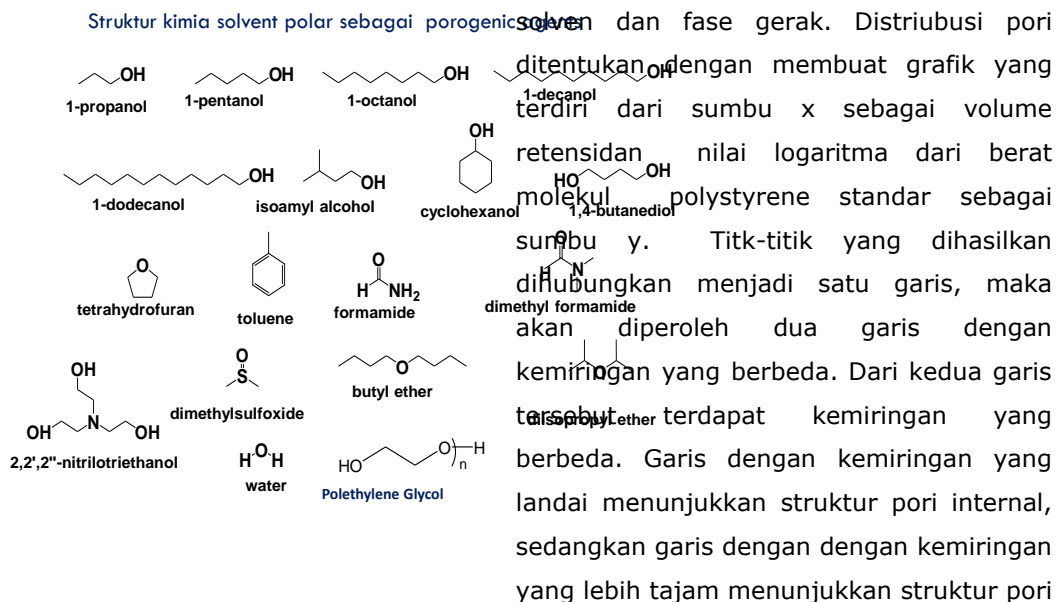


Gambar 5.8 Kurva ISEC Distribusi Ukuran Pori Monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA). monolith %T30 dan %C 50 a), monolith %T35 dan %C50 b) suhu polimerisasi 60°C, 24 jam

Gambar 2.6 Beberapa struktur porogen

Porogen berpengaruh pada ukuran *flow-through pores*, *micropores* dan *macropores*. Sehingga diperlukan proporsi dan rasio ideal dan memadai, untuk menghasilkan ukuran dan jenis pori yang sesuai dengan sampel yang akan dipisahkan. Pemilihan porogen yang polar dan yang lebih non polar juga akan mempengaruhi kinerja dari kolom monolith yang dihasilkan.

Untuk mengetahui distribusi *flow-through pores*, *mesopore*, dan *micropore*, maka dilakukan ISEC menggunakan polystyrene standard (MW = 500, 2000, 3000, 10000, 20000, 30000, 70000, 150000, 300000, 700000, 1000000, 1800000) dan pompa LC-20AD, autosampler SIL-20AC, oven CTO-20AC, dan detektor UV/VIS SPD-20A. Volume untuk injeksi sampel diatur 2 µL untuk masing-masing polistirene standar. Laju alir konstan 0,05 mL/min pada suhu ruangan. Panjang gelombang 254 nm digunakan untuk mendeteksi serapan maksimum polistirene standar. THF digunakan sebagai



eksternal. Perpotongan antara kedua garis tersebut menunjukkan *excluded pores*.

Dari hasil uji distribusi pori kedua kolom monolith Poly(MATE-co-VBC-co-EDMA) Proporsi mesopores dan macropores cukup berimbang.

