

РЫБАЛКО МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОНОЛИТНЫХ ПОРИСТЫХ КОЛОНОК В
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**



Москва - 2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им М.В Ломоносова

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Нестеренко Павел Николаевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Яшин Яков Иванович

доктор химических наук, профессор
Ланин Сергей Николаевич

Ведущая организация: Институт физической химии РАН

Защита диссертации состоится 17 ноября 2005 г. в 16 час 10 мин. в ауд 344 на заседании диссертационного совета Д501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В Ломоносова по адресу:

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ, химический факультет

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ.

Автореферат разослан 17 октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Торочешникова И.И

2006-4
21597

2212A21

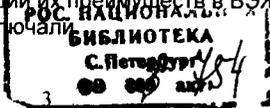
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Традиционно используемая в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) колонка, представляет собой стальную, стеклянную или полимерную трубку, заполненную частицами сорбента. Наиболее важной характеристикой хроматографической колонки является ее эффективность, которая обратно пропорциональна размеру частиц и прямо пропорциональна длине колонки, а также зависит от однородности набивки колонки и скорости пропускания элюента. Обычно для заполнения колонок используют сорбенты с частицами размером 5-10 мкм. При уменьшении размера частиц с 5 до 1-3 мкм улучшается массообмен, что теоретически позволяет повысить эффективность разделения. Однако уменьшение размера частиц сопровождается ухудшением проницаемости колонки, выражающимся в резком, обратном пропорциональном размеру частиц сорбента во второй степени увеличении давления на входе в колонку. В свою очередь, оптимальное рабочее давление определяется прочностью матрицы сорбента и, обычно, не превышает 100-150 атм для сорбентов на основе силикагеля и 80-100 атм для органополимерных сорбентов, а также возможностями хроматографических насосов. Поэтому использование колонок, заполненных частицами диаметром менее 3 мкм требует уменьшения длины колонки, и, следовательно, уменьшения ее эффективности (числа теоретических тарелок на колонку). Таким образом, эффективность набивной хроматографической колонки для аналитической ВЭЖХ лимитируется максимальным давлением на входе в колонку, которое определяется размером частиц.

Стремление исследователей получить разделения на колонках, заполненных частицами 1-3 мкм большой длины положило начало развитию такого варианта хроматографии как жидкостная хроматография сверхвысокого давления, когда разделение проводят при давлении вплоть до 9000 атм. Другое решение проблемы повышения эффективности разделения состоит в использовании принципиально новых сорбционных материалов, обладающих более высокой проницаемостью.

В конце 1990-х гг. ведущие производители хроматографических колонок освоили производство перспективных для решения этих проблем сорбентов, так называемых монолитных пористых колонок (МПК). МПК представляет собой непрерывную пористую структуру с бимодальным распределением пор. Сквозные транспортные поры обеспечивают низкое давление на входе в колонку, а мезопоры, формирующие развитую поверхность с большой площадью, обеспечивают высокую эффективность и нагрузочную способность. Эффективность кремнеземной монолитной колонки Chromolith RP 18e сравнима с эффективностью набивных колонок, заполненных частицами силикагеля размером 3 мкм, причем высокая скорость массообмена обеспечивает минимальные потери в эффективности разделения при высоких скоростях подвижной фазы. Давление на входе в монолитную колонку Chromolith приблизительно в 6 раз меньше, чем для колонки, заполненной частицами размером 3-5 мкм при одинаковых размерах колонок. Совокупность этих свойств позволяет выделить МПК как отдельную группу неподвижных фаз перспективных для использования в различных вариантах ВЭЖХ.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в изучении свойств монолитных пористых CIM (Convective Interaction Media) дисков, на основе сополимера глицидилметакрилата и этилендиметакрилата, и МПК Chromolith RP 18e на основе силикагеля и реализации их преимуществ в ВЭЖХ. Конкретные задачи исследования включали



- модифицирование метакрилатных СИМ дисков различными ионообменными и комплексообразующими функциональными группами – диольными, олигоэтиленаминами, аминокислотами и иминодиуксусной кислотой,
- изучение гидродинамических свойств МПК – сопротивления потоку и эффективности в зависимости от скорости пропускания элюента и их сравнение со свойствами набивных колонок;
- установление зависимости эффективности МПК от вязкости элюента при высоких линейных скоростях;
- изучение ионообменных и комплексообразующих свойств монолитных дисков, модифицированных олигоэтиленаминами и аминокислотами,
- установление возможностей использования монолитных пористых дисков для динамического сорбционного концентрирования неорганических ионов и пептидов,
- разработка нового варианта элюирования при использовании подвижной фазы постоянного состава с градиентом потока элюента для разделения анионов в варианте ионной ВЭЖХ и для разделения гомологов органических соединений в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ,
- разработка методики определения теобромона, теофиллина и кофеина в газированных напитках, чае и кофе в изофлюэнтном режиме и с градиентом потока элюента.

Научная новизна. Синтезировано 6 типов монолитных пористых дисков, модифицированных диольными группами, олигоэтиленаминами, аминокислотами и иминодиуксусной кислотой. Изучены их ионообменные свойства по удерживанию модельных органических соединений и неорганических анионов.

При разделении анионов на СИМ дисках впервые отмечен эффект улучшения эффективности разделения при увеличении скорости пропускания элюента при скоростях, значительно превышающих значения, соответствующие минимуму кривой Ван Деемтера. При изучении гидродинамических свойств МПК на основе силикагеля установлено, что зависимости эффективности от линейной скорости элюента заметно отличаются от классического вида, описываемого уравнением Ван Деемтера. Установлено, что при высоких скоростях элюента на МПК на зависимости появляется второй минимум. Эффект зависит от размера молекулы сорбата и появляется при более низких линейных скоростях при использовании элюентов с большей вязкостью.

Предложен новый вариант градиентной хроматографии при постоянной концентрации элюента, но с градиентом потока элюента. Показаны преимущества этого метода при разделении сложных смесей – полиароматических углеводородов (ПАУ), ди-*n*-алкилфталатов и метилксантинов. Наиболее эффективно использование этого приема для разделения смесей, компоненты которых сильно отличаются по удерживанию, а также гомологов органических соединений.

Предложен новый термин для разделения при постоянной скорости потока с элюентом постоянного состава – изофлюэнтное элюирование. На ультракороткой колонке Chromolith RP 18e длиной 5 мм получено разделение 8-ми компонентной смеси ПАУ в изофлюэнтном режиме и с градиентом потока.

Практическая значимость. Проведена оценка возможностей применения СИМ дисков с различными функциональными группами для динамического сорбционного концентрирования ионов переходных металлов в варианте комплексообразовательной хроматографии, гистидин-содержащих пептидов в варианте лигантообменной хроматографии и для разделения неорганических анионов в варианте ионной хроматографии. Показана возможность применения

С1М дисков, используемых в ВЭЖХ, для концентрирования переходных металлов с перистальтическим насосом

Показана перспективность использования градиента потока для сокращения времени разделения сложных смесей на примере разделения неорганических анионов в варианте ионной хроматографии и гомологов органических соединений – ПАУ и ди-*n*-алкилфталатов – в варианте ОФ ВЭЖХ. Показаны преимущества использования ультракоротких монолитных колонок для разделения ПАУ в варианте ОФ ВЭЖХ в случае, когда эффективность обычной хроматографической колонки длиной 5-10 см избыточна

Разработана методика определения теобромина, теофиллина и кофеина в газированных напитках, чае и кофе на монолитной пористой колонке в изофлюэнтной ОФ ВЭЖХ и с градиентом потока. Пределы обнаружения метилксантинов составляют 0.05 мкг/мл для теобромина и теофиллина и 0.1 мкг/мл для кофеина

На защиту выносятся следующие положения:

- синтез монолитных пористых дисков новыми функциональными группами и изучение их ионообменных и комплексообразующих свойств;
- гидродинамические свойства монолитных метакрилатных С1М дисков и МПК на основе силикагеля Chromolith RP-18e различной длины и их сравнение с набивными колонками;
- улучшение эффективности МПК при высоких скоростях элюента, значительно превышающих оптимальные, зависимость этого явления от вязкости элюента,
- применение монолитных пористых С1М дисков для концентрирования переходных металлов и гистидин-содержащих пептидов,
- применение градиентов потока элюента для разделения анионов в варианте ионной хроматографии и для разделения ПАУ и ди-*n*-алкилфталатов в варианте ОФ ВЭЖХ, принцип выбора оптимального градиента потока,
- методика определения теобромина, теофиллина и теобромина в газированных напитках, чае и кофе в изофлюэнтных условиях и с градиентом потока элюента

Апробация работы. Основные результаты диссертации изложены в публикациях и доложены на Международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2001», «Ломоносов-2003» и «Ломоносов-2004» (Москва), на Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы хроматографии» (Москва, 2002), на Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Краснодар, 2002); на 3-ем Международном симпозиуме по разделению в бионауках «100 лет хроматографии» (Москва, 2003); на Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы» (Москва, 2004); на Всероссийской конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2004), на 28-ом Международном симпозиуме по капиллярной хроматографии и электрохроматографии (Лас Вегас, 2005), на 29-ом Международном симпозиуме HPLC-2005 (Стокгольм, 2005).

