

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ КАТАЛИЗА ИМ. Г.К.
БОРЕСКОВА СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

На правах рукописи

СОТНИКОВА Юлия Сергеевна

Приготовление и исследование хроматографических свойств
монолитных колонок для ВЭЖХ с новыми неподвижными фазами
на основе гетероциклических азотсодержащих соединений

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Патрушев Юрий Валерьевич

Новосибирск – 2020

Оглавление

Список использованных обозначений	5
Введение	6
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1 Монолитные и насадочные неподвижные фазы.....	11
1.2 Типы монолитных колонок	14
1.2.1 Геометрическая форма.....	14
1.2.2 Химическая природа матрицы (основы).....	16
1.2.3 Химическая функциональность.....	20
1.2.3.1 Гидрофобные монолиты	21
1.2.3.2 Монолиты с заряженными группами	22
1.2.3.3 Гидрофильные монолиты	23
1.2.3.4 Монолиты со специфическими взаимодействиями (аффинные, хиральные)	24
1.2.3.5 Монолитные сорбенты со смешанным механизмом удерживания	25
1.2.3.6 Способы оценки селективности монолитных колонок.....	28
1.3 Приготовление монолитов.....	29
1.3.1 Свободнорадикальная термически инициированная полимеризация	29
1.3.1.1 Влияние температуры и времени полимеризации на свойства монолитных материалов	31
1.3.1.2 Влияние сшивающего агента.....	32
1.3.1.3 Влияние порообразующего растворителя	33
1.3.1.4 Влияние инициатора.....	36
1.3.2 Фотоиницируемая полимеризация.....	37
1.3.3 Радиационная полимеризация.....	38
1.4 Функционализация органических монолитных сорбентов	38
1.5 Заключение литературного обзора	40
Глава 2. Экспериментальная часть	43
2.1 Оборудование и реактивы	43
2.2 Синтез монолитных колонок.....	44
2.2.1 Предварительная обработка стеклянной трубки.....	44
2.2.2 Приготовление хроматографических колонок.....	45
2.3 Определение текстурных характеристик хроматографических колонок	48
2.3.1 Сканирующая электронная микроскопия	48
2.3.2 Исследование поверхности методом низкотемпературной адсорбции азота	49
2.4 Определение химического состава готового монолита.....	49

2.5	Исследование хроматографических свойств приготовленных колонок.....	49
2.5.1	Гидродинамические свойства	49
2.5.2	Зависимость эффективности от скорости потока подвижной фазы	50
2.5.3	Определение загрузочной емкости.....	50
2.5.4	Исследование хроматографической селективности колонок	50
2.5.4.1	Определение зависимости параметров удерживания от состава подвижной фазы.....	50
2.5.4.2	Расчет параметров модели линейных отношений энергий сольватации	51
2.6	Модифицирование и исследование колонок на основе 4-винилбензилхлорида.....	53
2.6.1	Зависимость фактора удерживания от состава ПФ	53
2.6.2	Оценка эффективности модифицированных колонок.....	53
2.6.3	Определение загрузочной емкости модифицированных колонок	54
	Глава 3. Результаты и обсуждение	55
3.1	Обоснование выбора основных объектов исследования.....	56
3.2	Определение текстурных характеристик хроматографических колонок	58
3.2.1	Исследование поверхности монолита с помощью сканирующей электронной микроскопии.....	58
3.2.1.1	Монолитные колонки с 1-винилимидазолом.....	58
3.2.1.2	Монолитные колонки с 4-винилпиридином	60
3.2.1.3	Монолитная колонка ВТр40	60
3.2.1.4	Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном.....	61
3.2.2	Исследование поверхности монолитных сорбентов методом низкотемпературной адсорбции азота.....	65
3.2.2.1	Монолитные колонки с 1-винилимидазолом.....	65
3.2.2.2	Монолитные колонки с 4-винилпиридином	67
3.2.2.3	Монолитная колонка ВТр40	68
3.2.2.4	Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном.....	69
3.2.3	Определение химического состава готового монолита методом СНН-анализа	72
3.3	Исследование хроматографических свойств приготовленных колонок.....	73
3.3.1	Гидродинамические свойства	73
3.3.1.1	Монолитные колонки с 1-винилимидазолом.....	74
3.3.1.2	Монолитные колонки с 4-винилпиридином	75
3.3.1.3	Монолитная колонка ВТр40	76
3.3.1.4	Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном.....	77
3.3.2	Зависимость эффективности колонки от скорости потока подвижной фазы	77
3.3.2.1	Монолитные колонки с 1-винилимидазолом.....	78

3.3.2.2	Монолитные колонки с 4-винилпиридином	79
3.3.2.3	Монолитная колонка ВТр40	79
3.3.2.4	Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном.....	80
3.3.3	Определение загрузочной емкости.....	81
3.3.4	Исследование хроматографической селективности приготовленных колонок.....	83
3.3.4.1	Зависимость фактора удерживания от состава ПФ.....	83
3.3.4.2	Расчет параметров модели линейных отношений энергий сольватации	88
3.4	Модифицирование монолитных колонок	92
3.4.1	Зависимость фактора удерживания от состава ПФ	94
3.4.2	Сравнительная оценка эффективности обработанных колонок в гидрофильном и обращенно-фазовом режимах	99
3.4.3	Сравнение загрузочной емкости модифицированных колонок в гидрофильном и обращенно-фазовом режимах	100
3.5	Примеры разделения на приготовленных колонках	102
	Заключение.....	122
	Основные результаты и выводы	123
	Благодарности	124
	Список литературы	125

Список использованных обозначений

- ВЭЖХ** – высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФХ – обращенно-фазовая хроматография
НФ – неподвижная фаза
ПФ – подвижная фаза
ИОХ – ионообменная хроматография
ИЖ – ионная жидкость
ГФХ – гидрофильная хроматография
ВЭТТ – высота, эквивалентная теоретической тарелке
ЛОЭС – метод линейных отношений энергий сольватации
ТГФ – тетрагидрофуран
АИБН – 2,2-азобисизобутиронитрил
БП – бензоилпероксид
ТМСПМ – 3-(триметоксисилил)пропилметакрилат
ТФК – трифторуксусная кислота
Ст – стирол
ДВБ – дивинилбензол
ФМ – функциональный мономер
МПир – 1-метил-2-пирролидон
ВИ – 1-винилимидазол
ВП – 4-винилпиридин
ВПр – 1-винил-2-пирролидон
ВТр – 1-винил-1,2,4-триазол
ВБХ – 4-винилбензилхлорид
1МИ – 1-метилимидазол
2МИ – 2-метилимидазол
2МП – 2-метилпиридин
4МП – 4-метилпиридин
ППГ – полипропиленгликоль
П – Pluronic 10R5

Введение

Актуальность работы

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – это один из основных методов исследования смесей веществ. В настоящее время одним из направлений развития метода ВЭЖХ является поиск новых сорбентов для хроматографических колонок. Технология приготовления большинства колонок для ВЭЖХ основана на упаковке трубки или капилляра частицами сорбента с функционализированной поверхностью (насадочные колонки). Такие колонки имеют ряд недостатков: отсутствие фиксации частиц сорбента, что приводит к перераспределению частиц внутри колонки, низкая гидродинамическая проницаемость и наличие нежелательных тепловых градиентов, возникающих из-за трения частиц друг об друга [1–3].

Другим подходом к созданию колонок для ВЭЖХ является технология монолитных колонок. Монолитные колонки позволяют преодолеть отмеченные выше ограничения традиционных насадочных колонок и рассматриваются как новая генерация колонок для ВЭЖХ [4]. Следует отметить, что монолитные колонки для ВЭЖХ могут быть приготовлены на основе либо диоксида кремния [5,6], либо органических полимеров. В отличие от монолитов на основе диоксида кремния, органические монолиты проявляют химическую устойчивость в широком диапазоне pH. Чаще всего для приготовления монолитных колонок используют сополимеры дивинилбензола и стирола [7], акрилатов [8–12], ароматических мономеров с различными функциональными группами [13–16], мономеров с гетероатомами [17,18] или смешанных прекурсоров, в которых присутствуют различные типы мономеров [19,20].

Разнообразие органических монолитов и интерес к ним связан с тем, что химическая природа неподвижной фазы (НФ) может оказывать существенное влияние на селективность разделения [21]. Помимо селективности, в достаточно широких пределах можно изменять текстурные характеристики монолитных сорбентов (удельную площадь поверхности, диаметр пор). Это позволяет создавать колонки под задачи разделения молекул определенного размера [22,23]. При этом существует ряд ограничений, которые не позволяют органическим монолитам приобрести широкое распространение. Большинство монолитных колонок в настоящее время получают в капиллярном формате. Такие колонки относительно просты в приготовлении, однако имеют малую загрузочную емкость. Это не позволяет вводить в колонку пробу большого объема, что накладывает ограничение на определение микропримесей. Другая проблема приготовления органических монолитных колонок заключается в отсутствии единой методики синтеза сорбентов. Так, для каждой новой композиции мономеров необходимо индивидуально подбирать условия синтеза (порообразующий растворитель, время, температуру

полимеризации и др.). Поэтому одним из актуальных направлений развития метода высокоэффективной жидкостной хроматографии является возможность создания новых монолитных органических колонок с заданными химическими и текстурными характеристиками по единой методике.

Степень разработанности темы исследования.

Монолитные колонки для ВЭЖХ на основе органических полимеров достаточно широко изучены и описаны в большом количестве публикаций. Большинство монолитных сорбентов, описанных в литературе, синтезированы внутри тонких капилляров. Данные колонки обладают крайне низкой загрузочной емкостью, что не позволяет вводить пробы большого объема, что, в свою очередь, является неотъемлемой частью определения микропримесей. Сложность синтеза монолита большого диаметра связана с затрудненным отводом тепла из середины колонки во время полимеризации. При этом возникает температурный градиент по радиальному сечению колонки, что приводит к различию свойств сорбента в разных его частях и к возможности механической деструкции. В научной литературе практически не встречается описание синтеза монолитов, в котором единая методика приготовления монолитов подразумевает получение неподвижных фаз с одинаковой морфологией, но различной хроматографической селективностью. При синтезе новой неподвижной фазы необходимо подробно описать основные характеристики хроматографической колонки. Однако комплексные исследования, включающее в себя описание всех хроматографических и текстурных свойств монолитных колонок в литературе встречается крайне редко. Так, например, определение загрузочной емкости монолитных колонок практически отсутствуют, несмотря на то, что она является одной из основных эксплуатационных характеристик хроматографической колонки, которая позволяет корректно оценить эффективность и селективность колонки.

Целью данной работы является разработка методов приготовления и исследование свойств новых хроматографических монолитных колонок на основе дивинилбензола и стирола для ВЭЖХ.

Для достижения этой цели решались **следующие задачи:**

- разработка методики синтеза монолитных колонок на основе сополимера стирола, дивинилбензола и одного из следующих функциональных мономеров: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид.
- разработка методики *in situ* модифицирования поверхностных хлорметильных групп монолитного сорбента на основе 4-винилбензилхлорида следующими функциональными реагентами: 1-метилимидазол, 2-метилимидазол, 2-метилпиридин и 4-метилпиридин;

— исследование химического состава, текстурных и хроматографических свойств приготовленных колонок (удельная площадь поверхности, средний диаметр пор, гидродинамическая проницаемость, эффективность, селективность, загрузочная емкость);

— исследование влияния относительного содержания дивинилбензола в сорбенте, а также природы порообразующего растворителя на текстурные и хроматографические свойства монолитных колонок;

— исследование разделительных свойств приготовленных колонок по отношению к веществам различных химических классов.

Научная новизна работы.

Впервые приготовлены монолитные колонки для ВЭЖХ, в которых неподвижной фазой являлся пористый полимер на основе стирола, дивинилбензола и гетероциклического азотсодержащего мономера, в качестве которого выступали: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол. Исследован химический состав приготовленных сорбентов. Изучены хроматографические свойства синтезированных колонок: эффективность, селективность, загрузочная емкость, а также их гидродинамические характеристики. Изучена пористая структура приготовленных монолитных сорбентов.

Впервые описан способ *in situ* изменения селективности монолитной хроматографической колонки с органическим сорбентом на основе стирола, дивинилбензола и 4-винилбензилхлорида, содержащим реакционноспособные хлорметильные группы. Для придания сорбенту новых свойств, проводили его модифицирование в колонке производными имидазола и пиридина (1-метилимидазолом, 2-метилимидазолом, 2-метилпиридином и 4-метилпиридином). Обработка данными реагентами приводит к образованию ионных пар на поверхности сорбента, состоящих из катиона имидазолия или пиридиния и аниона хлора. Исследованы хроматографические свойства приготовленных колонок.

Практическая значимость.

Приготовленные монолитные колонки на основе органических полимеров могут быть использованы для решения задач разделения как малых молекул, так и макромолекул, в том числе, белков и полимеров. Данная особенность является преимуществом полученных колонок по сравнению с единственной существующей коммерческой монолитной колонкой с сорбентом на основе стирола-дивинилбензола ProSwift RP-3U (Thermo Fisher Scientific), которая способна с удовлетворительной эффективностью разделять только крупные молекулы. Результаты комплексных исследований полученных монолитных материалов могут быть использованы для приготовления колонок на основе других функциональных мономеров. Полученные экспериментальные данные позволили выявить преимущество монолитных колонок на основе

дивинилбензола и стирола по сравнению с насадочными по величине гидродинамической проницаемости.

Методология и методы диссертационного исследования.

Методология исследования включает в себя: разработку синтеза монолитного сорбента внутри стеклянной трубки, а также физико-химическую характеристику полученных сорбентов. Для достоверного описания характеристик полученных сорбентов использовался набор методов, включающих в себя сканирующую электронную микроскопию, низкотемпературную адсорбцию азота, СНN-анализ, хроматографические методы анализа.

На защиту выносятся следующие основные положения диссертации:

— процесс приготовления монолитных колонок на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и одного из функциональных мономеров: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид, который включает в себя подбор концентраций компонентов полимеризационной смеси и условий проведения синтеза методом свободнорадикальной термически инициированной полимеризации в стеклянных трубках внутренним диаметром 2 мм;

— установленные корреляции между природой и концентрацией функционального мономера в исходной полимеризационной смеси и хроматографическими характеристиками приготовленных монолитных колонок (селективность, эффективность, загрузочная емкость, зависимость параметров удерживания от состава подвижной фазы);

— новые данные о текстурных характеристиках приготовленных сорбентов (удельная площадь поверхности, средний размер и объем пор, гидродинамическая проницаемость) и их химическом составе (элементный состав);

— способ изменения свойств монолитной неподвижной фазы путем модифицирования *in situ* колонки, приготовленной на основе 4-винилбензилхлорида, производными имидазола и пиридина: 1-метилимидазол, 2-метилимидазол, 2-метилпиридин, 4-метилпиридин;

— данные о хроматографических характеристиках модифицированных монолитных колонок.

Личный вклад автора. Сотникова Ю.С. осуществляла поиск, изучение, анализ и обобщение литературных данных. Постановка цели и задач диссертационной работы проводилась совместно с научным руководителем. Синтез всех описанных в работе монолитных сорбентов и все хроматографические эксперименты проводил соискатель. Обработка экспериментальных данных, их анализ и интерпретация результатов проводились совместно с научным руководителем. Подготовка материалов к публикации проводилась совместно с соавторами. Вклад соискателя признан всеми соавторами.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов работы обеспечивается согласованностью экспериментальных данных, полученных комплексом современных физико-химических методов исследования. Признание результатов работы мировым сообществом подтверждается публикациями их в рецензируемых международных и российских журналах и высокой оценкой на всероссийских конференциях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждались на X Всероссийской научной конференции с международным участием «АНАЛИТИКА СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА» (Барнаул, 2016), XXVI Менделеевской конференции молодых ученых (Самара, 2016), V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (Сочи, 2016), 55-й международной научной студенческой конференции МНСК-2017 (Новосибирск, 2017), VI, VII, VIII Всероссийских симпозиумах «Кинетика и динамика обменных процессов» (Сочи, 2017; Сочи, 2018; Москва, 2019), 3-ей Всероссийской конференции «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов» (Новосибирск, 2020).

Публикации по теме диссертации. Результаты исследований опубликованы в 8 статьях в научных журналах, из которых 7 входят в Перечень ВАК. 6 публикаций из 8 входят в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus. Опубликовано 12 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Диссертационная работа соответствует пункту 2 «Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.)», пункту 10 «Анализ органических веществ и материалов», пункту 15 «Анализ лекарственных препаратов», пункту 13 «Анализ пищевых продуктов» паспорта специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 156 страницах, содержит 74 рисунка и 10 таблиц, список литературы содержит 367 источников. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов, списка литературы.

Диссертационная работа, посвящённая синтезу и исследованию монокристаллов для ВЭЖХ с органическими сорбентами на основе гетероциклических азотсодержащих мономеров, выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральном исследовательском центре «Институте катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук» (ИК СО РАН).

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Монолитные и насадочные неподвижные фазы

В качестве неподвижных фаз в жидкостной хроматографии используется два основных типа сорбентов: твердые частицы и монолитный материал (рис. 1).

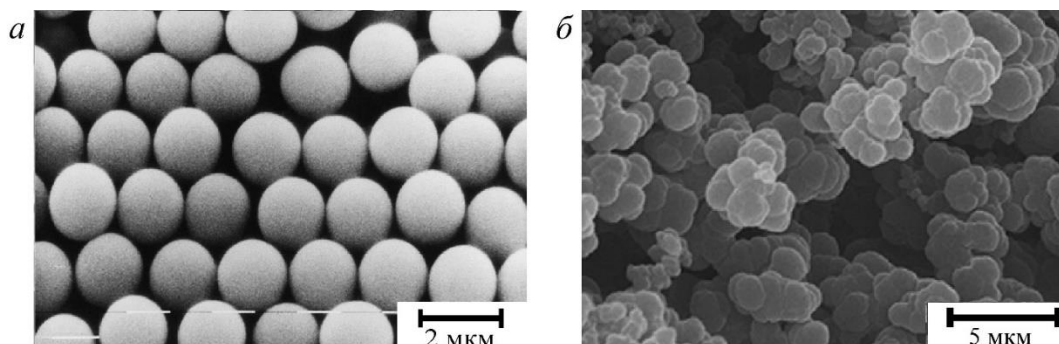


Рис. 1. Вид насадочного [24] (а) и монолитного [25] (б) сорбентов.

Первыми для жидкостной хроматографии были разработаны насадочные колонки с гранулярным сорбентом. Эффективность таких колонок определяется, главным образом, размером частиц и качеством их упаковки. В идеальном случае колонка должна быть заполнена абсолютно одинаковыми сферическими частицами максимально плотно и однородно. Для хорошего разделения сложной смеси на насадочных колонках требуется достаточно высокая площадь поверхности сорбента и наличие функциональных групп для селективного удерживания аналитов. Чаще всего используются колонки, заполненные сферическими пористыми частицами размером 3–5 мкм [26].

Насадочные колонки характеризуются медленным диффузионным массопереносом. Как известно, коэффициенты диффузии в жидкости примерно на 3 порядка меньше, чем в газе для молекул малого и среднего размера. Кроме того, диффузия внутри неподвижной фазы значительно медленнее, чем диффузия в объеме жидкости. Поэтому главная проблема жидкостной хроматографии заключается в том, чтобы преодолеть диффузионные ограничения массопереноса, уменьшив тем самым размывание вещества по колонке. Один из способов решить данную проблему – уменьшить средний размер частиц упаковки, чтобы свести к минимуму длину пути молекул аналита внутри сорбента. Действительно, уменьшение размера гранул сорбента приводит к повышению эффективности, однако при этом повышается перепад давления в колонке [27]. Это, в свою очередь, повышает требования к оборудованию для высокоэффективной жидкостной хроматографии. Существует и принципиальное ограничение по минимальному размеру гранул сорбента. Начиная с некоторого диаметра частиц, дальнейшее уменьшение их размера не приводит к повышению эффективности. Это связано с

тем, что при возрастании перепада давления на колонке происходит более интенсивное трение частиц сорбента как друг об друга, так и об стенку колонки, что влечет за собой повышение температуры. Причем максимальная температура наблюдается вблизи стенки колонки. Таким образом возникает градиент температур по сечению колонки [3], что приводит к уширению профиля хроматографической полосы, а, следовательно, к снижению эффективности [28].

В связи с перечисленными недостатками возникла необходимость создания колонок, в которых эти недостатки будут минимизированы или исключены. В качестве такой альтернативы возникла идея монолитных колонок. Такие колонки заполнены единым твердым материалом (монолитом), состоящим из взаимосвязанных структурных фрагментов и пор, пронизывающих колонку по всей длине [29].

Первые попытки получить монолиты с определенной структурой и системой пор с помощью золь-гель технологии отражены в работах [5,6]. Исследователи из Японии первыми использовали пористые монолиты из силикагеля в качестве колонок для ВЭЖХ [30]. Примерно в то же время были синтезированы органические полимерные монолиты [31].

Главная особенность монолитных колонок заключается в их высокой проницаемости, что было замечено в первых работах по исследованию новых колонок. В работе [32] проведено сравнение гидродинамических свойств монолитных колонок на основе стирол-дивинилбензольного полимера и насадочных колонок. На рисунке 2 представлены зависимости перепада давления на колонках от скорости потока подвижной фазы (ПФ). Видно, что для насадочных колонок (3, 4 и 5) угол наклона графика линейной зависимости существенно выше, чем для монолитных колонок (1 и 2). Т. е., при одном и том же потоке элюента перепад давления на монолитных колонках будет намного меньше, чем на насадочных. Как следствие, возникает возможность ускорить процесс разделения, увеличивая поток подвижной фазы, и/или использовать длинные колонки с большей общей эффективностью при умеренных давлениях.

Также было отмечено, что варьируя условия и состав исходной композиции, возможно получение монолитов с различным пористым пространством: макропористые, мезопористые и микропористые [33]. При правильной эксплуатации монолитные колонки имеют удовлетворительную механическую стабильность [34], оценить которую можно путем определения перепада давления в колонке в широком диапазоне изменения скоростей потока ПФ. Монолитный материал можно считать механически устойчивым, если наблюдается линейная зависимость между перепадом давления и скоростью потока [35,36].

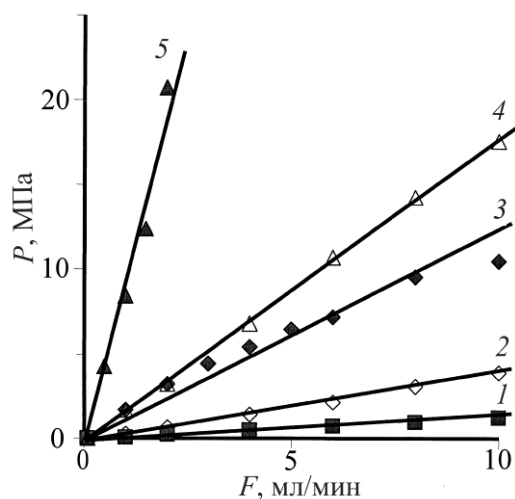


Рис. 2. Зависимость перепада давления (P) на колонках от объемной скорости потока подвижной фазы (F) [32]. ПФ: ацетонитрил/вода 14/86 об. %. 1 – Монолит А (50×4.6 мм), 2 – Монолит А' (150×4.6 мм), 3 – Hamilton PRP-3 (150×4.6 мм, размер зерна 10 мкм), 4 – Poros R2H (50×4.6 мм, размер зерна 10 мкм), 5 – Alltech Macrosphere C₈ (150×4.6 мм, размер зерна 5 мкм).

Однако существуют некоторые структурные особенности монолитных колонок, которые пока не позволяют им стать более достойным конкурентом насадочных колонок. Первая особенность – неоднородное пространственное распределение и изменяющаяся геометрия транспортных пор. По сравнению с более плотно и регулярно упакованными насадочными колонками, у монолитов проявляется существенный вклад вихревой диффузии, которая снижает эффективность. Другая особенность – размер адсорбционных и транспортных пор. В современных насадочных колонках используются частицы очень маленького размера (менее 2 мкм), в связи с чем уменьшается и размер транспортных пор (для насадочных колонок транспортными порами является межчастичное пространство). В монолитных колонках для повышения эффективности необходимо уменьшать размер структурных единиц (доменов), которые включают в себя повторяющийся фрагмент, состоящий из участка транспортной поры и окружающих ее частей монолита. И третья особенность, которая ограничивает эффективность монолитных колонок – это радиальная неоднородность монолитного стержня. Это явление в меньшей степени выражено для капиллярных колонок в связи с их малым диаметром [37]. Отсутствие перемешивания и температурный градиент внутри монолита в процессе синтеза приводят к неоднородности макроструктуры сорбента. Из-за неоднородности сорбента по сечению монолитной колонки возникает размывание фронта хроматографической зоны, а, следовательно, снижение эффективности [38]. Таким образом, чтобы получить более эффективные монолитные колонки необходимо приготовить сорбенты, которые будут иметь упорядоченную организацию транспортных пор и меньший размер структурных элементов (доменов).

1.2 Типы монолитных колонок

1.2.1 Геометрическая форма

Все монолитные колонки в соответствии с их геометрией можно условно разделить на 3 типа: стержни, диски и трубки (рис. 3).

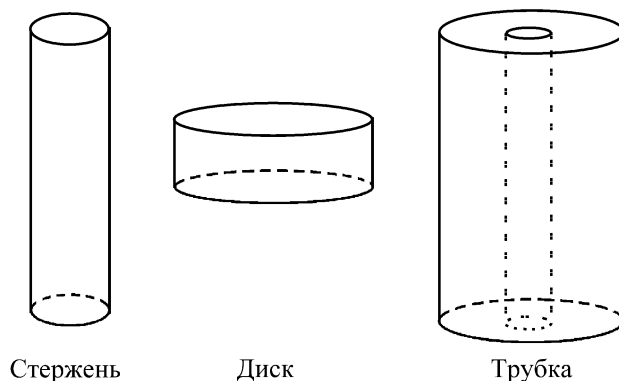


Рис. 3. Геометрические формы монолитных колонок.

Диск – один из первых вариантов формирования монолитных фаз, предназначенных для быстрого разделения белков [39]. На ранних стадиях развития монолитных неподвижных фаз было установлено, что для достижения хорошего разделения макромолекул в режиме градиентного элюирования требуется достаточно короткое расстояние [40]. Этот вывод привел к появлению концепции разделительных слоёв. Поскольку было достаточно трудно создавать такие слои из гранулярного сорбента из-за неравномерности упаковки, то была разработана новая неподвижная фаза в форме диска. Размеры дисков могут быть от очень малых, объемом 10 мкл [41] до достаточно больших, объемом 14 мл [42]. Главными особенностями дисков являются очень низкий перепад давления и высокая загрузочная емкость. В настоящее время существуют коммерчески доступные СИМ-диски. Они широко используются в медицинских, биологических, фармакологических, биохимических лабораториях [43–46].

Форма стержня является наиболее распространённой для монолитных колонок и характеризуется тем, что длина колонки существенно превышает ее диаметр. Как правило, в аналитических целях используются стержни диаметром от десятков микрометров (капиллярные монолитные колонки) до нескольких миллиметров. Получение однородной пористой структуры не является проблемой колонок малого диаметра, так как тепло во время полимеризации рассеивается равномерно по сечению стержня. Однако стержни, используемые в препаративной хроматографии, могут иметь диаметр до нескольких сантиметров. Например, в литературе описаны метакрилатные монолиты диаметром 8 мм [47] и 16 мм [48], силикагелевые монолиты диаметром 25 мм [49]. Для таких колонок появляется проблема получения однородной

структуры вследствие медленной теплопередачи и, как следствие, неравномерного прогрева полимеризационной смеси по сечению монолитного стержня во время реакции.

Проблема получения однородных стержней большого диаметра привела к разработке третьего геометрического типа монолитных колонок – трубки. Особенностью данного типа является возможность получения колонок большого диаметра и объема [50]. Существует два способа получения трубчатых монолитов. Первый заключается в приготовлении монолитного стержня большого диаметра с последующим механическим удалением центральной части, которая, как правило, характеризуется наибольшим отклонением от однородной пористой структуры [51]. Второй способ – полимеризация в кольцевой форме. Температура как на внешней, так и на внутренней поверхности матрицы поддерживается постоянной, что позволяет теплу более равномерно рассеиваться в монолите. Интересной особенностью этого способа является возможность вставки одной трубки меньшего диаметра в другую трубку большего диаметра (рис. 4).

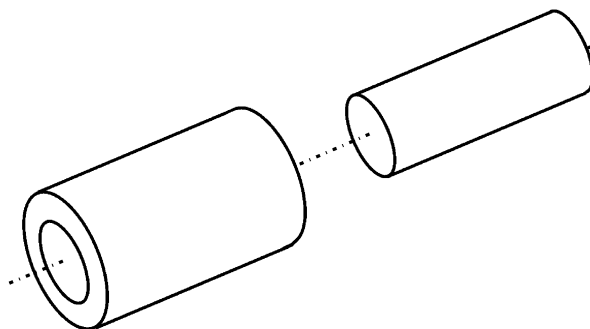


Рис. 4. Схема получения монолитной колонки.

Возможные пустоты между трубками можно заполнить смесью мономеров и провести дополнительно полимеризацию. Таким образом получается единый монолит с однородной структурой. У этого подхода есть преимущество – каждая трубка внутри единого монолита может иметь определенные активные центры, придающие каждой из концентрических трубок определенные химические свойства. Варьируя состав и толщину каждой трубки, можно контролировать хроматографические свойства колонки. Однако изготовление такой колонки связано с высокой трудоемкостью, и на данный момент времени в литературе существуют только теоретическое описание этого процесса [52].

Таким образом, из трёх основных существующих форматов монолитных колонок, только два нашли свое практическое применение: стержни и диски. Каждый обладает своими особенностями, позволяющими их использовать достаточно широко во многих отраслях науки и промышленности.

1.2.2 Химическая природа матрицы (основы)

В последние два десятилетия проводится большое количество исследований, посвященных синтезу и изучению свойств монокристаллических неподвижных фаз. Большой интерес к ним обусловлен относительной простотой приготовления и возможностью варьирования химического состава материала в широких пределах. Причем химические свойства монокристаллической колонки обуславливаются двумя составляющими: химией основы (матрицы) и химией функциональных групп на поверхности сорбента. Существует три типа монокристаллических материалов по химическому составу (матрицы): неорганические, органические и гибридные (органо-неорганические). Каждый тип представлен достаточно широким спектром веществ, основные примеры которых представлены в табл. 1.

Таблица 1

Примеры монокристаллических сорбентов, используемых в хроматографии

Монокристаллиты		
Органические	Неорганические	Гибридные
Полиметакрилат [40]	Силикагель [58]	Силикагель-метакрилат [65]
Полиакриамид [54]	Алюминий [59]	γ -Al ₂ O ₃ – полиметакрилат [66]
Агарозный гель [55]	Углерод [60]	
Поливиниловые спирты [56]	Гидроксиапатит [61]	
Полистиролы [57]	Оксид германия [62]	
	Оксид циркония [63]	
	Другие [64]	

Рассмотрим основные особенности органических, неорганических и гибридных монокристаллических материалов.

Неорганические материалы в своем классе представлены, главным образом, силикагелевыми монокристаллитами, поскольку именно они получаются наиболее эффективными. Колонки с монокристаллическим силикагелем получают с помощью золь-гель технологии, которая заключается в проведении реакции гидролиза алкоксисиланов и последующей их поликонденсации с образованием трехмерного каркаса диоксида кремния [67]. Детально процесс образования силикагелевого монокристаллита внутри кварцевого капилляра описан в работе [68]. Благодаря тщательно подобранным условиям синтеза силикагелевые монокристаллиты имеют структурированное постоянное (жесткое) пористое пространство (рис. 5а). Размеры каркаса и пор можно изменять путем варьирования состава исходной полимеризационной смеси. Синтезированный золь-гель методом силикагель обычно имеет бимодальное распределение пор

по размерам (микропоры диаметром до 2 нм и мезопоры диаметром 2–50 нм) [24,69] и удельную площадь поверхности 300 м²/г и более в зависимости от условий приготовления [70].

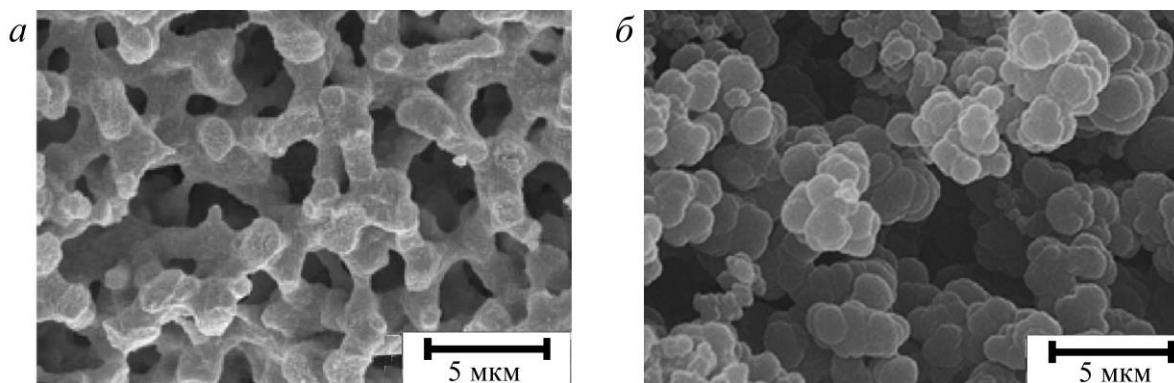


Рис. 5. Микрофотографии силикагелевого [71] (а) и органического [25] (б) монолитных материалов.

Современные монолитные материалы из силикагеля близки по хроматографическим характеристикам к насадочным колонкам с диаметром частиц 3 мкм, но их рабочее давление значительно ниже [72]. Благодаря этому, они хорошо подходят для разделения малых молекул. Однако применять неорганические монолиты для разделения биологических макромолекул, таких как белки и пептиды, довольно проблематично. Для разделения крупных молекул требуется наличие широких пор (15 – 100 нм) и относительно низкая площадь поверхности (10 – 150 м²/г), чтобы обеспечить легкий доступ аналитов к внутренней поверхности сорбента. Кроме того, ограниченная стабильность при температурах выше 60 °С и рН>8.5 не позволяют проводить разделение полярных веществ, особенно это касается основных аналитов [73]. К существенному недостатку силикагелевых монолитов можно отнести способность материала уменьшаться в объеме в процессе приготовления сорбента и в течение дальнейшей эксплуатации, что приводит к образованию пустого пространства между монолитным сорбентом и стенкой колонки, а также к изменению микро- и мезопористой структуры [74,75]. Кроме того, многостадийный процесс приготовления силикагелевых монолитов увеличивает трудоемкость создания колонки и снижает воспроизводимость хроматографических свойств [76].

Монолитные колонки на основе *органических полимеров* для ВЭЖХ впервые были приготовлены в конце 1980-х годов [4,7,77,78]. Получают их методом радикальной полимеризации, используя различные способы инициирования: термический, с помощью света (фотополимеризация) и радиационный. Структура органических монолитов представляет собой твердый каркас, состоящий из ассоциатов сферических частиц (глобул). Глобулы пронизаны мезопорами, а между ассоциатами образуются транспортные поры, обеспечивающие высокую проницаемость (рис. 5б). Как правило, органические монолиты имеют относительно низкую

площадь поверхности (10 – 150 м²/г) [37,72,79,80]. Это делает их подходящими сорбентами для разделения биологических макромолекул и не подходящими для разделения малых молекул. Однако известно немало примеров получения монолитов с высокой площадью поверхности и порами небольшого размера. Такие монолиты были успешно применены для разделения малых молекул в ВЭЖХ [81–83], электрохроматографии [84]. Монолитные колонки с органическими сорбентами способны работать в гораздо более широком диапазоне pH, чем колонки с неорганическими сорбентами [85]. Данная особенность позволяет использовать как кислотные, так и основные буферы для разделения заряженных аналитов [86].

Стоит отметить, что пористые свойства неорганических и органических монолитов, так же, как и гранулированных сорбентов обычно исследуют в сухом состоянии такими методами, как сканирующая электронная микроскопия, низкотемпературная адсорбция азота, ртутная порометрия. Однако результаты, полученные для сорбентов в сухом состоянии, не всегда корректно отражают их свойства, поскольку на пористую структуру значительное влияние оказывает среда, в которой он находится. В жидкостной хроматографии такой средой является подвижная фаза, в качестве которой используют различные комбинации органических растворителей и воды. Наиболее сильно зависимость от внешней среды выражена у пористых полимеров. Органические монолитные материалы образуют гелевую (непостоянную) пористость, которая отсутствует в сухом состоянии. Эта пористость обусловлена сольватацией и набуханием полимерного каркаса в среде «хорошего» растворителя [87]. При контакте с органическими полимерами вода обладает низкой способностью смачивания (большой угол смачивания), а ацетонитрил – высокой (угол смачивания почти равен нулю) [88]. Это приводит к тому, что при высоком содержании воды в подвижной фазе, монолитный сорбент сжимается, и его пористость уменьшается. Напротив, если в качестве ПФ использовать элюент, обогащенный ацетонитрилом, то монолит набухает, что приводит к увеличению пористости. В связи с этим, результаты, полученные при исследовании сорбента в сухом состоянии, не отражают истинные значения текстурных характеристик, которыми обладает монолит в рабочих условиях. Поэтому исследование свойств полимерного материала необходимо проводить в среде растворителя, в котором данный сорбент способен набухать [18,88–91]. В работе [92] проводили исследование монолита в сухом виде и при контакте с растворителем (водой и ацетонитрилом) с помощью конфокальной рамановской спектроскопии. Было установлено, что вода проникает только в крупные поры, а ацетонитрил заполняет все поровое пространство монолита. Это физическое свойство приводит к тому, что, подбирая состав подвижной фазы, можно менять текстурные характеристики неподвижной фазы монолитных колонок в достаточно широком диапазоне [93].

В связи с тем, что органические монолиты не обладают постоянным пористым пространством, существует проблема определения свободного (мёртвого) объема колонки. Свободный объем хроматографической колонки является важным параметром и используется как для определения характеристик самой колонки, так и для исследования физико-химических свойств неподвижной фазы или хроматографируемого вещества [94–96]. Величина этого объема складывается из пустот между частицами сорбента и доступного порового пространства внутри частицы сорбента. Существует несколько основных способов определения свободного объема колонки: метод неударживаемой метки [97], пикнометрический метод [98], метод незначительных возмущений [99] и метод, основанный на измерении времен выхода гомологических рядов [100]. Все эти методы применяются для обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с сорбентами на силикагелевой основе. Их использование дает возможность получить сопоставимые результаты [101]. На практике чаще используют метод несорбирующейся метки, как наиболее простой и быстрый. Он основан на предположении, что вещество, выступающее в качестве метки, не удерживается сорбентом, то есть не взаимодействует с неподвижной фазой. С другой стороны, метка должна быть достаточно малого размера, чтобы размер поры не создавал диффузионных затруднений при её движении в поровом пространстве сорбента. Поэтому, важным условием применения данного метода для определения свободного объема колонки является правильный подбор вещества-метки. В ОФ ВЭЖХ в качестве веществ-меток используются некоторые неорганические соли или органические вещества [102–104]. Поскольку полимеры органической природы меняют свою пористость в зависимости от состава подвижной фазы, то метод метки дает различные значения свободного объема колонки. Однако наряду с перечисленными способами существует прямой метод определения свободного объема колонки. Он основан на количественном определении компонентов подвижной фазы, которые находятся внутри хроматографической колонки и заполняют весь ее доступный свободный объем [105]. Провести такое определение можно с помощью газовой хроматографии. Данный метод позволяет наиболее точно оценить свободный объем органической монолитной колонки по сравнению с другими методами. Однако способ достаточно трудоемкий, поскольку необходимо отбирать фракции каждого нового состава ПФ непосредственно из колонки и проводить анализ на газовом хроматографе.