4. Conclusion

Pembuatan monolith menitik beratkan pada penekanan proporsi mesopore dan memaksimalkan proporsi *macropore*. Agar memberikan kinetika transfer massa secara konvektif. Akan tetapi keberadaan *mesopore* dan *micropore* harus dipertimbangkan juga karena dapat menyediakan luas permukaan yang besar untuk interaksi antara fase diam dan molekul analit. *Micropore* dapat menyebabkan adsorpsi *irreversible* yang tidak diinginkan dan resistansi transfer massa. Oleh karenanya, idealnya monolith keseimbangan antara proporsi *flow-through pores* (untuk transfer massa secara konvektif) dan luas permukaan yang memadai (ditandai dengan proporsi *mesopore*) sehingga mendapatkan *binding capacity* yang baik dan pemisahan secara kromatografi untuk aplikasi yang diinginkan (Sabarudin et al, 2012).

Referensi

Al-Bokari, M., Cherrak, D., Guiochon, G., (2002), Determination of the porosities of monolithic columns by inverse size-

exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 975, 275-284.

Cabera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H.M., Minakuchi, H., Nakanishi, K., (2000), A new monolithic-type HPLC column for fast separations, *Journal of High Resolution Chromatography*, 23, 93-99

Hsieh, T. F. dan R. L. Fischer. (2005). *Biology of chromatin dynamics. Annual Review of Plant Biology* 56: 327-351.

Falck, E., Groenhagen, A., Muhlich, J., Hempel, G., Wunsch, B., (2012), Genome-wide DNA methylation level analysis by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection after treatment of cell lines with azacytidine and antifolates, *Analytical Biochemistry*, 421, 439-445

Fu, L.M., Lin, C.H., (2004), High-resolution DNA separation in microcapillary electrophoresis chips utilizing double-L injection techniques, *Electrophoresis*, 25, 3652-3659.

Hjerten, S., Liao, J.L, Zhang, R., (1989), High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography*, 473, 273-275.

Huber, C.G., Oefner, P.J., Preuss, E., Bonn, G.K., (1993), High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles, *Nucleic Acids Research*, 21, 1061-1066.

K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* (2005), 6, 597.

Kim, S.J., Kelly, W.K., Fu, A., Haines, K., Hoffman, A, Zheng, T, Zhu, Y., (2011), Genomewide methylation analysis identifies involvement of TNF- α mediated cancer pathways in prostate cancer, *Cancer Letters*, 302, 47-53.

Lubbad. S., Mayr., B., Huber, C.G., Buchmeiser, M.R., (2002), Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: influence of stoichiometry on separation, *Journal of Chromatography A*, 959, 121-129