Публикации по работе. По материалам диссертации опубликовано 5 статей и 11 тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, выводов и списка литературы (173 наименования). Работа изложена на 180 страницах печатного текста, содержит 52 рисунка и 46 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В первой главе диссертации рассмотрены способы получения пористых монолитов с различной химией поверхности, а также их пористые, механические, гидродинамические свойства. Систематизированы данные о коммерчески выпускаемых МПК, условиях их эксплуатации и областях практического применения. Представлены примеры использования МПК в ионной, обращенно-фазовой, аффинной хроматографии, капиллярной электрохроматографии. На основании данных литературы сделан вывод о перспективности изучения свойств и использования МПК в различных областях ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

В работе изучены коммерчески выпускаемые монолитные пористые метакрилатные СИМ диски (BIASeparations, Словения) и МПК на основе силикагеля марки Chromolith RP 18e (Merck, Германия). Основные характеристики изученных МПК представлены в табл. 1. Комплексообразующие свойства монолитных СИМ дисков, модифицированных олигоэтиленаминами, сравнивали со свойствами силикагеля Силохром С-120 (ДЭТА-SiO₂), ($d_c = 40$ мкм, $S_{уд} = 120$ м²/г), помещенного в пластиковый патрон.

Для модифицирования ДЭТА и ТЭТА СИМ диск помещали в чистый амин на 24 часа при комнатной температуре. Для модифицирования пролином, гидроксипролином и ИДК диск помещали в 7-8 мМ раствор соответствующего лиганда с рН 10-11 и встряхивали 24 ч при 60 °С. Для получения СИМ-Диол и для гидролиза непрореагировавших с аминокислотами эпоксидных групп, диски встряхивали в течение 3-х часов в 0.1 М HCl или H₂SO₄ при нагревании (50 °С).

Таблица 1. МПК, использованные в работе и их основные характеристики

МПК	Химия поверхности	Матрица	Форма и размеры (х d, мм)	Пористые свойства	Условия эксплуатации
СИМ					
СИМ-Диол*	диольные группы	ГМА-ЭДМА	Диск (3×16)	$d_{\text{макро}} = 1500$ нм $d_{\text{мезо}} = 100$ нм $S_{уд} = 43.3$ м ² /г $V = 0.34$ мл	$F_{\text{max}} > 10$ мл/мин $F_{\text{раб}} = 5$ мл/мин $p_{\text{max}} = 200$ атм $p_{\text{раб}} = 50$ атм рН 1-14
СИМ-ЭДА	этилендиамин				
СИМ-ДЭТА*	диэтилентриамин				
СИМ-ТЭТА*	триэтилентетрамин				
СИМ-Pro*	L-пролин				
СИМ-HyPro*	L-гидроксипролин				
СИМ-ИДК*	иминодиуксусная к-та				
Chromolith					
Chromolith RP 18 e	C18	силикагель	Цилиндр (5, 50 и 100×4.6)	$d_{\text{макро}} = 2$ мкм $d_{\text{мезо}} = 13$ нм $S_{уд} = 300$ м ² /г	$F_{\text{max}} = 5$ мл/мин $p_{\text{max}} = 200$ атм рН 2-7.5 $T_{\text{max}} = 45$ °С

*синтезированы в работе

В работе использовали хроматографическую систему, состоящую из насоса высокого давления Beckman 114M (США) или Shimadzu LC-10AT (Германия) с программируемой скоростью потока элюента, инжектора Rheodyne (США), детекторов спектрофотометрического Uvicord S 2238 (Швеция) или кондуктометрического Conductolyser 5300B (Швеция), системы сбора и обработки хроматографических данных «Экохром» или «Мультихром» (Россия).

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОЛИТНЫХ ПОРИСТЫХ КОЛОНОК

Монолитные пористые колонки обладают большими каналоподобными транспортными порами, которые пронизывают монолит по всей длине. На практике отличие МПК от пористых микрочастиц проявляется в гидродинамических свойствах, т.е. в уменьшенном сопротивлении потоку и в сопротивлении массопереносу.

Сопротивление потоку. Сопротивление потоку СИМ дисков и влияние модифицирования поверхности на эту характеристику оценено по зависимости давления на входе в колонку от скорости пропускания элюента. Зависимости давления на входе в колонку от линейной скорости подвижной фазы для СИМ-ДЭТА и СИМ-Диол (рис. 1) линейны во всем изученном интервале скоростей и описываются следующими уравнениями:

$$\text{СИМ-Диол} \quad p = (b \pm \Delta b)u = (5.8 \pm 0.3)u \quad (P=0.95, m=12),$$

$$\text{СИМ-ДЭТА.} \quad p = (b \pm \Delta b)u = (6.1 \pm 0.1)u \quad (P=0.95, m=16)$$

где p – давление на входе в колонку (атм), u – линейная скорость подвижной фазы (мм/с). Для СИМ дисков u (мм/с) = $0.295 \times F$ (мл/мин). Тангенс угла наклона прямой (коэффициент b (атм·с/мм)) пропорционален сопротивлению колонки и одинаков в пределах погрешности. Таким образом, модифицирование поверхности ДЭТА достоверно не снижает проницаемость монолитных дисков.

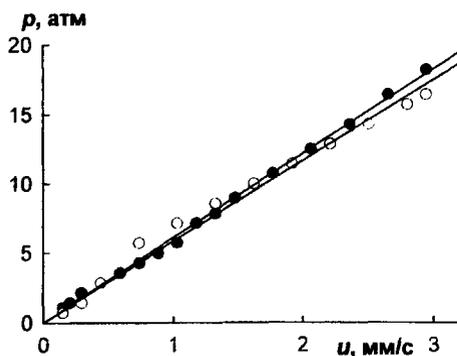


Рис. 1. Зависимость давления на входе в колонку от u элюента для СИМ-ДЭТА (●) и СИМ-Диол (○). Элюент дистиллированная вода.

Зависимость эффективности от линейной скорости пропускания элюента (кривые Ван Деемтера). Уменьшение эффективности разделения при увеличении скорости пропускания элюента связано с размыванием хроматографической полосы в колонке, в соединениях системы и в детекторе. Размывание в МПК описывается расширенным уравнением Ван Деемтера или уравнением Родригеса, которое кроме вихревой (A), продольной (B) диффузии и сопротивления массопереносу (C) учитывает вклад конвекции (K)

$$H = A + B/u + C \cdot u + K \cdot u. \quad (1)$$

Для оценки сопротивления массопереносу СИМ дисков получены зависимости ВЭТТ от линейной скорости элюента для СИМ-Рго (рис. 2), которые хорошо описываются уравнением вида (1). Максимальное число теоретических тарелок на диск составляет 31 (табл. 2).