Гибридные монолитные органо-неорганические материалы появились в качестве альтернативы для существующих неподвижных монолитных фаз в 2000 г [106]. Этот тип хроматографического материала совмещает в себе как преимущества органических и неорганических монолитов: механическую стабильность и устойчивость в широком диапазоне рН, высокие площади поверхности, наличие мезопор, низкое сопротивление потоку,

так и недостатки: зависимость пористости от среды (набухание) и трудоемкую функционализацию матрицы силикагеля [69,70].

Как правило, гибридные материалы получают с помощью золь-гель процесса (аналогично способу приготовления силикагелевых монолитов), который включает стадии гидролиза и поликонденсации. Основное отличие заключается в структуре прекурсора, который имеет в своем составе одну или две органические функциональные группы, замещающие алкоксильные группы [65,109]. Получаемый материал представляет собой силикагелевую матрицу, содержащую органические фрагменты, которые связаны с ней негидролизуемыми связями Si-C и равномерно распределены во всем объеме материала. Кроме золь-гель реакций такие колонки можно получить с помощью клик-химии [110,111] и полимеризацией с раскрытием цикла [109,112,113].

Гибридные монолиты используются для твердофазной экстракции [114–117], очистки дезоксирибонуклеиновой кислоты [118], электрохроматографии [106,119–121], разделения гликопептидов [122], разделения охратоксинов [109].

1.2.3 Химическая функциональность

Монолитные материалы на органической основе являются наиболее привлекательными из-за большого выбора различных мономеров, способных к полимеризации, и их стабильности в широком диапазоне значений pH. Органические монолиты можно условно разделить на 3 группы по типам мономеров, используемых для синтеза: стирольные (на основе стирола и его производных), метакрилатные, акриламидные [123]. Мономеры, которые чаще всего используются для синтеза органических монолитов представлены на рис. 6.

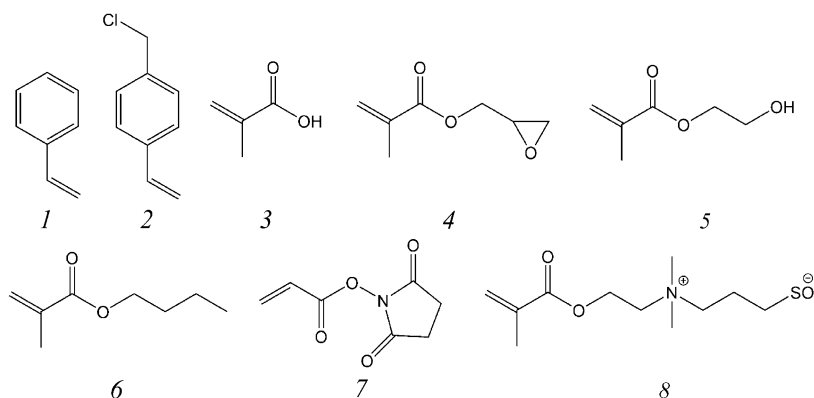


Рис. 6. Примеры монофункциональных мономеров, используемых для получения пористых полимерных материалов: стирол (1), 4-винилбензилхлорид (2), метакриловая кислота (3), глицидилметакрилат (4), 2-гидроксиэтилметакрилат (5), бутилметакрилат (6), N-акрилоксисукцинимид (7), N,N-диметил-N-метакрилоксиэтил-N-(3-сульфопропил) аммония бетаин (8).

Данные мономеры могут выступать в качестве функциональных фрагментов (придающих монолитному материалу определенные химические свойства) или являться матрицей. В последнем случае в полимеризационную смесь необходимо добавить еще, как минимум, один мономер, который будет задавать функциональность образуемому полимеру. Достаточно широкий выбор мономеров позволяет получать неподвижные фазы, которые значительно отличаются по химическому составу и физико-химическим свойствам.

1.2.3.1 Гидрофобные монолиты

Обращенно-фазовая хроматография является наиболее распространенным методом и широко используется для разделения как малых, так и больших молекул, используя неполярную неподвижную фазу и относительно полярную подвижную [124]. Несмотря на тот факт, что функционализированные силикагелевые неподвижные фазы более популярны в ОФХ, монолитные колонки на основе неполярных органических полимеров не уступают им по гидрофобности, а по некоторым параметрам даже превосходят их. Силикагелевые монолиты могут иметь свободные силанольные группы, количество которых на поверхности зависит от того, насколько полностью прошел процесс функционализации. Эти группы уменьшают гидрофобность матрицы и влияют на удерживание полярных соединений. Также стоит отметить такие существенные преимущества неполярных полимеров, как химическая стабильность в широком диапазоне pH и относительную простоту приготовления [125]. Известны две основные категории неполярных монолитов: полимеры на основе метакрилатов и на основе стирола. Такие монолиты признаны наиболее подходящими для гидрофобного разделения белков и пептидов в режиме обращенно-фазовой хроматографии [126–128].

Монолитные колонки на основе метакрилатов получили более широкое распространение [129]. Чаще всего при приготовлении сорбентов используются различные алкилметакрилаты, благодаря наличию гидрофобных алкильных групп различной длины: метил-, бутил-, гексил-, стеарил-, лаурил-, октадецил- [130–135].

Исследований, посвященных синтезу и исследованию свойств монолитов на основе стирола, значительно меньше [136–138]. Однако, несмотря на то, что метакрилатные монолиты чаще упоминаются в научной литературе, единственная коммерческая монолитная колонка приготовлена на основе сополимера стирол-дивинилбензол [88,139–141]. Компания Thermo Fisher Scientific производит данный монолит в различных форматах: диаметром 0.1–4.6 мм и длиной 50–250 мм.

1.2.3.2 Монолиты с заряженными группами

Ионообменная хроматография (**ИОХ**) широко применяется для разделения ионов и заряженных аналитов. Как правило, в качестве элюента используют растворы сильных электролитов (неорганические соли и гидроксиды), рН которых оказывает значительное ограничение на применение силикагелевых неподвижных фаз. В связи с этим, были разработаны неподвижные фазы на основе органических полимеров. Монолиты для ИОХ получают различными способами: химической модификацией поверхности монолита [142–145], сополимеризацией [146,147] и с помощью адсорбции ионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на поверхности монолита [148].

Анионообменное разделение является наиболее часто используемым хроматографическим режимом, поскольку многие биомолекулы имеют преимущественно отрицательный заряд. В таком случае монолитный сорбент функционализирован положительно заряженными лигандами (чаще всего аминами) для связывания с аналитами. Анализируемыми биологическими объектами выступают вирусы [149–152], бактериофаги [153], плазмиды ДНК [154]. Разделение протеинов проводят на ионообменниках с различной функциональностью [155,156].

В последние годы набирает популярность способ синтеза монолитных колонок для ионообменной капиллярной хроматографии и электрохроматографии, где используют ионные жидкости (**ИЖ**) в качестве функциональных мономеров [157,158]. Вследствие особых свойств, которыми обладают органические катионы и неорганические или органические анионы, большого разнообразия возможных взаимодействий (гидрофильные, гидрофобные, анионообменные и др.), ионные жидкости позволяют получать колонки с различной селективностью [159]. Процесс введения ИЖ в структуру монолита можно осуществить двумя способами. Первый заключается в добавлении ИЖ в качестве мономера в полимеризационную смесь, а второй – в модифицировании реакционноспособных групп заполимеризованного монолита ионной жидкостью. Хлорид 1-винил-3-октилимидазолия и этилендиметакрилат использовались для приготовления монолитной колонки в работе [160]. Было установлено, что полученная капиллярная колонка обладает хорошей проницаемостью и эффективностью, а также подходит для разделения алкилбензолов и аминокислот в режиме электрохроматографии. В другой работе монолит на основе поли(глицидилметакрилата-этилендиметакрилата) был обработан хлоридом 1-винил-3-бутилимидазолия. Приготовленная колонка обладает смешанным механизмом удерживания и подходит для разделения стероидов, витаминов и ароматических аминов [161]. Кроме перечисленных примеров, в литературе

существует значительное количество интересных исследований, посвященных разделению полярных аналитов на колонках с ИЖ [162–167].

1.2.3.3 Гидрофильные монолиты

Впервые термин «Гидрофильная хроматография» был введен Эндрю Алпертом в 1990 г. [168]. Метод гидрофильной хроматографии (ГФХ) является альтернативой метода обращенно-фазовой хроматографии, если задача заключается в разделении полярных аналитов, включая, нуклеозиды [169], аминокислоты [170], пептиды и белки [171–174], наркотические препараты [175], гликоалкалоиды [176].

В ГФХ используется элюент, содержащий значительное количество органического растворителя (обычно это ацетонитрил с концентрацией в ПФ более 70 об. %) и воды (по меньшей мере 2.5 об. %). При этих условиях на поверхности полярного сорбента образуется адсорбированный слой воды. Разделение достигается путем распределения полярных аналитов между этим адсорбированным слоем воды и обогащенной органическим растворителем ПФ. Однако для большинства аналитов реализуется не только распределительный механизм, но и адсорбционный, поскольку в такой системе возникают водородные связи, диполь-дипольные, электростатические взаимодействия, которые влияют на удерживание [177].

Гидрофильная хроматография обладает рядом преимуществ по сравнению с более распространенной обращенно-фазовой. Так, например, элюенты, обогащенные ацетонитрилом, способствуют повышению эффективности разделения (улучшению формы пика) и приводят к увеличению чувствительности детектора [178,179]. Такие элюенты, обладая малой вязкостью, обеспечивают низкое рабочее давление на колонке [180]. С другой стороны график зависимости высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), от скорости потока подвижной фазы имеет более пологую правую ветвь, что позволяет работать при более высоких скоростях потока без значительной потери эффективности. Данное свойство можно объяснить улучшенной диффузией растворенных веществ в ПФ, обогащенных органическими растворителями [181]. Как следствие, эта особенность приводит к возможности сокращения времени анализа и использования более длинных хроматографических колонок [175].

В настоящее время существует достаточно большое количество гидрофильных монолитных полимеров, в основе которых чаще всего используется полиакриламид [182–186] и различные гидрофильные метакрилаты: 3-хлор-2-гидроксипропилметакрилат [187], N-(гидроксиметил)метакрилат [188], метакриловая кислота [186]. Кроме перечисленных групп мономеров можно отметить капиллярные монолитные колонки на основе сополимера 1-винилимидазола с различными сшивающими агентами [189]. Используя N,N-диметил-N-

метакриламидопропил-*N*-(3-сульфопропил)-аммоний бетаина в качестве гидрофильного мономера, авторы работ [190] и [191] приготовили капиллярные колонки, на которых удовлетворительно разделяются смеси нуклеозидов.

Несмотря на значительные преимущества метода ГФХ, он обладает и недостатками. Например, некоторые полярные и заряженные аналиты имеют ограниченную растворимость в элюенте, обогащенном ацетонитрилом, что может повлечь за собой выпадение в осадок вещества непосредственно в колонке. Также многие органические вещества являются недостаточно гидрофильными, чтобы иметь удовлетворительное удерживание в данном режиме. Еще одна проблема заключается в более длительном времени, необходимом для уравнивания хроматографической системы. То есть необходимо достаточно долгое время промывать колонку необходимым составом ПФ, чтобы начать разделение [192,193].

1.2.3.4 Монолиты со специфическими взаимодействиями (аффинные, хиральные)

Аффинная монолитная хроматография – разновидность хроматографии, в основе которой лежит реакция взаимодействия разделяемых аналитов с лигандом, связанным с инертным монолитным носителем. К таким реакциям относятся: связывание антитела с антигеном, фермента с субстратом или гормона с рецептором. Селективность связывания является результатом действия одновременно нескольких различных видов взаимодействий: кулоновское, диполь-дипольное, водородные связи и стерические эффекты [194].

Среди доступных мономеров для получения органических монолитов с аффинными свойствами наиболее подходящими являются глицидилметакрилат (благодаря достаточно простому процессу модифицирования эпоксидной группы), а в качестве сшивающего агента – этиленгликольдиметакрилат [195,196]. Существует достаточно много способов модифицирования эпоксидной группы. Большая их часть описана в обзорной работе [197]. Монолиты на основе перечисленных мономеров можно получить в различных формах и с текстурными характеристиками, изменяемыми в широких пределах. Последнее свойство имеет особое значение, поскольку в таком случае размер пор и площадь поверхности монолитного носителя можно подобрать под конкретные молекулы белков и других макромолекул [194]. Аффинная хроматография может быть использована для выделения биохимических веществ таких как ферменты, антитела и другие белки [198–203]. Кроме того, данный метод используется для определения термодинамики и кинетики взаимодействия между участниками реакций [204].

Интерес к разделению оптических изомеров значительно возрос за последние два десятилетия в связи с тем, что большинство фармацевтических препаратов являются

хиральными [205]. Соответственно, фармацевтическим компаниям необходимо совершенствовать препаративные методы разделения таких препаратов.

Монолитные колонки с хиральными центрами, включенными в полимерную матрицу, получают путем сополимеризации хирального мономера [206] или пришивкой хирального соединения к поверхности монолита с реакционноспособными группами [207]. Для полимерной матрицы используются такие мономеры, как метакрилаты, акриламиды или производные стирола. Считается, что стирольные матрицы являются наименее подходящими для приготовления энантиоселективных сорбентов, так как, гидрофобная ароматическая система стирола склонна к неспецифическим взаимодействиям (гидрофобным и π - π), которые негативно влияют на энантиоселективность [208]. Наиболее широко в качестве хиральных реагентов используются β -циклодекстрин и его производные [209–214]. В роли энантиоселективных функциональных фрагментов также используются: целлюлоза [215], амилоза [216], металлоорганические каркасы [217], углеродные нанотрубки [218], оксид графена [219].

Почти все хиральные монолиты, описанные в литературе, были приготовлены в масштабах капиллярных колонок и применяются в электрохроматографии [215,217,220], микромасштабной жидкостной хроматографии [221–223] и аффинной хроматографии [218,219].

1.2.3.5 Монолитные сорбенты со смешанным механизмом удерживания

Аналитическое разделение различных соединений в сложных образцах становится все более важным в последние годы благодаря достижениям медицинской химии, протеомики. Классическое использование одного хроматографического режима (ОФХ, ГФХ, ИОХ) не позволяет провести удовлетворительное разделение сложных смесей, которые состоят одновременно из гидрофильных, гидрофобных и/или ионных соединений.

В связи с данной проблемой в настоящее время активно исследуется метод смешанной хроматографии, в котором удерживание аналитов определяется по меньшей мере двумя типами взаимодействиями. Это становится возможным благодаря особым свойствам неподвижных фаз. Так, например, если НФ одновременно имеет гидрофобные и ионообменные функциональные фрагменты, то в зависимости от структуры аналита и условий элюирования, она способна работать в ОФХ или ИОХ режиме [224,225]. Колонки на основе 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой кислоты и пентаэритритол триакрилата, которые были приготовлены в работе [226], проявили возможность работы в гидрофильном и катионообменном режимах благодаря гидрофильности кислоты и наличию у неё сульфогруппы. Смешанный механизм ГФХ/ОФХ был выявлен у колонки на основе пентаэритритол триакрилата и N,N-диметил-N-акрилоксиундецил-N-(3-сульфопропил) аммония

бетаина [227]. Также известна работа, в которой исследуют колонки, способные работать в трех режимах [228].

Оценить способность работы колонки можно с помощью зависимости логарифма фактора удерживания аналита от состава ПФ. Рассмотрим смешанный механизм удерживания на примере обращенно-фазового и гидрофильного режимов. Установлено, что для классических ОФ колонок такая зависимость имеет линейный характер как для полярных, так и для неполярных аналитов: фактор удерживания увеличивается с увеличением доли водного элюента в ПФ ($\phi(\text{H}_2\text{O})$) (рис. 7а) [229]. А для колонок с гидрофильным механизмом удерживания характерна зависимость, представленная на рис 7б. Для нее характерно наличие двух участков. На первом наблюдается резкое увеличение фактора удерживания с уменьшением доли водного элюента. На втором – медленное уменьшение фактора удерживания до установления почти постоянного минимального значения с увеличением доли водного элюента [191].

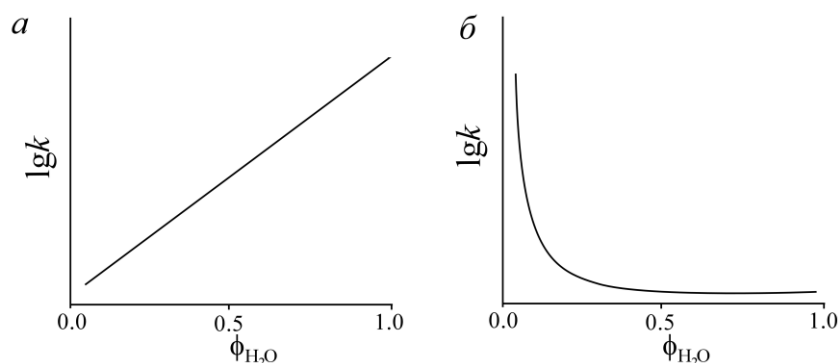


Рис. 7. Вид зависимостей логарифма фактора удерживания от состава ПФ для обращенно-фазового (а) и гидрофильного (б) механизмов удерживания.

Если зависимость логарифма фактора удерживания от состава ПФ для исследуемой колонки имеет параболическую форму, то это свидетельствует о том, что данная колонка способна работать в различных хроматографических режимах. Так, например, для колонок со смешанным механизмом ГФХ/ОФХ зависимость логарифма фактора удерживания от состава ПФ будет выглядеть так, как это показано на рис. 8.

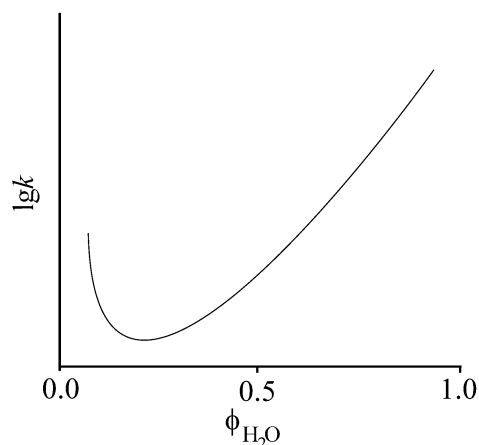


Рис. 8. Вид зависимости логарифма фактора удерживания от состава ПФ для смешанного механизма удерживания (ОФХ/ГФХ).

Левая часть кривой отвечает за гидрофильный, а правая – за обращенно-фазовый механизм. Минимум кривой соответствует переходу одного преимущественного механизма удерживания в другой [230]. Угол наклона правой ветви данной зависимости, которая обычно близка к линейной, зависит от степени гидрофобности вещества (коэффициента $\lg P$) [231]. Поведение вещества в гидрофильном режиме объяснить и предсказать достаточно сложно, поскольку оно определяется большим количеством различных типов химических и физических взаимодействий [232].

Для описания U-формы экспериментальных графиков $\lg k$ в зависимости от объемной доли воды в подвижной фазе ($\phi(\text{H}_2\text{O})$) используется следующее уравнение:

$$\lg k = a_1 + m_{\text{RP}} * \phi(\text{H}_2\text{O}) - m_{\text{HILIC}} * \lg(\phi(\text{H}_2\text{O})) \quad (1)$$

Параметры a_1 , m_{RP} и m_{HILIC} этого уравнения могут быть определены путем нелинейной регрессии экспериментальных коэффициентов удерживания, измеренных при различных объемных долях воды в подвижной фазе. Параметр m_{RP} характеризует влияние увеличения концентрации воды в подвижной фазе на усиление вклада обращенно-фазового механизма в удерживание; параметр m_{HILIC} является мерой уменьшения вклада гидрофильного режима в удерживание в высокоорганических подвижных фазах; параметр a_1 является эмпирической константой [233].

Метод смешанной хроматографии нашел наибольшее применение в разделении небольших полярных молекул, в том числе в фармацевтическом анализе для разделения, выделения и очистки лекарственных препаратов. Однако большинство этих применений проводится на силикагелевых колонках [234–239]. Поскольку имеются коммерчески доступные колонки на основе силикагеля, способные работать в смешанном режиме. Использование

органических монолитных колонок достаточно ограничено, ввиду отсутствия на данный момент таких коммерчески доступных колонок.

1.2.3.6 Способы оценки селективности монолитных колонок

При исследовании новых сорбентов для ВЭЖХ необходима их характеристика с точки зрения селективности. Как правило, оценку селективности колонок проводят относительно друг друга: сравнивают ряд колонок по их способности удерживать разные классы веществ и величине этого удерживания. В настоящее время существует множество подходов для сравнения и выбора хроматографических колонок [240]. Некоторые методы сравнения используют тестовые смеси, позволяющие оценить определённые характеристики неподвижной фазы: гидрофобность, селективность, способность образовывать водородные связи и осуществлять ионный обмен. К таким методам относятся: тест Энгельгардта [241], тест Танака и его модификации [242–244].

Другие подходы основываются на построении определенных моделей, которые описывают селективность колонок в терминах молекулярных отношений. Самыми популярными моделями являются: модель количественного отношения удерживание-структура (quantitative structure retention relationships (QSRR)) [245,246], модель Снайдера (Snyder's hydrophobic-subtraction model (HSM)) [247].

Кроме перечисленных выше моделей существует метод линейных отношений энергий сольватации (ЛЮЭС) [248–250], который дает возможность на количественном уровне оценить селективность колонки и связать ее с определенными типами межмолекулярных взаимодействий. Согласно данной модели, хроматографическое удерживание описывается линейной зависимостью между параметрами удерживания (время удерживания, фактор удерживания) и параметрами, описывающими межмолекулярные взаимодействия в системе сорбент-сорбат-элюент.

В общем виде связь зависимой переменной (SP), например, времени удерживания или фактора удерживания, с независимыми переменными - дескрипторами для таких зависимостей можно представить следующим уравнением [251]:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (2)$$

Заглавные буквы (E , S , A , B , V), называемые дескрипторами, являются коэффициентами, учитывающими вклад в межмолекулярные взаимодействия со стороны аналитов. Дескриптор E характеризует способность молекулы сорбата взаимодействовать с n - и π -электронами сорбента, S отвечает за поляризуемость, A – за кислотность донора водородной связи, B – за основность акцептора водородной связи. Дескриптор V – объем Мак-Гована,

характеризует размер молекулы (молярный объем) [252]. Дескрипторы определяются экспериментально, и в литературе можно найти их численные значения для большого количества соединений [253]. Дескрипторы описывают свойства данного вещества и являются константами. Коэффициенты уравнения (2) (e , s , a , b , v) являются параметрами, которые описывают вклад в межмолекулярные взаимодействия со стороны неподвижной фазы. Параметр e отвечает за π - π и n - π взаимодействия, s – за диполь-дипольные. Параметры a и b являются оценкой вклада фазы в образование обратимой водородной связи, причем a отвечает за силы, где неподвижная фаза выступает в качестве акцептора протона, а b – в качестве донора. И параметр v учитывает дисперсионную составляющую межмолекулярных взаимодействий. Эти коэффициенты рассчитываются экспериментально. Для этого необходимо составить как минимум 6 уравнений, исследовав удерживание 6 сорбатов, и, используя для них величины дескрипторов из литературных данных. Однако для достижения удовлетворительной точности предпочтительнее использовать как можно больше различных по природе сорбатов при заданной подвижной фазе. Только в этом случае модель линейных отношений энергий сольватации может быть использована для описания сорбента [254].

1.3 Приготовление монолитов

1.3.1 Свободнорадикальная термически инициированная полимеризация

Наиболее популярным способом синтеза монолитных органических сорбентов является радикальная полимеризация. Этот процесс достаточно прост и хорошо изучен [255,256]. Монолит получают из смеси, состоящей из полимеризующихся мономеров, радикального инициатора и порообразующего растворителя. Часто используют вспомогательные растворители, позволяющие контролировать во времени момент разделения фаз. Процесс протекает через стадии зарождения радикалов, роста и обрыва цепи согласно механизму радикальной полимеризации. Стадия зарождения цепи начинается с разложения инициатора на свободные радикалы при достижении определённой температуры. Образующиеся радикалы запускают появление линейных и разветвленных олигомеров, которые, достигнув некоторого размера, перестают быть растворимыми в порообразователе и отделяются от жидкой фазы. В таких условиях мономеры являются лучшими сольватирующими агентами по сравнению с порообразователем, что приводит к их концентрированию в осаждающихся гелеобразных частицах и дальнейшему участию в полимеризации, протекающей как в растворе, так и внутри этих частиц (ядер). Растущие ядра образуют кластерные структуры, которые продолжают расти, оставаясь диспергированными в растворе полимеризационной смеси. В какой-то момент времени кластеры становятся достаточно крупными для того, чтобы вступить в контакт

в другими, что, в итоге, приводит к формированию единой связанной матрицы. Образующаяся матрица постепенно укрепляется за счет межглобулярных сшивок. По завершении процесса полимеризации порообразующие растворители представляют собой отдельную органическую фазу и заполняют пустоты полимерной матрицы, которые представляют собой транспортные поры этого монолитного материала. Доля пор в конечном полимерном материале соответствует объемной доле порообразующих растворителей в начальной полимеризационной смеси. [257].

Следует отметить, что вследствие экзотермического характера реакции полимеризации при синтезе монолита возникает такой нежелательный эффект, как температурный градиент (в случае приготовления монолита в трубке большого диаметра), который оказывает нежелательное влияние на морфологию формирующихся пор. Это приводит к более низкой эффективности хроматографической колонки, так как структура монолита в центре стержня и около стенок различается. Чтобы минимизировать данный эффект, получают монолитные колонки небольшого диаметра. Чаще всего монолит синтезируют в капиллярах, что значительно упрощает получение сорбента со структурой, равномерно распределенной по всему объему колонки [255].

Еще одним фактором, который может оказывать нежелательное влияние на скорость реакции и тип получаемых продуктов, является присутствие кислорода в смеси мономеров. Кислород вступает в реакцию со свободными радикалами с образованием прочных полимерных перекисей, а также пероксидных радикалов. Чтобы запустить реакцию разложения образовавшихся перекисей необходимо значительно увеличить температуру (более 100 °C) [258–260]. Образование пероксидных радикалов приводит к получению полимерных цепей с низкой молекулярной массой и ограниченной конверсией мономеров [261]. В связи с этим необходимо удалять растворенный кислород из полимеризационной смеси, например, продувая раствор инертным газом [262].

Монолитный материал готовят внутри формы, в качестве которой, обычно, выступает трубка или капилляр. Размеры формы могут быть разнообразными: от тонких капилляров до трубок диаметром несколько сантиметров. Материалом для формы служат: стекло [263–265], кварц [266,267], нержавеющая сталь [268,269], полимеры [270–274]. Перед заполнением формы полимеризационной смесью необходимо провести обработку стенок этой формы. Данный этап является крайне важным для того, чтобы обеспечить химическую пришивку полимерного материала к стенкам колонки. В противном случае, в процессе приготовления монолита между ним и стенками будут образовываться пустоты, которые негативно скажутся на эффективности будущей колонки. Так, например, кварцевые капилляры и стеклянные трубки обрабатывают 3-(триметоксисилил)пропилметакрилатом [266], трубки из политетрафторэтилена – смесью перекиси водорода и серной кислоты [274], капилляры из полиэфирэфиркетона

последовательной промывкой концентрированной серной кислотой, раствором тетрабората натрия в диметилсульфоксиде, раствором восстановителя с формулой $\text{NaAlH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ в диметиловом эфире тетраэтиленгликоля [270].

После того, как стенки формы обработаны, один конец герметично закрывается или запаивается (в зависимости от материала). Далее форма заполняется полимеризационной смесью, второй конец закрывается аналогичным образом. Форма помещается в термостат на определенное время при выбранной температуре. После завершения полимеризации закрытые (запаянные) части трубки удаляются, и колонка снабжается фитингами для установки в хроматограф с целью удаления непрореагировавших мономеров и порообразующего растворителя путем промывки растворителем.

На морфологию конечного монолитного материала значительное влияние оказывают многие факторы: природа и количество порообразователей, химическая природа и концентрация сшивающего агента и функционального мономера, способ инициирования, температура и время полимеризации. Рассмотрим влияние некоторых из этих параметров подробнее.

1.3.1.1 Влияние температуры и времени полимеризации на свойства монолитных материалов

Температура полимеризации является особенно эффективным средством контроля над распределением пор по размерам при приготовлении монолитного материала. Скорость распада инициатора полимеризации растет при повышении температуры. Это способствует росту количества свободных радикалов, которое приводит к увеличению числа полимерных ядер (зародышей) и уменьшению их размера [189]. Следовательно, при повышенной температуре образуется более плотный полимер с меньшими размерами пор и, таким образом, более низкой проницаемостью [276–278].

Время полимеризации существенно влияет на внутреннюю структуру монолитного материала. Увеличение времени полимеризации способствует более полной конверсии мономеров. Однако это не всегда хорошо для хроматографических свойств сорбента. Увеличение степени конверсии приводит к уменьшению среднего размера и объема мезопор и к снижению удельной площади поверхности [279]. Такое явление характерно для синтеза как акрилатных, так и стирольных монолитов [11,15]. При малом времени полимеризации образуются монолиты с большей площадью поверхности, что приводит к возможности разделения малых молекул в изократическом режиме [280].

1.3.1.2 Влияние сшивающего агента

Сшивающий агент при синтезе органического сорбента – это сомономер, имеющий две или более функциональные группы, способные к образованию ковалентных связей. При наличии сшивающего агента в полимеризационной смеси может происходить образование не только линейных полимеров, но и разветвленных трехмерных полимерных каркасов.

Как уже говорилось выше, органические монолиты обычно имеют невысокую площадь поверхности, что накладывает некоторые ограничения на разделение малых молекул. Однако можно увеличить концентрацию сшивающего агента в исходной полимеризационной смеси, что приведёт к более раннему разделению фаз и образованию сильно сшитых микроглобул. Как следствие, такие полимеры имеют увеличенную площадь поверхности [281–283]. Существует ряд работ, посвященных исследованию влияния количества сшивающего агента на свойства монолитного материала [22,284,285]. Общим выводом для всех исследований является тот факт, что с увеличением доли сшивающего агента в исходной полимеризационной смеси происходит увеличение площади поверхности монолита. Однако было установлено, что увеличение доли сшивающего агента сопровождается снижением гидродинамической проницаемости [275].

Наиболее часто применяемые сшивающие агенты представлены на рис. 9. К ним относятся этиленгликольдиметакрилат [286] и триметиленпропан триметакрилат [135], используемые для сшивания метакрилатных и акрилатных мономеров. Дивинилбензол обычно применяется в комбинации со стирольными мономерами. N,N'-метилден-бис-акриламид, как правило, используется с акриламидом [287]. С гидрофильными акрилатными и метакрилатными мономерами в качестве сомономера выступает глицерин-1,3-диметакрилат [25].

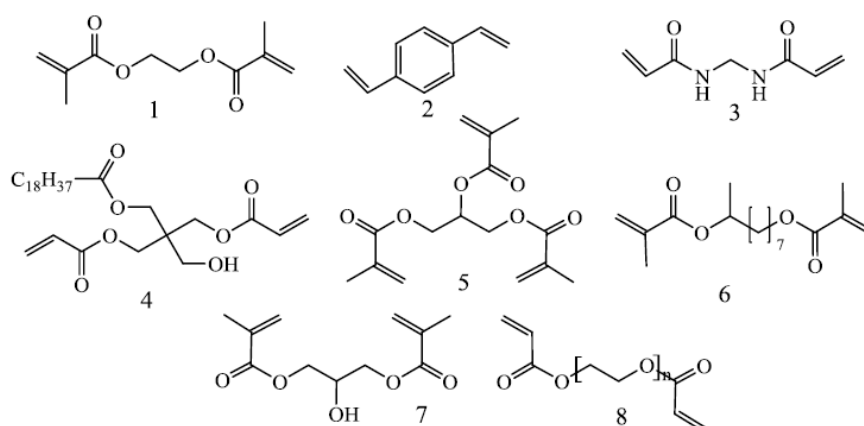


Рис. 9. Соединения, используемые в качестве сшивающих агентов для получения пористых полимерных материалов: этиленгликольдиметакрилат (1); дивинилбензол (2); метилден-бис-акриламид (3); пентаэритритдиакрилатмоностеарат (4); триметиленпропан триметакрилат (5); 2-метил-1,8-октандиол диметакрилат (6); глицерин-1,3-диметакрилат (7); поли(этиленгликоль)диакрилат (8).

1.3.1.3 Влияние порообразующего растворителя

Выбор порообразователя является еще одним инструментом, который может быть использован для контроля пористых свойств полимера. В отличие от других переменных, таких как соотношение сомономеров и тип инициатора полимеризации, природа порообразователя не влияет на химический состав монолита.

Для получения макропористых полимерных монолитов в качестве порообразователя используются низкомолекулярные соединения (алифатические спирты, толуол и др.) [187,189,288], линейные олигомеры и полимеры (полиэтиленгликоли, полистиролы) [289,290], сверхкритические флюиды (углекислый газ и 1,1,1,2-тетрафторэтан) [291,292], а также твердые порообразователи такие, например, как карбонат натрия [275] и сульфат натрия [293].

Процесс синтеза большинства органических монолитов основан на методике, описанной в работе [7]. Данная методика определяет процентное массовое соотношение суммы мономеров к порообразующему растворителю 40/60, а количество инициатора полимеризации составляет 1 масс. % по отношению к содержанию мономеров. Так, как механизм формирования транспортных пор основан на разделении фаз во время полимеризации, то порообразователи выбирают исходя из их способности растворять мономеры и образующиеся макромолекулы. На начальных этапах полимеризация протекает в гомогенном растворе. После того, как полимерные цепи вырастают до определенной молекулярной массы, они становятся нерастворимыми в полимеризационной смеси и отделяются в виде полимерных агломератов, образуя гетерогенную систему [294]. Влиять на поровое пространство монолитного материала можно путем изменения количества порообразователя в полимеризационной смеси или химической природы порообразователя. Известно, что увеличение концентрации порообразователя приводит к увеличению объема транспортных пор, а также к снижению механической прочности полимера [275]. Влияние природы порообразователя на свойства монолита необходимо рассмотреть подробнее.

Существует ряд особенностей, которыми порообразующий растворитель должен обладать, чтобы подходить для каждой конкретной системы мономеров. Во-первых, порообразующий растворитель (смесь порообразователей) должен смешиваться со всеми исходными компонентами полимеризационной смеси. Во-вторых, желательно, чтобы в состав полимеризационной смеси входил и «плохой» и «хороший» растворители. В «плохом» растворителе полимерные цепи начинают осаждаться раньше, тем самым, генерируя монолит с большими транспортными порами. «Хорошие» растворители, наоборот, дают монолиты с небольшими порами в связи с более поздним разделением фаз. Следовательно, выбор подходящего порообразователя должен, в первую очередь, зависеть от назначения будущего

сорбента [277]. Используя бинарную (или тройную) систему (варьирование соотношения «хорошего» и «плохого» растворителей), можно оптимизировать получение нужной пористости [295,296]. В-третьих, порообразователь должен подходить под способ инициирования. Так, например, при термическом инициировании температура кипения растворителя должна быть выше температуры полимеризации, а при фотоинициации обычно рекомендуется использовать только прозрачные в ультрафиолетовом диапазоне растворители [297]. В-четвертых, он должен быть химически инертным, то есть не вступать в реакции с мономерами и другими реагентами в полимеризационной смеси. Более подробно требования к порообразователям и особенности их выбора описаны в обзорной работе для полимерных монолитов [298].

В «классической» системе мономеров стирол - дивинилбензол, в качестве порообразователей используют различные вещества: толуол, метанол, этанол, пропан-1-ол, декан-1-ол, додекан-1-ол, тетрагидрофуран (ТГФ), формамид, 2,2,4-триметилпентан (изооктан), и их смеси [20,296,299]. Тoluол обладает физическим сродством к образующимся полимерным цепям и является «хорошим» растворителем для данной системы. Он способен сольватировать и удерживать некоторое время полимер в жидкой фазе. Применение 1-деканола позволяет получить развитые макропоры в монолитном материале в связи с более быстрым разделением фаз на ранних стадиях полимеризации. В работе [23] в качестве порообразующего растворителя для системы стирол-дивинилбензол используют смесь тетрагидрофурана и декан-1-ола, где ТГФ выступает в качестве «хорошего» растворителя, а декан-1-ол в качестве «плохого». Авторы установили, что с увеличением доли ТГФ в смеси порообразователей размер глобул полимера значительно уменьшается. Это происходит вследствие позднего разделения фаз. И наоборот, когда содержание декан-1-ола в смеси увеличивается, то разделение фаз происходит раньше, что приводит к образованию более крупных глобул. На этой стадии в растворе все еще присутствует большое количество мономеров, которые заполняют образовавшиеся мелкие поры, что влечет за собой слияние микроглобул в крупные агрегаты. Схема, отражающая влияние «хорошего» и «плохого» растворителей представлена на рис. 10.

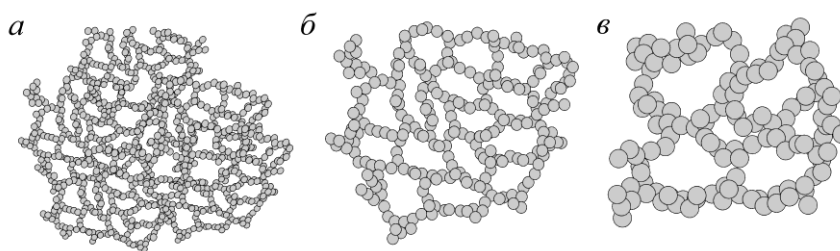


Рис. 10. Схема влияния порообразователя на макропористость и размер глобул монолитного сорбента. Количество «плохого» растворителя увеличивается от (а) к (в).

В дополнение к низкомолекулярным органическим растворителям в качестве порообразователей применяют полимеры. Особенностью макромолекулярного порообразователя при получении монолита является то, что он может вызвать повышение вязкости системы, поэтому проникновение мономеров в растущие ядра ограничено малой диффузионной подвижностью [300]. Наиболее используемыми полимерными порообразователями являются: полиэтиленгликоль с молекулярными массами в пределах 200–400 г/моль [137,182,269,290,301], полистирол [290,302,303]. Составной порообразователь полистирол-толуол-ТГФ использовался в работе [304]. «Хороший» растворитель толуол был необходим для получения высокой площади поверхности путем создания мезопор, в то время как раствор полистирола в ТГФ действовал как макропорообразователь для получения проницаемого монолита. Для колонки, приготовленной с использованием данного составного порообразователя наблюдалась линейная зависимость скорости потока от перепада давления, что указывает на механическую устойчивость этих монолитов.

В качестве порообразователей используются также блок-сополимеры. Длину и порядок блоков можно варьировать, тем самым меняя молекулярную массу и полярность полимера. Авторы работы [284] использовали блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, представленные на рис. 11 в качестве порообразователей для создания мезопор в монолитном сорбенте. Было установлено, что использование блок-сополимера в качестве порообразователя приводит к получению практически непроницаемого сорбента. В связи с этим в качестве порообразователя стали использовать бинарную смесь, состоящую из блок-сополимера, изопропилового спирта и ТГФ. Путем варьирования отношения этих компонентов было установлено, что с увеличением доли спирта проницаемость системы увеличивается, то есть появляются крупные транспортные поры.