- Lu.YQ, Lin.Z.X., Svec. F (2012) Hypercrosslinked large surface area porous polymer monoliths for hydrophilic interaction liquid chromatography of small molecules featuring zwitterionic functionalities attached to gold nanoparticle shield in layered structure. *Anal Chem* 84: 8457–8460.
- Lubbad, S., Mayr, B., Huber, C.G., Buchmeiser, M.R., 2002, Micropreparative fractionation of DNA fragments on metathesis-based monoliths: influence of stoichiometry on separation, *Journal of Chromatography A*, 959, 121-129.
- Morris, M.R., Ricketts, C. J., Gentle, D., McDonald, F., Carli, N., Khalili, H., Brown, M., Kishida, T., Yao, M., Banks, R.E., Clarke, N., Latif, F., Maher, E. R., 2011, Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma, *Oncogene* 30, 1390–1401.
- Nakanishi, K., Soga, N., (1991), Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: systems containing Ppoly(sodium styrenesulfonate), *Journal of American Ceramic Society*, 74, 2518
- Nischang I, Teasdale I, Brüggemann. O (2010), Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography *Journal of Chromatography A*: 7514–7522
- Plass, C. and P. D. Soloway. (2002). DNA methylation, imprinting, and cancer. *European Journal of Human Genetics* 10: 6-16.
- Sabarudin, A.,(2012), Development of monolithic micro-extraction system for online collection/ concentration of trace elements: study on the substances circulation in the hydrosphere , JSPS report (unpublished).
- Sabarudin, A., Huang, J., Sakagawa, S., Umemura, T., (2012), Preparation of Methacrylate-Based Anion-Exchange Monolithic Microbore Column for Chromatographic Separation of DNA Fragments and Oligonucleotides, *Analytica Chimica Acta*, 736, 108-114.
- Sabarudin, A., Shu, S., Umemura, T., (2013), Microbore Monolithic Microreactor for High-Speed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction, *Angewandte Chemie* (in submission).
- Sabarudin, A., Rahmi, D., Takasaki, Y., Umemura, T., (2010), Development of monolithic chelating adsorbent for solid phase microextraction of trace elements in water samples, *Annual Meeting of Japan Society For Analytical Chemistry*, 15-17 September, Sendai, Japan.
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, et al , (2007), Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits, *J. PLoS Genetics*, 3, e115.
- Shabo, A., (2008), Integrating genomics into clinical practice: standards and regulatory challenges, *Current opinion in molecular therapeutics*, 10, 267–272.
- Shu, S., Kobayashi, H., Kojima, N., Sabarudin, A., Umemura, T.,(2011), Preparation and characterization of lauryl methacrylate-based monolithic microbore column for reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1218, 5228-5234.
- Shu, S., Kobayashi, H., Okubo, M., Sabarudin, A., Butsugan, M., Umemura, T., (2012), Chemical anchoring of lauryl methacrylate-based reversed phase monolith to 1/16" o.d. polyetheretherketone tubing, *Journal of Chromatography A*, 1242, 59-66.
- Svec, F., (2004), Porous monoliths: emerging stationary phases for HPLC and related methods, *LCGC LC Column Technology Supplement*, June, 18–21
- Takasaki, Y., Sakagawa, S., Inagaki, K., Fujii, S.I., Sabarudin, A., Umemura, T., Haraguchi, H., (2012), Development of salt-tolerance interface for an high performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry system and its application to accurate

- quantification of DNA sample, *Analytica Chimica Acta* ,713, 23.
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., (2008), Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer, *Cancer Research*, 68, 4123.
- Ueki, Y., Umemura, T., Li, J., Odake, T., Tsunoda, K., (2004), Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography, *Analytical Chemistry* ,76, 7007-7012.
- Umemura, T., Ueki, Y., Tsunoda, K-I., Katakai, A., Tamada, M., Haraguchi, H., (2006), Preparation and characterization of methacrylate-based semi-micro monoliths for high-throughput bioanalysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 566-571.
- Urban J, Svec F, Fréchet JMJ (2010) Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column. *Anal Chem* 82: 1621–1623.
- Yang, I., Fortin, M.C., Richardson, J. R., Buckley, B., (2011), Fused-core silica column ultraperformance liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry for determination of global DNA methylation status, *Analytical Biochemistry*, 409, 138-14.
- Yin, H., Zhou, Y., Xu, Z., Chen, L., Zhang, D., Ai, S., (2013), An electrochemical assay for DNA methylation , methyltransferase activity and inhibitor screening based on methyl binding domain protein, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 492-497.
- Li Y., Huang C., Zheng J., Qi H. (2012) Electrogenerated chemiluminescence biosensing method for the detection of DNA methylation and assay of the methyltransferase activity *Biosensors and Bioelectronics* 38 407–410.
- Svec. F. (2010) Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation *Journal of Chromatography A*, 1217 902–924.
- Nischang. I, Svec. F., Fréchet .J (2009)., Effect of capillary cross-section geometry and size on the separation of proteins in gradient mode using monolithic poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) columns *J. Chromatogr. A* 1216 2355–236.
- Chen. M.L., Liu. Y.L., Xing. X.W., Zhou. X., Feng. Y.Q., ,* Yuan.B.Q., (2013) Preparation of a Hyper-cross-linked Polymer Monolithic Column and Its Application to the Sensitive Determination of Genomic DNA Methylation *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 1035 – 1041