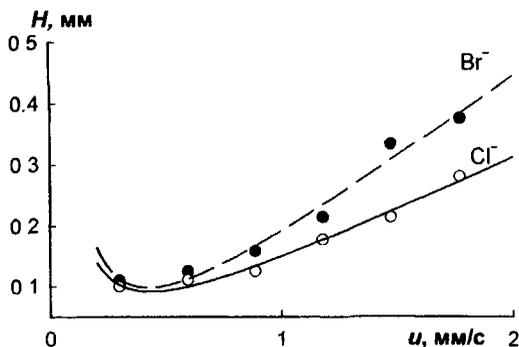


Рис. 2. Зависимости ВЭТТ от u 5 мМ янтарной кислоты для СІМ-Pro

Таблица 2. Координаты минимумов и значения параметра $(C+K)$ для кривых Ван Деемтера ($P=0.95$) для СІМ-Pro.

Параметры	u_{min} , мм/с	H , мм	$(C+K)$, с	R^2	m	N , теор т/диск	N , теор т/м
для Br	~0.4-0.5	0.098	0.28 ± 0.08	0.978	6	31	10.200

Сопротивление массопереносу колонок типа Chromolith RP 18e оценено по зависимостям ВЭТТ для ПАУ разного размера (рис 3) В табл 3 приведены коэффициенты уравнения Ван Деемтера, рассчитанные из экспериментальных данных, а также литературные данные для различных ПАУ Во всех случаях наблюдается хорошее соответствие экспериментальных и литературных данных для монолитных колонок типа Chromolith RP-18e

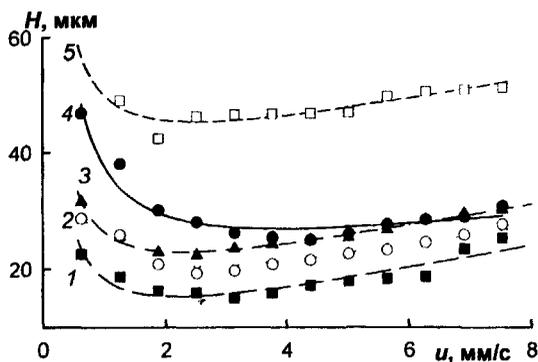


Рис. 3. Кривые Ван Деемтера для нафталина (1), антрацена (2), пирена (3), бензола (4), дибенз[а,һ]антрацена (5) ПФ ацетонитрил - вода (60:40 об %). Колонка - Chromolith Performance RP-18e 100x4 6 мм

Для ряда ПАУ коэффициент $(C+K)$ одинаков в пределах погрешности Сравнение коэффициентов для набивной хроматографической колонки Competitor, заполненной частицами 5 мкм показало, что сопротивление массопереносу и вклад конвекции, для монолитной колонки в 2 - 3 раза меньше Согласно теории Родригеса, это свидетельствует о том, что скорость процесса сорбции - десорбции на монолитной колонке значительно выше и приблизительно одинакова для гомологов Сравнение коэффициентов $(C+K)$ уравнения Родригеса для СІМ дисков (табл 2) и колонки типа Chromolith RP 18e (табл 3), показало, что для СІМ дисков этот параметр приблизительно в 50-100 раз больше, чем для Chromolith Скорее всего, это связано с более медленной скоростью массообмена

в случае ионного обмена, определяемой более сложным характером этого процесса, по сравнению с гидрофобными взаимодействиями

Таблица 3. Расчетные значения параметров A , B и $(C+K)$ уравнения Родригеса для бензола и ПАУ ($P=0.95$) Колонка – Chromolith Performance RP-18e 100×4.6 мм

Вещество	$A \cdot 10^5, м$	$B \cdot 10^8, м^2/с$	$(C+K) \cdot 10^3, с$	m	R^2	Элюент
Бензол	1.7 ± 0.6	1.5 ± 0.4	2 ± 1	12	0.927	АСН-Н ₂ O (60:40 об. %)
	0.49 ± 0.04^1	2.8 ± 0.4	1.33 ± 0.06	18	0.995	
	0.5 ± 0.2^2	4 ± 1	5.0 ± 0.4	10	0.996	
Нафталин	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.3	2.6 ± 0.9	12	0.829	
Антрацен	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.3	12	0.981	
	0.22 ± 0.03^1	0.48 ± 0.01	1.95 ± 0.04	19	0.999	
Пирен	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	2.2 ± 0.8	12	0.840	
Дибенз[а, h]антрацен	3.5 ± 0.8	1.0 ± 0.8	3 ± 1	11	0.756	
Трифенилен	0.98 ± 0.03^1	1.34 ± 0.07	3.0 ± 0.1	38	0.958	CH ₃ OH- H ₂ O (80:20 об. %)
Перилен	0.2 ± 0.2^1	0.51 ± 0.05	2.0 ± 0.4	10	0.987	100%-ный CH ₃ OH

¹ данные литературы для Chromolith RP-18, ² для набивной колонки Competitor, размер частиц 5 мкм

ОСОБЕННОСТИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА МОНОЛИТНЫХ ПОРИСТЫХ КОЛОНКАХ ПРИ ВЫСОКИХ СКОРОСТЯХ ЭЛЮЕНТА

Низкое сопротивление потоку МПК позволяет изучить зависимости ВЭТТ от u при скоростях элюента, значительно превышающих оптимальные значения. Однако, до сих пор подробное изучение зависимостей ВЭТТ от скорости и от вязкости элюента не проводилось. Для исследования зависимостей ВЭТТ от u при высоких скоростях элюента были выбраны 3 подвижные фазы, отличающиеся вязкостью, но имеющие одинаковую элюирующую способность, которую рассчитывали по уравнению:

$$\delta = \phi_B \delta_B + \phi_{орг} \delta_{орг} \quad (2)$$

где δ , δ_B , $\delta_{орг}$ – параметр растворимости Гильденбранда для водно-органической ПФ, воды и органического растворителя, соответственно (кал/мл), ϕ_B , $\phi_{орг}$ – объемные доли воды и органического растворителя в ПФ. Состав элюентов и времена удерживания ПАУ в зависимости от элюента приведены в табл. 4.

Зависимости ВЭТТ от u (рис. 4) значительно отличаются от классических, описываемых уравнением Ван Деемтера. Для ацетонитрилсодержащей подвижной фазы можно отметить выход кривой на плато в интервале скоростей от 0.8 до 1.25 см/с в случае нафталина. Для более вязких изопропанольной и этанольной ПФ максимум смещается в область меньших линейных скоростей и достигается для ПФ, содержащей пропанол-2 при линейной скорости 0.3 см/с для всех сорбатов, для этанолсодержащей ПФ – при скорости 0.25 см/с.

Таблица 4. Времена удерживания нафталина, антрацена и пирена для изозлюентных подвижных фаз Колонка – Chromolith Performance RP-18e 100×4 6 мм. Скорость ПФ – 1 мл/мин

Сорбат	$t_d(\text{мин}), P=0.95, n=3$		
	60% АСН*	65% этанол	58% пропанол-2
нафталин	3.93±0.09	3.6±0.1	3.46±0.01
антрацен	7.3±0.1	6.13±0.02	5.90±0.02
пирен	9.98±0.06	8.58±0.08	8.20±0.01

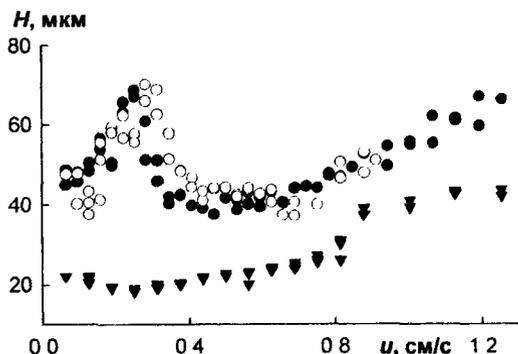


Рис. 4 Сравнение зависимости ВЭТТ от u для различных ПФ Колонка Chromolith SpeedRod RP-18e 50×4 6 мм ПФ. этанол-вода (65/35 об. %) (●), пропанол-2 – вода (58/42 об. %) (○), ацетонитрил-вода (60/40 об. %) (▼) Сорбат: нафталин.