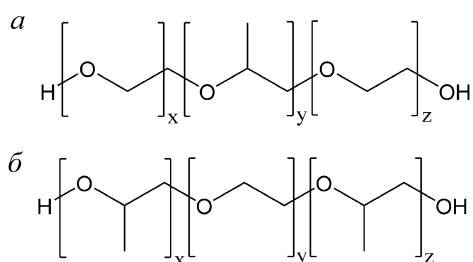


Рис. 11. Структурные формулы триблок-сополимеров: поли(этиленгликоль)-блок-поли(пропиленгликоль)-блок-поли(этиленгликоль) (а), поли(пропиленгликоль)-блок-поли(этиленгликоль)-блок-поли(пропиленгликоль) (б).

Подходящий порообразователь крайне важен при приготовлении полимерных монолитов, поскольку этот компонент в значительной степени формирует пористую структуру конечного материала и может влиять на эффективность и проницаемость приготовленной колонки.

1.3.1.4 Влияние инициатора

Тип и концентрация инициатора влияют на морфологию и пористость монолита. Процесс полимеризации запускается с момента разложения инициатора на свободные радикалы, которые в свою очередь активируют рост полимерной цепи. Скорость разложения инициатора и специфичность реакций инициирования зависят от температуры полимеризации и типов порообразователя и мономеров. Порообразователи могут оказывать нежелательное влияние на образование полимера, вызывая побочные реакции, такие как рекомбинация свободных радикалов, обрыв цепи. Концентрация инициатора влияет, главным образом, на размер пор и площадь поверхности монолита. Увеличение концентрации инициатора влечет за собой увеличение скорости полимеризации, что, в свою очередь, способствует образованию большого количества зарождающихся низкомолекулярных полимерных ядер. В таком случае, образование более крупных олигомеров происходит значительно позже, а, следовательно, позже происходит разделение фаз. Это приводит к образованию монолитов с меньшими размерами глобул и пор и более высокой площадью поверхности [295,305].

При синтезе органических полимеров методом свободнорадикальной полимеризации используют два основных типа инициаторов: бензоилпероксид (БП) и 2,2-азобисизобутиронитрил (АИБН) [137,205,306]. АИБН менее взрывоопасен, чем БП. Хотя существует риск взрыва при температуре выше 65 °С. АИБН крайне токсичен. На рисунке 12 представлены реакции разложения этих инициаторов. Основное отличие в свойствах этих инициаторов – это скорость их разложения. Так, установлено, что при использовании АИБН распределение пор по размерам получаемого монолитного материала сдвинуто в сторону меньшего размера, по сравнению с монолитами, полученными с помощью БП. Это можно объяснить тем фактом, что скорость разложения АИБН примерно в 4 раза выше, чем БП. Это приводит к образованию большего количества полимерных цепей, которые выпадают в осадок и образуют множество микроглобул с небольшими порами между ними [307]. В связи с этим можно сделать вывод, что подбор инициатора стоит осуществлять исходя из поставленной задачи, которую должен решать монолитный сорбент.

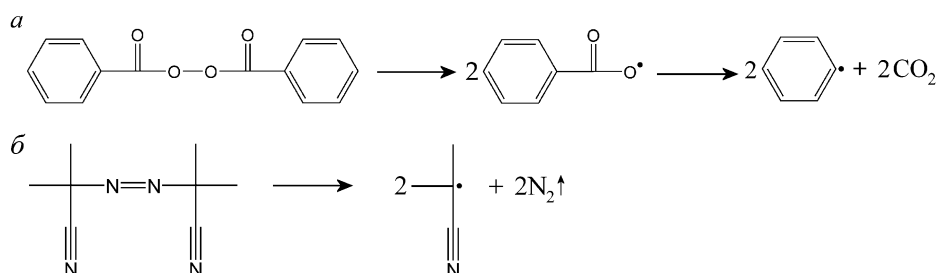


Рис. 12. Реакции разложения инициаторов, используемых при синтезе полимерных монолитов: бензоилпероксид (а), 2,2'-азобисизобутиронитрил (б).

Небольшой выбор инициаторов термической полимеризации объясняется практической универсальностью уже имеющихся. При синтезе полимеров всё же наибольшую роль играют другие компоненты полимеризационной смеси.

1.3.2 Фотоиницируемая полимеризация

В 1997 г. была опубликована одна из первых работ, описывающая процесс фотоиницируемой свободно-радикальной полимеризации для получения макропористых монолитов в кварцевых колонках, проницаемых для ультрафиолетового излучения [308].

Этот новый метод изначально не нашел широкого применения, так как термически инициированная полимеризация была стандартом и хорошо подходила для приготовления монолитных структур, которые полностью заполняли весь объем колонки. Однако существуют устройства, в которых необходимо частичное заполнение монолитной структурой. Для достижения этой цели используются «маски», которые закрывают необходимые участки устройства от облучения [309].

Концепция фотополимеризации проста. Смесь, подобная той, которая обычно используется для термически инициируемого процесса, помещается в форму и облучается ультрафиолетовым светом для инициирования полимеризации. По сравнению с термически инициируемой полимеризацией фотополимеризация проходит значительно быстрее даже при комнатной температуре и может быть завершена за минуты, а не за часы. Однако проводить этот синтез можно лишь в малых объемах (тонких слоях, капиллярах). Поэтому данный способ инициирования часто применяется при изготовлении микрофлюидных устройств и чипов [310–314], а также капиллярных хроматографических колонок [315–317]. Поскольку процесс может протекать при комнатной температуре, то можно использовать ряд менее распространенных легкокипящих растворителей, таких как метанол, этанол, хлороформ, этилацетат и гексан [318]. Ограничением этого метода является необходимость использования форм и мономеров, проницаемых для ультрафиолетового излучения. В качестве формы используют специальные кварцевые капилляры, чипы и трубки из боросиликатного стекла [319]. Что касается мономеров, то неподходящими являются ароматические мономеры, такие, например, как стирол и дивинилбензол, поскольку данные мономеры поглощают в УФ диапазоне. Вместе с тем в процессе фотополимеризации можно использовать множество других мономеров и сшивающих агентов, включая большое количество различных акрилатов и метакрилатов. Важной частью полимеризационной смеси является фотоинициатор. Наиболее популярным является АИБН. Он разлагается при облучении светом с длиной волны 365 нм с образованием

свободных радикалов [302]. Поскольку этот инициатор также можно использовать для термически иницируемой полимеризации, были проведены сравнительные исследования обоих способов иницирования [321]. Были обнаружены лишь небольшие различия в хроматографических характеристиках монолитных капиллярных колонок, полученных этими двумя способами. Однако фотоиницированные монолиты были несколько менее проницаемые, что указывает на разницу в пористой структуре. Другими инициаторами, специально разработанными для фотополимеризации, являются ароматические кетоны [312,321].

1.3.3 Радиационная полимеризация

Основным преимуществом данного метода является отсутствие инициатора в полимеризационной смеси. Использование источника гамма-излучения позволяет проводить синтез макропористых матриц в формах разнообразного дизайна без применения повышенных температур. Во время синтеза свободные радикалы могут образовываться из всех компонентов полимеризационной смеси, поэтому особое внимание следует обратить на выбор порообразующих растворителей [322].

Этот метод не получил распространения в связи с необходимостью соблюдения жестких требований безопасности при работе с ионизирующим излучением. Однако существует ряд работ, посвященных приготовлению монолитов с использованием излучения γ -радиации [322–327].

1.4 Функционализация органических монолитных сорбентов

Придать монолитному сорбенту определенную функциональность можно двумя способами. Первый заключается в одностадийной сополимеризации функционального мономера с сшивающим агентом. А второй – в обработке сформированного монолита, содержащего реакционноспособные группы, реагентами с различной функциональностью. Несмотря на простоту первого способа, он требует оптимизации условий полимеризации для каждой новой композиции сомономеров. Необходимо каждый раз индивидуально подбирать порообразователь, его концентрацию в исходном растворе, дополнительные растворители для того, чтобы обеспечить разделение фаз в нужный момент времени полимеризации. Таким образом, для того, чтобы изменить селективность монолитного сорбента путем использования разных типов сомономеров, приходится пересматривать весь синтез. Для того, чтобы унифицировать методики синтеза сорбентов с различной селективностью можно использовать второй подход. На первой стадии проводится сополимеризация мономеров, содержащих реакционноспособные группы. На второй стадии проводится химическое модифицирование готового монолитного сорбента по данным группам. При этом можно получить гораздо

большее разнообразие колонок с различной селективностью, чем при синтезе сорбента из исходных сомономеров различной химической природы. Такой подход является наиболее оптимальным, так как количество модифицирующих реагентов существенно больше, чем количество функциональных сомономеров. Это дает возможность получить большое разнообразие колонок с различной селективностью [328,329].

К самым распространенным способам модифицирования исходного монолита относятся: клик-химия, сверхсшивка, введение наночастиц и наноструктур.

Проведение клик-реакций – это один из наиболее популярных способов получения монолитных колонок с различной химической селективностью. Чтобы реакция относилась к категории «клик», необходимо выполнение следующих условий: высокая скорость, и специфичность, отсутствие побочных продуктов, и, желательна, температура, близкая к комнатной [330]. В настоящее время сложились основные типы реакций, используемых в данном способе модификации: тиоловое присоединение, азид-алкиновое циклоприсоединение, реакция Дильса-Альдера [331]. Среди перечисленных типов реакций наибольшее распространение для получения монолитных сорбентов получили тиоловые реакции присоединения, которые ориентированы на реакцию с поверхностной группой (-SH). Эта группа может принадлежать монолитному материалу, и тогда можно провести его модифицирование [332,333]. Или, наоборот, модифицирующий реагент сам может обладать данной группой. В этом случае монолит может обладать любой функциональной группой, способной реагировать с -SH [93,334]. К клик-реакциям так же относится реакция с раскрытием цикла эпоксидной группы. Эту группу предварительно вводят в структуру монолита сополимеризацией метакрилатных мономеров с глицидиметарилатом. В данном случае наиболее подходящими реагентами для модификации являются соединения, которые содержат аминогруппу [335–337].

Чтобы получить полимерный монолит с развитой поверхностью используется дополнительная сшивка уже сформированного полимера. Данный процесс был назван «сверхсшивкой» и впервые был описан в конце 1960-х годов В.А. Даванковым при синтезе микропористых полистирольных сферических частиц, имеющих большую площадь поверхности [338,339]. Синтез микропористых частиц осуществляют не сополимеризацией мономеров, а путем сшивания линейных полимерных цепей в растворе или в набухшем геле сополимера стирола с дивинилбензолом бифункциональными соединениями, которые вступают в реакцию с бензольными кольцами в присутствии катализаторов Фриделя-Крафтса [340]. Сверхсшитые полистиролы имеют жёсткую нанопористую структуру с большой площадью поверхности (до 1500 м²/г). Они способны поглощать органические растворители и газы и имеют высокую сорбционную активность [341]. На основании предположения о том, что

увеличение площади поверхности материала приводит к повышению эффективности хроматографических колонок, процесс сверхсшивки был применен и для монолитных органических сорбентов [291–293]. Например, в работе [136], используя 4,4'-бис(хлорметил)-1,1'-бифенил в качестве сшивающего агента в присутствии катализатора Фриделя-Крафтса, был получен сверхсшитый дивинилбензол-стирольный монолит с площадью поверхности около 900 м²/г. Полученная капиллярная колонка проявила эффективность 70000 тт/м при разделении алкилбензолов.

Третий способ модифицирования – это введение наночастиц и наноструктур. В последние годы активно используют наночастицы металлов (золото, серебро) и оксидов металлов, углеродные нанотрубки и графен для изменения функциональных свойств монолитных колонок [344]. Благодаря высокой площади поверхности и биосовместимости наночастицы золота привлекли внимание исследователей [345,346]. Такие частицы были успешно введены в структуру органического монолита за счёт возможности образования ковалентной связи золота с группами NH-, SH- и CN- [347]. Например, в работе [348] наночастицами золота был модифицирован монолит на основе глицидилметакрила, который предварительно обработали цистеином для создания на поверхности активных центров в виде SH- групп. Углеродные нанотрубки и графен также используются для модифицирования монолитных колонок. При этом поверхность сорбента становится сильно гидрофобной, что позволяет проводить разделения небольших неполярных молекул в режиме обращенно-фазовой хроматографии [349–351]. Однако в качестве модифицирующего агента графен встречается в литературе значительно реже.

В последние годы использование техники модифицирования занимает значительное место в процессе приготовления монолитных сорбентов. Целью модифицирования является разделение контроля над морфологией и селективностью сорбента. Этот процесс может привести к получению монолитов с оптимизированной морфологией, а также к более высокой плотности функциональных групп на поверхности сорбента.

1.5 Заключение литературного обзора

Обзор литературы и анализ основных результатов опубликованных исследований в области приготовления и исследования органических монолитных колонок для хроматографии показал, что существует ряд ограничений, которые не позволяют органическим монолитам приобрести широкое распространение. Прежде всего стоит отметить, что большинство монолитных колонок в настоящее время получают в капиллярном формате. Это объясняется тем фактом, что негативное влияние температурного градиента, возникающего в форме в

процессе полимеризации, минимизировано в тонком капилляре. Такие колонки относительно просты в приготовлении и их можно получить с достаточной степенью воспроизводимости. Однако капиллярные колонки имеют малую загрузочную емкость, что позволяет вводить только небольшие объемы проб. Это ограничивает их использование для решения биохимических и фармацевтических задач выделения, разделения и очистки биологических молекул, которые являются наиболее подходящими аналитами для монолитных сорбентов. Из чего можно сделать вывод, что существует задача подбора условий и материалов таким образом, чтобы получить монолитные колонки большего диаметра.

Опираясь на описание методик приготовления органических монолитов можно заметить, что существует проблема унифицирования процесса синтеза. То есть, чтобы приготовить монолитные материалы с различной селективностью необходимо в существенной степени варьировать условия их получения. Так, для каждой новой композиции мономеров необходимо подбирать порообразующий растворитель, который может состоять из двух или трех компонентов, время и температуру полимеризации. Этот процесс достаточно трудоемкий и времязатратный, поэтому в массовом производстве реализовать это достаточно сложно. Встает задача подбора условий и материалов так, чтобы, меняя функциональный мономер в полимеризационной смеси, остальные условия сохранялись максимально постоянными. То есть использовать один и тот же порообразователь в одинаковом количестве, постоянное время и температуру полимеризации.

В настоящее время большинство органических материалов обладают преимущественно одним типом свойств (гидрофобными/гидрофильными/ионообменными). На таких колонках крайне проблематично провести разделение образцов сложного состава, где одновременно присутствуют вещества, значительно отличающиеся по химическим характеристикам. Поэтому существует задача получения колонок со смешанным механизмом удерживания, на которых в зависимости от условий элюирования можно осуществлять разделения веществ с различными химическими свойствами. Например, колонки со смешанным механизмом удерживания ОФХ/ГФХ должны иметь в своей химической структуре как гидрофобные фрагменты, так и гидрофильные полярные функциональные группы. Наряду с существующими монолитами на основе метакрилатов, для данных целей подойдут и монолиты на основе производных стирола и дивинилбензола. Полярные гидрофильные фрагменты можно ввести на стадии полимеризации или модифицированием сшитого монолита. Гидрофобная неполярная матрица, состоящая из бензольных ароматических систем, обеспечит возможность разделения в обращенно-фазовом режиме, а полярные группы на её поверхности – в гидрофильном. Стоит отметить, что дивинилбензол-стирольная матрица вносит существенный вклад в возможность реализации обращенно-фазового режима благодаря достаточно большому молекулярному

объему бензольного кольца. В то время, как метакрилатные мономеры имеют в большинстве случаев гораздо меньший молекулярный объем гидрофобной составляющей, что влияет на проявление обращенно-фазового механизма удерживания. Таким образом, вероятно, на монолитных сорбентах, приготовленных на основе сополимера дивинилбензола и производных стирола смешанный механизм удерживания будет проявляться более выражено, чем для классических метакрилатных монолитов.

В ходе рассмотрения хроматографических сорбентов с различной селективностью было установлено, что достаточно часто в составе функциональных групп сорбента присутствует атом азота (амино-, циано- и другие группы). Особое внимание привлекли гетероциклические азотсодержащие мономеры, относящиеся к классам имидазолов, пиридинов, триазолов. Использование таких мономеров недостаточно изучено, однако существуют публикации, в которых описывается применение данных мономеров для приготовления хроматографических колонок со специфическими свойствами. Так, например, известно использование 1-винилимидазола для получения колонок для газовой и жидкостной хроматографии [352,353]. Кроме того, существует коммерческая насадочная колонка COSMOSIL HILIC, полученная на основе силикагеля с привитыми триазольными группами [354]. Данная колонка способна разделять полярные аналиты без использования ион-парного реагента, а также проявлять гидрофильный и анионообменный механизмы удерживания. Благодаря доступности винильных производных гетероциклических мономеров, их можно включить в структуру монолита на стадии полимеризации в качестве одного из компонентов полимеризационной смеси. В то же время, сшитые монолитные сорбенты, на поверхности которых имеются реакционноспособные группы, можно обработать гетероциклическим реагентом и получить на поверхности ионные пары, благодаря которым на таких колонках можно реализовывать различные механизмы удерживания.

Описанные выше представления о монолитных органических сорбентах позволили выбрать в качестве основных объектов исследования монолитные колонки с органическими сорбентами на основе сополимера стирола, дивинилбензола и гетероциклических азотсодержащих мономеров. Для приготовления сорбентов необходимо освоить метод термически иницируемой полимеризации и оптимизировать условия синтеза. Кроме того, необходимо провести оценку влияния таких факторов, как природа и количество функционального мономера, количество сшивающего агента, природы порообразующего растворителя на различные свойства монолитных колонок. Для исследования текстурных и хроматографических свойств приготовленных колонок необходимо использовать эффективные современные физико-химические методы исследования.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование и реактивы

В работе использовали следующее хроматографическое и общелабораторное оборудование:

1. Жидкостный хроматограф Милихром А-02 со спектрофотометрическим детектором.
2. Жидкостный хроматограф Thermo Scientific DIONEX UltiMate 3000 с детектором заряженных аэрозолей Corona ultra RS.
3. Воздушный термостат SNOL 58/350.
4. Аналитические весы Denver instrument company XE-100.
5. Центрифуга Eppendorf MiniSpin plus.
6. Ультразвуковая ванна «Сапфир».

Используемые реактивы: вода деионизованная (0.05 мкСм/см), ацетонитрил, урацил (PanReac AppliChem, Испания), бензойная кислота (Acros organics, Бельгия), этанол, бензол, толуол, 1,3,7-триметилпурин-2,6-дион (кофеин), фенол, бромид калия (НПО Экрос, Санкт-Петербург), 3-триметилсилилпропилметакрилат (ТМСППМ), уксусная кислота, трифторуксусная кислота, стирол, дивинилбензол (80 %, смесь изомеров), 1-винилимидазол (99 %), 4-винилпиридин (99 %), 1-винил-1,2,4-триазол (99 %), 1-винил-2-пирролидон (99 %), бензоилпероксид, Pluronic 10R5, 1-метилимидазол (99 %), 2-метилимидазол (99 %), 2-метилпиридин (99 %), 4-метилпиридин (99 %), нитропропан (99 %), 4-винилбензилхлорид (90 %), 1,3,5-триоксибензол (99 %), 1,4-дигидроксибензол (99 %), 1,3-дигидроксибензол (99 %), 1,2-дигидроксибензол (90 %), бензальдегид (90 %), 4-нитробензальдегид (99 %), 2-нитро-1-фенилэтанол (99 %), 2-нитро-1-(4-нитрофенил)этан-1-ол (99 %), пиридин (99 %), 1,4-дигидроксибензол (99 %), 1-фенил-1-пропанол (99 %), нитробензол (99 %), пропилбензол (99 %), 1,1'-бифенил (99 %), фенантрен (90 %), этилбензол (90 %), бутилбензол (99 %), диметилфталат, 4-метилфенол, 2-метилфенол, 2,6-диметилфенол, 2,3-диметилфенол, 2-хлорфенол (90 %), 2-амино-4-нитрофенол (90 %), 4-нитроанилин (99 %), 3-нитроанилин (99 %), 2-нитроанилин (99 %), 2,4-нитротолуол (99 %), 2,4-дихлорфенол (99 %), 2,4,6-трихлорфенол (99 %), пентахлорфенол (99 %), фруктоза (99.5 %), глюкоза (99.5 %), сахароза (99.5 %), мальтоза (99.5 %), 2-гидроксибензойная кислота (95 %), лактальбумин (85 %), лизоцим (90 %), овальбумин (90 %), бычий сывороточный альбумин (90 %), человеческий сывороточный альбумин (97 %) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Полипропиленгликоль с молекулярными массами: 250 г/моль (Serva, Германия), 425 г/моль (LOBA Feinchemie, Австрия), 2025 г/моль (Fluka AG, Швейцария). Лекарственные

препараты: Ацетилсалициловая кислота (ЗАО «МЕДИСОРБ»), Парацетамол (ОАО «Фармстандарт-Лексредства»), Пенталгин (ОАО «Фармстандарт-Лексредства»), Аскофен-П (ПАО «Отисифарм»), Каффетин (АО «Алкалоид»), Дротаверин (ОАО «Органика»), Напроксен (ОАО «Акрихин»).

В качестве колонок сравнения использовали:

1) насадочная полумикроколонка Диасфер-250-СТ (сорбент - дивинилбензол-стирольный полимер, диаметр частиц 5 мкм), длина 75 мм внутренний диаметр 2 мм;

2) насадочная полумикроколонка ProntoSIL-120-5-C18 (силикагель, модифицированный группами C₁₈, диаметр частиц сорбента 5 мкм), длина 75 мм внутренний диаметр 2 мм. Обе колонки производства ООО Институт хроматографии «ЭкоНова», Новосибирск;

3) колонка с монолитным сорбентом стирол-дивинилбензол ProSwift RP-3U длиной 50 мм и диаметром 4.6 мм производства Thermo Fisher Scientific, USA.

2.2 Синтез монолитных колонок

2.2.1 Предварительная обработка стеклянной трубки

Для приготовления колонок использовали трубки из свинцового стекла С87-2 внутренним диаметром 2 мм. Чтобы увеличить концентрацию силанольных групп на поверхности стекла, трубки обрабатывали раствором уксусной кислоты. Для этого стеклянную трубку заполняли 60 об. % раствором уксусной кислоты, запаивали концы и выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч. Затем трубку промывали деионизованной водой и сушили в токе азота при комнатной температуре.

Для химической пришивки монолита к стенке колонки использовали бифункциональный сшивающий агент 3-(триметоксисил)пропилметакрилат (ТМСПМ). Алкоксильными группами ТМСПМ взаимодействует с поверхностными силанольными группами стеклянной трубки, а двойная связь реагента принимает участие в радикальной полимеризации при образовании монолита (рис. 13). Трубку заполняли раствором, содержащим 2 мл ТМСПМ, 2 мл этанола и 0.02 мл 99 об. % трифторуксусной кислоты (ТФК). Концы стеклянной трубки запаивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч. После этого трубку промывали этиловым спиртом и сушили в токе азота.

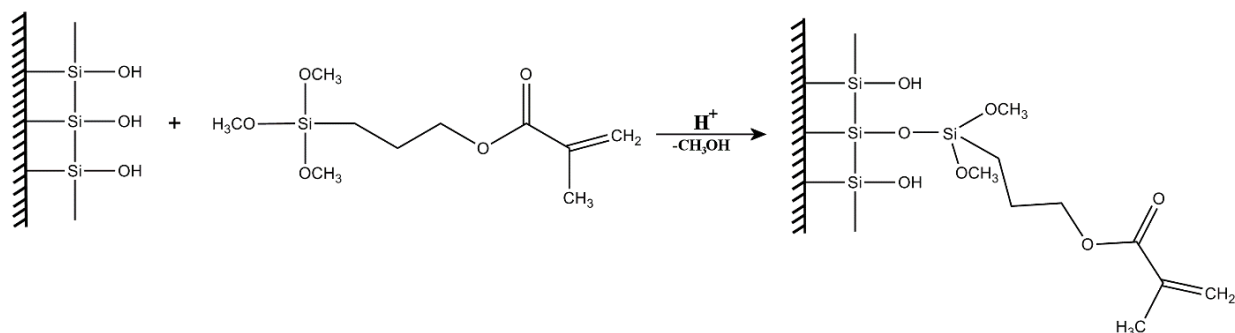


Рис. 13. Реакция 3-(триметоксисилил)пропилметакрилата с силанольными группами поверхности стекла.

2.2.2 Приготовление хроматографических колонок

Для синтеза монолитного сорбента готовили полимеризационные смеси, состоящие из: стирола (**Ст**), дивинилбензола (**ДВБ**), функционального гетероциклического сомономера, порообразующего растворителя и перекиси бензоила. В качестве функциональных сомономеров (**ФМ**) использовали: 1-винилимидазол (**ВИ**), 4-винилпиридин (**ВП**), 1-винил-2-пирролидон (**ВПр**), 1-винил-1,2,4-триазол (**ВТр**). Кроме гетероциклических мономеров использовали 4-винилбензилхлорид (**ВБХ**) в качестве функционального сомономера для последующего модифицирования монолитного сорбента. Для приготовления колонок с 1-винил-2-пирролидоном использовали несколько порообразователей: Pluronic 10R5 (**П**) с молекулярной массой 2000 г/моль и полипропиленгликоль с разными молекулярными массами: 2025, 425, 250 г/моль (**ППГ2025**, **ППГ425**, **ППГ250** соответственно). При приготовлении остальных колонок использовали только Pluronic 10R5 в качестве порообразователя. Структурные формулы используемых для синтеза монолитных колонок реагентов представлены на рис. 14.

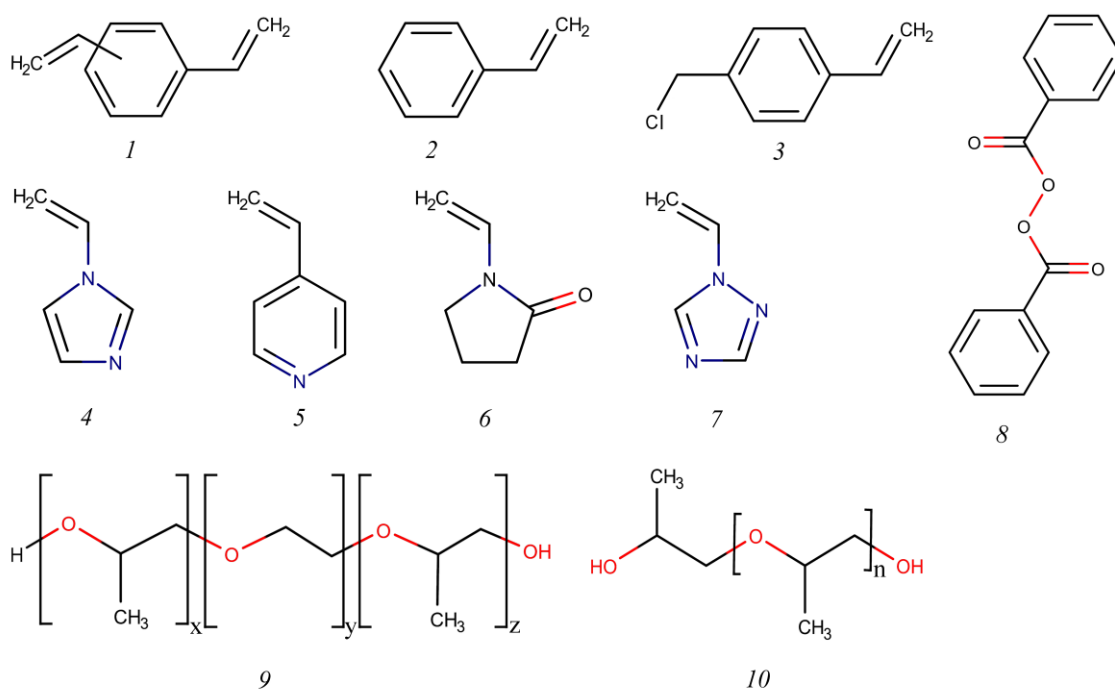


Рис. 14. Структурные формулы используемых для синтеза реагентов: 1 – дивинилбензол, 2 – стирол, 3 – 4-винилбензилхлорид, 4 – 1-винилимидазол, 5 – 4-винилпиридин, 6 – 1-винил-2-пирролидон, 7 – 1-винил-1,2,4-триазол, 8 – бензоил пероксид, 9 – Pluronic 10R5, 10 – полипропиленгликоль.

В таблице 2 представлены составы исходных смесей для синтеза монолитных колонок. Число в названии колонки обозначает объемное процентное содержание гетероциклического сомомера в исходной полимеризационной смеси. Для колонок с ВПр его содержание составляло 30 об. %. В названии для этих колонок указано содержание изменяющихся параметров: дивинилбензола и порообразователя. Кроме компонентов, принимающих участие в полимеризации, и порообразующего растворителя в смесь добавляли соразтворитель 1-метил-2-пирролидон (**МПир**) объемом 0.4 мл при приготовлении колонок с ВПр, ВТр, ВБХ. Содержание перекиси бензоила во всех смесях составляло 1 % от суммарной массы мономеров, принимающих участие в реакции.

Таблица 2

Состав полимеризационной смеси

Название колонки	Ст, мл	ДВБ, мл	ФМ, мл	Сорастворитель МПир, мл	Порообразую щий растворитель, V = 3 мл	
Колонки с 1-винилимидазолом						
ДВБ-Ст	1.00	1.00	0.00	-	Pluronic 10R5	
ВИ10	0.80	1.00	0.20	-		
ВИ17	0.68	1.00	0.34	-		
ВИ25	0.50	1.00	0.50	-		
ВИ40	0.20	1.00	0.80	-		
Колонки с 4-винилпиридином						
ВП10	0.80	1.00	0.20	-		
ВП20	0.60	1.00	0.40	-		
ВП30	0.40	1.00	0.60	-		
ВП40	0.20	1.00	0.80	-		
ВП50	0.00	1.00	1.00	-		
Колонки с 1-винил-2-пирролидоном						
ВПр20_ДВБ50_П	0.60	1.00	0.40	0.40		
ВПр40_ДВБ50_П	0.20	1.00	0.80	0.40		
ВПр30_ДВБ30_П	0.80	0.60	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ40_П	0.60	0.80	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ50_П	0.40	1.00	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ60_П	0.20	1.20	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ70_П	0.00	1.40	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ30_ППГ2025	0.80	0.60	0.60	0.40	ППГ2025	
ВПр30_ДВБ40_ППГ2025	0.60	0.80	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ50_ППГ2025	0.40	1.00	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ60_ППГ2025	0.20	1.20	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ70_ППГ2025	0.00	1.40	0.60	0.40		
ВПр30_ДВБ50_ППГ425	0.40	1.00	0.60	0.40	ППГ425	
ВПр30_ДВБ50_ППГ250	0.40	1.00	0.60	0.40	ППГ250	
Колонки с 1,2,4-триазолом						
ВТр10	0.80	1.00	0.20	0.40	Pluronic 10R5	
ВТр40	0.20	1.00	0.80	0.40		
ВТр50	0.00	1.00	1.00	0.40		
Колонка с 4-винилбензилхлоридом						
ВБХ40	0.20	1.00	0.80	0.40	Pluronic 10R5	

Предварительно обработанную ТМСПМ стеклянную трубку заполняли полимеризационной смесью и запаивали оба конца. Далее трубку помещали в воздушный термостат на 4 часа при температуре 80 °С. После этого трубку с монолитом охлаждали и отрезали запаянные концы. Были приготовлены колонки длиной от 50 до 110 мм. Колонку устанавливали в хроматограф Милихром А-02 при помощи стандартных фитингов из нержавеющей стали производства компании Restek (рис. 15). Для удаления порообразователя и остатков полимеризационной смеси колонку промывали ацетонитрилом со скоростью 10 мкл/мин 1 мл, далее скорость постепенно увеличивали до 100 мкл/мин. Объем ацетонитрила для промывки колонки составлял 20 мл. После этого колонка была готова к работе.

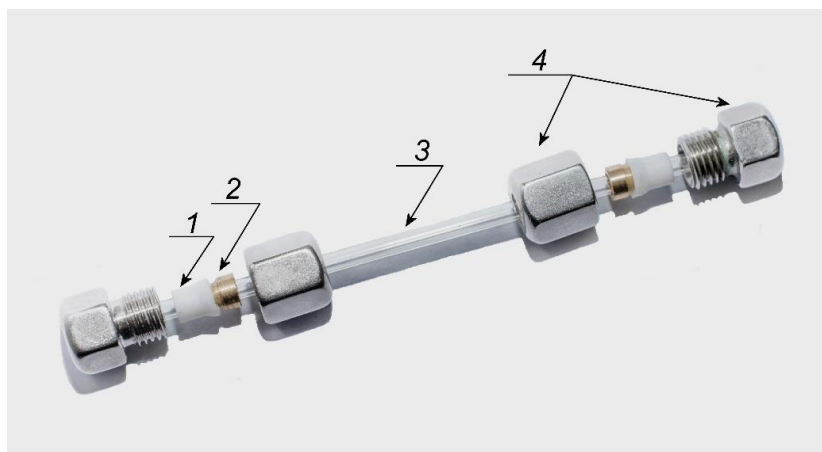


Рис. 15. Внешний вид колонки: 1 – фторопластовая втулка, 2 – медный конус, 3 – стеклянная трубка, 4 – фитинги из нержавеющей стали.

2.3 Определение текстурных характеристик хроматографических колонок

2.3.1 Сканирующая электронная микроскопия

Исследование макропористой структуры монолитного сорбента в колонках проводили с помощью электронного сканирующего микроскопа JSM-6460LV (JEOL, Япония). Монолитный сорбент извлекали из колонки и сушили при температуре 150 °С в течение 4 ч. Затем отрезали от сорбента цилиндр высотой около 2 мм. Цилиндр при помощи токопроводящего серебряного клея фиксировали на металлической подложке, как показано на рис. 16. Далее на поверхность монолитов проводили магнитно-разрядное напыление золота, толщина пленки которого составляла около 10 нм.



Рис. 16. Образцы монолитного сорбента, приклеенные на подложку и покрытые золотом толщиной пленки около 10 нм.

2.3.2 Исследование поверхности методом низкотемпературной адсорбции азота

Изотермы адсорбции азота для приготовленных монолитов и для сорбента Диасфер-250-СТ получали на анализаторе удельной поверхности и пористости Autosorb-6B (Quantachrome, США) при 77 К. Перед измерением образцы тренировали в вакууме при 150 °С в течение 20 ч. Удельную поверхность рассчитывали методом Брунауэра-Эммета-Теллера (ВЕТ); объем пор и средний размер пор рассчитывали методом Баррета-Джойнера-Халенды (ВН) по адсорбционной ветви.

2.4 Определение химического состава готового монолита

Элементный анализ выполняли на автоматическом CHNS/O-элементном анализаторе EuroVector EA-3000 (НЕКАtech GmbH, Германия).

2.5 Исследование хроматографических свойств приготовленных колонок

2.5.1 Гидродинамические свойства

Для исследования гидродинамических характеристик монолитных колонок, их устанавливали в хроматограф Милихром А-02 и пропускали элюент с различными скоростями потока (20–800 мкл/мин). В качестве подвижной фазы для исследования проницаемости колонок использовали ацетонитрил. Фиксируя скорость потока, при которой происходило изменение давления, построили зависимость перепада давления от объемной скорости ПФ.

Рассчитывали долю свободного объема колонки, доступного для ПФ по формуле [355]:

$$\varepsilon = \frac{F}{Su}, \quad (3)$$

где F – объемная скорость потока ПФ (мл/мин), u – линейная скорость ПФ (см/мин), S – площадь сечения пустой трубки (см²).

Коэффициент проницаемости рассчитывали по модифицированному уравнению Дарси:

$$B_0 = \frac{\eta L}{bS\varepsilon}, \quad (4)$$

где L – длина колонки (см), η – вязкость подвижной фазы (Па·сек), b – угол наклона зависимости перепада давления от объемной скорости потока ПФ.

2.5.2 Зависимость эффективности от скорости потока подвижной фазы

Зависимость эффективности колонки от линейной скорости потока подвижной фазы исследовали по бензолу. Концентрация бензола в растворе составляла 5 мг/мл. Растворитель – ацетонитрил. Объемное соотношение ацетонитрил/вода в подвижной фазе составляло 70/30. Колонку устанавливали в хроматограф Милихром А-02. Пробу объемом 1 мкл вводили в колонку с помощью автоматического дозатора. Запись хроматограмм проводилась при объёмных скоростях потока от 20 до 250 мкл/мин. Каждую пробу хроматографировали 3 раза и рассчитывали стандартное отклонение.

2.5.3 Определение загрузочной емкости

Загрузочная емкость хроматографической колонки – это количество введенного вещества, при котором эффективность колонки снижается незначительно. Определение загрузочной емкости монолитных колонок проводили по 1-нитропропану. Для этого были приготовлены растворы 1-нитропропана в ацетонитриле в диапазоне концентраций 1–160 мг/мл. Колонку устанавливали в хроматограф Милихром А-02. Пробу объемом 1 мкл вводили в колонку с помощью автодозатора. Эксперимент проводили при составе подвижной фазы ацетонитрил/вода 60/40 и 20/80 об. % в изократическом режиме элюирования. Объемная скорость подвижной фазы составляла 100 мкл/мин.

2.5.4 Исследование хроматографической селективности колонок

2.5.4.1 Определение зависимости параметров удерживания от состава подвижной фазы

Были приготовлены растворы тестовых веществ: бензол (5 мг/мл, растворитель – ацетонитрил), фенол (1.5 мг/мл, растворитель - ацетонитрил), бензойная кислота (5 мг/мл, растворитель – ацетонитрил/0.1 об. % раствор ТФК = 98/2). Растворы парацетамола и ацетилсалициловой кислоты были приготовлены из фармацевтических препаратов по следующей методике: таблетку препарата измельчали в ступке, далее растворяли в смеси ацетонитрил/0.1 об. % раствор ТФК в объемном соотношении 98/2 об. %. Далее полученную

суспензию выдерживали в ультразвуковой ванне с течением 20 мин. Отбирали пробу объемом 1 мл и центрифугировали в течение 3 минут при 12000 об/мин. После чего, полученный раствор разбавляли в 10 раз.

Приготовленные растворы бензола и фенола хроматографировали со скоростью потока элюента 100 мкл/мин в диапазоне содержания ацетонитрила в смеси с водой 99–40 об. %. Растворы бензойной кислоты, парацетамола и ацетилсалициловой кислоты хроматографировали при скорости потока элюента 200 мкл/мин в диапазоне составов ПФ (ацетонитрил/0.1 % раствор ТФК) 99/1–40/60 об. %.

Фактор удерживания рассчитывали по формуле:

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}, \quad (5)$$

где t_R – время удерживания тестового вещества (мин), t_0 – мертвое время (мин). В качестве неудерживаемого вещества при хроматографировании бензола и фенола использовали бромид калия, при хроматографировании лекарственных препаратов – кофеин.

Аналогично приготовлению растворов парацетамола и ацетилсалициловой кислоты был приготовлен раствор лекарственного препарата «Аскофен-П». Приготовленный раствор хроматографировали со скоростью потока элюента 200 мкл/мин при следующих составах ПФ (об. %): 40/60, 50/60, 60/40, 70/30, 80/20 и 90/10 - 99/1 с шагом 1 об. % ацетонитрил/0.3 об. % фосфорная кислота в воде соответственно. Из полученных хроматограмм определяли времена удерживания компонентов смеси: кофеин, парацетамол, ацетилсалициловая кислота, салициловая кислота (2-гидроксибензойная кислота).

2.5.4.2 Расчет параметров модели линейных отношений энергий сольватации

Были приготовлены растворы 35 тестовых веществ с концентрацией 2 мг/мл, список которых представлен в табл. 3. Исследование проводили на колонках ДВБ-Ст, ВИ (10–25), ВП (10–40), ВТр40, ВПр30_ДВБ50_П. Хроматографирование проводили в изократическом режиме при составе подвижной фазы ацетонитрил/вода = 60/40 об. %. Объемная скорость потока подвижной фазы составляла 150 мкл/мин. В качестве неудерживаемого вещества использовали бромид калия.

Расчет коэффициентов e , s , a , b , v уравнения (2) (см. разд. 1.2.3.6) был произведен исходя из данных параметров удерживания тестовых веществ. Значения соответствующих дескрипторов взяты из [253,356–358] и приведены в табл. 3. В качестве параметра удерживания

(SP) использовали значения $\lg k$, где k - фактор удерживания. Для расчета параметров e , s , a , b , v применялся метод множественной линейной регрессии с использованием программы OriginPro 9 (OriginLab Corp.).

Таблица 3

Дескрипторы тестовых веществ

№	Вещество	E	S	A	B	V
1	1,3,5-триоксибензол	1.355	1.12	1.4	0.82	0.893
2	гидрохинон	1	1	1.16	0.6	0.834
3	резорцинол	0.98	1	1.1	0.58	0.834
4	пирокатехин	0.97	1.07	0.85	0.52	0.834
5	<i>n</i> -нитроанилин	1.22	1.91	0.42	0.38	0.99
6	1-фенил-1-пропанол	0.775	0.83	0.3	0.66	1.198
7	диметилфталат	0.78	1.4	0	0.84	1.429
8	фенол	0.805	0.89	0.6	0.3	0.775
9	<i>n</i> -крезол	0.82	0.87	0.57	0.31	0.916
10	<i>o</i> -крезол	0.84	0.86	0.52	0.3	0.916
11	3,4-диметилфенол	0.83	0.86	0.56	0.39	1.057
12	нитробензол	0.871	1.11	0	0.28	0.891
13	диэтилфталат	0.729	1.4	0	0.88	1.7106
14	фторбензол	0.477	0.57	0	0.1	0.734
15	2,6-диметилфенол	0.86	0.79	0.39	0.39	1.057
16	<i>n</i> -этилфенол	0.8	0.9	0.55	0.36	1.057
17	бензол	0.61	0.52	0	0.14	0.716
18	2,5-диметилфенол	0.84	0.79	0.54	0.37	1.057
19	2,3-диметилфенол	0.85	0.85	0.52	0.36	1.057
20	<i>o</i> -нитротолуол	0.866	1.11	0	0.28	1.032
21	2-хлорфенол	0.853	0.88	0.32	0.31	0.898
22	4-нитрофенол	1.07	1.72	0.82	0.26	0.949
23	толуол	0.601	0.52	0	0.14	0.857
24	4-хлор-3-метилфенол	0.92	1.02	0.67	0.22	1.038
25	тимол	0.822	0.79	0.52	0.44	1.339
26	<i>o</i> -ксилол	0.663	0.56	0	0.16	0.998
27	этилбензол	0.613	0.51	0	0.15	0.998
28	<i>n</i> -ксилол	0.613	0.52	0	0.16	0.998
29	хлорбензол	0.718	0.65	0	0.07	0.839
30	трет-бутилбензол	0.619	0.49	0	0.18	1.28
31	нафталин	1.34	0.92	0	0.2	1.085
32	бифенил	1.36	0.99	0	0.26	1.324
33	2,4-дихлорфенол	0.96	0.84	0.53	0.19	1.02
34	фенантрен	2.055	1.29	0	0.29	1.454
35	пирен	2.808	1.71	0	0.28	1.5846

2.6 Модифицирование и исследование колонок на основе 4-винилбензилхлорида

Для функционализации монолита готовили растворы модифицирующих реагентов: 1-метилимидазол (1МИ), 2-метилпиридин (2МП), 4-метилпиридин (4МП) (6.3 % об. % в ацетонитриле) и 2-метилимидазол (2МИ) (2.5 об. % в ацетонитриле). Исходную колонку с монолитным сорбентом (ВБХ40) промывали раствором модифицирующего реагента. Объем раствора для обработки колонки составлял 1 мл, скорость потока 200 мкл/мин. Далее колонку, промытую реагентом, погружали в стеклянную пробирку, заполненную раствором того же реагента, который уже находился в колонке и помещали в воздушный термостат на 15 часов при температуре 80 °С. После этого колонку извлекали из пробирки и промывали ацетонитрилом. В дальнейшем обработанные колонки будут обозначены по названиям модифицирующего реагента: 1МИ, 2МП, 4МП и 2МИ.

2.6.1 Зависимость фактора удерживания от состава ПФ

Были приготовлены растворы: толуола (5 мг/мл, растворитель – ацетонитрил), фенола (1.2 мг/мл, растворитель – ацетонитрил), бензойной кислоты, 2-гидроксibenзойной кислоты, 2,4-дигидроксibenзойной кислоты (5 мг/мл, растворитель – ацетонитрил/0.1 % водный раствор ТФК = 98/2 об. %). Раствор парацетамола был приготовлен из фармацевтического препарата по методике, описанной в разд. 2.5.4.1.

Растворы тестовых веществ (толуол, парацетамол, бензойная кислота) вводили в колонку ВБХ40 и в модифицированные колонки. Хроматографирование проводили при скорости потока элюента 200 мкл/мин при следующих составах ПФ (об. %): 40/60, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 93/7 ацетонитрил/0.3 об. % водный раствор ТФК соответственно. Предварительно все модифицированные колонки были промыты смесью ацетонитрила и 0.5 об. % раствором ТФК в соотношении 50/50 объемом 10 мл со скоростью 200 мкл/мин. Фактор удерживания рассчитывали по формуле (5).

2.6.2 Оценка эффективности модифицированных колонок

Зависимость эффективности от линейной скорости потока подвижной фазы исследовали по фенолу как для обращенно-фазового, так и гидрофильного режимов. Концентрация фенола в ацетонитриле составляла 1.2 мг/мл. Объемное соотношение ацетонитрил/вода в подвижной фазе составляло 70/30 (обращенно-фазовый режим) и 95/5 (гидрофильный режим) для колонок 1МИ, 2МИ и 2МП; 70/30 (обращенно-фазовый режим) и 93/7 (гидрофильный режим) для колонки 4МП. Пробу объемом 1 мкл вводили в колонку с помощью автоматического дозатора.

Измерения проводили при объёмных скоростях потока подвижной фазы в диапазоне от 20 мкл/мин до 180 мкл/мин.

2.6.3 Определение загрузочной емкости модифицированных колонок

Определение загрузочной емкости приготовленных колонок проводили по фенолу. Были приготовлены растворы фенола в ацетонитриле с концентрацией от 0.17 мг/мл до 61 мг/мл. Колонки были испытаны как в режиме обращенно-фазовой, так и в режиме гидрофильной хроматографии. Для создания различных режимов удерживания меняли состав подвижной фазы (ПФ), то есть объемное соотношение ацетонитрил/0.3 об. % раствор трифторуксусной кислоты. Для колонок, обработанных 1-метилимидазолом, 2-метилимидазолом и 2-метилпиридином состав ПФ 70/30 соответствовал обращенно-фазовому режиму, в то время как соотношение 95/5 относилось к гидрофильному. Для колонки, функционализированной 4-метилпиридином, обращенно-фазовый режим соответствовал составу подвижной фазе ацетонитрил/0.3 об. % раствор трифторуксусной кислоты = 70/30, а гидрофильный = 92/8. Составы ПФ во всех случаях были подобраны так, чтобы значения фактора удерживания фенола для каждой колонки в обращенно-фазовом режиме и гидрофильном режиме были примерно одинаковы. Объемная скорость подвижной фазы во всех случаях составляла 80 мкл/мин.

Глава 3. Результаты и обсуждение

В ходе научно-исследовательской работы были получены 28 новых монолитных неподвижных фаз на основе сополимера стирола и дивинилбензола с добавлением гетероциклического азотсодержащего мономера. Синтез проводили внутри стеклянных колонок с внутренним диаметром 2 мм. Состав исходной полимеризационной смеси и соответствующие названия колонок описаны в главе 2 (разд. 2.2.2). Были приготовлены колонки длиной от 50 мм до 110 мм. На рисунке 17 представлен внешний вид описанных в данной работе монолитных колонок с фитингами для установки в хроматограф.

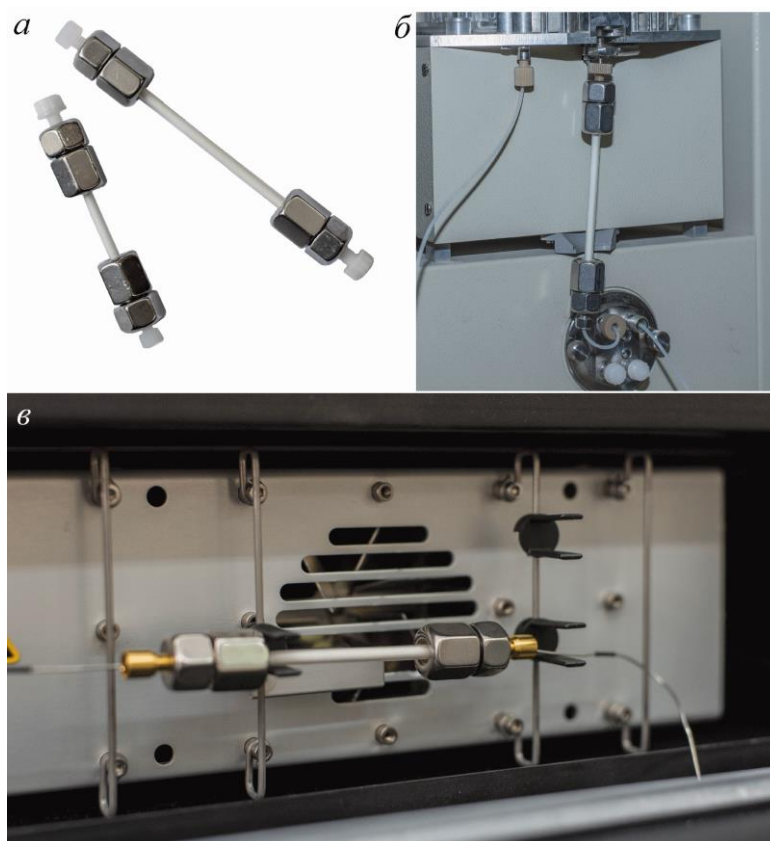


Рис. 17. Внешний вид монолитных колонок (*а*), колонка, установленная в хроматограф Милихром А-02 (*б*), колонка, установленная в хроматограф Thermo Scientific DIONEX UltiMate 3000 (*в*).

Для того, чтобы оценить воспроизводимость методики синтеза монолитных сорбентов, было проведено сравнение хроматографических свойств нескольких колонок с одним и тем же сорбентом, приготовленных в разное время. В качестве хроматографического параметра сравнения выбрали факторы удерживания трех тестовых веществ (бензол, толуол, фенол). Всего было испытано 12 колонок (по 4 для каждого сорбента). Из таблицы 4 видно, что максимальное относительное стандартное отклонение фактора удерживания составляет около 3 % по пику фенола для колонки ВП30. Такую сходимость параметров удерживания можно считать удовлетворительной для малой серии колонок.

Значения факторов удерживания тестовых веществ с указанием среднеквадратичного отклонения для приготовленных колонок

Сорбент	k (бензол)	k (фенол)	k (толуол)	n
ДВБ-Ст	2.13±0.02	0.28±0.00	3.14±0.02	4
ВИ25	1.63±0.02	1.06±0.00	2.33±0.01	4
ВП30	1.42±0.02	2.17±0.07	1.83±0.02	4

Примечание: k – фактор удерживания, n – количество приготовленных колонок

3.1 Обоснование выбора основных объектов исследования

Каждую монолитную колонку, приготовленную по методике, описанной в разделе 2.2.2 тестировали на пригодность к дальнейшим исследованиям. Для этого ее промывали смесью ацетонитрила и воды в соотношении 70/30 об. % и вводили смесь тестовых веществ (неудерживаемое вещество, бензол, фенол). Такой состав тестовой смеси был выбран в связи с тем, что бензол часто используют в ВЭЖХ в качестве неполярного компонента, а фенол – в качестве полярного вещества, близкого по размеру молекулы к бензолу. Хроматографирование проводили при составе ПФ 70/30 об. % ацетонитрил/вода и скорости потока 100 мкл/мин. Рассчитывали факторы удерживания фенола и бензола. Полученные данные представлены в виде гистограмм на рис. 18. На рисунке 18 представлены данные не для всех приготовленных колонок. Это связано с тем, что относительно низкая эффективность некоторых колонок, а именно ВП50, ВПр40_ДВБ50_П, ВТр50, не позволила с необходимой точностью определить из хроматограмм времена удерживания тестовых веществ. Ввиду неудовлетворительной эффективности разделения на данных колонках, они были исключены из дальнейшего исследования.

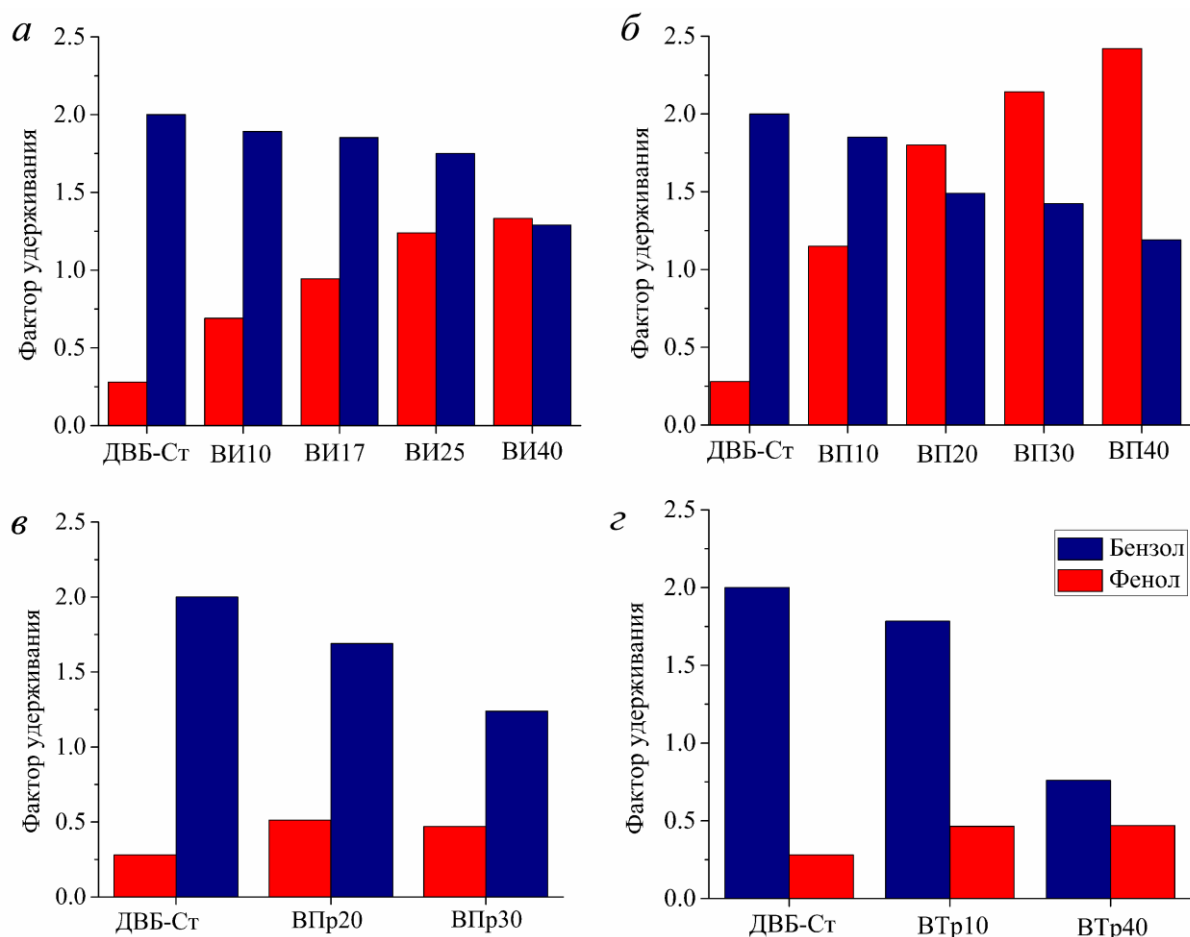


Рис. 18. Зависимость фактора удерживания бензола и фенола от содержания функционального сомономера в монолитной колонке. Колонки с функциональным сомономером: 1-винилимидазол (а), 4-винилпиридин (б), 1-винил-2-пирролидон (в), 1-винил-1,2,4-триазол (г).

Из рисунка 18 видно, что с увеличением содержания функционального сомономера в полимеризационной смеси характер изменения фактора удерживания для полярных и неполярных анализов значительно отличаются. По мере увеличения доли гетероциклического сомономера в исходной полимеризационной смеси увеличивается фактор удерживания фенола. При этом фактор удерживания бензола, наоборот, несколько снижается.

Рассмотрим колонки с 1-винилимидазолом и 4-винилпиридином (рис. 18а и 18б). Из представленных данных видно, что фактор удерживания по тестовым веществам значительно меняется в зависимости от содержания 1-винилимидазола и 4-винилпиридина в исходной полимеризационной смеси. То есть, меняются хроматографические свойства колонок во всем диапазоне концентраций функциональной добавки в исходной полимеризационной смеси от 10 до 40 об. %. Поэтому все данные колонки представляют интерес для дальнейшего подробного исследования. Для колонок с 1-винил-2-пирролидоном можно отметить, что увеличение доли функционального мономера в исходной

полимеризационной смеси не оказывает существенного влияния на изменение селективности колонок по полярному анализу (фенол) (рис. 18в). Поэтому для дальнейших исследований текстурных и хроматографических характеристик была выбрана только одна колонка с содержанием 1-винил-2-пирролидона 30 об. %. Выбор был обусловлен тем, что данная колонка проявила максимальную эффективность по сравнению с колонками с иным содержанием 1-винил-2-пирролидона в полимеризационной смеси. Эту же колонку выбрали для исследования влияния природы порообразующего растворителя и количества сшивающего мономера (дивинилбензол) на хроматографические свойства монолита. Для колонок с 1-винил-1,2,4-триазолом было установлено, что увеличение доли функционального мономера в исходной полимеризационной смеси не оказывает существенного влияния на изменение селективности колонок по полярному анализу (фенол) (рис. 18г). Для дальнейшего исследования была выбрана колонка ВТр40.

3.2 Определение текстурных характеристик хроматографических колонок

Наиболее часто используемыми методами для исследования текстуры монолитных колонок являются метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и метод низкотемпературной адсорбции азота. СЭМ позволяет оценить морфологию материала в масштабе нескольких микрометров. Используя метод низкотемпературной адсорбции азота, можно определить удельную площадь поверхности сорбента, диаметр и объем мезопор.

3.2.1 Исследование поверхности монолита с помощью сканирующей электронной микроскопии

Для исследования монолита методом СЭМ колонку оставляли с открытыми концами при комнатной температуре в течение двух суток. Затем сухой сорбент осторожно извлекали из стеклянной трубки и кондиционировали на воздухе в течение 4 часов при температуре 150 °С. После чего готовили образцы согласно методике, описанной в разделе 2.3.1.

3.2.1.1 Монолитные колонки с 1-винилимидазолом

На рисунке 19 представлены микрофотографии полученных монолитов. Видно, что для всех монолитов с 1-винилимидазолом наблюдается картина, типичная для классических пористых полимеров на основе дивинилбензола и стирола. Монолитный материал представляет собой ассоциаты из глобул, образующие каркас, пронизанный транспортными порами. Из представленных на рисунке 19 микрофотографий видно, что монолитный сорбент имеет разную плотность каркаса. В данном случае под плотностью каркаса подразумевается

визуальная оценка отношения объема колонки, занятого твердым материалом, к объему пустого пространства. Так, из рисунка 19 видно, что средний размер глобул и плотность твердого каркаса увеличиваются с увеличением содержания 1-винилимидазола в исходной полимеризационной смеси. Наибольшая плотность каркаса, соответственно, наблюдается для монолита ВИ40. В этом сорбенте глобулы полимера упакованы достаточно плотно, и их форма значительно отличается от сферической.

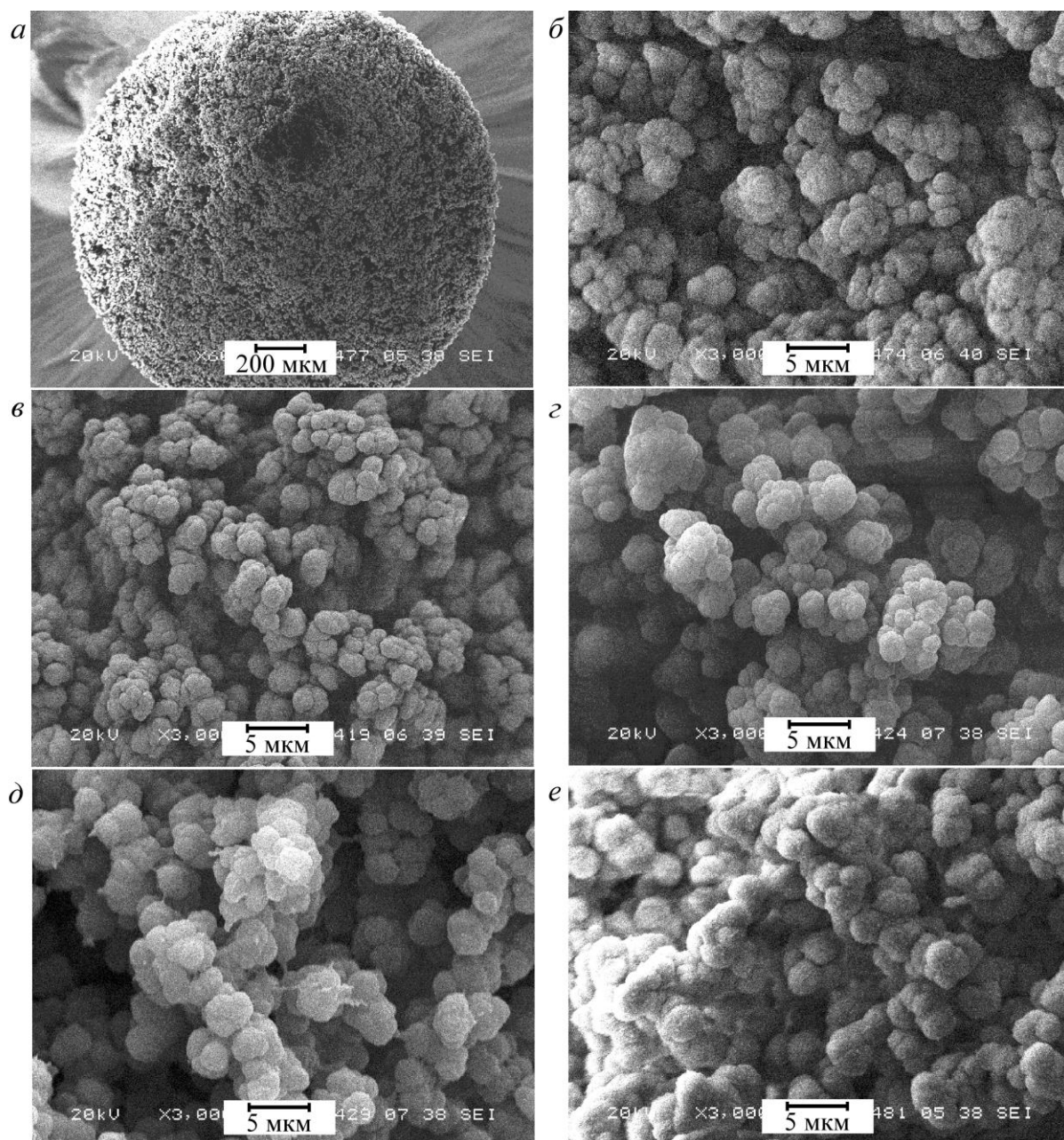


Рис. 19. Микрофотографии монолитных сорбентов: ДВБ-Ст (*a* и *б*), ВИ10 (*в*), ВИ17 (*г*), ВИ20 (*д*), ВИ40 (*е*).

3.2.1.2 Монолитные колонки с 4-винилпиридином

Для колонок с 4-винилпиридином каркас монолита представляет собой ассоциаты из глобул различного диаметра (рис. 20). Плотность твердого каркаса увеличивается с увеличением содержания 4-винилпиридина в исходной полимеризационной смеси. Наибольшая плотность каркаса, соответственно, наблюдается для монолита ВП40. Однако в отличие от монолитов на основе 1-винилимидазола для данных монолитов не наблюдается существенного изменения формы глобул и их среднего размера с увеличением содержания ВП.

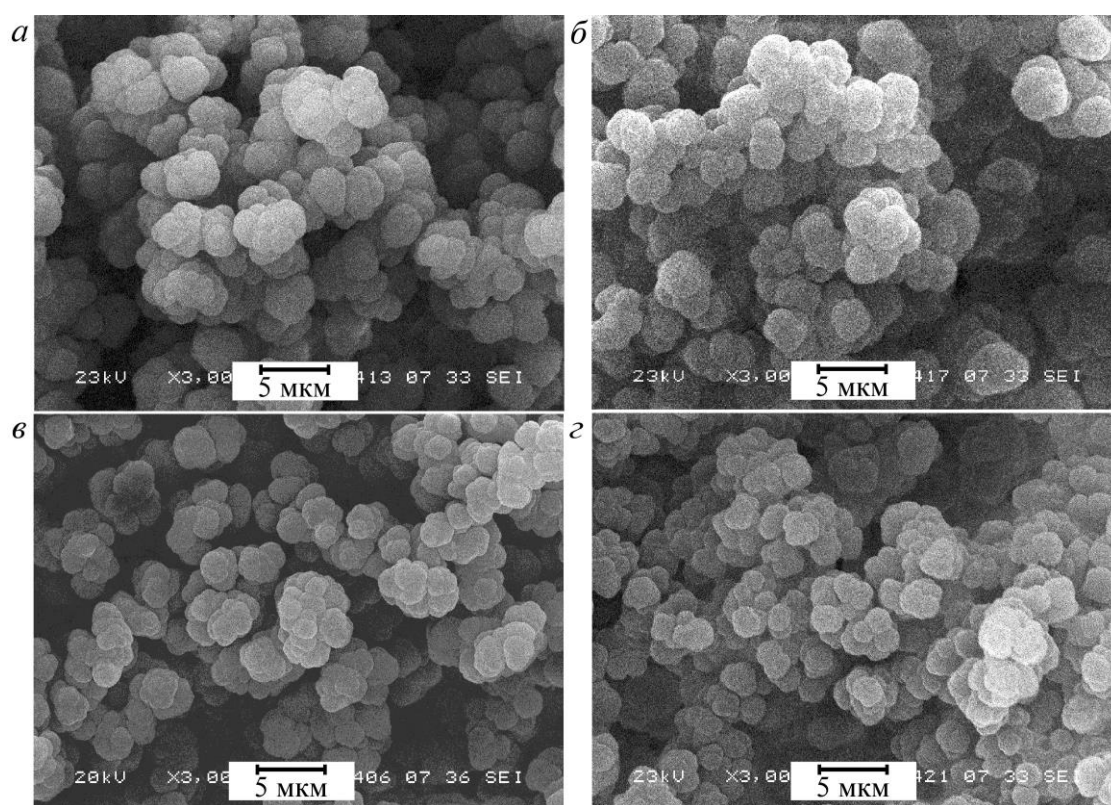


Рис. 20. Микрофотографии монолитных сорбентов. ВП10 (а), ВП20 (б), ВП30 (в), ВП40 (г).

3.2.1.3 Монолитная колонка ВТр40

На рисунке 21 представлены микрофотографии монолита с 1-винил-1,2,4-триазолом в разном масштабе. Видно, что сорбент представляет собой твердый каркас, сформированный из ассоциатов глобул, диаметром около 2–3 мкм. Каркас пронизан транспортными порами размером около 4 мкм. Для монолита ВТр40 наблюдается существенное отличие внешнего вида глобул по сравнению с остальными монолитными сорбентами, синтезированными в данной работе. Этот материал имеет глобулы неправильной формы с шероховатой поверхностью.

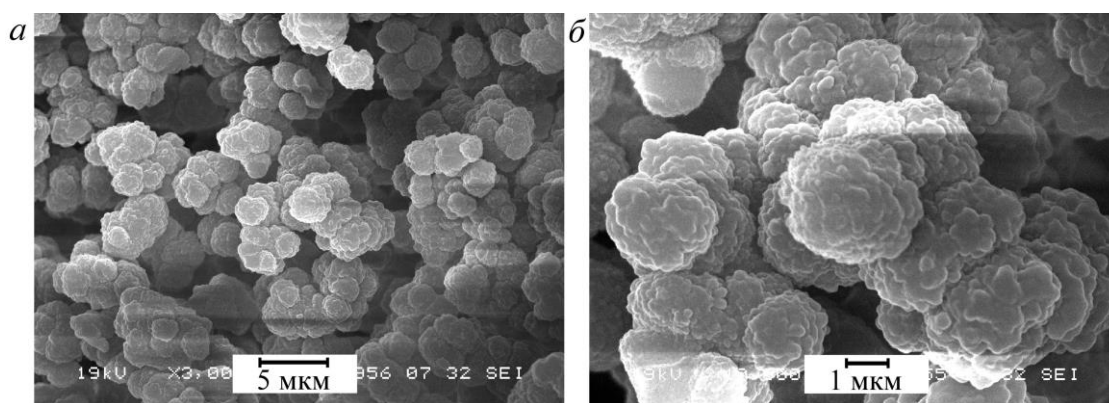


Рис. 21. Микрофотографии монолитных сорбентов. ВТр40 5 мкм (а), ВТр40 1 мкм (б).

3.2.1.4 Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном

3.2.1.4.1 Исследование влияния порообразующего растворителя на морфологию материала

В качестве порообразующего растворителя при приготовлении колонок с 1-винил-2-пирролидоном были использованы полипропиленгликоль (ППГ) с различными молекулярными массами: 250, 425 и 2025 г/моль, а также триблоксополимер полипропиленгликоль-блок-полиэтиленгликоль-блок-полипропиленгликоль с молекулярной массой 2000 г/моль (Pluronic 10R5). Содержание дивинилбензола в полимеризационных смесях для всех колонок составляло 50 об. %. На приготовленных колонках хроматографировали тестовую смесь, состоящую из бромида калия, бензола, толуола и фенола при составе ПФ 70 об. % ацетонитрила в воде и скорости потока 100 мкл/мин. Из представленных на рисунке 22 хроматограмм видно, что колонки, полученные с помощью ППГ с молекулярной массой 250 и 425 г/моль, имеют низкую эффективность, что выражается в широких пиках неправильной формы (рис. 22а и б). Вероятно, этот недостаток связан с неоднородной морфологией макротекстуры данных материалов. Так, для ППГ250 можно видеть неоднородность глобул по размерам. Наблюдается разброс от мелких глобул, диаметром около 1 мкм до крупных, диаметром 4 мкм. Для монолита с ППГ425 наблюдается плотная структура каркаса, состоящая из очень мелких глобул. Напротив, колонки с ППГ2025 и Pluronic 10R5 имеют удовлетворительную эффективность (рис. 22в и г). Материалы, полученные с использованием этих порообразователей имеют средние размеры глобул приблизительно одинакового размера. Твердый каркас и транспортные поры распределяются равномерно по сечению монолита. В связи с тем, что колонки, полученные с помощью ППГ2025 и Pluronic 10R5, имеют более высокую эффективность, то в дальнейших исследованиях для приготовления колонок использовали только эти порообразователи.

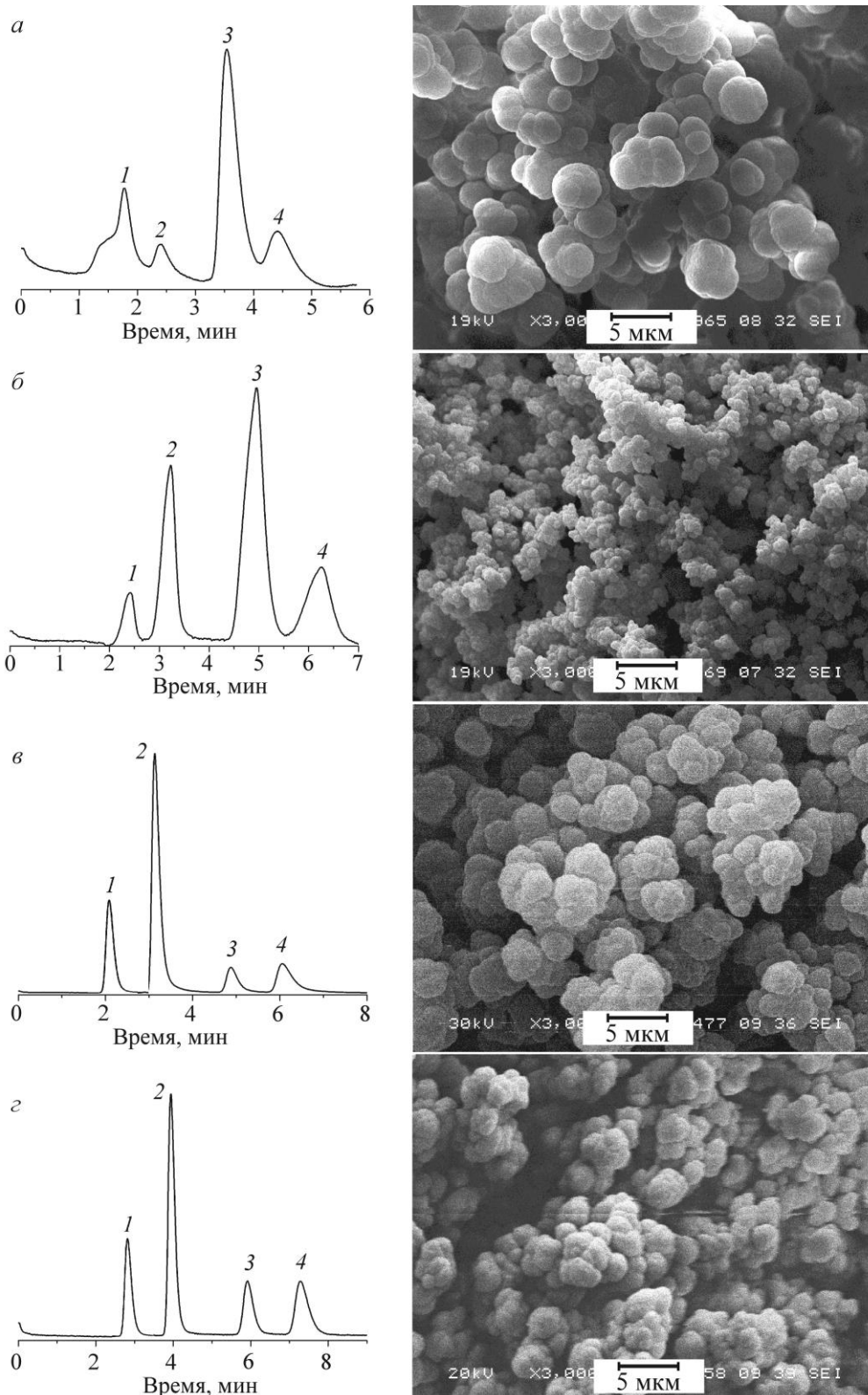


Рис. 22. Хроматограммы тестовой смеси на колонках с ВПр, приготовленных с использованием следующих порообразователей: полипропиленгликоль с молекулярной массой 250 г/моль (*а*), 425 г/моль (*б*), 2025 г/моль (*в*), Pluronic 10R5 (*г*). 1 – KBr, 2 – фенол, 3 – бензол, 4 – толуол. Справа представлены микрофотографии соответствующих сорбентов.

3.2.1.4.2 Исследование влияния сшивающего мономера на морфологию материала

При приготовлении всех монолитных колонок в качестве бифункционального мономера использовали дивинилбензол. Содержание ДВБ в исходной смеси варьировали в диапазоне от 30 до 70 об. % от суммарного объема всех мономеров, участвующих в реакции, с шагом 10 об. %.

На рисунке 23 представлены микрофотографии полученных сорбентов с разным содержанием ДВБ, из которых видно, что существенного видимого влияния на размер глобул, плотность каркаса и размер транспортных пор изменение содержания ДВБ не оказывает. Согласно литературным данным, количество ДВБ влияет на микро- и мезопористую систему сорбента. Поэтому необходимо было исследовать текстуру монолитных сорбентов с различным содержанием ДВБ методом низкотемпературной адсорбции азота. Данный метод позволяет оценить удельную площадь поверхности и вклад микро- и мезопор в пористую систему монолитов.