Для изученных ПФ были определены значения динамических вязкостей η , плотности ρ и рассчитаны значения кинематической вязкости μ (табл. 5) Полученные зависимости демонстрируют, что отклонения от классического вида кривой Ван Деемтера проявляются при более низких линейных скоростях в случае ПФ с большей вязкостью

Таблица 5. Значения динамической вязкости η , плотности ρ и кинематической вязкости μ для ряда элюентов

Состав ПФ	$\eta, \text{сПуаз}$	$\rho, \text{г/см}^3$	$\mu, \text{Ст}$
ацетонитрил-вода 60/40 об. %	0.70	0.864	0.81
этанол-вода 65/35 об. %	2.24	0.887	2.52
пропанол-2 - вода 58/42 об. %	2.61	0.878	2.97

Улучшение эффективности, вызванное увеличением линейной скорости пропускания ПФ, происходит в результате эффекта вязкости растворителя, природа которого до конца не понятна. Возможно, отклонения на кривых связаны с частичным переходом ламинарного течения в турбулентное. Косвенным свидетельством возникновения турбулентного течения является вид зависимости давления на входе в колонку от линейной скорости элюента (рис. 5). Согласно закону Хагена-Пуазейля, давление на входе в МПК прямо пропорционально средней ламинарной линейной скорости потока. Отклонение зависимости от линейности говорит о возможности перехода ламинарного течения в

турбулентное. Для наименее вязкой ПФ на основе ацетонитрила полученная зависимость линейна ($R^2=0.9997$). В случае зависимости для этанольной и пропанольной ПФ происходит заметное отклонение от линейности при объемных скоростях превышающих 4 мл/мин. Для элюентов на основе этанола и пропанола-2 наблюдаются 2 минимума при различных линейных скоростях, которые соответствуют максимальной эффективности колонки. Хроматограммы разделения модельной смеси ПАУ при скоростях элюента, соответствующих первому и второму минимумам (рис. 6), демонстрируют, что этот эффект позволяет сократить время разделения ПАУ в 7 раз.

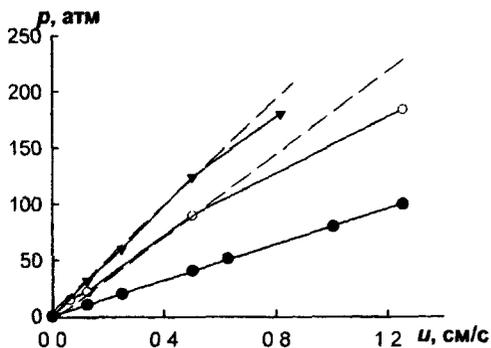


Рис. 5. Зависимости давления на входе в колонку от u . Колонка Chromolith SpeedRod RP-18e 50×4 6 мм ПФ ацетонитрил-вода (60:40 об. %), этанол-вода (65:35 об. %), пропанол-2 – вода (58:42 об. %).

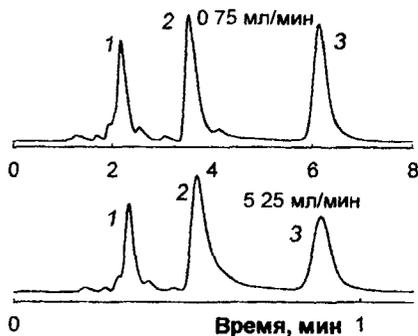


Рис. 6. Хроматограммы модельной смеси ПАУ, полученные при скоростях, соответствующих минимумам зависимости ВЭТТ от u ПФ пропанол-2 – вода (58:42 об. %). Колонка Chromolith Performance RP-18e 50×4 6 мм УФ (254 нм). 1 – нафталин, 2 – антрацен, 3 – пирен.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРАДИЕНТА ПОТОКА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ РАЗДЕЛЕНИЯ В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Обычно для уменьшения времени удерживания сильноудерживаемых сорбатов и, соответственно, сокращения времени анализа используют градиент концентрации компонента подвижной фазы с более высокой элюирующей способностью. Такое разделение проводят при постоянной скорости потока элюента, т.е. в изофлюентном режиме (*iso* – равный, *fluentum* – поток, *isofluentum*). Возможной альтернативой градиенту концентрации является градиент потока элюента. В этом случае уменьшение времени сильноудерживаемых пиков происходит за счет постепенного увеличения объемной скорости элюента постоянного состава. Для реализации этого приема достаточно одного насоса с программируемой скоростью потока, что упрощает систему по сравнению с системой создания концентрационного градиента. Гидродинамические свойства монолитных колонок позволяют варьировать объемную скорость элюента в широком диапазоне от 1 до 10 мл/мин и более, при незначительных потерях в эффективности колонки. Это дает возможность получить на МПК разделение с градиентом потока.

Использование градиента потока в ионной хроматографии для разделения анионов. На основании изучения анионообменных свойств дисков, модифицированных пролином и гидроксипролином в зависимости от природы элюента, его концентрации и pH были выбраны условия для разделения анионов

в изофлюентном режиме. При постоянной оптимальной скорости элюента - 1 мл/мин на СИМ-НурПро получено разделение Br^- , I^- и CNS^- за 40 минут (рис 7, А). Эффективность разделения в изофлюентных условиях не превышает 5000 теор/метр. Разделение той же смеси анионов получено с применением градиента потока от 1 до 4 мл/мин (рис 7, Б). Градиент скорости потока элюента позволил сократить время разделения в 2-3 раза по сравнению с изофлюентным режимом, при этом высота пиков увеличилась в 4 раза.

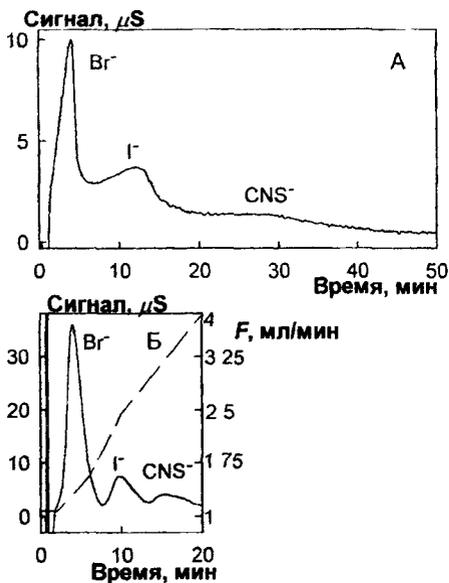


Рис. 7. Разделение Br^- , I^- и CNS^- без (А) и с градиентом потока (Б) на СИМ-НурПро. Элюент. 5 мМ янтарная кислота. Профиль градиента потока – пунктирная линия. Детектирование кондуктометрическое. Концентрация аналитов – 2 мМ, объем пробы – 5 мкл.

Разделение с градиентом потока можно рассматривать как изократическое по отношению к концентрации элюента. Это дает возможность рассчитать эффективность разделения N . Для этого вместо времени удерживания t_R в формулах следует использовать значение объема удерживания V_R , а ширину пика представить как объем

элюента, прошедшего через колонку за данный период времени. Относительное стандартное отклонение (S_r) значений объема удерживания анионов в случае градиента потока не превышает 0,03. Это подтверждает постоянство коэффициента распределения и возможность такого подхода к вычислениям. Рассчитанные значения эффективности разделения и разрешения пиков (табл. 6) при постоянной скорости и с градиентом потока демонстрируют anomalous увеличение эффективности в 2 раза при использовании градиента потока. Аналогичный эффект отмечен и для разрешения пиков.

Таблица 6. Влияние градиента потока на эффективность (N) и разрешение пиков (R_s)

Анион	Без градиента потока		С градиентом потока	
	N^*	R_s	N^*	R_s
Br^-	15,0	0,59	15,1	0,83
I^-	12,5	0,48	22,2	0,71
CNS^-	12,3	-	28,0	-

*Число теоретических тарелок на диск

Использование градиента потока элюента в ОФ ВЭЖХ для разделения гомологов органических соединений

Полиароматические углеводороды. ПАУ принадлежат к классу органических веществ, обладающих канцерогенными и мутагенными свойствами и занесены в список наиболее опасных загрязнителей. Из-за различия в гидрофобности хроматографическое определение ПАУ обычно проводят с градиентом концентрации органического растворителя.

Оптимальный профиль градиента потока можно определить из закономерностей удерживания гомологов или ПАУ. Хроматографический анализ в изократических условиях должен обеспечивать селективное разделение первых членов гомологического ряда и максимальную эффективность в изофлюентном режиме. Поэтому, сначала необходимо определить оптимальный состав подвижной фазы и скорость ее подачи, удовлетворяющие описанным выше требованиям. Профиль изменения градиента потока элюента во времени можно определить из закономерностей удерживания членов гомологического ряда. Критерием выбора оптимального состава элюента является полное разрешение пиков слабоудерживаемых членов гомологического ряда, которое достигалось для элюента вода - ацетонитрил (40:60 об. %) оптимальная скорость для разделения ПАУ в изофлюентном режиме на колонке Chromolith Performance RP 18e 100×4.6 мм и начальная скорость для градиента потока определяется минимумом на кривых Ван Деемтера и составляет 2 - 3 мл/мин.

Для создания оптимального профиля градиента потока необходимо получить зависимость удерживания членов гомологического ряда от числа атомов углерода в молекуле ПАУ:

$$\lg k = a + bn, \quad (3)$$

где n – число атомов углерода, a и b – коэффициенты. Для гомологического ряда ПАУ зависимости $\lg k$ от числа атомов углерода $n(C)$ линейна (рис. 8).

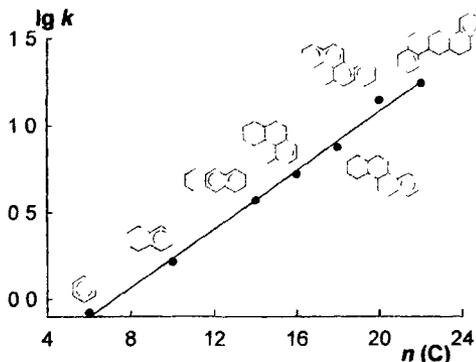


Рис. 8. Зависимость удерживания ПАУ от числа атомов углерода. Элюент ацетонитрил-вода (60:40 об. %) Колонка – Chromolith Performance RP-18e 100×4.6 мм

В выбранных условиях была получена хроматограмма для бензола и модельной смеси восьми ПАУ в изофлюентном режиме при скорости 3 мл/мин (рис. 9, А) и с линейным градиентом потока элюента от 3 до 6 мл/мин (рис. 9, В). Начальная точка градиента – время выхода пика бензола (45 с), конечная – пика пирена (2.5 мин). Для сравнения была получена хроматограмма в изофлюентном режиме при максимальной скорости использованного ранее градиента потока – 6 мл/мин (рис. 9, Б). Полученные хроматограммы демонстрируют, что при объемной скорости 3

мл/мин пики более высоких гомологов – бенз[а]пирена и дибенз[а, h]антрацена – отстают на 2-3 мин, при скорости 6 мл/мин время разделения удается сократить в 2 раза, однако пики флуорантена и пирена плохо разрешаются. Градиент потока позволяет полностью разделить все компоненты за 4 5 мин. Сравнение пологого градиента с однократным увеличением скорости или шагом (рис 9, В-Г) показало, что пологий градиент потока элюента дает выигрыш во времени равный 6% и позволяет избежать резкой механической нагрузки в виде гидравлического удара на пористый материал колонки

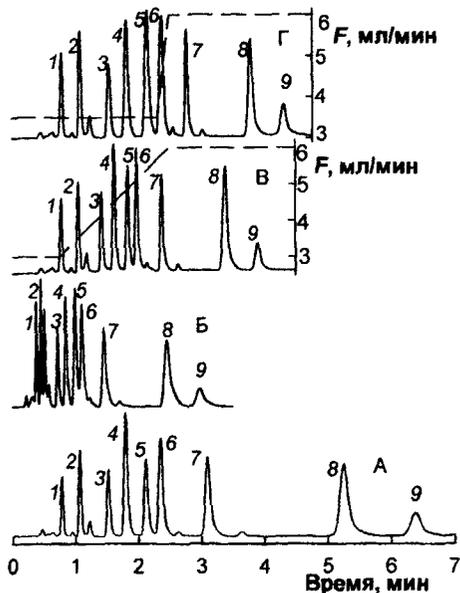


Рис. 9. Разделение модельной смеси ПАУ в изофлюентных условиях [3 мл/мин (А)] и [6 мл/мин (Б)], с градиентом потока (В) и с шаговым увеличением скорости (Г) Профиль градиента потока – пунктирная линия Колонка Chromolith Performance RP-18e 100×4 6 мм Элюент ацетонитрил - вода (60/40) УФ (254 нм) 1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - аценафтен, 4 - антрацен, 5 - флуорантен, 6 - пирен, 7 - хризен, 8 - бенз[а]пирен, 9 - дибенз[а, h]антрацен

Разделение ПАУ на ультракороткой монолитной колонке. В аналитической практике часто возникают такие задачи, когда эффективность обычной хроматографической колонки длиной 10-15 см является избыточной. Ультракороткие МПК Chromolith RP-18e Guard Cartridge 5×4 6 мм, рекомендуемые производителем в качестве предколонок, дают новые возможности для развития экспресс-анализа. В сочетании с градиентом потока элюента время разделения может быть значительно сокращено.

В оптимальных изофлюентных условиях (элюент - ацетонитрил/вода (40/60 об %), 3 мл/мин) была разделена модельная 8-ти компонентная смесь ПАУ за 6 мин (рис 10, А). Эта смесь также разделена с линейным градиентом потока элюента от 3 до 10 мл/мин (рис 10, Б). Начальная точка градиента – время выхода нафталина (0 5 мин), конечная – пика бенз[а]пирена (3 мин).

Ди-н-алкилфталаты. Другим объектом исследования были выбраны эфиры о-фталевой кислоты. Их широко используют в качестве пластификаторов в химической промышленности, а также в вакуумных насосах как малолетучие жидкости. Аналогично ПАУ, для разделения ди-н-алкилфталатов обычно используют градиент состава элюента. На основании изучения удерживания ди-н-алкилфталатов (C₁-C₈) от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе и от числа атомов углерода в алкильном радикале выбраны условия для

изофлюэнтного разделения и разделения с градиентом потока элюента. Разделение в изофлюэнтном режиме (элюент – ацетонитрил/вода (70/30 об. %), скорость 2 мл/мин) не является оптимальным и требует 26 мин (рис. 11, А). Разделение с градиентом потока от 2 до 10 мл/мин позволило сократить время анализа с 26 до 8 мин (рис. 11, В). Начальная точка градиента потока – время выхода диэтилфталата (1,16 мин), конечная – ди-*n*-гептилфталата (4,5 мин). Следует отметить, что в отличие от ПАУ оптимальный профиль градиента потока при разделении фталатов описывается логарифмической зависимостью.

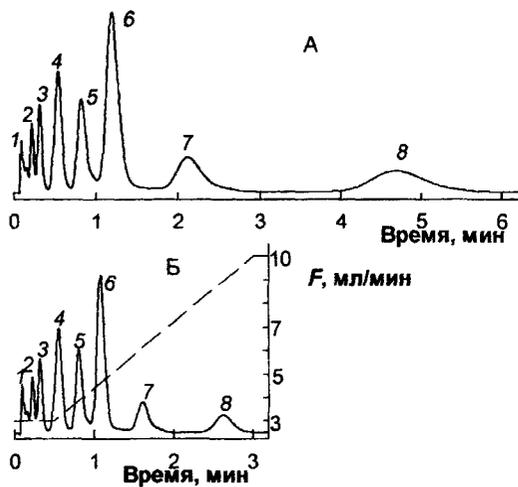


Рис. 10. Разделение модельной смеси ПАУ в изофлюэнтных условиях со скоростью 3 мл/мин (А) и с градиентом потока (Б). Пунктирная линия – профиль градиента потока. Колонка: Chromolith RP-18e 5×4.6 мм. Элюент ацетонитрил – вода (40/60 об. %) УФ (254 нм). 1, 2 – примеси, 3 – нафталин, 4 – аценафтен, 5 – антрацен, 6 – пирен, 7 – хризен, 8 – бенз[а]пирен.