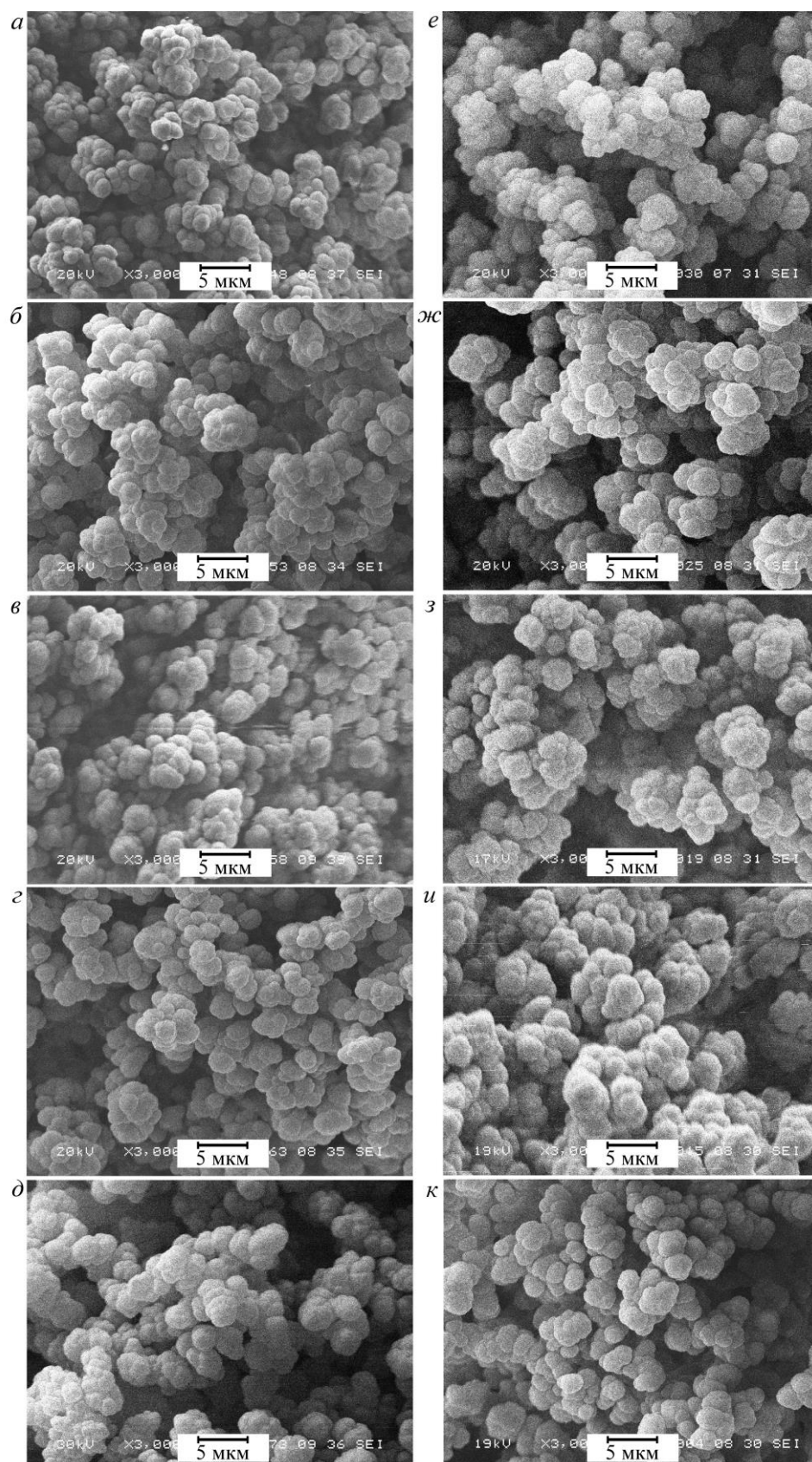


Рис. 23. Микрофотографии монолитных сорбентов с 1-винил-2-пирролидоном: ДВБ30_П (а), ДВБ40_П (б), ДВБ50_П (в), ДВБ60_П (г), ДВБ70_П (д), ДВБ30_ППГ2025 (е), ДВБ40_ППГ2025 (ж), ДВБ50_ППГ2025 (з), ДВБ60_ППГ2025 (и), ДВБ70_ППГ2025 (к).

3.2.2 Исследование поверхности монолитных сорбентов методом низкотемпературной адсорбции азота

Метод сорбции/десорбции азота позволяет определять важнейшие характеристики твердых материалов, такие как удельная площадь поверхности, объем пор, соотношение объемов микро- и мезопор, распределение пор по размерам. Этот метод удачно дополняет другие физические методы исследования, такие как дифракционные методы анализа, микроскопию и др., давая более полную информацию об образце. Поскольку наиболее распространёнными моделями расчета площади поверхности является модель BET [359], а определения общего объема пор и распределение пор по размерам – модель ВЈН [360], они были использованы для оценки текстурных характеристик приготовленных сорбентов.

3.2.2.1 Монолитные колонки с 1-винилимидазолом

На рисунке 24 представлены изотермы низкотемпературной адсорбции/десорбции азота для полученных колонок. Все полученные изотермы относятся к изотермам 2-го типа, характерным для непористых и макропористых сорбентов [361]. В связи с тем, что колонка ВИ40 проявила низкую эффективность разделения, что, вероятно, связано с неоднородностью макроструктуры материала по данным СЭМ, то исследование данного сорбента методом низкотемпературной адсорбции азота не проводилось.

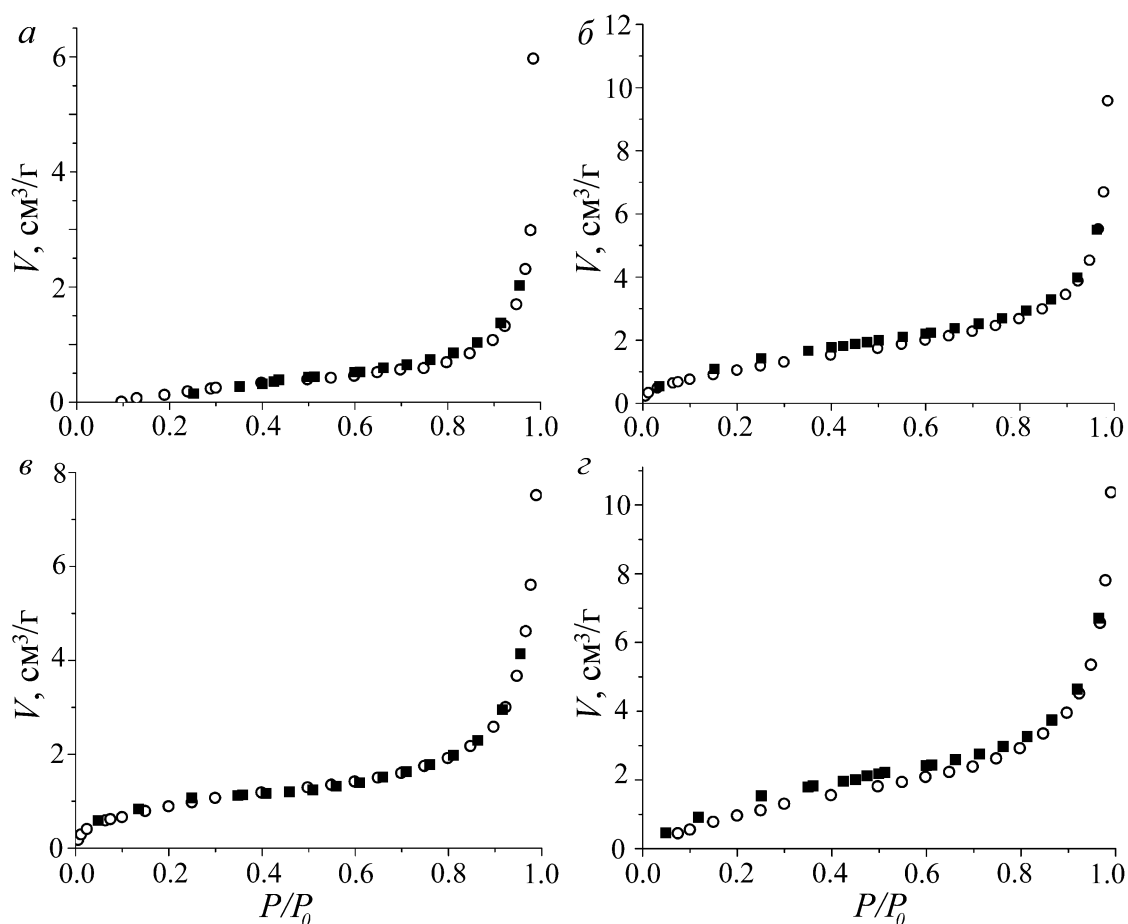


Рис. 24. Изотермы адсорбции азота на приготовленных органических монолитах: ДВБ-Ст (а), ВИ10 (б), ВИ17 (в), ВИ25 (г).

Из таблицы 5 видно, что удельная площадь поверхности приготовленных сорбентов в сухом виде составляет несколько квадратных метров на грамм сухого материала. При этом в монолитных сорбентах отсутствует микропористость в отличие от коммерческого гранулированного полимерного сорбента Диасфер-250-СТ, который обладает достаточно большой площадью поверхности ($667 \text{ м}^2/\text{г}$). Корреляция между содержанием ВИ в исходной полимеризационной смеси и рассчитанными величинами объема и размера пор не наблюдается. К полученным данным нужно относиться с определенной осторожностью, поскольку определение площади поверхности проводили для сорбентов в сухом состоянии. Поэтому нельзя утверждать, что эти данные будут в полной мере отражать текстурные свойства монолитного материала, когда он находится в колонке, заполненной подвижной фазой. Как уже говорилось выше (см. разд. 1.2.2), полимерные сорбенты способны набухать в «хороших» растворителях. Колонка в рабочем состоянии всегда заполнена подвижной фазой. Таким образом сорбент внутри колонки всегда находится в какой-то мере в набухом состоянии. Если же удалить растворитель из поровой системы, то возможно объемное сжатие монолитного материала, приводящее к изменению текстуры.

Таблица 5

Текстульные характеристики сорбентов, используемых в работе

Колонка	$S_{уд}, \text{м}^2/\text{г}^*$	$V_{\Sigma\text{пор}}, \text{см}^3/\text{г}^{**}$	$D_{\text{пор}}, \text{Å}^{**}$	$S_{\text{микропор}}, \text{м}^2/\text{г}$
Диасфер-250-СТ	667	0.40	113	108
ДВБ-Ст	<1	0.01	335	-
ВИ10	4	0.01	186	-
ВИ17	3	0.01	210	-
ВИ25	6	0.02	175	-

*Определение удельной поверхности методом Брунауэра–Эммета–Теллера (ВЕТ).

**Определение диаметра пор методом Баррета–Джойнера–Халенды (ВЖН).

3.2.2.2 Монолитные колонки с 4-винилпиридином

Для монолитных сорбентов с ВП наблюдается такая же картина, как и для сорбентов с ВИ. То есть все полученные изотермы относятся к изотермам 2-го типа, характерным для непористых и макропористых сорбентов (рис. 25).

Рассчитанные значения удельных площадей поверхности для исследуемых монолитов в сухом состоянии не превышают $4 \text{ м}^2/\text{г}$ (табл. 6). При этом объем и диаметр пор не коррелирует с содержанием ВП в исходной полимеризационной смеси. Данные материалы не обладают микропористостью.

Таблица 6

Текстульные характеристики сорбентов

Колонка	$S_{уд}, \text{м}^2/\text{г}^*$	$V_{\Sigma\text{пор}}, \text{см}^3/\text{г}^{**}$	$D_{\text{пор}}, \text{Å}^{**}$
Диасфер-250-СТ	667	0.40	113
ВП10	2	0.01	207
ВП20	2	0.01	270
ВП30	3	0.01	171
ВП40	4	0.01	247

*Определение удельной поверхности методом Брунауэра–Эммета–Теллера (ВЕТ).

**Определение диаметра пор методом Баррета–Джойнера–Халенды (ВЖН).

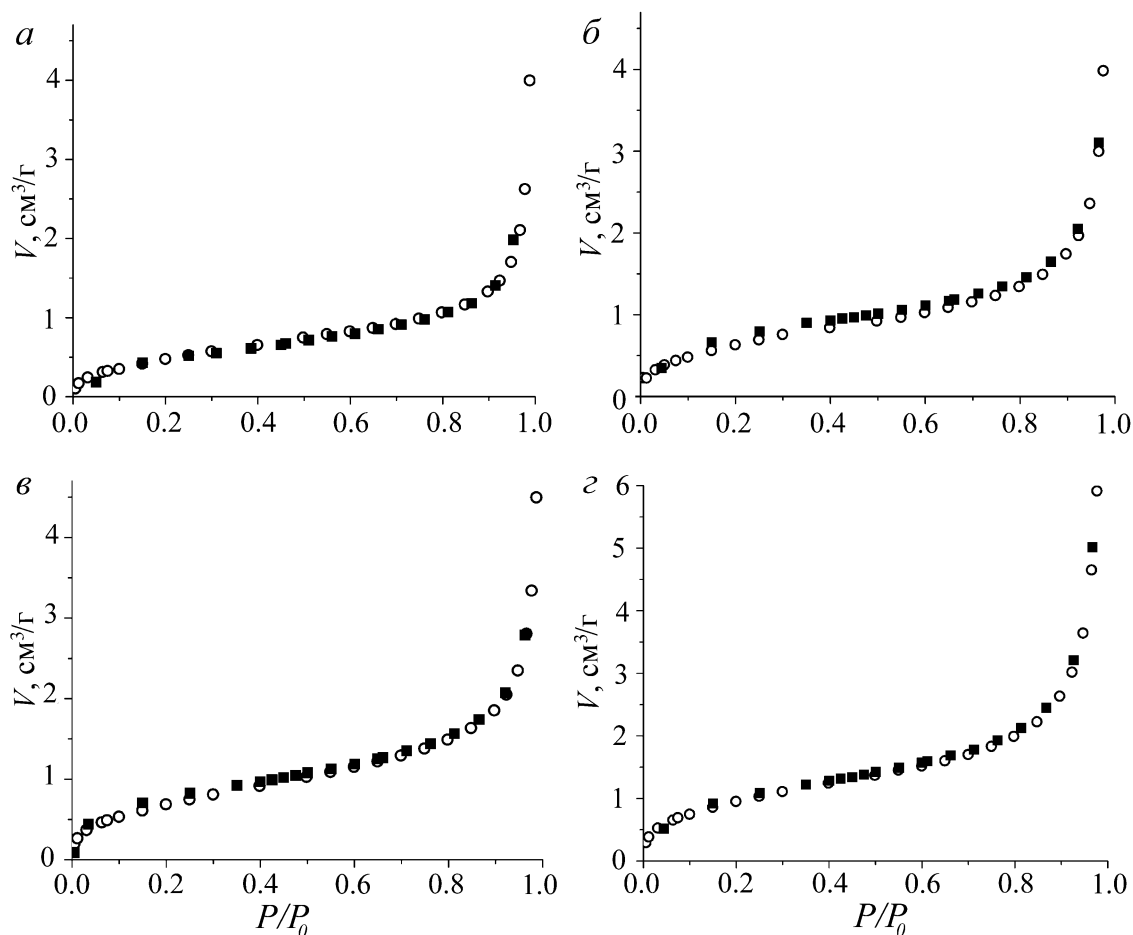


Рис. 25. Изотермы адсорбции азота на приготовленных органических монолитах. ВП10 (а), ВП20 (б), ВП30 (в), ВП40 (з).

3.2.2.3 Монолитная колонка ВТр40

Для монолитной колонки, на основе мономера 1-винил-1,2,4-триазола, изотерма адсорбции имеет характер, отличный от изотерм, полученных для колонок, описанных выше. Из рисунка 26 видно, что изотерма имеет гистерезис, что свидетельствует о наличии пор, имеющих одно узкое устье и широкий внутренний объем (бутылочная пора). Суммарный объем пор составляет $0.14 \text{ см}^3/\text{г}$, средний диаметр пор равен 30 \AA . Оба параметра были рассчитаны по методу ВН. Величина удельной площади поверхности, рассчитанной методом ВЕТ, составляет $200 \text{ м}^2/\text{г}$, что на два порядка больше, чем для колонок с 1-винилимидазолом и 4-винилпиридином. Вероятно, такая разница связана с заметно отличающейся морфологией глобул сорбента ВТр40 (рис. 21б) по сравнению с поверхностью остальных сорбентов (рис. 19, 20, 23). Так, по данным сканирующей электронной микроскопии поверхность глобул сорбента колонки ВТр40 выглядит не гладкой, как у всех остальных сорбентов, а шероховатой, с четко выраженным рельефом. Наличие развитого рельефа на поверхности глобул, возможно связано с высоким значением удельной площади поверхности.

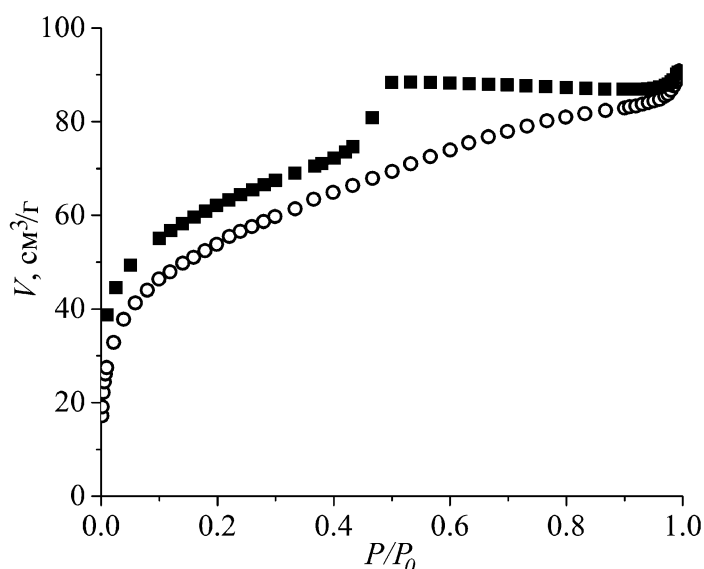


Рис. 26. Изотерма адсорбции азота на приготовленной колонке ВТр40.

3.2.2.4 Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном

3.2.2.4.1 Исследование влияния порообразующего растворителя и сшивающего мономера на текстурные характеристики материала

Как уже было описано выше (раздел 1.3.1.2) количество сшивающего агента в полимеризационной смеси влияет на такие текстурные характеристики монолитного сорбента, как площадь поверхности, объем и размер пор. На примере монолитных колонок с ВПр было исследовано влияние количества ДВБ в исходной полимеризационной смеси на перечисленные характеристики. Параллельно исследовали влияние порообразующих растворителей ППГ2025 и Pluronic 10R5 на свойства монолитных колонок.

На рисунке 27 представлены изотермы адсорбции, которые относятся к изотермам 2-го типа. Однако стоит отметить, что для монолитов, содержащих более 50 об. % ДВБ, наблюдается резкое увеличение объема адсорбируемого азота. На рисунке 28 представлены гистограммы, отражающие зависимость удельной площади поверхности от содержания ДВБ в полимеризационной смеси. Видно, что для монолитных материалов с долей ДВБ 30 и 40 об. % наблюдаются крайне малые величины площади поверхности. Для монолитов с содержанием ДВБ в исходной смеси 50, 60 и 70 об. % и порообразователя Pluronic 10R5 величина удельной площади поверхности составляет около 400, 460 и 520 м²/г соответственно, а при использовании в качестве порообразователя полипропиленгликоль с $M = 2025$ г/моль для 50 об. % ДВБ – 110 м²/г, 60 об. % – 370 м²/г, для 70 об. % – 500 м²/г. Стоит отметить, что характер зависимости, представленной на рис. 28, для монолитов, полученных с использованием в качестве порообразователя ППГ2025, имеет более резкий угол подъема, чем

для монолитов, полученных с помощью Pluronic 10R5. То есть текстурные характеристики монолитов с ППГ2025 в большей степени зависят от содержания ДВБ с полимеризационной смеси, чем для монолитов с Pluronic 10R5.

В таблице 7 представлены значения среднего диаметра пор, суммарный объем пор и объем микропор полученных монолитов. Так, для монолитов ДВБ30_П и ДВБ40_П установлено наличие достаточно крупных мезопор (30–40 нм), а для монолитов ДВБ30_ППГ2025 и ДВБ40_ППГ2025 – макропор (117-127 нм). При высоком содержании ДВБ (50, 60, 70 об. %) наблюдается изменение пористого пространства в сторону наличия небольших мезопор с диаметром 6–8 нм. Кроме того, было установлено наличие микропористости для монолитов с содержанием ДВБ 60 и 70 об. % для обеих групп монолитов (ППГ2025 и Pluronic 10R5) и для монолита с содержанием ДВБ 50 об. % для порообразователя Pluronic 10R5. Причем доля микропор от общей площади поверхности для монолитов с ППГ2025 составляет около 60 %, а для монолитов, полученных с помощью Pluronic 10R5 – около 6 % для ДВБ 60 и 70 об. % и около 16 % для ДВБ 50 об. %. Поскольку для жидкостной хроматографии микропористость является нежелательной характеристикой сорбента, то Pluronic 10R5 является наиболее подходящим порообразователем для приготовления монолитных колонок.

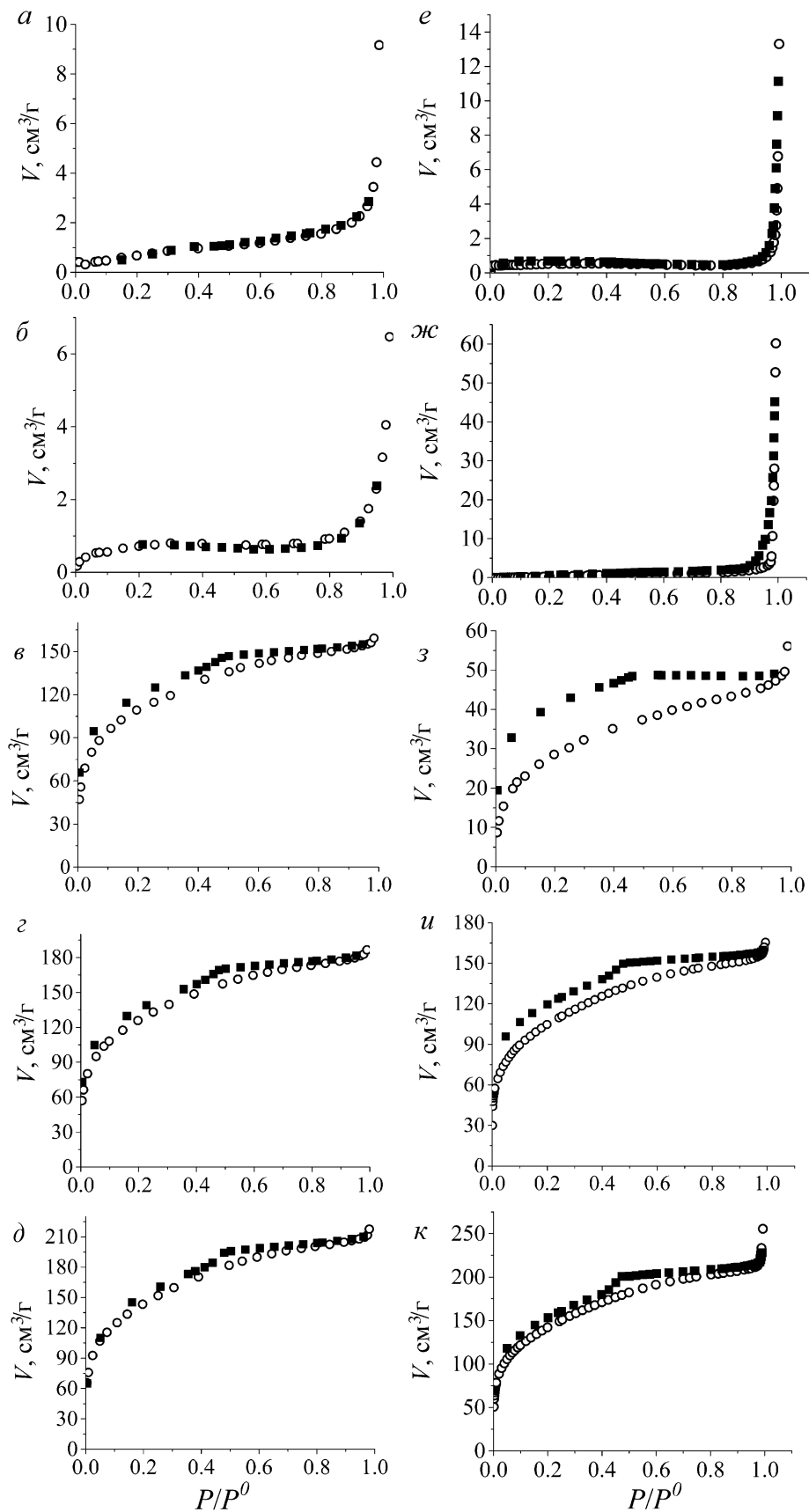


Рис. 27. Изотермы адсорбции: ДВБ30_П (а), ДВБ40_П (б), ДВБ50_П (в), ДВБ60_П (г), ДВБ70_П (д), ДВБ30_ППГ2025 (е), ДВБ40_ППГ2025 (ж), ДВБ50_ППГ2025 (з), ДВБ60_ППГ2025 (и), ДВБ70_ППГ2025 (к).

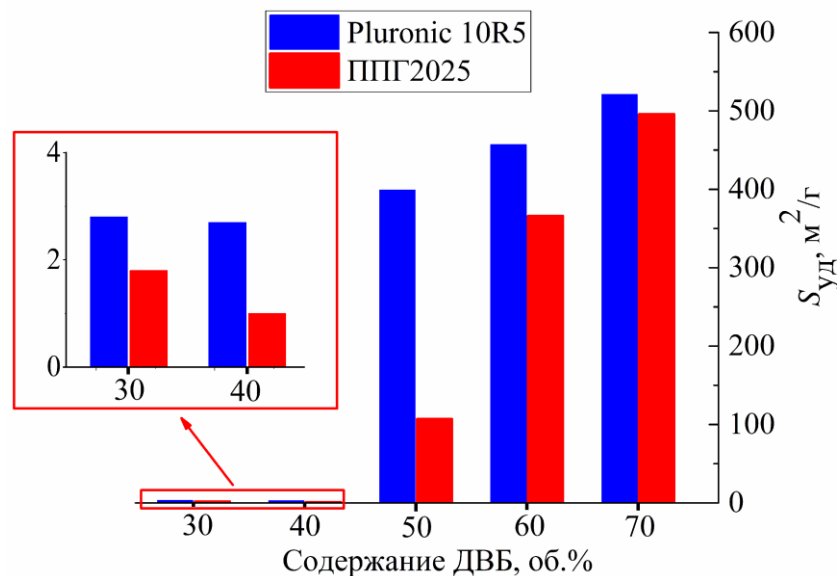


Рис. 28. Зависимость площади поверхности приготовленных монолитов от содержания ДВБ в исходной полимеризационной смеси.

Таблица 7

Текстурные характеристики сорбентов, используемых в работе

Колонка	$D_{\text{пор}}, \text{Å}^*$	$V_{\Sigma\text{пор}}, \text{см}^3/\text{г}^*$	$V_{\text{микропор}}, \text{см}^3/\text{г}^*$
Диасфер-250-СТ	110	0.40	0.05
ДВБ30_П	320	0.01	-
ДВБ40_П	400	0.01	-
ВПр30_ДВБ50_П	60	0.25	0.04
ДВБ60_П	60	0.29	0.02
ДВБ70_П	60	0.34	0.02
ДВБ30_ППГ2025	1270	0.02	-
ДВБ40_ППГ2025	1170	0.09	-
ВПр30_ДВБ50_ППГ2025	80	0.09	-
ДВБ60_ППГ2025	60	0.25	0.16
ДВБ70_ППГ2025	70	0.35	0.21

*Определение методом Баррета–Джойнера–Халенды (ВН).

3.2.3 Определение химического состава готового монолита методом СНН-анализа

Элементный анализ сорбента проводили для монолитных колонок ВИ25, ВП40, ВПр30_ДВБ50_П и ВТр40. В таблице 8 представлены полученные процентные массовые содержания основных элементов (углерод, водород и азот). Результат получали усреднением значений двух параллельных экспериментов. С учетом количества атомов азота в молекулах функциональных мономеров рассчитывали массовое процентное содержание

соответствующего мономера в готовой монолитной колонке. Из таблицы 8 видно, что доля функциональных мономеров 1-винилимидазол и 1-винил-2-пирролидон в готовой колонке относительно мала. Однако даже такое малое содержание вносит существенный вклад в изменение селективности монолитных колонок по сравнению с колонкой ДВБ-Ст, в которой нет функциональных азотсодержащих гетероциклических мономеров (см. рис.18). Для монолита с содержанием 4-винилпиридина 40 об. % уставлена полная конверсия реакции полимеризации, а для монолита с содержанием 1-винил-1,2,4-триазол конверсия мономера составляет около 50 %.

Таблица 8

Содержание основных элементов в готовых монолитных колонках

Колонка	Углерод, мас. %	Водород, мас. %	Азот, мас. %	Содержание мономера в монолите**, %
ВИ25	87.55 ± 0.27	8.52 ± 0.04	1.57 ± 0.17	5
ВП40	82.28 ± 0.21	7.86 ± 0.06	5.37 ± 0.00	40
ВПр30_ДВБ50_П	90.43 ± 0.03	8.65 ± 0.06	0.70 ± 0.19	5
ВТр40	80.71 ± 0.26	7.99 ± 0.04	8.78 ± 0.00	20

Примечание. В качестве погрешности определения представлено стандартное отклонение, рассчитанное по данным двух экспериментов.

**Массовое процентное содержание функционального азотсодержащего мономера в монолитном материале в пересчете на сухой сорбент.

3.3 Исследование хроматографических свойств приготовленных колонок

3.3.1 Гидродинамические свойства

К гидродинамическим характеристикам монолитных колонок можно отнести два основных параметра: гидродинамическое сопротивление (коэффициент проницаемости) и механическую стабильность.

Сопротивление монолитной колонки потоку подвижной фазы определяется транспортными порами (полостями в каркасе монолита), размер, форма и количество которых зависит от состава материала и условий полимеризации. Механическая стабильность новых неподвижных фаз является одним из требований для их практического использования в хроматографии. Недостаточная механическая стабильность может влиять на воспроизводимость времен удерживания. Оценка механической стабильности полимерных неподвижных фаз обычно проводится путем определения перепада давления на колонке при

использовании растворителей различной полярности в широком диапазоне скоростей потока. Неподвижная фаза может считаться механически стабильной, если получена линейная зависимость между объемной скоростью потока и перепадом давления.

Для определения данных параметров были построены зависимости перепада давления от скорости потока ПФ и рассчитаны коэффициенты проницаемости для всех приготовленных монолитных и коммерческих насадочных колонок.

3.3.1.1 Монолитные колонки с 1-винилимидазолом

На рисунке 29 представлены зависимости перепада давления на монолитных и коммерческих насадочных колонках от скорости потока подвижной фазы. Длина всех колонок составляла 75 мм. Видно, что для насадочных колонок (ProntoSIL 120-5-C18 и Диасфер-250-СТ) угол наклона графика линейной зависимости существенно больше, чем для приготовленных монолитных колонок. Кроме того, стоит отметить, что угол наклона данных зависимостей для монолитных колонок увеличивается с увеличением содержания 1-винилимидазола в сорбенте от 10 до 40 об. % в исходной полимеризационной смеси. Это может быть вызвано повышением плотности каркаса и уменьшением доли объема транспортных пор с увеличением количества 1-винилимидазола в монолите, что согласуется с данными сканирующей электронной микроскопии (рис. 19).

Все полученные зависимости перепада давления от скорости подвижной фазы имеют линейный характер, что свидетельствует о механической стабильности монолитных колонок в диапазоне от 10 до 650 мкл/мин.

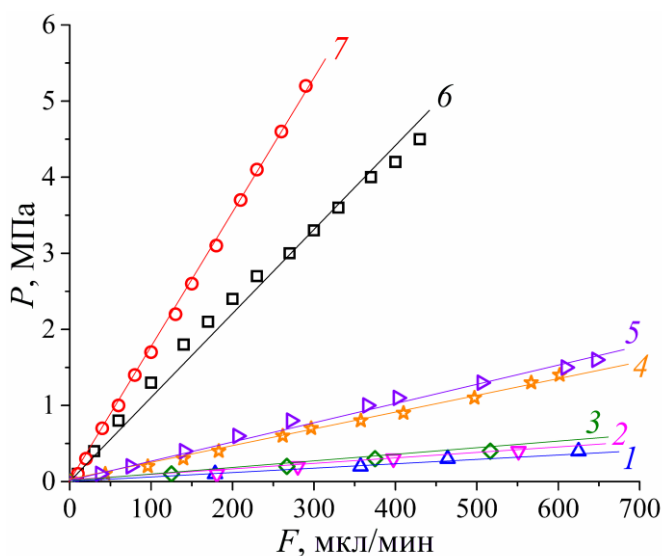


Рис. 29. Зависимость перепада давления на исследуемых колонках от объемной скорости потока подвижной фазы. 1 – ДВБ-Ст, 2 – ВИ10, 3 – ВИ17, 4 – ВИ25, 5 – ВИ40, 6 – ProntoSIL 120-5-C18, 7 – Диасфер 250-СТ.

Рассчитанные по уравнению (4) коэффициенты проницаемости (табл. 9) для монолитных колонок примерно на порядок выше, чем для насадочных.

Таблица 9

Значения коэффициентов проницаемости

Колонка	$B_0 \cdot 10^{13}, \text{ м}^2$
Диасфер-250-СТ	0.12
ProntoSIL 120-5-C18	0.18
ДВБ-Ст	3.28
ВИ10	3.02
ВИ17	2.52
ВИ25	0.95
ВИ40	0.71

3.3.1.2 Монолитные колонки с 4-винилпиридином

На рисунке 30 представлены зависимости перепада давления на исследованных колонках от скорости потока подвижной фазы. Длина всех колонок составляла 75 мм.

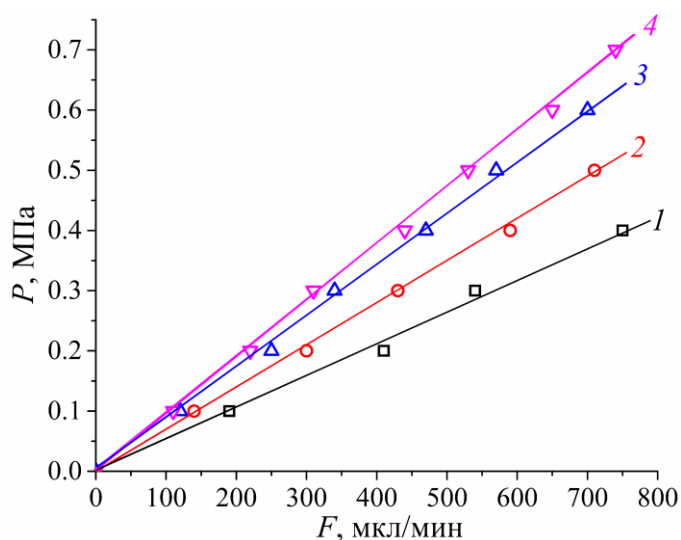


Рис. 30. Зависимость перепада давления на исследуемых колонках от объемной скорости потока подвижной фазы. 1 – ВП10, 2 – ВП20, 3 – ВП30, 4 – ВП40. Элюент – ацетонитрил.

Из представленных графиков видно, что зависимости для монолитных колонок с ВП также, как и для колонок с ВИ, имеют значительно меньший угол наклона, чем для насадочных колонок. При этом наблюдается увеличение угла наклона с увеличением доли 4-винилпиридина

в исходной полимеризационной смеси. Однако это изменение не такое существенное, как для колонок с 1-винилимидазолом.

Аналогично монолитным колонкам на основе 1-винилимидазола, данные колонки также являются механически стабильными, поскольку зависимости перепада давления от скорости потока подвижной фазы в исследуемом диапазоне имеют линейный характер.

Рассчитанные из полученных зависимостей коэффициенты проницаемости (табл. 10) для монолитных колонок примерно на порядок выше, чем для насадочных, значения для которых представлены в табл. 9.

Таблица 10

Значения коэффициентов проницаемости для исследованных колонок

Колонка	$B_0 \cdot 10^{13}, \text{ м}^2$
ВП10	3.94
ВП20	3.19
ВП30	2.43
ВП40	2.25

3.3.1.3 Монолитная колонка ВТр40

Для колонки ВТр40 длиной 75 мм была построена зависимость перепада давления от скорости потока элюента, которая представлена на рис. 31. Видно, что зависимость линейная, что свидетельствует о механической стабильности полученной колонки. Для данной колонки был рассчитан коэффициент проницаемости, величина которого составила $3.00 \cdot 10^{13} \text{ м}^2$. То есть, проницаемость данной колонки примерно соответствует проницаемости колонок с ВИ и ВП.

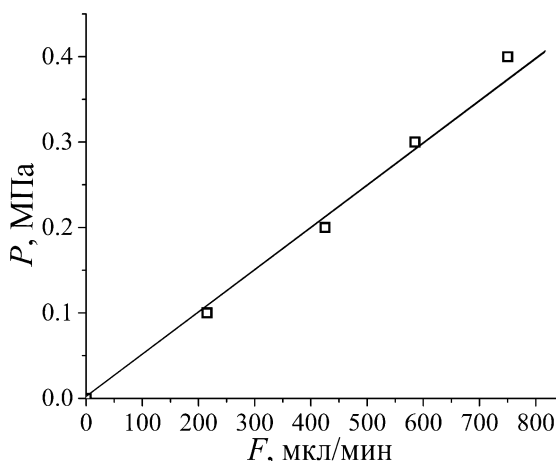


Рис. 31. Зависимость перепада давления на колонке ВТр40 от объемной скорости потока подвижной фазы. Элюент – ацетонитрил.

3.3.1.4 Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном

Для монолитных колонок с различным содержанием ДВБ были рассчитаны коэффициенты проницаемости. Зависимости коэффициента проницаемости от содержания ДВБ в исходной полимеризационной смеси для двух различных порообразователей (ППГ2025 и Pluronic 10R5) представлены на рис. 32. Видно, что проницаемость сорбента снижается с увеличением содержания ДВБ. Характер изменения проницаемости для колонок, полученных с использованием ППГ2025, более резкий, чем для колонок, полученных с использованием Pluronic 10R5. Это свидетельствует о том, что гидродинамические свойства монолитов с ППГ2025 в большей степени зависят от содержания ДВБ с полимеризационной смеси, чем для монолитов с Pluronic 10R5.

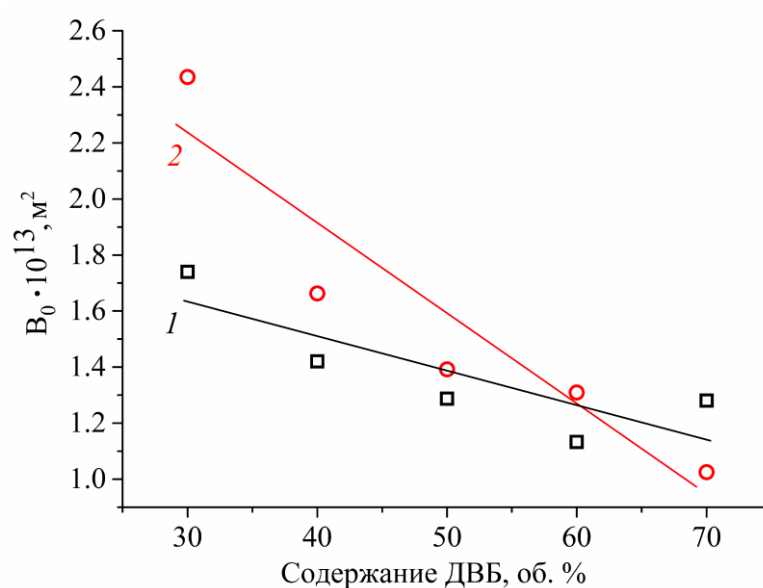


Рис. 32. Зависимость коэффициента проницаемости от содержания ДВБ в полимеризационной смеси. Порообразователь: 1 – Pluronic 10R5, 2 – ППГ2025.

Согласно проведенным экспериментам установлена общая закономерность в том, что все приготовленные монолитные колонки обладают достаточно высокой проницаемостью. Это подтверждается рассчитанными коэффициентами проницаемости, которые примерно на порядок выше, чем для насадочных колонок с размером гранул 5 мкм. Это позволяет ускорить процесс разделения на монолитных колонках путем увеличения потока подвижной фазы и увеличивать длину колонки при сохранении умеренной величины перепада давления.

3.3.2 Зависимость эффективности колонки от скорости потока подвижной фазы

Характеристикой, которая позволяет оценить вклады различных диффузионных факторов в процесс элюирования, является зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке

(ВЭТТ), от линейной скорости потока ПФ. Эта зависимость позволяет определить, в каком диапазоне скоростей потока ПФ эффективность колонки максимальна.

Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы для всех колонок исследовали по бензолу. Концентрация бензола в растворе составляла 5 мг/мл. Растворитель – ацетонитрил. Объемное соотношение ацетонитрил/вода в подвижной фазе составляло 70/30. Пробу объемом 1 мкл вводили в колонку с помощью автоматического дозатора. Запись хроматограмм проводилась при объёмных скоростях потока в диапазоне от 20 до 250 мкл/мин.