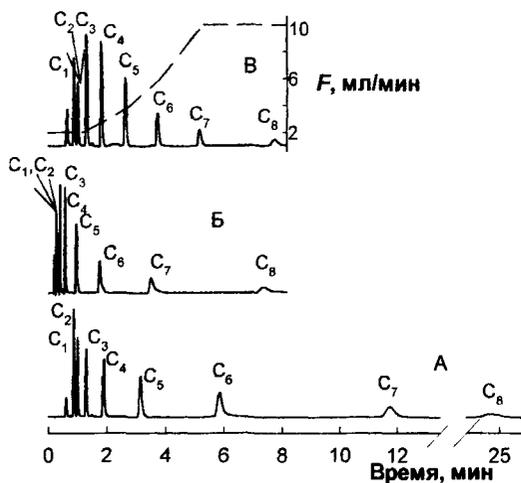


Рис. 11. Разделение модельной смеси ди-*n*-алкилфталатов (C₁-C₈) в изофлюэнтных условиях при скорости 2 мл/мин (А) и 6 мл/мин (Б) и с градиентом потока (В). Колонка Chromolith Performance RP-18e 100×4.6 мм. Элюент ацетонитрил – вода (70/30 об. %) УФ (254 нм).

Метилксантины. В настоящее время большое внимание уделяют контролю содержания алкалоидов группы метилксантинов в пищевых продуктах и лекарственных препаратах. Важнейшими представителями этой группы

соединений являются теofilлин (ТФ), теобромин (ТБ) и кофеин (К). Эти соединения содержатся в кофе, какао и шоколаде. Избыточное потребление ТФ, ТБ и К может вызвать побочные реакции и даже приводить к смерти. Поэтому необходим контроль за содержанием метилксантинов в пищевых продуктах. Кроме того, представляет интерес сравнение метрологических характеристик количественного определения в изофлюентных условиях и с градиентом потока.

Удерживание ТБ, ТФ и К изучено в зависимости от концентрации ацетонитрила и от концентрации H_3PO_4 . Оптимальное разделение достигается с подвижной фазой состава ацетонитрил - 3 мМ H_3PO_4 (5:95). На рис. 12 представлены хроматограммы модельной смеси метилксантинов в изофлюентных условиях и с градиентом потока (начальная точка - «мертвое» время (1.35 мин); конечная - после выхода пика К (5.5 мин)). Относительное стандартное отклонение S_r , высот пиков в случае градиента потока не превышает 0.05.

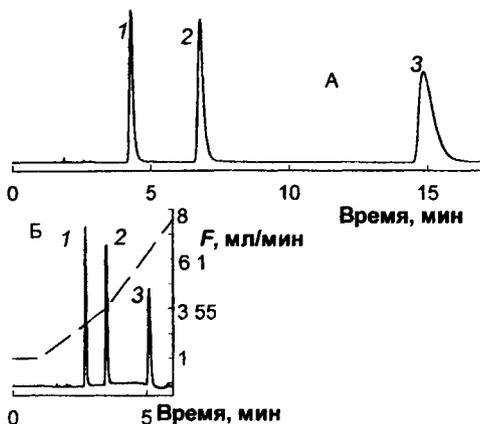


Рис. 12. Разделение модельной смеси ТБ (0.77 мг/мл) (1), ТФ (0.73 мг/мл) (2) и К (1 мг/мл) (3) в изофлюентных условиях (1 мл/мин (А)) и с градиентом потока (Б). Колонка Chromolith Performance RP-18e 100×4.6 мм УФ (280 нм). Градиент потока - пунктирная линия.

Методика определения теобромину, теofilлину и кофеину в чае, кофе и кофеинсодержащих энергетических напитках методом ОФ ВЭЖХ на колонке Chromolith Performance RP-18e 100×4.6 мм

Предложена методика определения ТБ, ТФ и К в энергетических напитках, чае и кофе. Разделение и определение проводили в изофлюентных и градиентных условиях. Подвижная фаза - ацетонитрил - 3 мМ H_3PO_4 (5:95). В изофлюентных условиях - скорость 1 мл/мин, в случае градиента потока изменяется следующим образом:

0-1 мин	1 мл/мин
1-3.5 мин	от 1 до 3.5 мл/мин
3.5-6 мин	от 3.5 до 8 мл/мин

Идентификацию хроматографических пиков проводили, сравнивая их времена удерживания t_R с t_R теобромину, теofilлину и кофеину на хроматограмме модельной смеси. Содержание индивидуальных веществ в образце определили по градуировочным графикам зависимости высоты хроматографического пика от концентрации вещества. Метрологические характеристики методики определения метилксантинов представлены в табл. 7. Хроматограмма образца мате

метилксантинов представлены в табл 7 Хроматограмма образца мате представлена на рис 13, результаты определения метилксантинов в энергетическом напитке Adrenaline Rush, в растворимом кофе и мате - в табл 8

Таблица 7. Характеристики методики определения метилксантинов в изофлюентных условиях и с градиентом потока (P=0 95)

Характеристика	скорость ПФ - 1 мл/мин			С градиентом		
	ТБ	ТФ	К	ТБ	ТФ	К
c_n , мг/мл	0 026	0 023	0 012	0 035	0 020	0 061
c_{min} , мкг/мл	0 046	0 046	0 094	0 051	0 055	0 12
R^2	0 999	0 999	0 999	0 999	0 999	0 996

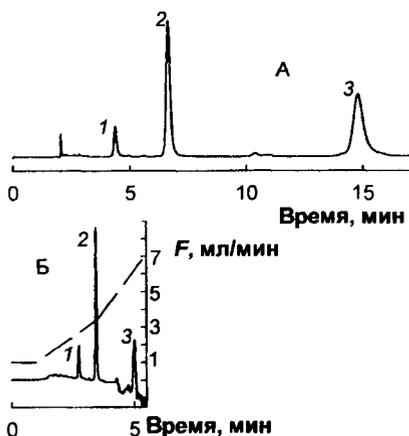


Рис. 13. Хроматограмма образца мате в изофлюентных условиях при скорости 1 мл/мин (А) и с градиентом потока (Б) ПФ - ацетонитрил – 3 мМ H_3PO_4 (5 95) УФ (280 нм) Градиент потока – пунктирная линия Объем пробы – 5 мкл Теобромин (1), теофиллин (2) и кофеин (3)

Таблица 8. Содержание теобромина, теофиллина и кофеина в напитках (P=0 95, n=3)

Объект	Определяемый ксантин, мг/г			
	Теобромин	Теофиллин	Кофеин	
Adrenaline rush	+(< c_n)	-	0.34 ± 0.01^1	0.34^3
Растворимый кофе ⁴	-	5 ± 3^1	30 ± 5^1	-
	-	6 ± 1^2	32 ± 5^2	-
Мате ⁴	4 ± 2^1	21 ± 2^1	18 ± 1^1	-
	3 ± 2^2	22 ± 2^2	13 ± 6^2	-

¹ изофлюентные условия, скорость ПФ 1 мл/мин градуировочная зависимость по высоте пика
² градиент потока, градуировочная зависимость по высоте пика ³ содержание кофеина, указанное производителем, ⁴ в пересчете на сухой порошок

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОЛИТНЫХ СИМ ДИСКОВ ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Концентрирование переходных металлов на СИМ дисках, модифицированных олигоэтиленаминами. Как правило, прямое определение следовых количеств переходных и тяжелых металлов невозможно без предварительного концентрирования этих металлов из растворов. Сорбционное концентрирование с использованием комплексообразующих сорбентов является одним из наиболее эффективных способов решения этой задачи. Были выбраны СИМ диски, модифицированные олигоэтиленаминами – ЭДА, ДЭТА и ТЭТА. Сорбционная емкость по переходным металлам, определенная в статических условиях, составляет 3,36, 1,86 и 0,71 ммоль/г, соответственно.

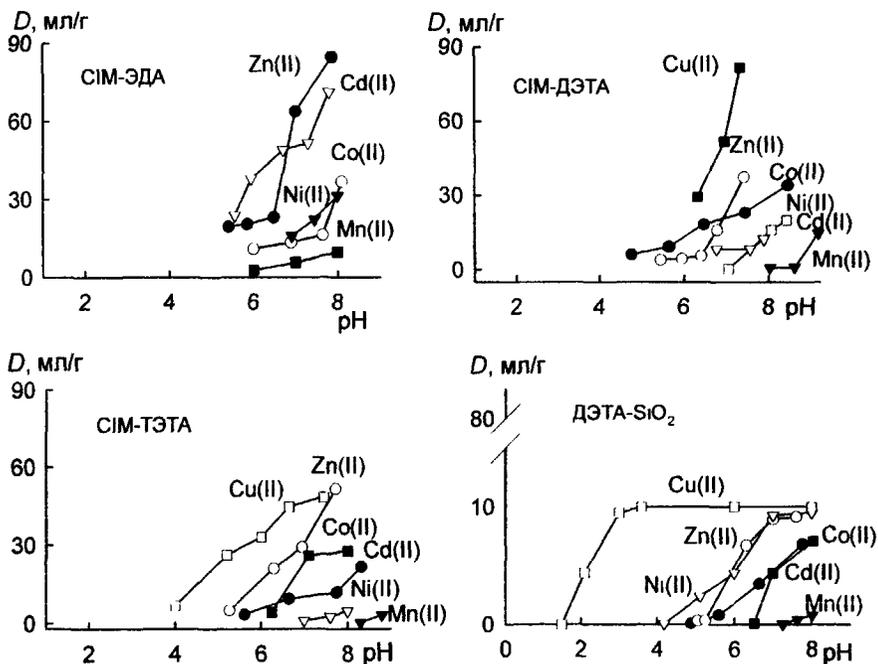


Рис. 14. Зависимости сорбции переходных металлов от pH 0,2 М ацетатный буфер, объем пробы 10 мл ($C_{Me} = 50$ мкг/мл), $u = 0,4$ см/мин

Изучены комплексообразующие свойства сорбентов и проведено сравнение со свойствами матрицы и с силикагелем SiO₂-ДЭТА (сорбционная емкость по Cu(II) - 0,12 ммоль/г). Проведенные исследования демонстрируют, что СИМ диски, модифицированные олигоэтиленаминами характеризуются высокими значениями коэффициентов распределения D для переходных металлов (рис. 14). Следует отметить, что для СИМ-ЭДА, СИМ-ДЭТА и СИМ-ТЭТА зависимости D от pH смещены в более щелочную область относительно зависимостей для ДЭТА-SiO₂, что связано с взаимодействием аминогрупп с остаточными силанольными группами на поверхности силикагеля. Это обуславливает сорбцию переходных металлов на силикагеле в более кислой области относительно СИМ дисков. Однако на ДЭТА-

SiO₂ значения *D* не превышают 10 мл/г, а на СИМ дисках достигают 90 мл/г. Несмотря на высокие коэффициенты распределения, полученные для переходных металлов на модифицированных СИМ дисках, одного СИМ диска недостаточно для обеспечения количественной сорбции (рис 15). Для концентрирования следовых количеств переходных металлов необходимо использовать более длинные колонки, состоящие из 2-х и более дисков.

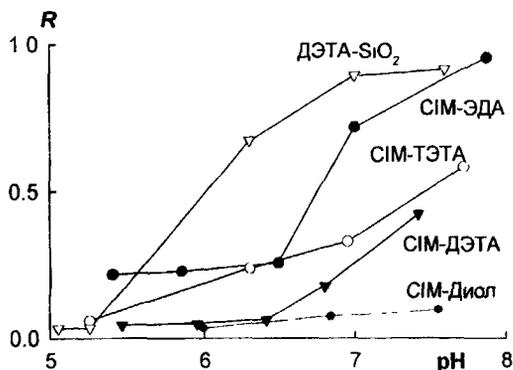


Рис. 15. Зависимости степени извлечения *R* Cu(II) от pH раствора для СИМ-Диол, и Zn(II) на СИМ-ДЭТА, СИМ-ТЭТА, СИМ-ЭДА и для ДЭТА-SiO₂. Условия как на рис 14

Концентрирование гистидин-содержащих пептидов на СИМ диске методом металло-хелатной хроматографии. Металло-хелатная хроматография – это разновидность лигандообменной хроматографии, предназначенная для разделения белков. Белки, содержащие остатки гистидина способны образовывать координационные связи с ионами переходных металлов. Этот метод обеспечивает количественное выделение белков и пептидов без нарушения их структуры и обладает исключительно высокой селективностью. Активные центры сорбента, на которых происходит сорбция, представляют собой систему ион переходного металла – иминодиацетатная группа (рис 16). Наиболее стабильными являются поверхностные комплексы иминодиуксусной кислоты (ИДК) с медью(II).

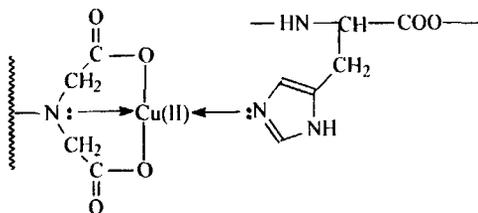


Рис. 16. Комплекс ИДК-Cu(II) на поверхности сорбента.

Природа сорбента, то есть матрица, тип и плотность расположения функциональных групп, существенно влияет на его селективность. Для изучения селективности к гистидин-содержащим пептидам был выбран монолитный СИМ-ИДК диск и для сравнения 3 коммерческие набивные колонки, модифицированные ИДК, но имеющие различную матрицу. Свойства изученных сорбентов представлены в табл 9.

Таблица 9. Свойства сорбентов, применяемых для выделения гистидин-содержащих пептидов

Колонка	Матрица	d_c , мкм	d_p
СИМ-ИДК	ГМА-ЭДМА, монолит	-	1500 нм и 100 нм
HiTrap Chelating	Высокоочищенная агароза	34	-
Poros 20MC	СТ-ДВБ	20	-
TSK Chelate-5PW	Метакрилат	10	-

Селективность выбранных сорбентов была изучена для трансферрина, подвергнутого гидролизу. Профили элюирования представлены на рис 17. Для колонки TSK Chelate-5PW наблюдали самый большой пик, относящийся к удерживаемым пептидам. Предполагается, что эта колонка удерживает наибольшее количество пептидов. Это подтверждено результатами масс-спектрометрического анализа (табл 10). Однако эта колонка имеет ряд недостатков - некоторые из удерживаемых пептидов не содержат гистидин, и удерживаются за счет неспецифических взаимодействий, что усложняет дальнейшее исследование. Недостатком колонки на основе агарозы является высокое давление на входе в колонку. Количество пептидов, удерживаемых HiTrap Chelating и TSK Chelate-5PW приблизительно одинаково. Poros удерживает пептиды очень слабо. Монолитный СИМ диск, модифицированный ИДК проявляет селективность к гистидин-содержащим пептидам близкую к селективности таких популярных в металло-хелатной хроматографии сорбентов как TSK-гель и агароза. Для элюирования пептидов с СИМ-ИДК достаточно использовать самый простой способ - понижение pH. Для СИМ-ИДК давление на входе в колонку при скорости 1 мл/мин не превышает 3-4 атм. Повышение скорости пропускания элюента позволит сократить продолжительность металл-хелатного разделения пептидов в несколько раз.

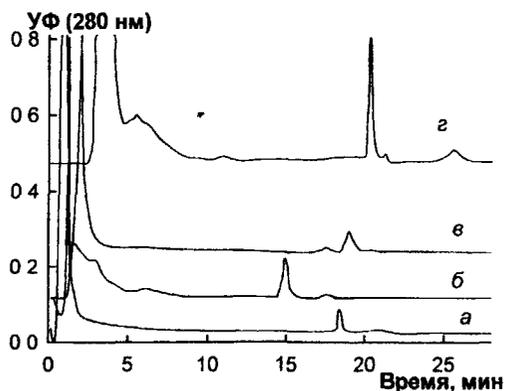


Рис. 17. Профили элюирования гистидин-содержащих пептидов трансферрина на различных колонках. Элюент - 0.1 М ацетат натрия (pH 4). Колонки: СИМ-ИДК (а), HiTrap Chelating (б), Poros 20MC (в), TSK Chelate-5PW (г).