3.3.2.1 Монолитные колонки с 1-винилимидазолом

На рисунке 33 представлены зависимости ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы для приготовленных колонок. Максимальная эффективность колонки ВИ40 (ВЭТТ = 115 мкм) оказалась намного ниже, чем остальных исследованных колонок. В связи с этим данную колонку нецелесообразно использовать для аналитических разделений.

Из представленных на рисунке 33 зависимостей видно, что колонки ДВБ-Ст, ВИ25 имеют наименьшее значение ВЭТТ (около 40 мкм) среди приготовленных колонок. Аналогичное значение ВЭТТ было найдено для коммерческой насадочной колонки с сорбентом Диасфер-250-СТ. Оптимальная скорость потока для всех приготовленных колонок составляет от 0.2 до 0.3 мм/с.

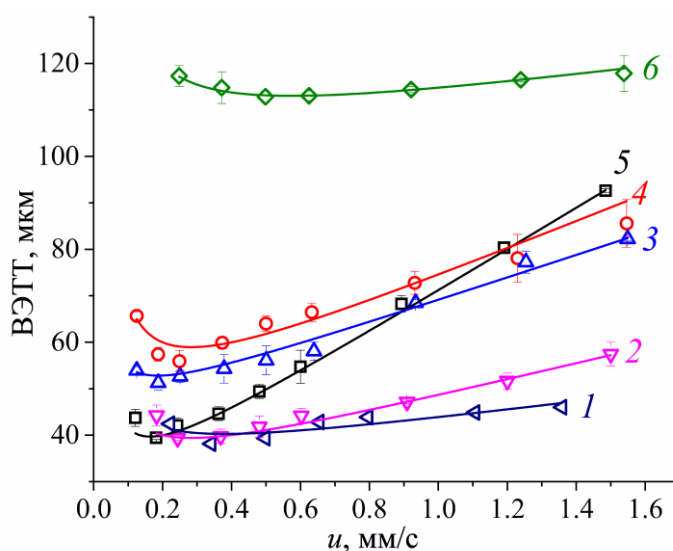


Рис. 33. Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока элюента. 1 – Диасфер 250-СТ, 2 – ВИ25, 3 – ВИ17, 4 – ВИ10, 5 – ДВБ-Ст, 6 – ВИ40.

Для колонки ДВБ-Ст наблюдается большой угол наклона правой ветви графика по сравнению с колонками на основе 1-винилимидазола. Это свидетельствует о повышенном сопротивлении массопереносу в неподвижной фазе. Таким образом, на колонке ДВБ-Ст

целесообразно работать при скорости потока, близкой к оптимальной, поскольку ВЭТТ для данного типа колонок быстро растет при увеличении скорости потока подвижной фазы.

3.3.2.2 Монолитные колонки с 4-винилпиридином

На рисунке 34 представлены зависимости ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы для приготовленных колонок. Наименьшую эффективность имеет колонка ВП40 (ВЭТТ = 62 мкм). Максимальную эффективность имеет колонка ВП20 (ВЭТТ = 40 мкм). Стоит отметить, что угол наклона правой ветви зависимости для колонок ВП10, ВП20, ВП30 больше, чем для колонок с 1-винилимидазолом. Следовательно, для колонок с 4-винилпиридином характерно повышенное сопротивление массопереносу в неподвижной фазе по сравнению с колонками на основе 1-винилимидазола.

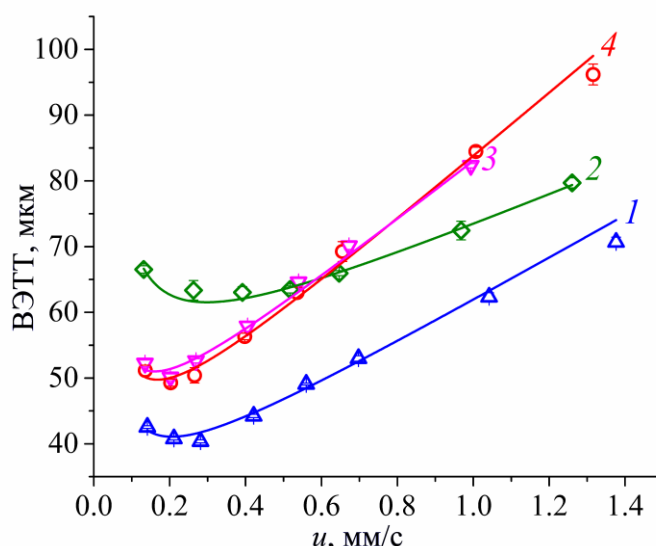


Рис. 34. Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока элюента. 1 – ВП20, 2 – ВП40, 3 – ВП30, 4 – ВП10; Элюент: смесь ацетонитрил/вода = 70/30 об. %.

3.3.2.3 Монолитная колонка ВТр40

Для колонки ВТр40 оптимальная скорость потока составляет 0.2–0.3 мм/с. Величина ВЭТТ в области оптимальных скоростей потока ПФ составляет 45 мкм (рис. 35).

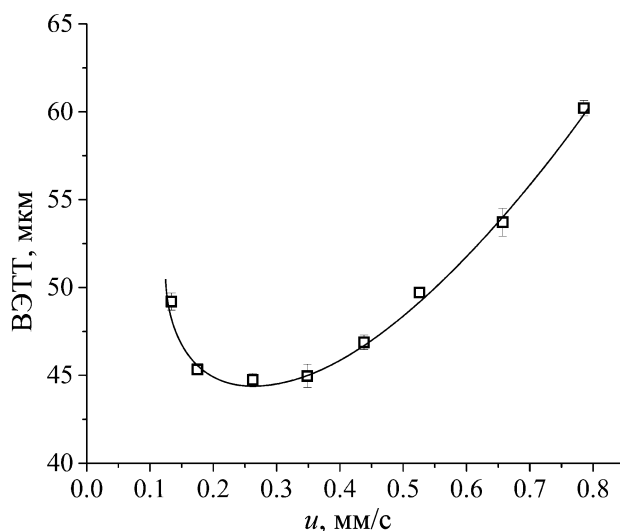


Рис. 35. Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока элюента для колонки VTr40.

3.3.2.4 Монолитные колонки с 1-винил-2-пирролидоном

Для оценки характера зависимости ВЭТТ от скорости потока ПФ для колонок, приготовленных с использованием различных порообразующих растворителей, были выбраны колонки ВПр30_ДВБ50_П и ВПр30_ДВБ50_ППГ2025. На рисунке 36 представлены графики, из которых видно, что обе колонки имеют примерно одинаковую максимальную эффективность (ВЭТТ = 40 – 42 мкм) при линейной скорости потока 0.3 – 0.5 мм/с. Однако для колонки ВПр30_ДВБ50_ППГ2025 наблюдается бóльший угол наклона правой ветви кривой, что говорит о затрудненном массопереносе в неподвижной фазе для данной колонки по сравнению с колонкой ВПр30_ДВБ50_П. Поэтому для дальнейших исследований была выбрана колонка ВПр30_ДВБ50_П.

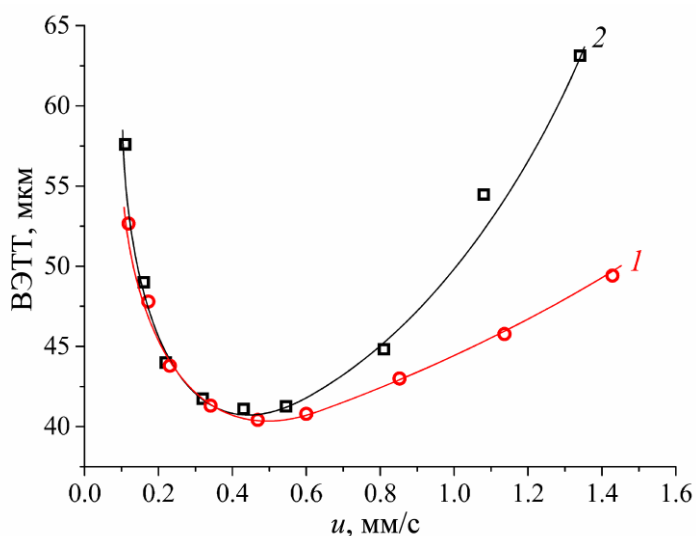


Рис. 36. Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока элюента для колонок: 1 – ВПр30_ДВБ50_П, 2 – ВПр30_ДВБ50_ППГ2025.

На рисунке 37 представлены зависимости ВЭТТ от скорости потока ПФ для колонок с различным содержанием ДВБ (в качестве порообразователя использовали Pluronic 10R5), из которых видно, что минимальной эффективностью обладает колонка ДВБ30 (ВЭТТ = 62 мкм), а максимальную эффективность среди пяти исследуемых колонок имеет колонка ДВБ70 (ВЭТТ = 38 мкм). Оптимальная скорость потока для колонок ДВБ30 и ДВБ40 (0.5–0.7 мм/с) несколько выше, чем для колонок ДВБ50, ДВБ60 (0.4 мм/с). Таким образом, при увеличении содержания ДВБ в монолите оптимальная скорость потока подвижной фазы уменьшается, а эффективность колонки несколько повышается. При этом эффективность колонки ДВБ30 значительно ниже остальных. Данный сорбент в набухшем состоянии имеет желеобразную консистенцию. Ввиду относительно редких поперечных швов линейных макромолекул, они достаточно подвижны друг относительно друга. Вероятно, это приводит к появлению неоднородностей макроструктуры у сорбента в набухшем состоянии. Хотя по данным сканирующей электронной микроскопии (рис. 23а), данный сорбент в сухом состоянии имеет такую же морфологию, как и остальные монолиты.

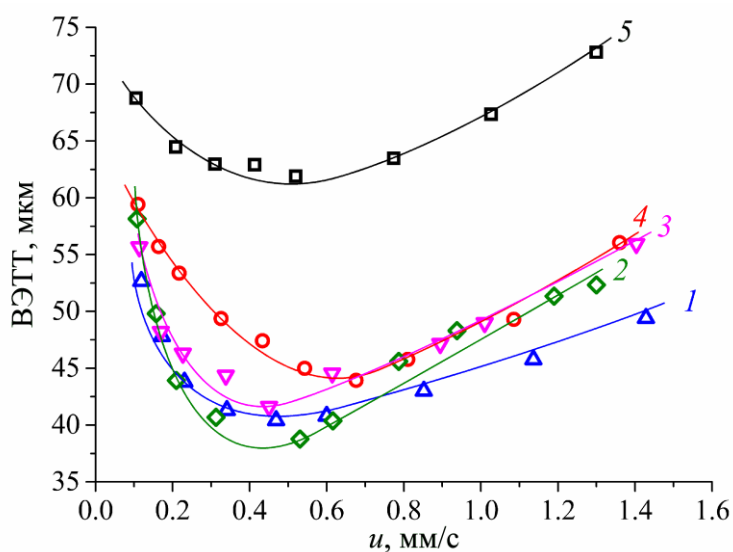


Рис. 37. Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока элюента для колонок :
 1 – ДВБ50 , 2 – ДВБ70, 3 – ДВБ60, 4 – ДВБ40, 5 – ДВБ30.

3.3.3 Определение загрузочной емкости

Как уже говорилось ранее (разд. 1.2.2), состояние пористой системы полимерного сорбента зависит от растворителя, в который он помещен. Так, в «хорошем» растворителе, который смачивает его поверхность, полимер способен набухать, а в «плохом» растворителе сжиматься. При этом может изменяться степень доступности адсорбционных пор внутри сорбента для молекул сорбата. Поскольку загрузочная емкость хроматографической колонки зависит от удельной площади поверхности и объема пор сорбента, то уменьшение доступности

пор в «плохом» растворителе должно приводить к уменьшению загрузочной емкости колонки. Рассмотрим, как меняется величина загрузки в условиях, когда ПФ хорошо смачивает неподвижную фазу (большая доля ацетонитрила по отношению к воде), и сравним полученный результат с тем случаем, когда ПФ слабо смачивает сорбент (большая доля воды в ПФ по отношению к ацетонитрилу). Эксперимент проводили при двух составах подвижной фазы в изократическом режиме. При составе подвижной фазы ацетонитрил/вода = 60/40 реализуется обращенно-фазовый режим хроматографирования. В этом случае ПФ является хорошим растворителем. При соотношении ацетонитрил/вода = 20/80 подвижная фаза обогащена водой и является плохим растворителем. Это максимальное содержание воды, при котором на приготовленных монолитных колонках хроматографические пики еще имеют гауссову форму. Правильная форма пика необходима для корректного расчета эффективности колонки. В качестве тестового вещества использовали 1-нитропропан, который растворяли в ацетонитриле для получения растворов с различной концентрацией. Объемная скорость подвижной фазы составляла 100 мкл/мин.

Растворы с различной концентрацией 1-нитропропана последовательно вводили в колонку. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Каждая проба содержала разное количество 1-нитропропана: от 1 до 160 мкг. Рассчитывали число теоретических тарелок (N) по пику 1-нитропропана. Полученные значения делили на N_{\max} (максимальную эффективность колонки при самом малом количестве 1-нитропропана, введенного в колонку). Таким образом, исследовали изменение эффективности по отношению к максимальной эффективности колонки N/N_{\max} . На рисунке 38 представлены зависимости относительной эффективности колонок от величины вводимой пробы 1-нитропропана при составе ПФ ацетонитрил/вода в соотношении 60/40 (рис. 38а) и 20/80 (рис. 38б). Если принять, что перегрузка колонки наступает тогда, когда ее эффективность снижается до 80 % от максимальной, то загрузочная емкость равна массе введенного вещества, вызывающего такое падение эффективности. Из зависимостей видно, что при большом содержании воды в ПФ (80 об. %) коммерческая насадочная колонка Диасфер-250-СТ обладает такими же загрузочными свойствами (30 мкг), как и при содержании воды в ПФ 40 об. %. Это свидетельствует о том, что пористая система данной неподвижной фазы не меняется в зависимости от состава ПФ. Такой эффект может быть связан с высокой степенью сшивки ДВБ-Ст сорбента, что согласуется с наличием микропор и развитой поверхности (таблица 5). Однако для монолитных колонок наблюдается существенное отличие в величине загрузки в зависимости от состава элюента. Так, при 60 об. % ацетонитрила в ПФ загрузочная емкость для ВИ25, ВП30 и ВПр30_ДВБ50_П составляет порядка 100 мкг, для ВТр40 – 110 мкг, а при 20 об. % ацетонитрила – примерно в 3 раза меньше (около 30 мкг для ВП30 и ВТр40, 40 мкг для ВИ25 и 20 мкг для ВПр30_ДВБ50_П).

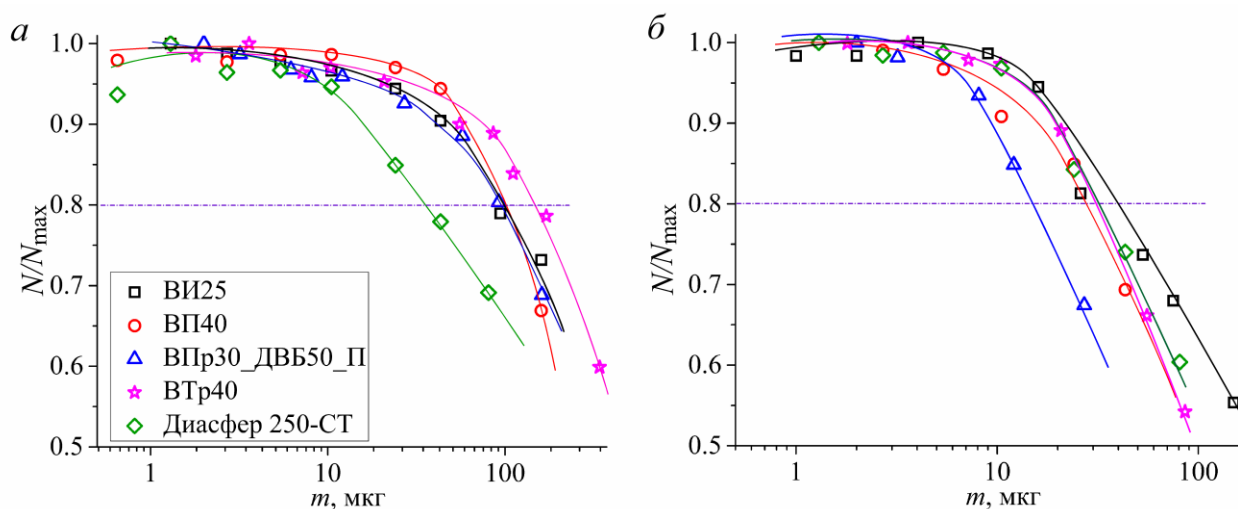


Рис. 38. Зависимости относительной эффективности от величины пробы при составе элюента: ацетонитрил/вода = 60/40 (а), ацетонитрил/вода = 20/80 (б).

Поэтому, несмотря на большую разницу в удельной площади поверхности насадочной колонки и приготовленных монолитных колонок (см. рис. 28) их загрузочные свойства примерно сопоставимы при содержании ацетонитрила в ПФ 20 об. %. При содержании ацетонитрила в ПФ 60 об. % загрузочная емкость приготовленных монолитных колонок выше, чем коммерческой насадочной колонки. Это может быть связано с тем, что в хорошем растворителе монолитные сорбенты способны набухать, увеличивая при этом количество доступных адсорбционных пор. Это приводит к повышению удельной площади поверхности и, следовательно, к увеличению загрузочной емкости.

Таким образом, исследование загрузочных свойств монолитных колонок с неподвижными фазами на основе сополимера дивинилбензол/стирол с добавкой гетероциклического азотсодержащего мономера и коммерческой насадочной колонки показало, что текстурные характеристики (площадь поверхности, объем и размеры пор), полученные для сухого образца, не всегда коррелируют с величиной загрузки. Загрузочные свойства колонок с исследованными монолитными материалами зависят от состава подвижной фазы, использованной в процессе хроматографирования.

3.3.4 Исследование хроматографической селективности приготовленных колонок

3.3.4.1 Зависимость фактора удерживания от состава ПФ

Как было сказано выше (см. разд. 1.2.3.5), неподвижные фазы, содержащие в своем составе как неполярные, так и полярные фрагменты, способны проявлять смешанный механизм удерживания. Поскольку приготовленные колонки представляют собой неполярную матрицу ДВБ-Ст с введенными в нее полярными группами в виде азотсодержащих гетероциклов, можно

сделать предположение, что данные колонки будут способны проявлять смешанный механизм удерживания. В данном случае можно реализовать как обращенно-фазовый, так и гидрофильный механизмы удерживания. Для того, чтобы оценить вклад того или иного механизма удерживания, исследовали зависимость логарифма фактора удерживания (k) неполярного (бензол) и полярного (фенол) тестовых веществ от состава подвижной фазы (ацетонитрил/вода). Относительное содержание ацетонитрил/вода меняли в диапазоне от 40/60 до 95/5 об. %. Сравнение проводили с обращенно-фазовой колонкой ProntoSIL 120-5-C18, в которой неподвижной фазой является силикагелевый сорбент с химически привитыми к поверхности алкильными радикалами C_{18} . На рисунке 39 представлены зависимости логарифма фактора удерживания от объемной доли воды в подвижной фазе (ϕ_{H_2O}).

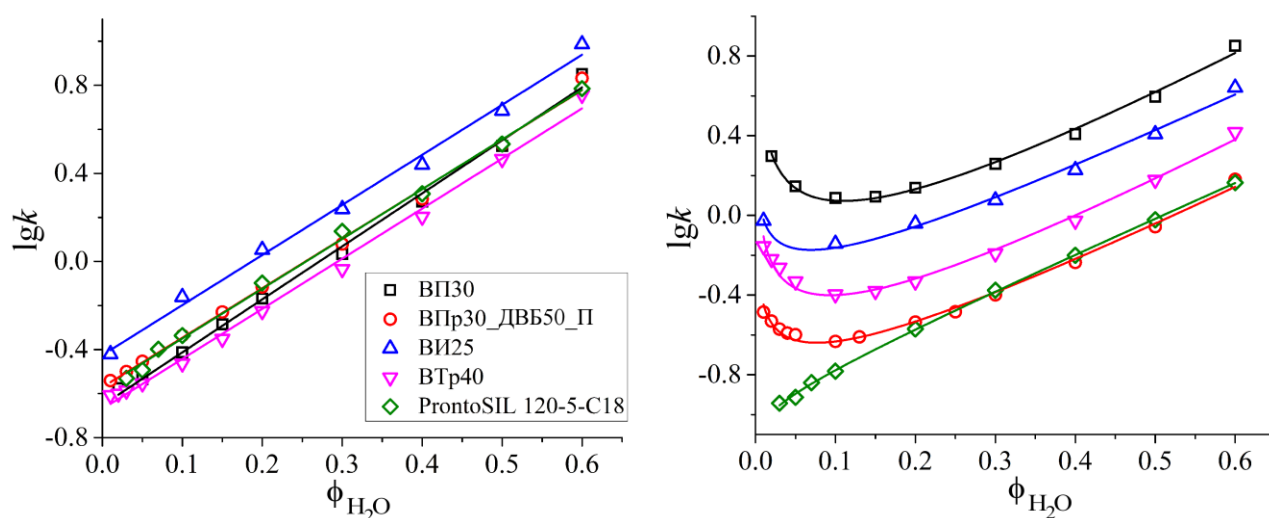


Рис. 39. Зависимости логарифма фактора удерживания от состава ПФ для бензола (а), фенола (б).

Видно, что зависимость по бензолу имеет линейный вид для всех колонок (рис. 39а). То есть для данного анализа реализуется только обращенно-фазовый механизм удерживания как на колонке ProntoSIL 120-5-C18, так и на монолитных колонках [362]. Для полярного компонента фенола зависимость фактора удерживания от состава ПФ сохраняется на колонке ProntoSIL 120-5-C18. Для монолитных колонок с полярными функциональными группами наблюдается совершенно другая картина (рис. 39б). Установлено наличие минимума для данных зависимостей. Такая форма графиков показывает, что колонка может работать как в режиме обращенно-фазовой хроматографии (когда k возрастает с увеличением доли воды в ПФ), так и в режиме гидрофильной хроматографии (когда k увеличивается с уменьшением доли воды в ПФ). В точке минимума данной зависимости происходит смена преимущественных механизмов удерживания (0.05–0.10 воды в подвижной фазе). Линии, построенные по математической модели смешанного механизма удерживания (уравнение 1 (разд. 1.2.3.5)), хорошо согласуются с экспериментальными точками.

Поскольку приготовленные колонки способны проявлять смешанный механизм удерживания, то были исследованы зависимости логарифма фактора удерживания от состава ПФ для веществ с различной полярностью. В качестве полярных веществ, обладающих кислотными свойствами, выбрали бензойную и ацетилсалициловую кислоты. В качестве вещества с основными свойствами выбрали парацетамол. Данные вещества могут существовать в растворе как в ионной, так и молекулярной формах, что может приводить к ухудшению формы хроматографического пика или появлению дополнительных пиков на хроматограмме. Для того, чтобы все тестовые вещества элюировались в молекулярной форме, вместо воды в качестве второго элюента использовали 0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде. На рисунке 40 представлены полученные зависимости логарифма фактора удерживания от объемной доли 0.1 об. % раствора ТФК в подвижной фазе ($\phi_{\text{ТФК}}$).

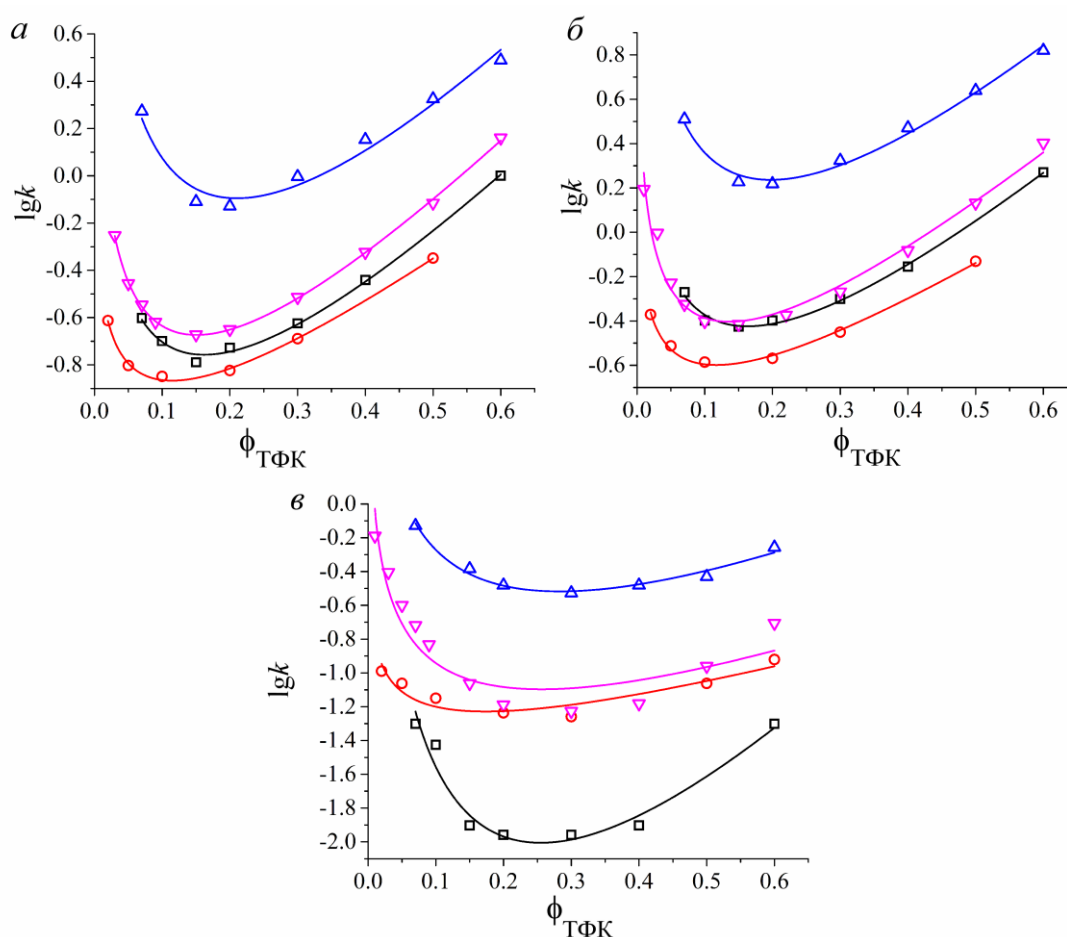


Рис. 40. Зависимости логарифма фактора удерживания от состава ПФ для ацетилсалициловой кислоты (а), бензойной кислоты (б), парацетамола (в). (\square) – VI25, (\circ) – VPr30_ДВБ50_П, (Δ) – VPr30, (∇) – VTr40.

Рассмотрим данные зависимости для компонентов с кислотными свойствами – ацетилсалициловой кислоты (рис. 40а) и бензойной кислоты (рис. 40б). Видно, что

удерживание этих веществ существенно выше на колонке с 4-винилпиридином по сравнению с другими колонками. Минимальные значения факторов удерживания кислот были найдены для колонки с 1-винил-2-пирролидоном. Значения фактора удерживания ацетилсалициловой кислоты и бензойной кислоты на колонках ВИ25 и ВТр40 близки во всем диапазоне $\phi_{\text{ТФК}}$. Объемная доля водного элюента, при которой происходит смена преимущественных механизмов удерживания составляет: 0.2 для колонки ВП30, 0.1 для колонки ВПр30 и 0.15 для колонок ВТр40 и ВИ25. Зависимости для парацетамола отличаются тем, что имеют менее выраженный минимум и большую долю водной фазы (0.2–0.3), при которой происходит смена механизмов удерживания. Наиболее резкое изменение удерживания парацетамола в зависимости от состава ПФ установлено для колонок ВТр40 и ВИ25. Так, при $\phi_{\text{ТФК}} < 0.1$ (область гидрофильной хроматографии) логарифм фактора удерживания парацетамола на колонке ВТр40 изменяется от -0.2 до -1.05, а на колонке ВИ25 от -1.3 до -1.95. Математическая модель смешанного механизма удерживания (уравнение 1 (разд. 1.2.3.5)), представленная на графике линиями, хорошо согласуются с экспериментальными данными, которые обозначены точками.

Характер левой ветви зависимости фактора удерживания от состава ПФ описать достаточно сложно, поскольку гидрофильный механизм удерживания основан на нескольких различных типах межмолекулярных взаимодействий. В отличие от гидрофильного режима, величина удерживания в обращено-фазовом режиме обычно коррелирует с величиной коэффициента гидрофобности хроматографируемого вещества ($\lg P$). Коэффициент гидрофобности – это логарифм константы распределения вещества между 1-октанолом и водой. Рассмотрим на примере колонки ВТр40 зависимость фактора удерживания парацетамола, ацетилсалициловой кислоты и бензойной кислоты от состава ПФ (рис. 41).

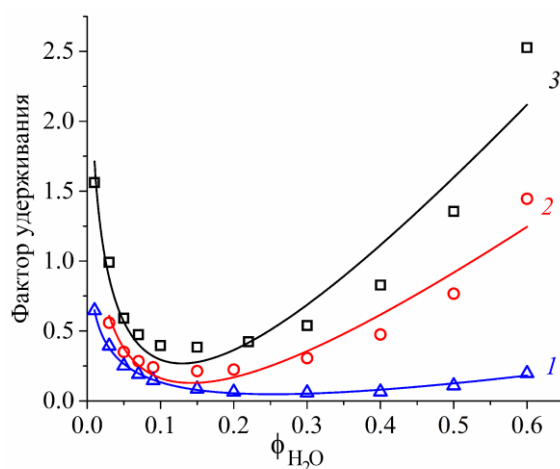


Рис. 41. Зависимости фактора удерживания для колонки ВТр40 от состава ПФ: 1 – парацетамол, 2 – ацетилсалициловая кислота, 3 – бензойная кислота. ПФ: ацетонитрил/ 0.3 об. % раствор H_3PO_4 в воде.

На представленных графиках видно, угол наклона правой ветви кривой при увеличении содержания воды в ПФ значительно отличается для компонентов с разными значениями коэффициента гидрофобности. Так, для парацетамола, ацетилсалициловой кислоты и бензойной кислоты $\lg P$ равен 0.46, 1.18 и 1.87 соответственно. То есть угол наклона правой ветви зависимости, отвечающей за обращено-фазовый механизм, увеличивается с увеличением коэффициента гидрофобности. Чем выше гидрофобность вещества, тем значительнее состав ПФ влияет на его удерживание в обращенно-фазовом режиме.

Построение зависимостей параметров удерживания (k , t_R , $\lg k$) от состава ПФ является удобным инструментом, позволяющим предсказать оптимальный состав ПФ для удовлетворительного разделения исследуемой смеси. Рассмотрим это на примере компонентов лекарственного препарата «Аскофен-П»: кофеин, парацетамол, ацетилсалициловая кислота и салициловая кислота (рис. 42). Последний компонент не является действующим веществом и не входит в состав, указанный на упаковке. Салициловая кислота является примесью, которая образуется на стадии синтеза ацетилсалициловой кислоты. Таблетку «Аскофена-П» измельчали и растворяли в 4 мл смеси ацетонитрила с водой в соотношении 98/2 об. % соответственно. Далее выдерживали полученную суспензию в ультразвуковой ванне в течение 10 минут, после чего 1 мл суспензии центрифугировали в течение 3 минут при 12000 об/мин. Отбিরали отцентрифугированную жидкость и разбавляли ее в 10 раз смесью ацетонитрила и воды (98/2 об. %). Хроматографирование проводили при скорости потока элюента 200 мкл/мин. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и 0.3 об. % водного раствора фосфорной кислоты.

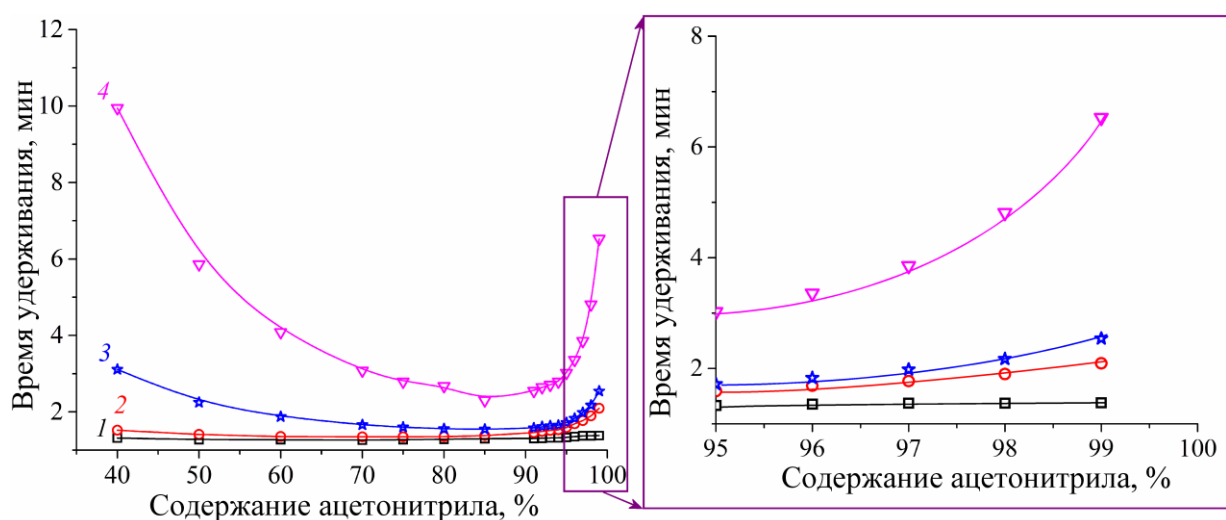


Рис. 42. Зависимости времени удерживания от состава ПФ для колонки ВТр40: 1 – кофеин, 2 – парацетамол, 3 – ацетилсалициловая кислота, 4 – салициловая кислота.

ПФ: ацетонитрил/ 0.3 об. % H_3PO_4 . Скорость потока ПФ 200 мкл/мин.

Из представленного рисунка видно, что разделить кофеин и парацетамол можно только в гидрофильном режиме при объемной доле ацетонитрила в ПФ более 97 об. %. Раствор «Аскофена-П» хроматографировали при 98 об. % ацетонитрила в ПФ в изократическом режиме и скорости потока 300 мкл/мин. На рис. 43 представлены хроматограммы, записанные при разном составе ПФ.

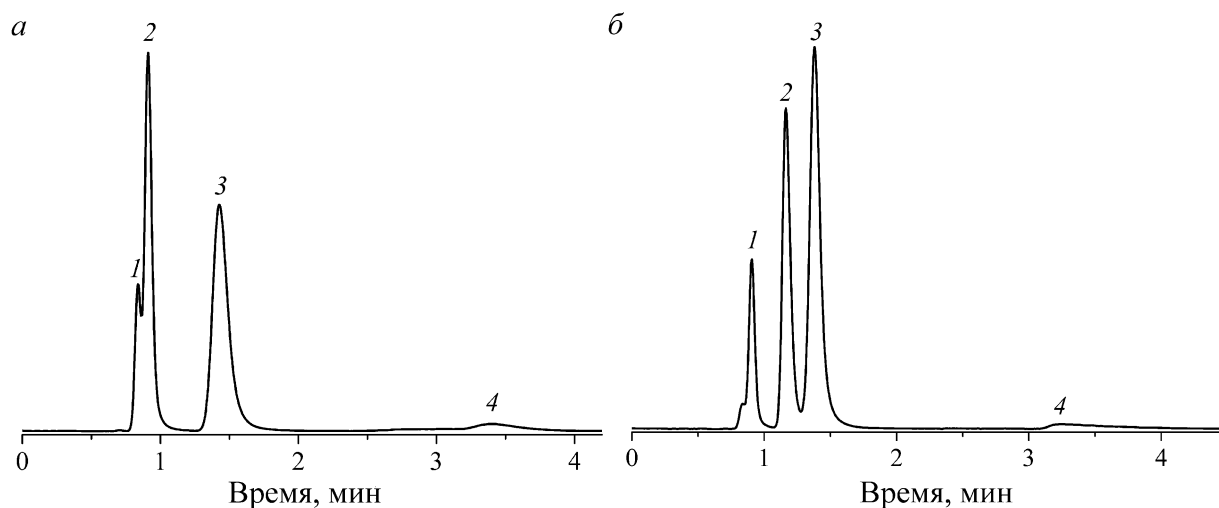


Рис. 43. Хроматограмма разделения лекарственного препарата «Аскофен-П». Колонка ВТр40 длиной 78 мм. 1 – кофеин, 2 – парацетамол, 3 – ацетилсалициловая кислота, 4 – салициловая кислота. Элюент: 50/50 = ацетонитрил/0.3 об. % H_3PO_4 (а), 98/2 = ацетонитрил/0.3 об. % H_3PO_4 (б). Скорость потока ПФ 300 мкл/мин.

При составе подвижной фазы ацетонитрил/вода = 50/50 разделение происходит преимущественно по обращенно-фазовому механизму (рис. 43а). При этом кофеин и парацетамол делятся неудовлетворительно. При дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе происходит увеличение фактора удерживания для всех компонентов смеси, кроме кофеина (рис. 42б). Это говорит о том, что повышается вклад гидрофильных взаимодействий в удерживание аналитов. На рисунке 43б видно, что при составе ПФ ацетонитрил/вода = 98/2 разделение всех компонентов смеси удовлетворительное и хроматографирование проходит за 4 мин.

Таким образом, построение зависимости параметров удерживания от состава ПФ можно использовать не только для оценки селективности колонок, но и для определения состава ПФ, при котором можно разделить определенную смесь веществ.

3.3.4.2 Расчет параметров модели линейных отношений энергий сольватации

Модель линейных отношений энергий сольватации (ЛОЭС) в настоящее время является одним из наиболее информативных методов оценки селективности хроматографических колонок с точки зрения типов межмолекулярных взаимодействий. Согласно данной модели,

хроматографическое удерживание описывается линейной зависимостью между параметрами удерживания (время удерживания или фактор удерживания) и параметрами, характеризующими тестовое вещество (дескрипторы). Данная модель предполагает постоянство состава подвижной фазы во время проведения эксперимента. В данном эксперименте хроматографирование тестовых веществ проводили при составе ПФ ацетонитрил/вода = 60/40 об. % соответственно.

3.3.4.2.1 Монолитные колонки с 1-винилимидазолом и 4-винилпиридином

Проводили оценку полярности колонок с приготовленными монолитами, учитывающую взаимодействия в системе сорбент – сорбат – элюент, на основе теории ЛОЭС. Для этого на всех приготовленных колонках с 1-винилимидазолом и 4-винилпиридином были определены времена удерживания для каждого из 35 веществ (разд. 2.5.4.2, табл. 3). Из времен удерживания рассчитали значения факторов удерживания k , и далее для них были найдены значения $\lg(k)$. После этого дескрипторы (для каждого из тестовых веществ), взятые из литературных источников, были подставлены в уравнение (2) (разд. 1.2.3.6).

Таким образом, для каждой из колонок существуют 35 уравнений с неизвестными коэффициентами, которые решаются методом множественной линейной регрессии с использованием средств OriginPro 9 (OriginLab Corp).

Для более наглядного представления о свойствах исследуемых хроматографических систем на рис. 44 изображены гистограммы, характеризующие изменения параметров модели Абрахама (e , s , a , b , v) в зависимости от состава исходной полимеризационной смеси для каждой из колонок.

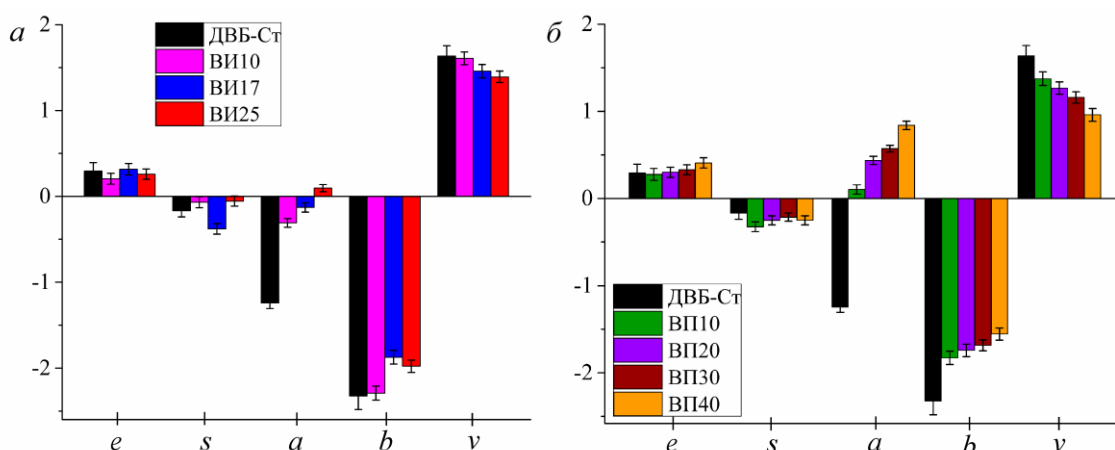


Рис. 44. Гистограммы параметров модели ЛОЭС для приготовленных колонок. Колонки с монолитом на основе 1-винилимидазола (а) и 4-винилпиридина (б). ПФ: ацетонитрил/вода (60/40).

Коэффициент v для всех колонок является положительным, и его численное значение выше, чем для остальных коэффициентов уравнения (2). Это говорит о том, что удерживание

аналитов на данных неподвижных фазах определяются, в основном, гидрофобными взаимодействиями.

Коэффициент e , характеризующий π - π и n - π взаимодействия имеет приблизительно одинаковые положительные значения для всех колонок, и его величина слабо меняется в зависимости от типа и количества модифицирующего мономера. Это может быть связано с тем, что основными компонентами для всех сорбентов являются стирол и дивинилбензол, составляющие основу полимерного материала и, скорее всего, именно эти фрагменты монолита определяют его способность к n - π -взаимодействиям.

Коэффициент s , описывающий диполь-дипольные взаимодействия, имеет отрицательные и приблизительно одинаковые значения для всех колонок. Отрицательные значения этого коэффициента свидетельствуют о том, что в изученных системах способность к поляризуемости со стороны подвижной фазы (данного конкретного состава) больше, чем со стороны неподвижной фазы.

Коэффициенты b имеют отрицательные и большие по модулю значения для всех колонок. Это говорит о том, что аналиты, обладающие протонно-акцепторной способностью, хуже удерживаются на данных неподвижных фазах, чем вещества, не проявляющие основных свойств. Отрицательные значения коэффициентов указывают на то, что в данной системе подвижная фаза является более сильным донором протонов, чем неподвижная.

Теперь рассмотрим коэффициент a , который характеризует монолиты как акцепторы протонов. Для колонки ДВБ-Ст значения данного коэффициента отрицательные, что говорит о слабых акцепторных свойствах данного монолита в сравнении с подвижной фазой. При увеличении количества ВП и ВИ в монолите протонно-акцепторные свойства неподвижных фаз усиливаются, что, скорее всего, обусловлено наличием в азотсодержащих фрагментах неподеленной электронной пары. В результате монолиты с ВП и ВИ проявляют основные свойства в большей мере, чем подвижная фаза. Положительные значения a дают основания предполагать, что удерживание аналитов, проявляющих кислотные свойства, будет сильнее для колонок с сорбентом, содержащим 4-винилпиридин.

Отсюда можно сделать вывод о том, что монолитные колонки на основе ДВБ-Ст в зависимости от содержания ВИ или ВП в сорбенте проявляют способность к различным типам взаимодействий, характер которых может быть определен из знания параметров, характеризующих эти взаимодействия. Варьируя концентрации 1-винилимидазола или 4-винилпиридина в полимеризационной смеси, можно изменять селективность колонок в достаточно широких пределах при одном и том же составе подвижной фазы ацетонитрил/вода (60/40). Оказалось, что колонки с монолитом, в состав которого входит 4-винилпиридин, в большей степени проявляют свойства акцептора протона по сравнению с другими

исследованными колонками. При увеличении содержания 4-винилпиридина в реакционной смеси основность сорбента повышается.

3.3.4.2.2 Сравнение колонок ВИ25, ВП30, ВТр40, ВПр30_ДВБ50_П

Аналогичный эксперимент был проведен для колонок ВТр40 и ВПр30_ДВБ50_П. Сравнительная гистограмма представлена на рис. 45.

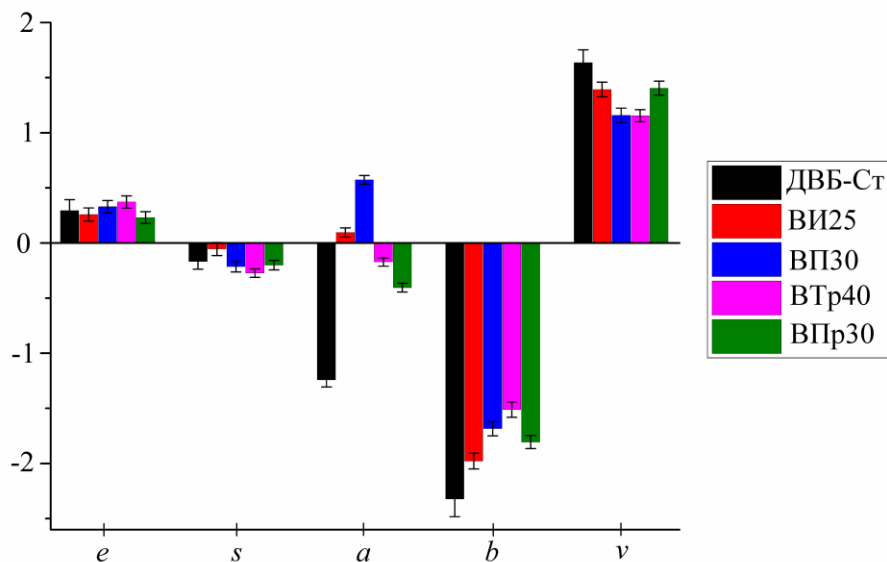


Рис. 45. Гистограммы параметров модели ЛОЭС для приготовленных колонок. ПФ: ацетонитрил/вода (60/40).

Коэффициент v для всех колонок является положительным, и его численное значение выше, чем для остальных коэффициентов уравнения (2). Это говорит о том, что удерживание аналитов на данных неподвижных фазах определяется, в основном, за счет их гидрофобности. Можно отметить, что для монолитных колонок с гетероциклическим азотсодержащим мономером данный коэффициент имеет более низкие значения, чем для колонки ДВБ-Ст. Это можно объяснить тем, что коэффициент гидрофобности $\lg P$ для гетероциклических мономеров меньше ($\lg P = 0.58$ (ВИ), 1.49 (ВП), 0.15 (ВПр), 0.22 (ВТр)), чем для мономеров стирола (2.71) и дивинилбензола (3.45). Уменьшение коэффициента v для колонок ВП30 и ВТр40 более существенное, что можно объяснить более высокой степенью конверсии этих мономеров в процессе полимеризации (см. разд. 3.2.3, табл. 8).

Коэффициент e , характеризующий π - π и n - π взаимодействия, для всех колонок имеет приблизительно одинаковые положительные значения, и его величина слабо меняется в зависимости от типа и количества модифицирующего мономера. Это может быть связано с тем, что основными компонентами для всех сорбентов являются стирол и дивинилбензол и, скорее всего, именно эти фрагменты монолита определяют его способность

к π - π -взаимодействиям. Несколько более низкое значение коэффициента e наблюдается для колонки ВПр30. Это можно объяснить тем, что данный мономер не обладает ароматичностью.

Коэффициент s , описывающий диполь-дипольные взаимодействия, имеет отрицательные и приблизительно одинаковые значения для всех колонок. Отрицательные значения этого коэффициента свидетельствуют о том, что в изученных системах способность к поляризуемости со стороны подвижной фазы больше, чем со стороны неподвижной фазы.

Коэффициенты b имеют отрицательные и большие по модулю значения для всех колонок. Это говорит о том, что аналиты, обладающие протонно-акцепторной способностью, хуже удерживаются на данных неподвижных фазах, чем вещества, не проявляющие основных свойств. Отрицательные значения коэффициентов указывают на то, что в данной системе подвижная фаза является более сильным донором протонов, чем неподвижная.

Коэффициент a характеризует монолиты как акцепторы протонов. Для колонок ДВБ-Ст, ВТр40 и ВПр30 значения данного коэффициента отрицательные, что говорит о слабых акцепторных свойствах данных монолитов в сравнении с подвижной фазой. Для колонок ВП30 и ВИ25 протонно-акцепторные свойства усиливаются. В результате монолиты с ВП и ВИ проявляют основные свойства в большей мере, чем подвижная фаза. Положительные значения a дают основания предполагать, что удерживание аналитов, проявляющих кислотные свойства, будет сильнее для колонок с сорбентом, содержащим 4-винилпиридин.

Исходя из полученных данных, можно установить, что в зависимости от типа функционального мономера можно в достаточно широких пределах варьировать селективность монолитных колонок.

3.4 Модифицирование монолитных колонок

Одним из путей изменения селективности колонок для ВЭЖХ является пост-модификация поверхности хроматографического сорбента. Для органических монолитов, состоящих из полимера на основе дивинилбензола и стирола такая модификация возможна в случае введения в монолит реакционных функциональных групп на стадии синтеза полимера. Приготовление монолитного сорбента на основе ДВБ, Ст и 4-винилбензилхлорида дает возможность функционализации поверхности органического материала по хлорметильной группе. Содержание 4-винилбензилхлорида составляло 40 об. %, поэтому далее данную колонку будем называть исходной ВБХ40. Приготовление данной колонки описано в разд. 2.2.2.

На рисунке 46 представлена микрофотография монолитного сорбента колонки ВБХ40. Видно (рис. 46а), что сорбент равномерно распределен внутри трубки, а его структура (рис. 46б) является типичной для органических монолитов и представляет собой ассоциаты, состоящие из глобул диаметром около 2 мкм. Удельная площадь поверхности данного

монолита по данным низкотемпературной адсорбции/десорбции азота составляет около $2 \text{ м}^2/\text{г}$, а средний диаметр пор около 200 \AA .

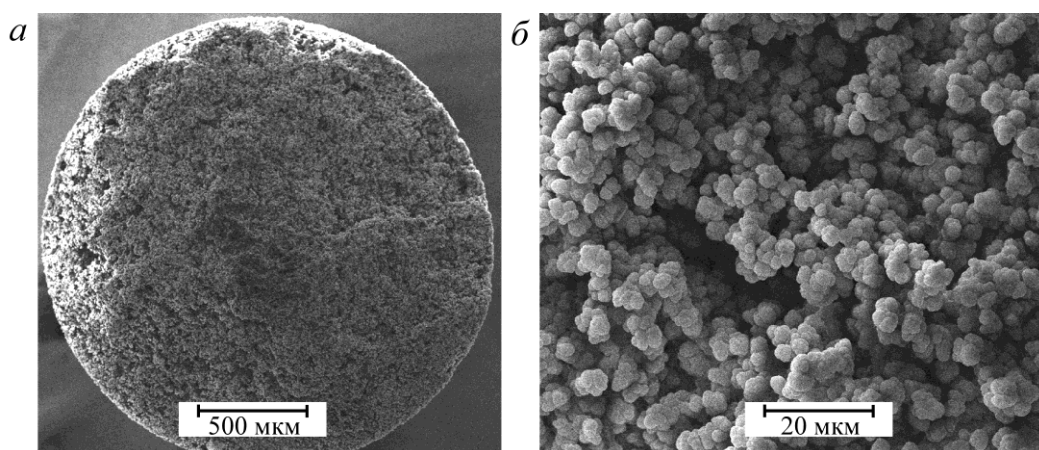


Рис. 46. Микрофотография монолитного сорбента ВВХ40. Общий вид монолита в колонке (а), макротекстура монолита (б).

Исходные колонки ВВХ40 были обработаны растворами производных имидазола и пиридина: 1-метилимидазолом, 2-метилимидазолом, 2-метилпиридином и 4-метилпиридином. Для этого готовили растворы каждого функционального реагента в ацетонитриле в концентрациях: 6.3 об. % (1МИ, 2МП, 4МП) и 2.5 об. % (2МИ). Исходные колонки ВВХ40 промывали приготовленными растворами в течение 5 мин со скоростью 200 мкл/мин. Далее каждую колонку помещали в запаянную с одного конца и заполненную раствором, которым была промыта колонка, стеклянную трубку. Запаивали второй конец и помещали в термостат на 15 ч при температуре $80 \text{ }^\circ\text{C}$. По завершении процесса модифицирования колонку извлекали, устанавливали в фитинги и промывали ацетонитрилом объемом 1 мл со скоростью 200 мкл/мин для удаления раствора функционального реагента. Таким образом на поверхности органической матрицы были получены ионные пары, состоящие из органического катиона (имидазолия или пиридиния) и аниона, в нашем случае хлора, как это показано на рис. 47.

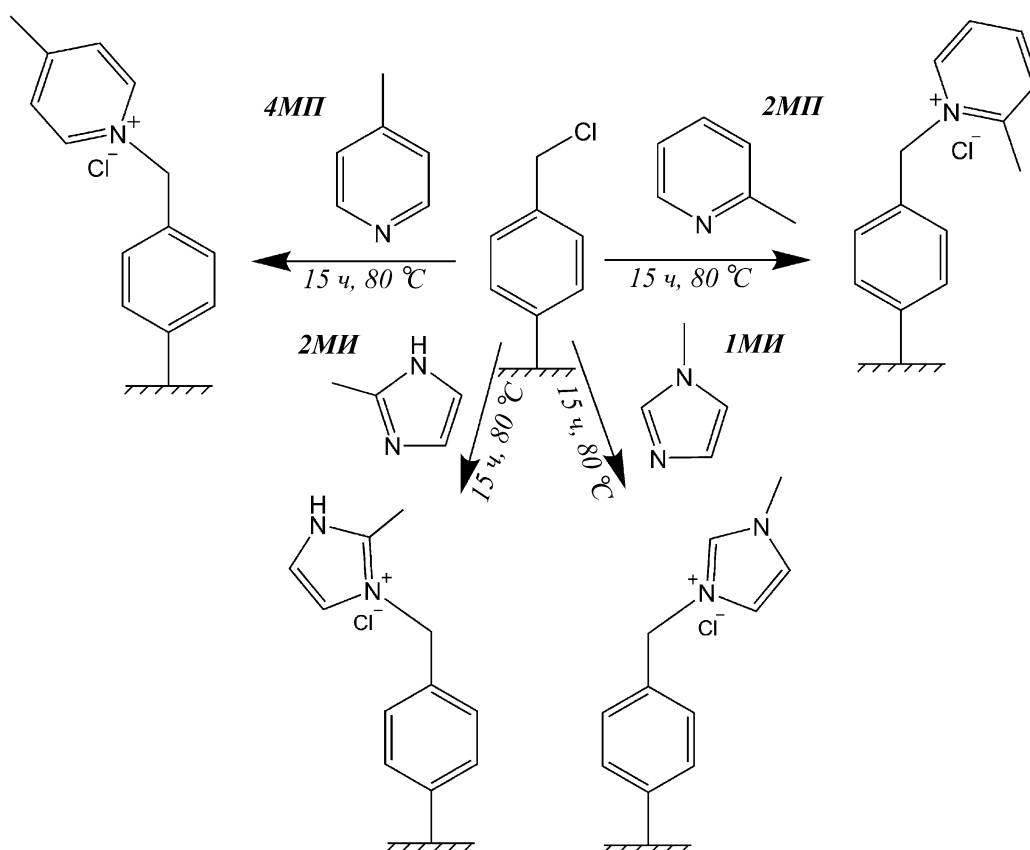


Рис. 47. Схема модифицирования монолитной колонки ВВХ40 функциональными реагентами.

Поскольку в дальнейших экспериментах использовали раствор трифторуксусной кислоты в качестве элюента, то после обработки колонки проводили замену хлорид-аниона на трифторацетат-анион. Для этого, раствором, содержащим ацетонитрил и 0.5 об. % ТФК в соотношении 50/50, колонку промывали со скоростью 200 мкл/мин в течение 50 мин.

3.4.1 Зависимость фактора удерживания от состава ПФ

Для того, чтобы оценить способность полученных колонок, к удерживанию веществ, были определены факторы удерживания (k) для аналитов различных химических классов при разных составах подвижной фазы (ацетонитрил/0.3 об. % ТФК) от 40/60 до 95/5 об. %. В качестве тестовых компонентов были использованы вещества с кислотными свойствами (бензойная кислота, 2-гидроксибензойная кислота, 2,4-дигидроксибензойная кислота и фенол), с основными свойствами (кофеин, N-(4-гидроксифенил)ацетамид (парацетамол)) и толуол как нейтральный неполярный аналит. Было найдено что кофеин не удерживается при всех составах подвижной фазы, поэтому он был выбран в качестве не удерживаемого вещества для расчета фактора удерживания остальных веществ.

Зависимости фактора удерживания от доли водного элюента ($\phi_{\text{ТФК}}$) для исходной колонки ВВХ40 представлены на рис. 48. Видно, что фактор удерживания по толуолу снижается при

повышении содержания ацетонитрила в элюенте во всем диапазоне составов ПФ. Полярные компоненты удерживаются существенно хуже толуола. Это говорит о том, что монолитный сорбент с хлорметильными группами проявляет свойства, которые типичны для обращенной фазы.

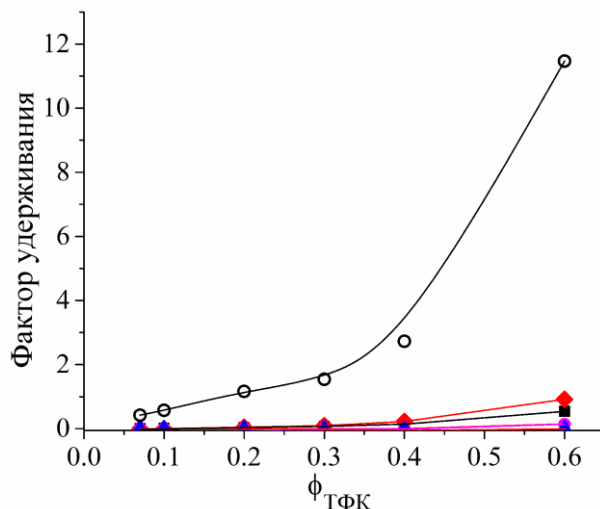


Рис. 48. Зависимость фактора удерживания от состава подвижной фазы по тестовым веществам для колонки ВВХ40. (○) – толуол, (●) – 2,4-дигидроксibenзойная кислота, (▲) – N-(4-гидроксифенил)ацетамид, (◆) – 2-гидроксibenзойная кислота, (■) – бензойная кислота.

В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 0.3 об. % ТФК.

Скорость потока ПФ 200 мкл/мин.

Другая картина зависимости k от состава ПФ наблюдается в случае элюирования компонентов на функционализированных колонках. Эти зависимости для колонок 1МИ, 2МИ, 2МП, 4МП представлены на рис. 49. Линии, построенные по математической модели смешанного механизма удерживания (уравнение 1 (разд. 1.2.3.5)), хорошо согласуются с экспериментальными данными, представленными на графике точками. Кривые зависимостей для всех компонентов, кроме толуола, имеют минимум, который соответствует определенному составу подвижной фазы. Такая форма графиков показывает, что колонка может работать как в режиме обращенно-фазовой хроматографии (когда k возрастает с увеличением доли воды в ПФ), так и в режиме гидрофильной хроматографии (когда k возрастает с уменьшением доли воды в ПФ). В точке минимума данной зависимости происходит смена преимущественных механизмов удерживания. Для парацетамола и 2,4-дигидроксibenзойной кислоты смена механизма удерживания происходит при доле раствора ТФК в ПФ 0.2–0.3. Для фенола, бензойной кислоты и 2-гидроксibenзойной кислоты минимум кривой приходится на долю раствора ТФК 0.1–0.2. Для толуола зависимость $\lg k$ от содержания ацетонитрила монотонная во всем диапазоне составов ПФ. Это связано с тем, что основными типами взаимодействий толуола с неподвижной фазой, которая содержит ароматические фрагменты являются π - π – и

дисперсионные взаимодействия. В то же время, у молекулы толуола отсутствуют фрагменты, способные к диполь-дипольным взаимодействиям. Поэтому обогащенный водой слой подвижной фазы, адсорбированный на поверхности монолита, не влияет на удерживание толуола [363].

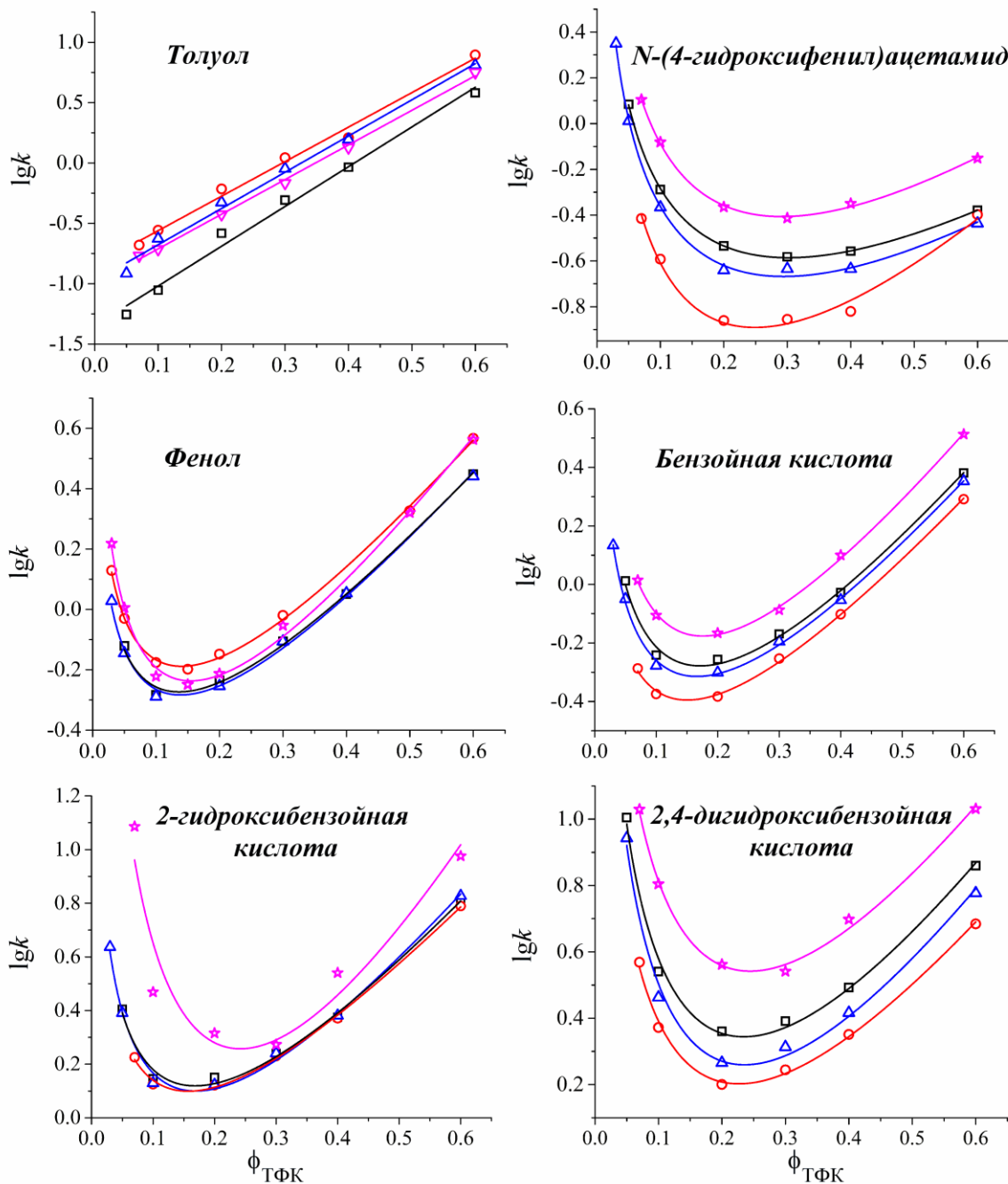


Рис. 49. Зависимости фактора удерживания тестовых веществ от доли водного элюента в ПФ на функционализированных колонках. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 0.3 об. % ТФК. Скорость потока ПФ 200 мкл/мин. (○) – 2МИ, (□) – 1МИ, (Δ) – 2МП, (☆) – 4МП.

Таким образом, характер удерживания на функционализированных колонках при разных составах ПФ значительно отличается от того, что получено на исходной колонке ВХ40 (см. рис. 48). Это приводит к иной селективности функционализированных колонок по сравнению

с исходной колонкой, как это можно видеть из хроматограмм тестовых веществ, представленных на рис. 50. На колонке ВВХ40 независимо от содержания ацетонитрила в подвижной фазе порядок элюирования компонентов не меняется. Фенол удерживается слабо, а урацил и кофеин практически не удерживаются. На функционализированных колонках величина удерживания и порядок элюирования меняется в зависимости от состава элюента. Так, для всех функционализированных колонок в режиме обращенно-фазовой хроматографии (40 об. % ацетонитрила в ПФ) урацил удерживается относительно слабо, а кофеин не удерживается. В режиме гидрофильной хроматографии (93 об. % ацетонитрила в ПФ) кофеин по-прежнему не удерживается на всех колонках, а урацил удерживается довольно сильно, за исключением колонки 2МИ. Тoluол на всех колонках удерживается заметно сильнее при 40 об. % ацетонитрила, чем при 93 об. % ацетонитрила в ПФ. Этого и следует ожидать, поскольку для толуола характерны только дисперсионные и π - π взаимодействия. Для фенола удерживание в обращенно-фазовом и гидрофильном режиме существенно не меняется. Молекула фенола достаточно хорошо удерживается и при 93 об. % и при 70 об. % ацетонитрила в ПФ. При этом механизмы удерживания в том и другом режимах могут быть разными. Это связано с тем, что молекула фенола имеет как гидрофобную часть - бензольное кольцо, так и гидрофильный фрагмент -ОН.

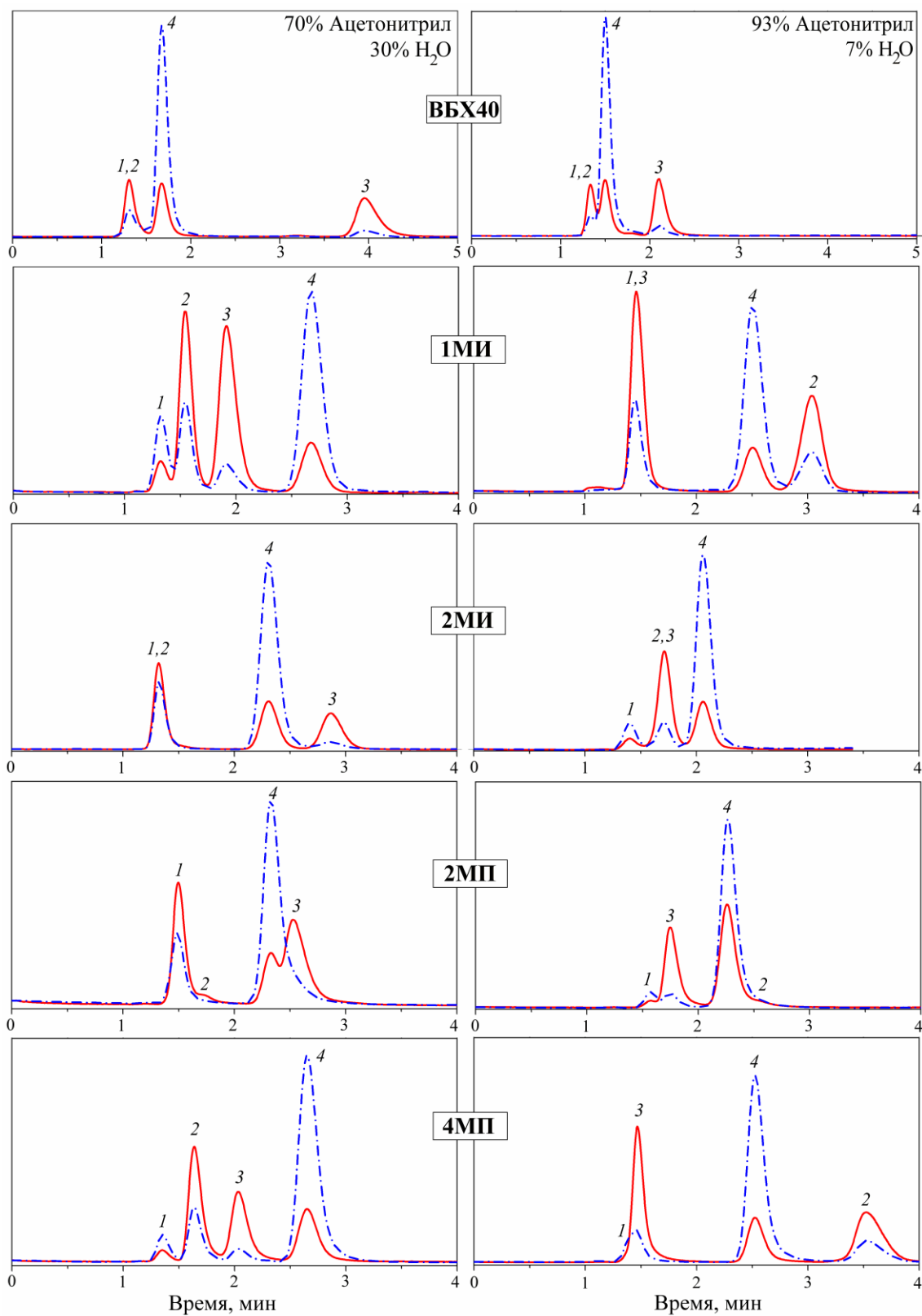


Рис. 50. Хроматограммы тестовой смеси режиме обращенно-фазовой (левый столбец) и гидрофильной хроматографии (правый столбец). Скорость потока 100 мкл/мин. 1 – кофеин, 2 – урацил, 3 – толуол, 4 – фенол. Длина всех колонок 60 мм. Детектор: УФ-спектрометр, $\lambda = 254$ нм (сплошная линия), $\lambda = 274$ нм (пунктирная линия).

3.4.2 Сравнительная оценка эффективности обработанных колонок в гидрофильном и обращенно-фазовом режимах

Известно, что для колонки с органическим сорбентом эффективность зависит от состава ПФ [93]. Поэтому были исследованы зависимости высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), от скорости потока элюента для двух составов ПФ, при которых реализуется обращенно-фазовый и гидрофильный режим. Из рисунка 49 можно определить состав подвижной фазы, когда преимущественным является тот или иной механизм удерживания. Мы выбрали следующие объемные соотношения ацетонитрил/0.3 об. % ТФК в ПФ: для обращенно-фазового режима - 70/30, а для режима гидрофильной хроматографии - 95/5. Расчет ВЭТТ проводили по фенолу, для чего был приготовлен его раствор в ацетонитриле с концентрацией 1.2 мг/мл. Фенол был выбран в качестве тестового вещества в связи с тем, что зависимость фактора удерживания этого компонента от состава подвижной фазы для всех колонок имеет примерно одинаковый характер (см. рис. 49). Для расчета линейной скорости потока подвижной фазы использовали кофеин как неударживаемый компонент.

Из рисунка 51 видно, что область оптимальных линейных скоростей ПФ для всех колонок находится в области 0.1 – 0.4 мм/с. В этом диапазоне скоростей ПФ значения ВЭТТ составляют от 25 мкм до 58 мкм для всех функционализированных колонок. Можно увидеть, что для колонок 1МИ, 2МИ, и 4МП везде виден четкий минимум ВЭТТ для гидрофильного режима. Для этих же колонок в обращенно-фазовом режиме мы не достигли минимума из-за очень низкой оптимальной скорости потока ПФ. При этом зависимость в исследованном диапазоне скоростей близка к линейной. Колонки 2МИ и 4МП в обращенно-фазовом режиме проявляют несколько большую эффективность, чем в гидрофильном, в то время как для колонки 1МИ эта ситуация обратная. Колонка 2МП в обращенно-фазовом режиме имеет четкий минимум ВЭТТ при скорости ПФ 0.3 – 0.4 мм/с.

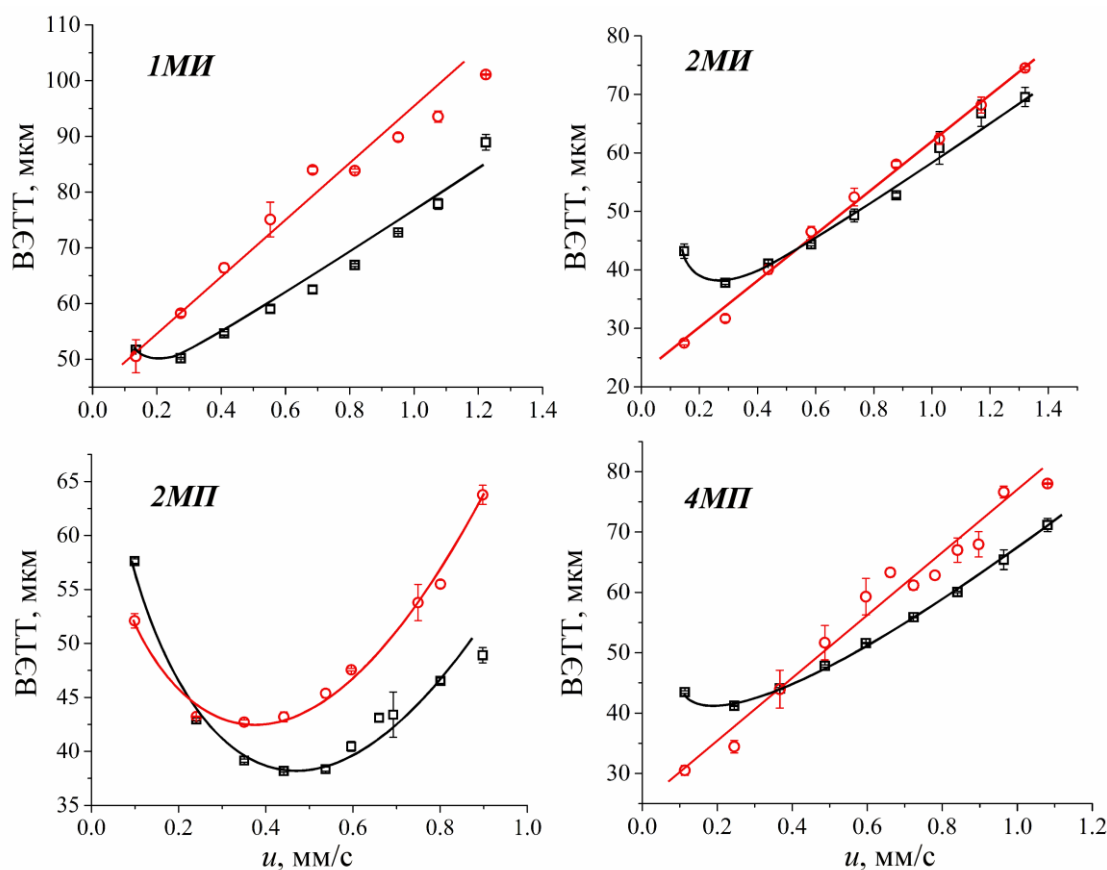


Рис. 51. Зависимость эффективности колонок от скорости потока подвижной фазы: (○) – 70/30 об. % ацетонитрил/вода, (□) – 95/5 об. % ацетонитрил/вода.

3.4.3 Сравнение загрузочной емкости модифицированных колонок в гидрофильном и обращенно-фазовом режимах.

Определение загрузочной емкости модифицированных колонок проводили так же, как для колонок с гетероциклическими мономерами (раздел 3.3.3). Однако в качестве тестового вещества в данном случае использовали фенол, концентрации которого в растворах были диапазоне от 0.17 до 61 мг/мл. Составы ПФ подбирали таким образом, чтобы на колонке осуществлялся преимущественно обращенно-фазовый или гидрофильный механизм, а фактор удерживания фенола оставался примерно одинаковым. Так, согласно зависимостям логарифма фактора удерживания от состава ПФ (рис. 49), для обращенно-фазового режима была выбрана смесь ацетонитрила и воды в соотношении 70/30 об. % для всех колонок, для гидрофильного режима – 92/8 об. % (для колонок 1МИ, 2МИ, 2МП) и 95/5 об. % (для 4МП) соответственно. Пробы фенола объемом 1 мкл вводили с помощью автодозатора. Скорость потока ПФ составляла 80 мкл/мин.

На рисунке 52 представлены зависимости относительной эффективности колонок от величины вводимой пробы фенола в обращенно-фазовом режиме и гидрофильном режиме.

Как видно, загрузочные свойства всех исследованных колонок различаются незначительно. Как в обращенно-фазовом, так и в гидрофильном режимах масса фенола, вызывающая снижение эффективности на 20 % составляет от 10 до 20 мкг. На исходной колонке ВБХ40 эффективность снижается на 20 % при введении в колонку 13 мкг фенола (состав ПФ: 70 об. % ацетонитрил, 20 об. % вода). Зависимость эффективности данной колонки от величины загрузки представлена на рис. 52а.

Для сравнения можно привести данные по загрузкам из работы [364], в которой исследовали загрузочные свойства насадочной колонки Hamilton PRP-1 длиной 150 мм и диаметром 4.1 мм, заполненной гранулами органического сорбента ДВБ-Ст, диаметром 5 мкм. Колонка, описанная в цитированной работе, показала снижение эффективности на 10 % при введении в нее 7.4 мкг фенола.

Таким образом, исследованные монолитные колонки позволяют работать с пробами, которые сравнимы по величине загрузки для насадочной колонки с неподвижной фазой аналогичной природы.