**Таблица 10. Влияние матрицы сорбента на удерживание гистидин (H) -
содержащих пептидов трансферрина**

Масса пептида	Последовательность	HiTrap Chelating	CIM диск	Poros	TSK Chelate-5PW
1196.53	WCALSHHER	+	+	+	*
1010.44	CALSHHEK	+	+	+	*
2550.27	KPVDEYKDCHLAQWPSHTVVAR	+	+	+	+
2233.12	DGAGDVAFVKHSTIFENLANK	+	+	+	+
2070.03	EDLIWELLNQAQEHFGK	+	+	*	+
1587.76	KPVEEYANCHLAR	+	+	+	+
1413.71	ELLNQAQEHFGK	+	+	+	+
1276.63	EFQLFSSPHGK	+	+	+	+
1273.65	HSTIFENLANK	+	+	+	+
964.53	APNHAVVTR	+	+	+	+
874.44	DSAHGFLK	+	+	+	+
1166.59	HQTVPQNTGCK	+	+		+
987.46	DKEACVHK	+	+		+
1690.83	DCHLAQVPSHTVVAR	+	+		+
1016.49	KSCHTGLGR или KSCHTAVGR	+	+		+
1318.57	WCAVSEHEATK	+			+
1209.51	CQSFRDHMK	+			+
744.33	EACVHK	+			+
700.32	LNHCR			+	+

Примечание (+) пептиды элюируются 0.1 М ацетатом натрия (pH 4) * - пептиды элюируются 50 мМ имидазолом (pH 7)

ВЫВОДЫ

1 Синтезированы и изучены монолитные пористые метакрилатные CIM диски, модифицированные олигоэтиленаминами для динамического сорбционного концентрирования ионов переходных металлов в варианте комплексообразовательной хроматографии; модифицированные иминодиуксусной кислотой - для концентрирования гистидин-содержащих пептидов в варианте лигандообменной хроматографии, модифицированные аминокислотами - для разделения анионов в варианте ионной хроматографии. Полученные сорбенты не уступают по селективности традиционно используемым в этих вариантах ВЭЖХ сорбентам.

2 Изучены зависимости эффективности метакрилатных CIM дисков и монолитных колонок на основе силикагеля Chromolith RP 18e различной длины от линейной скорости ПФ. Рассчитаны коэффициенты уравнения Ван Деемтера для этих зависимостей и показано, что потеря эффективности на МПК (коэффициент (C+K) уравнения Родригеса) при увеличении линейной скорости ПФ в 2-4 раза меньше, чем для набивных колонок, заполненных частицами с диаметром более 5 мкм.

3 Установлено, что при высоких линейных скоростях элюента на МПК происходит отклонение зависимости ВЭТТ от классического вида, выражающееся в появлении плато или второго минимума. Проявление эффекта зависит от размера молекулы сорбата и от вязкости элюента. Преимущества эффекта продемонстрированы на примере разделения модельной смеси ПАУ.

4. Предложен новый способ градиентного элюирования для гомологов органических соединений и сложных смесей, компоненты которых сильно отличаются по удерживанию, – разделение с градиентом потока элюента. Преимущество этого способа по сравнению с изофлюэнтным вариантом показано на примере разделения анионов в ионной хроматографии и ПАУ и ди-*n*-алкилфталатов в ОФ ВЭЖХ. Использование градиента потока на МПК позволяет сократить продолжительность анализа в несколько раз при минимальных потерях эффективности разделения и сохранении разрешения пиков до базовой линии. Сформулирован принцип создания оптимального градиента потока элюента для разделения гомологов.

5. Впервые для разделения использована ультракороткая монолитная колонка Chromolith RP 18e длиной 5 мм. Возможности такой колонки показаны на примере разделения 8-ми компонентной модельной смеси ПАУ в изофлюэнтном варианте и с градиентом потока.

6. Разработана методика определения теобромину, теофиллину и кофеину в газированных водах, в чае и кофе в изофлюэнтных условиях и с градиентом потока, которая не уступает по чувствительности известным методикам с УФ-детектором при длине волны 280 нм.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Воронков А Э, Рыбалко М.А. Монолитные комплексообразующие сорбенты для концентрирования переходных металлов / Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2001». Москва, 10-13 апреля 2001 года С 9

2. Рыбалко М А, Нестеренко П Н Комплексообразующие свойства монолитных СИМ дисков с закрепленными олигоэтиленаминами Материалы Всероссийского симпозиума «Современные проблемы хроматографии» Москва, 2002 С. 84.

3. Рыбалко М.А., Нестеренко П Н Сорбция переходных металлов на монолитных СИМ дисках, модифицированных олигоэтиленаминами / Материалы Международного симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии» Краснодар, 6-11 октября 2002 года С

4. Рыбалко М А Разделение неорганических анионов на СИМ диске, модифицированном L-гидроксипролином. / Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2003» Москва, 15-18 апреля 2003 года С. 41

5. Rybalko M A, Ren D, Penner N A, Slentz B E, Inerovicz D, Nesterenko P N., Regnier F Influence of matrix of iminodiacetic acid-immobilized sorbents on recovery of histidine-containing peptides by immobilized metal affinity chromatography / Abstr 3rd Int Symposium on Separations in BioSciences «100 years of chromatography» Moscow, 13-18 May 2003. P 155

6. Rybalko M A, Nesterenko P N Anion-exchange properties of monolithic CIM disk modified by L-hydroxyproline / Abstr 3rd Int Symposium on Separations in BioSciences «100 years of chromatography» Moscow, 13-18 May 2003 P 238

7. Рыбалко М А, Нестеренко П.Н Использование градиента потока элюента для ВЭЖХ гомологов органических соединений / Материалы Всероссийского симпозиума «Хроматография и хроматографические приборы» Москва, 15-19 марта 2004 года. С.

8. Рыбалко М А Применение градиента потока элюента в различных вариантах ВЭЖХ / Материалы Международной конференции студентов и

аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2004» Москва, 12-15 апреля 2004 года С 33

9 Ren D.Y., Penner N.A., Slentz B.E., Inerowicz H.D., Rybalko M., Regnier F.E. // Contributions of commercial sorbents to the selectivity in immobilized metal affinity chromatography with Cu(II). // J Chromatogr A 2004 V. 1031 P 87-92

10 Nesterenko P.N., Rybalko M.A. The use of continuous flow-gradient for separation of inorganic anions on monolithic disk // Mendeleev Commun 2004 V 14 N⁰ 3. P. 121-122

11 Рыбалко М.А., Порус М.В., Нестеренко П.Н. ВЭЖХ полиароматических углеводородов на монолитной колонке с использованием градиента потока элюента. / Материалы VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока-2004». Новосибирск, 6-11 октября 2004 г

12. Нестеренко П.Н., Рыбалко М.А. Разделение гомологов органических соединений с применением градиента потока элюента на монолитной пористой колонке. // Журн. аналит химии. 2005 Т. 60 N⁰ 4 С 398-403

13. Nesterenko P.N., Rybalko M.A., Paull B. Significant viscosity dependent deviations from classical van Deemter theory in liquid chromatography with porous silica monolithic columns // Analyst. 2005. V 130. N⁰ 6. P. 828-830

14. Nesterenko P.N., Rybalko M.A. Turbulent flow liquid chromatography in porous monolithic columns. / Scientific program of 28th Int. Symposium on Capillary chromatography and electrophoresis Las Vegas, 22-25 May 2005

15 Nesterenko P.N., Rybalko M.A., Paull B. Significant viscosity dependent deviations from classical van Deemter theory in liquid chromatography with porous silica monolithic columns. // Analyst. 2005 V 130. N⁰ 6 P 828-830

16 Nesterenko P.N., Paull B., Rybalko M.A. The chromatographic performance of monolithic columns under flow gradient and turbulent liquid chromatography modes / Scientific program of 29th Int. Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC-2005 Stockholm, Sweden, 26-30 June 2005.

17 Нестеренко П.Н., Рыбалко М.А. Применение ультракоротких монолитных пористых колонок и градиента потока элюента для хроматографического разделения полиароматических углеводородов. // Доклады РАН 2005 Т 404 N⁰ 3. С. 348-351

Подписано к печати 14.10.05г. Объем 1,4 п.л.

Заказ 133.

Тираж 100

ООП Физ ф-та МГУ.

№ 13842

РНБ Русский фонд

2006-4

21597