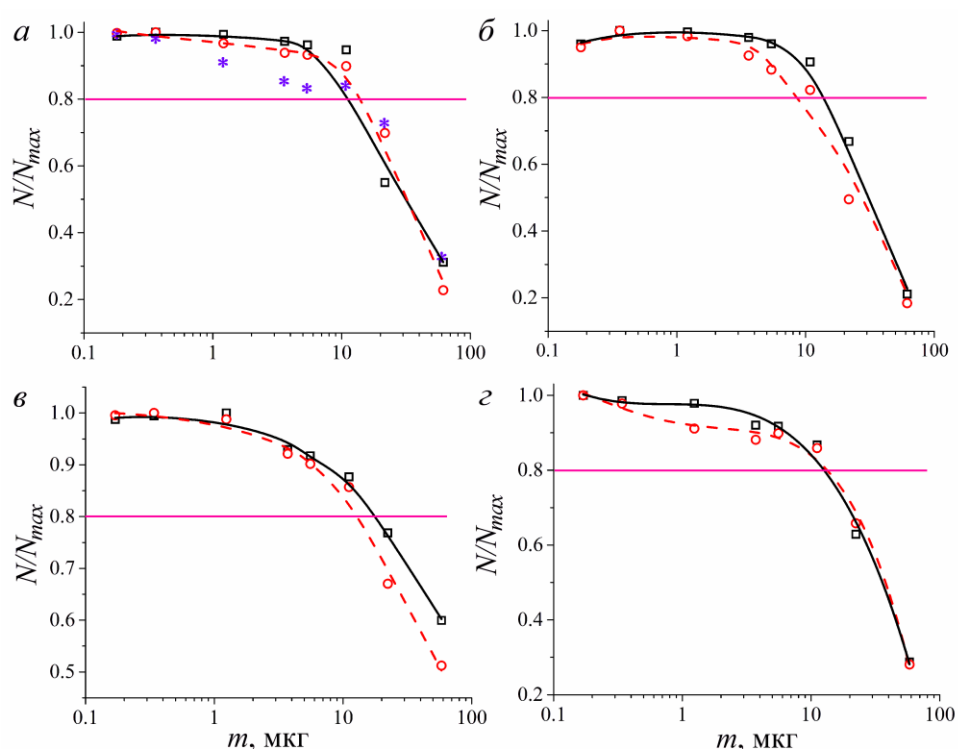


Рис. 52. Зависимости эффективности от количества вводимой пробы: 1МИ (а) (* - ВБХ40 при 70 об. % ацетонитрила), 2МИ (б), 2МП (в), 4МП (з). (○) – 70/30 об. % ацетонитрил/вода, (□) – 95/5 об. % ацетонитрил/вода (92/8 об. % для 4МП).

3.5 Примеры разделения на приготовленных колонках

Предыдущие разделы настоящей работы были посвящены приготовлению и исследованию свойств монолитных колонок для ВЭЖХ. Полученные результаты показали, что данные колонки имеют хороший потенциал для решения задач разделения веществ различных химических классов методом ВЭЖХ.

В настоящем разделе приведены примеры разделений на тех монолитных колонках, которые проявили удовлетворительную эффективность и селективность. В зависимости от объекта исследования, колонки устанавливали на хроматограф Милихром А-02 со спектрофотометрическим детектором (для детектирования соединений, поглощающих в УФ-диапазоне) или на хроматограф DIONEX UltiMate 3000 (Thermo scientific, США) с детектором заряженных аэрозолей Corona ultra RS (для детектирования нелетучих соединений, не поглощающих в УФ-диапазоне).

Монолитные колонки с 1-винилимидазолом и 4-винилпиридином

Для того, чтобы оценить влияние количественного содержания функционального сомономера в монолите на разделительные свойства приготовленных колонок, проводили хроматографирование тестовой смеси, состоящей из фенола, бензола и толуола. Разделение проводили в изократическом режиме. Состав ПФ: ацетонитрил/вода = 70/30 об. %. Скорость потока ПФ составляла 100 мкл/мин. Из представленных на рисунке 53 хроматограмм видно, что с увеличением содержания азотсодержащего мономера в исходной полимеризационной смеси изменяется относительное расположение пиков на хроматограмме. На колонках с ВИ наблюдается увеличение времени удерживания для фенола по сравнению с колонкой ДВБ-Ст, на которой фенол элюируется рядом с несорбирующимся компонентом (бромидом калия). Для колонок с 4-винилпиридином наблюдается изменение порядка выхода пиков веществ: на хроматограмме фенол элюируется после бензола и толуола (рис. 53 (ж, з)).

На рисунке 54 представлены примеры разделения ароматических соединений с одной, двумя и тремя фенольными группами: бензол-1,3,5-триол, бензол-1,4-диол, бензол-1,3-диол, бензол-1,2-диол, фенол. Градиент состава ПФ подбирали таким образом, чтобы достигнуть удовлетворительного разрешения пиков за минимальное время. Из представленных хроматограмм видно, что колонка ДВБ-Ст позволяет отделить фенол от группы пиков остальных веществ, которые не делятся на данной колонке. В то же время на колонках ВИ10 и ВП10, можно достаточно хорошо разделить все компоненты исследуемой смеси.

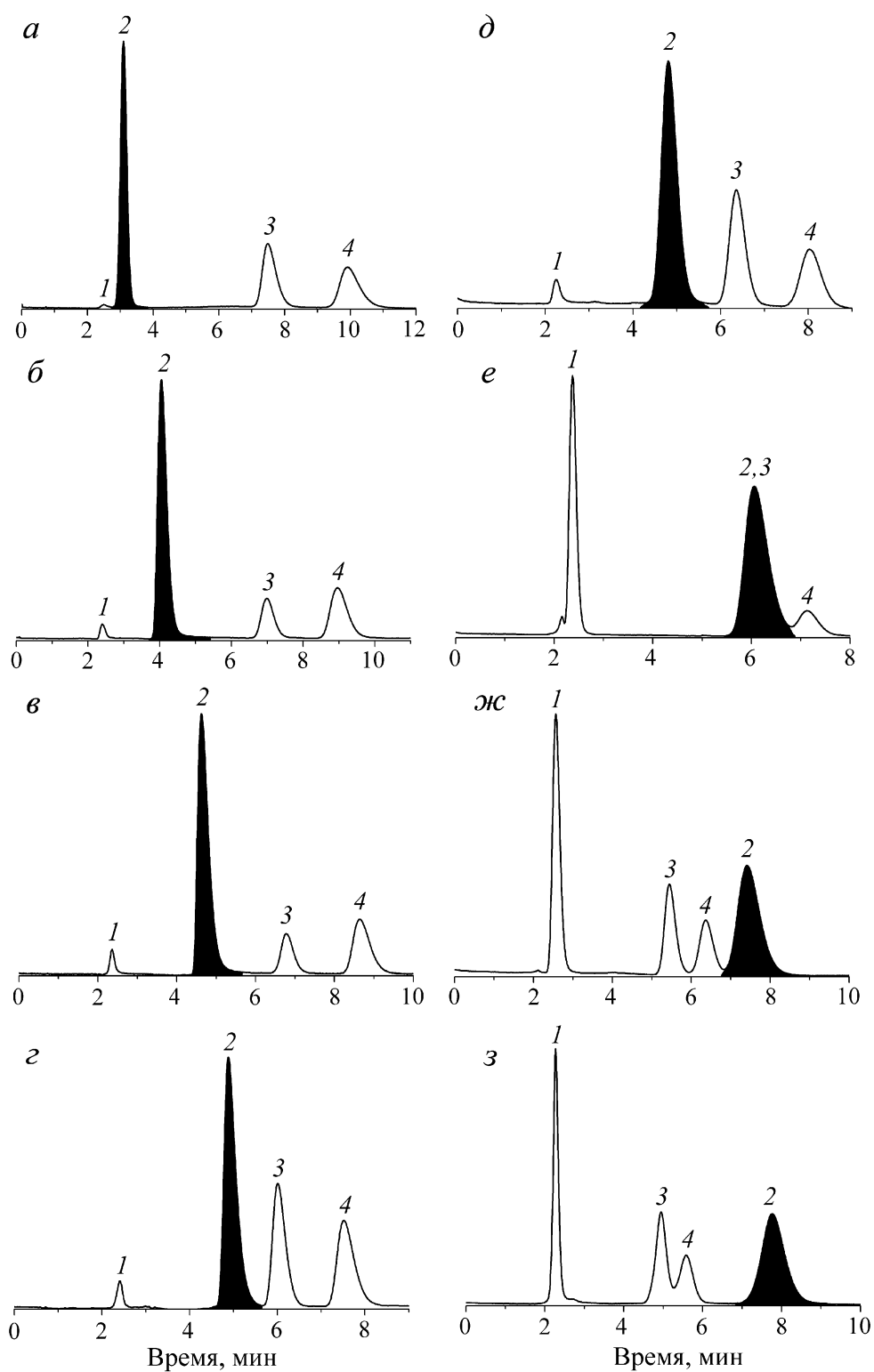


Рис. 53. Разделение смеси фенола, бензола и толуола на приготовленных колонках. ДВБ-Ст (а), ВИ10 (б), ВИ17 (в), ВИ25 (г), ВП10 (д), ВП20 (е), ВП30 (ж), ВП40 (з). ПФ – ацетонитрил/вода (70/30 об. %). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны: 254 нм. 1 – КВг, 2 – фенол, 3 – бензол, 4 – толуол.

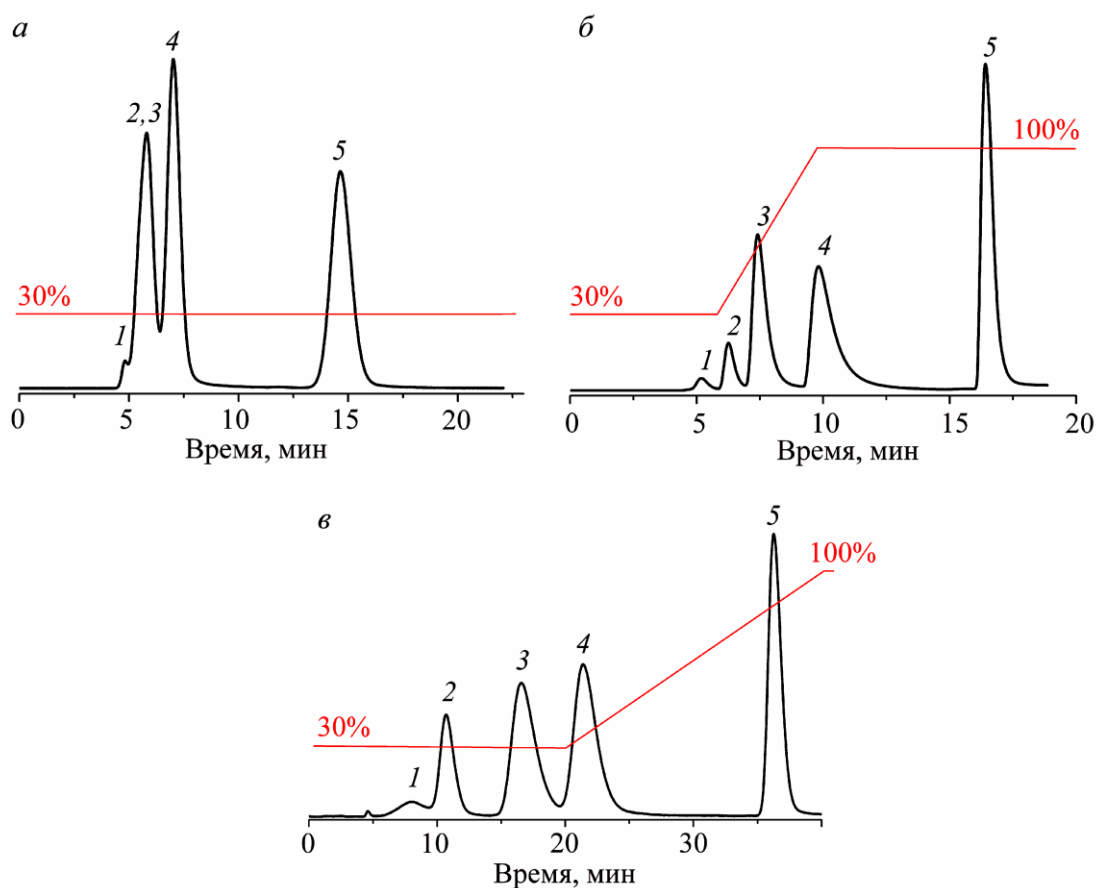


Рис. 54. Разделение смеси ароматических соединений с фенольными группами на подготовленных колонках: ДВБ-Ст длиной 85 мм (а), ВИ10 длиной 86 мм (б), ВП10 длиной 90 мм (в). ПФ – ацетонитрил/вода. Градиентное элюирование (красная линия). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны: 220 нм. 1 – 1,3,5-триоксибензол, 2 – 1,4-дигидроксибензол, 3 – 1,3-дигидроксибензол, 4 – 1,2-дигидроксибензол, 5 – фенол.

На рисунке 55 представлен пример разделения продуктов реакции синтеза нитроспиртов [365]. Хроматографирование проводили на колонке с сорбентом на основе 4-винилпиридина. В качестве детектора использовали УФ-спектрометр. Хроматограмму записывали на двух длинах волн: $\lambda = 220$ нм, при которой достигается максимальная интенсивность пиков 2-нитро-1-фенилэтан-1-ол и бензойной кислоты; $\lambda = 254$ нм, при которой достигается максимальная интенсивность для остальных пиков.

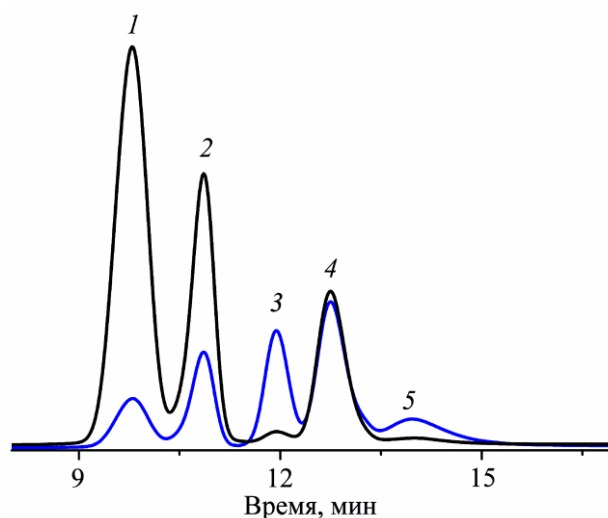


Рис. 55. Разделение продуктов реакции синтеза нитроспиртов на колонке ВП30 длиной 90 мм. Элюент А – вода; элюент Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0 – 5 мин (40 об. % Б), 5 – 15 мин (100 об. % Б), 15 – 17 мин (100 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны: 220 нм (синяя линия), 254 нм (черная линия). 1 – бензальдегид, 2 – 4-нитробензальдегид, 3 – 2-нитро-1-фенилэтанол, 4 – 2-нитро-1-(4-нитрофенил)этан-1-ол, 5 – бензойная кислота.

На рисунке 56 представлен пример разделения ароматических углеводов с различными функциональными группами на колонке ВП20 длиной 90 мм. Смесь состоит из полярных веществ (фенолов с различным числом ОН-групп, нитробензола, пиридина) и неполярных (алкилбензолов, 1,1'-бифенила и фенантрена). Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Из представленной хроматограммы видно, что данная колонка позволяет удовлетворительно разделять смеси, состоящие как из полярных, так и неполярных веществ.

Пример быстрого разделения ароматических соединений на колонке ВИ25 представлен на рис. 57. Хроматографирование проводили в изократическом режиме (70 об. % ацетонитрила в воде). Видно, что все пики разделены удовлетворительно, а время разделения составляет около 2 мин. Поток элюента составлял 850 мкл/мин. Проведение эксперимента при столь высокой скорости потока подвижной фазы возможно благодаря высокой проницаемости монолитной колонки. Перепад давления в колонке длиной 90 мм составил 14 атм. Следует отметить, что при использовании насадочной колонки Диасфер-250-СТ невозможно поддерживать такую скорость потока, поскольку давление при этом превышает 70 атм, т. е., выше максимально возможного рабочего давления хроматографа Милихром А-02.

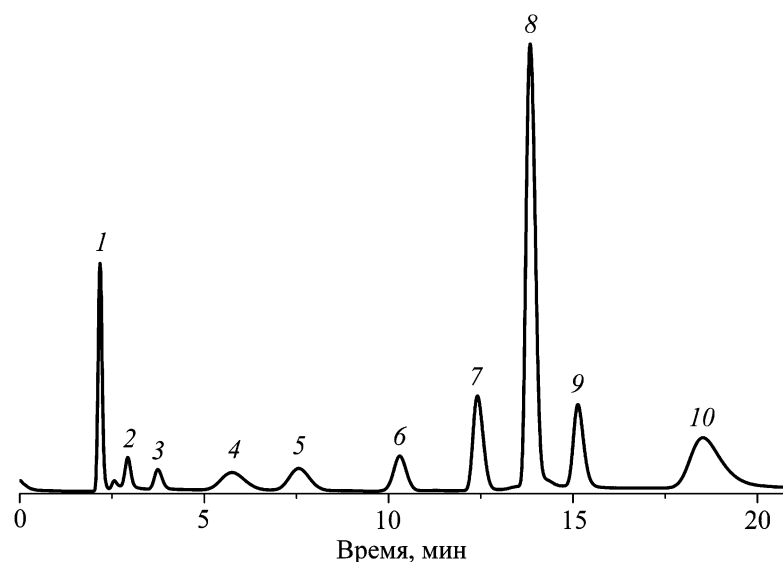


Рис. 56. Разделение веществ различных химических классов на колонке ВП20 длиной 90 мм. Элюент А – вода; Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0–5 мин (50 об. % Б), 5–10 мин (100 об. % Б), 10–23 мин (100 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны: 220 нм. 1 – КВг, 2 – пиридин, 3 – примесь 1,4-дигидроксибензола, 4 – 1,4-дигидроксибензол, 5 – 1-фенил-1-пропанол, 6 – нитробензол, 7 – толуол, 8 – пропилбензол, 9 – бифенил, 10 – фенантрен.

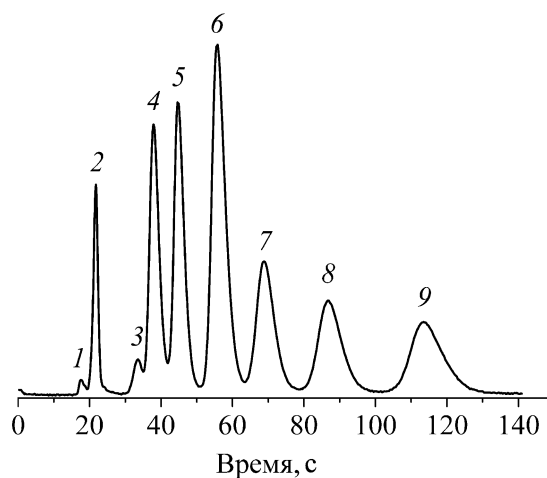


Рис. 57. Быстрое разделение смеси алкилбензолов и пиридина на колонке VI25 длиной 90 мм. ПФ – ацетонитрил/вода (70/30 об. %). Скорость потока 850 мкл/мин ($P = 14$ атм). Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 260 нм. 1 – КВг, 2 – пиридин, 3 – неидент. вещество, 4 – фенол, 5 – бензол, 6 – толуол, 7 – этилбензол, 8 – пропилбензол, 9 – бутилбензол.

Далее рассмотрим возможность разделения биологических макромолекул на монолитных колонках. На рисунке 58а приведен пример разделения смеси, состоящей из лактальбумина, лизоцима, овальбумина и бычьего сывороточного альбумина на колонке VI25. На рисунке 58б можно видеть хроматограммы тех же самых веществ, полученные на коммерческой монолитной колонке Thermo RP-3U длиной 50 мм и диаметром 4.6 мм с сорбентом ДВБ-Ст.

Хроматографирование проводилось в градиентном режиме. ПФ имела следующий состав: элюент А: ацетонитрил (5 об. %)/0.1 об. % ТФК (95 об. %); элюент Б: ацетонитрил (80 об. %)/0.1 об. % ТФК (20 об. %). Из представленных хроматограмм видно, что полное разделение не достигается ни на одной колонке, однако на колонке ВИ25 при удовлетворительном разделении время хроматографирования составляет менее 4 минут при скорости потока 300 мкл/мин. В то время, как на коммерческой колонке время разделения составляет около 7 минут при скорости потока 1 мл/мин. Таким образом, монолитная колонка ВИ25 позволяет разделять данные белки в два раза быстрее. При этом расход подвижной фазы на один анализ примерно в 6 раз меньше, чем на колонке RP-3U.

Преимуществом колонки ВИ25 является то, что она, помимо белковых макромолекул, позволяет проводить разделение молекул малого размера (рис. 57). В то время, как на колонке Thermo RP-3U не удастся провести удовлетворительное разделение малых молекул. Так, в качестве сравнения на рисунке 59 представлены хроматограммы разделения тестовой смеси, состоящей из бромида калия, фенола, бензола, толуола, при составе ПФ ацетонитрил/вода = 70/30 об. % на коммерческой колонке Thermo RP-3U (рис. 59а) и приготовленной монолитной колонки ДВБ-Ст (рис. 59б). Видно, что колонка ДВБ-Ст позволяет удовлетворительно разделить тестовую смесь при скорости потока 100 мкл/мин за 12 мин.

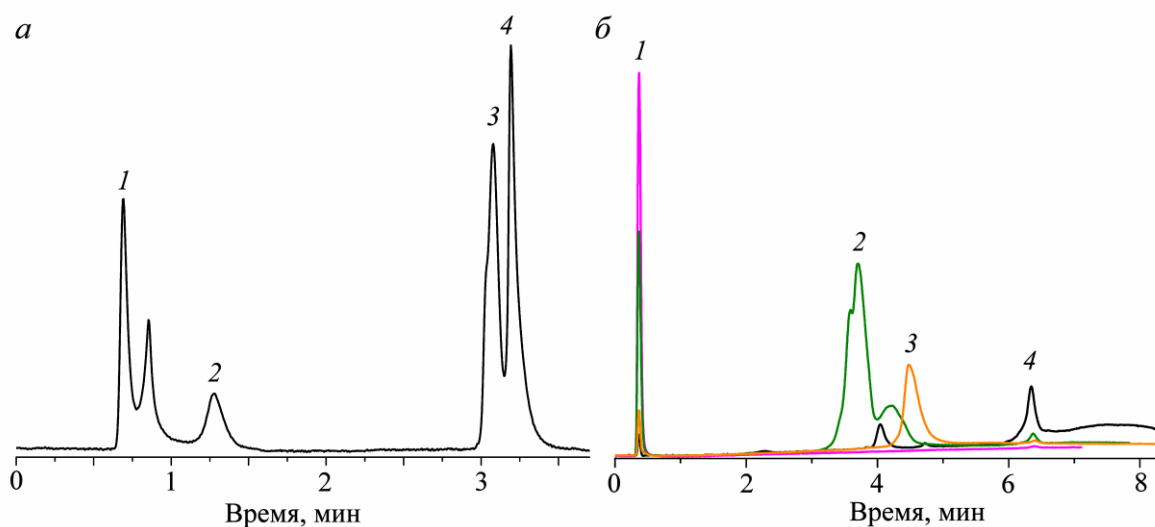


Рис. 58. Пример разделения белковых молекул. 1 – лактальбумин, 2 – лизоцим, 3 – овальбумин, 4 – бычий сывороточный альбумин. Элюент А – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (5/95 об. %); Элюент Б – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (95/5 об. %). (а) - колонка ВИ25 длиной 90 мм. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 280 нм. Градиентное элюирование: 0 – 1.5 мин (16 об. % Б), 1.5 – 2.5 мин (80 об. % Б), 2.5 – 5 мин (80 об. % Б). Скорость потока 300 мкл/мин. (б) – монолитная коммерческая колонка Thermo RP-3U с сорбентом ДВБ/Ст 4.6•50 мм. Детектор заряженных аэрозолей.

Градиентное элюирование: 15 – 80 % Б за 12 мин. Скорость потока 1 мл/мин.

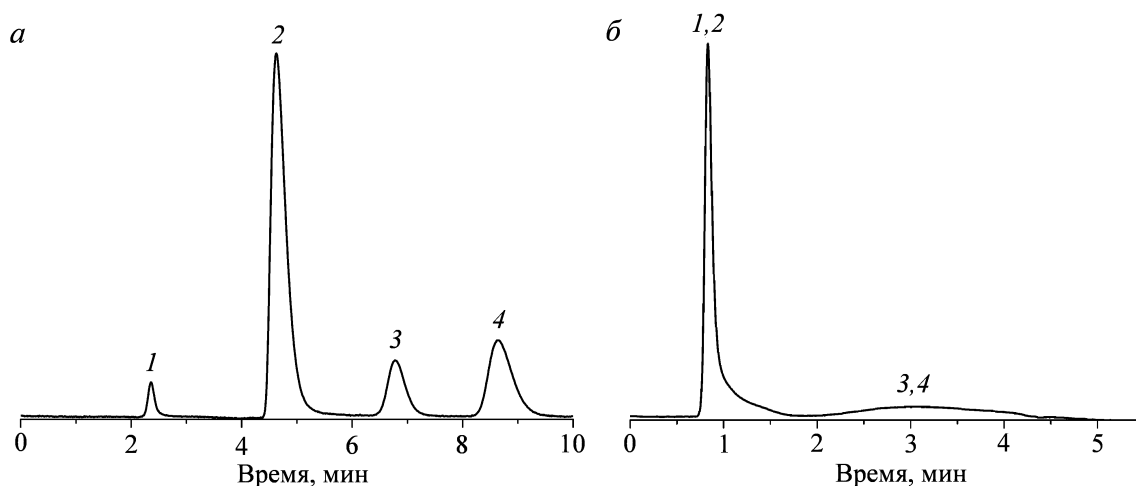


Рис. 59. Пример разделения тестовых веществ: (а) – колонка ВИ25 90 мм, скорость потока 100 мкл/мин, (б) – колонка Thermo RP-3U. Скорость потока 1 мл/мин. ПФ – ацетонитрил/вода (70/30 об. %). Длина волны – 254 нм. 1 – КBr, 2 – фенол, 3 – бензол, 4 – толуол.

На рисунке 60 показано разделение бычьего сывороточного альбумина (БСА) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Эти белки имеют сходную структуру и очень близкую молекулярную массу: 66438 Да для ЧСА и 66411 Да для БСА [366]. Как можно видеть на рисунке 60, ЧСА имеет симметричный узкий пик, а БСА имеет затянутый хвост на всех хроматограммах. Колонка ДВБ-Ст позволяет достаточно хорошо разделить белки (рис. 60а), но пик БСА разбивается на две части. Колонка ВП30 не позволяет разделить БСА с ЧСА и слабо их удерживает. (рис. 60з). В результате оба соединения элюируются из колонки как один неудерживаемый пик. Колонки ВИ17 (рис. 60б) и ВП10 (рис. 60в) обеспечивают удовлетворительное разрешение пиков $R = 1.08$ и $R = 1.53$ соответственно. Оба пика имеют удовлетворительную форму при времени удерживания около 6 минут. Полученное разделение позволяет проводить количественную обработку пиков.

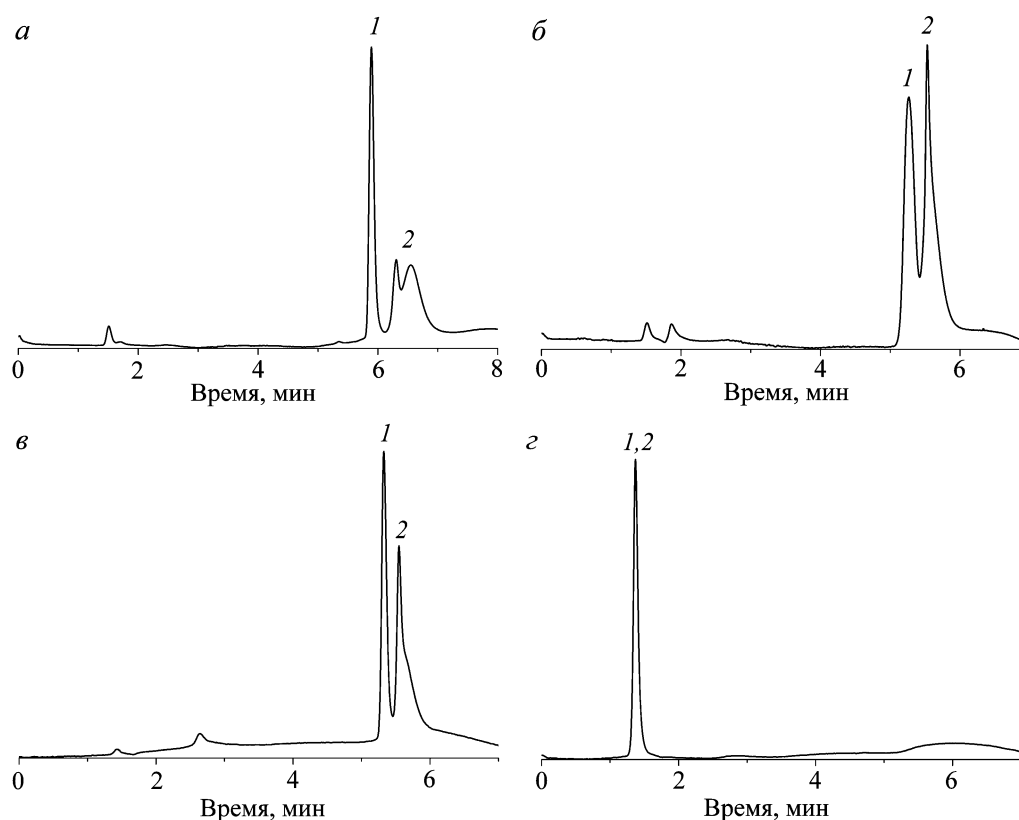


Рис. 60. Разделение человеческого сывороточного альбумина (1) и бычьего сывороточного альбумина (2) на монолитных колонках длиной 90 мм: ДВБ-Ст (а), ВИ17 (б), ВП10 (в), ВП30 (г). Элюент А – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (5/95 об. %); Элюент Б – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (95/5 об. %). Градиент: 0 – 2 мин (16 об. % Б); 2 – 4.5 мин (80 об. % Б); 4.5 – 10 мин (80 об. % Б). Скорость потока 150 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 214 нм.

Примером, который демонстрирует изменение акцепторных свойств (разд. 3.3.4.2.1) приготовленных монолитов, является разделение смеси фенолов и диметилфталата. На рисунке 61а приведена хроматограмма, полученная на колонке ДВБ-Ст. Видно, что фенолы (доноры протонов) удерживаются слабо, и диметилфталат, не обладающий свойствами донора протона, элюируется среди группы фенолов. То есть, на колонке ДВБ-Ст удерживание веществ не зависит от их кислотных свойств. На колонке ВИ25 наблюдается увеличение времен удерживания фенолов при улучшении селективности, а диметилфталат элюируется перед фенолами и хорошо отделяется от них (рис. 61б). При разделении этой же смеси на колонке ВП30 наблюдается увеличение времен удерживания фенолов и их дальнейшее отделение от диметилфталата, который элюируется значительно раньше (рис. 61в). Такое поведение колонок ВИ25 и ВП30, по-видимому, связано с их способностью выступать в роли акцептора протона. Действительно, если посмотреть на рисунок 45, то видно, что для колонки ДВБ-Ст коэффициент a , отвечающий за протоноакцепторные свойства, имеет отрицательное значение (-1.24). Для колонки ВИ25 коэффициент a положительный и равен 0.09. Максимальное значение

коэффициента α (0.57) имеет колонка ВП30, на которой удерживание фенолов значительно сильнее, чем на колонках ДВБ-Ст и ВИ25.

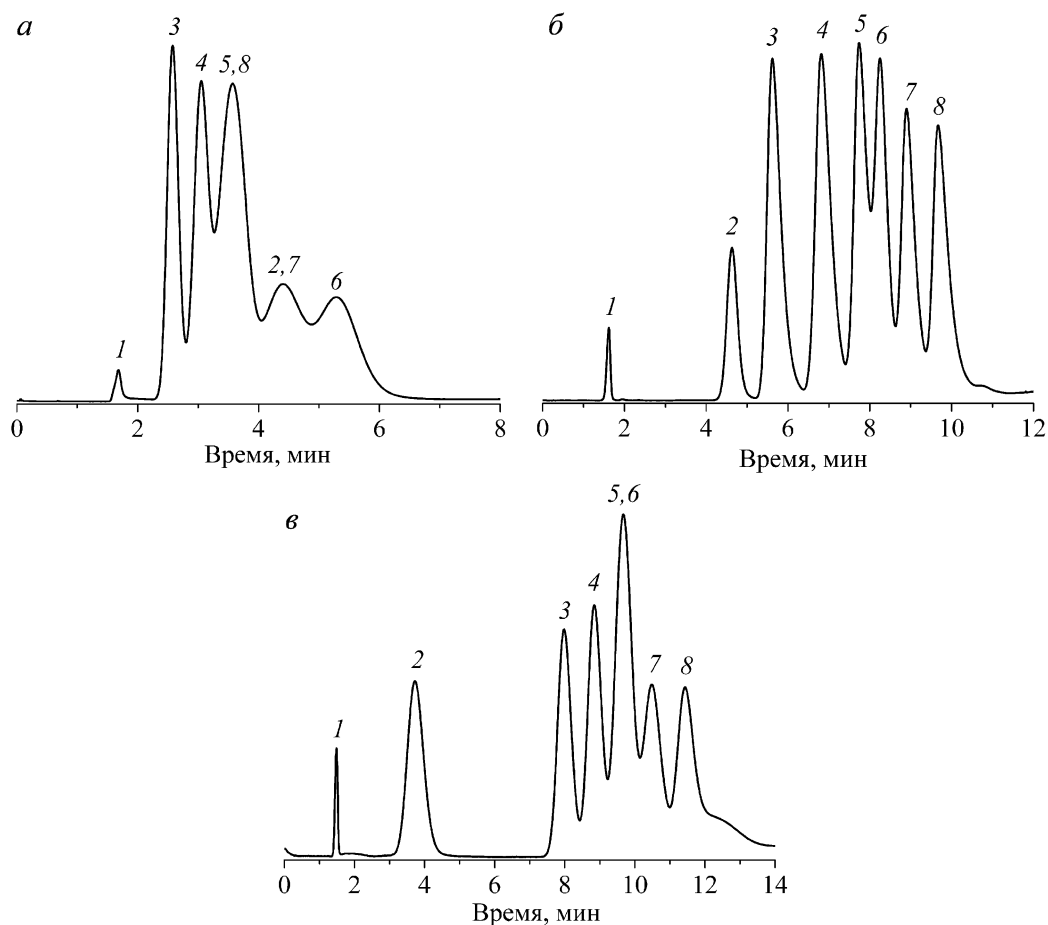


Рис. 61. Разделение смеси фенолов и диметилфталата на подготовленных колонках: ДВБ-Ст (*a*), ВИ25 (*б*), ВП30 (*в*). Скорость потока 150 мкл/мин. Элюент А – вода, элюент Б – ацетонитрил. Градиент: 0 – 3.5 мкл (50 об. % Б), 3.5 – 10 мин (100 об. % Б). Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 220 нм. 1 – KBr, 2 – диметилфталат, 3 – фенол, 4 – 4-метилфенол, 5 – 2-метилфенол, 6 – 2,6-диметилфенол, 7 – 2,3-диметилфенол, 8 – 2-хлорфенол.

Монолитные колонки на основе 1-винилпирролидона

На рисунке 62 представлен пример разделения ароматических нитросоединений. Хроматографирование проводили в градиентном режиме на колонке ВПр30_ДВБ50_П длиной 70 мм. Из хроматограммы видно, что пики разделены удовлетворительно. В том числе хорошо разделяются п, м, о - изомеры нитроанилина (пики 3, 4 и 5).

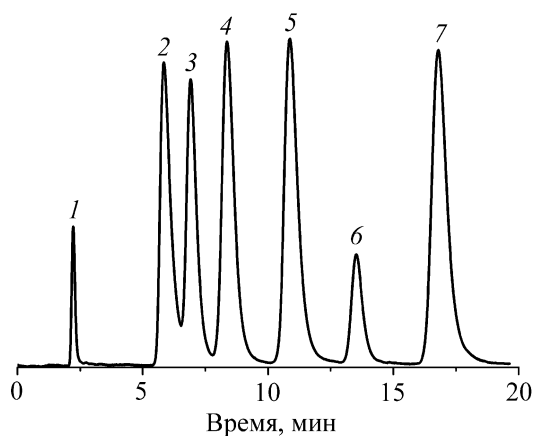


Рис. 62. Пример разделения смеси нитросоединений на колонке ВПр30_ДВБ50_П длиной 70 мм. Элюент А – вода; элюент Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0 – 5 мин (40 об. % Б), 5 – 10 мин (50 об. % Б), 10 – 20 мин (50 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 220 нм. 1 – КВг, 2 – 2-амино-4-нитрофенол, 3 - 4-нитроанилин, 4 - 3-нитроанилин, 5 - 2-нитроанилин, 6 – нитробензол, 7 – 2,4-нитротолуол.

Пример разделения фенолов, содержащих одну, две и три ОН-группы, на колонке ВПр30_ДВБ60_П представлен на рис. 63. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и воды. Видно, что все пики хорошо разделены.

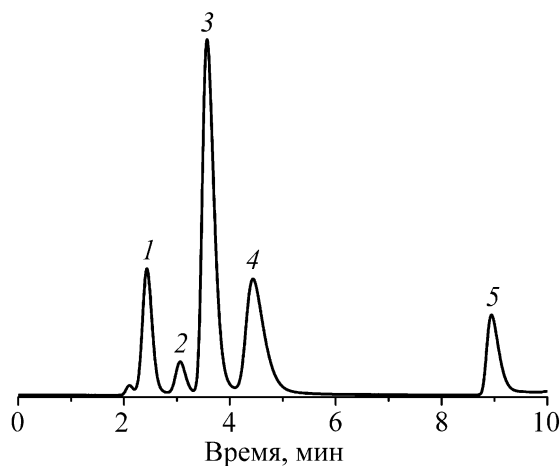


Рис. 63. Пример разделения смеси фенолов на колонке ВПр30_ДВБ60_П длиной 70 мм. Элюент А – вода; элюент Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0 – 4.5 мин (30 об. % Б), 4.5 – 5 мин (100 об. % Б), 5 – 10 мин (100 об. % Б). Скорость потока ПФ 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 220 нм. 1 – 1,3,5-триоксibenзол, 2 – 1,2-дигидроксибензол, 3 – 1,3-дигидроксибензол, 4 – 1,4-дигидроксибензол, 5 – фенол.

На рисунке 64 представлен пример разделения смеси хлорпроизводных фенола на колонке ВПр30_ДВБ60_П. Длина колонки 70 мм. Хроматографирование проводили в градиентном

режиме. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и воды. Видно, что все пики хорошо разделены.

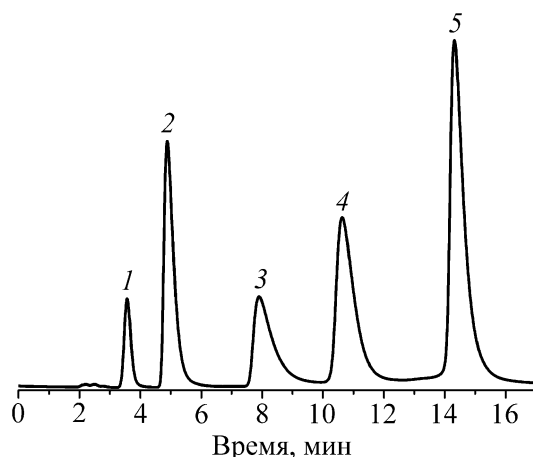


Рис. 64. Пример разделения смеси хлорпроизводных фенола на колонке ВПр30_ДВБ60_П длиной 70 мм. Элюент А – вода; элюент Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0 – 5 мин (60 об. % Б), 5 – 11 мин (100 об. % Б), 11 – 17 мин (100 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 220 нм. 1 – фенол, 2 – 2-хлорфенол, 3 – 2,4-дихлорфенол, 4 – 2,4,6-трихлорфенол, 5 – пентахлорфенол.

Следующие два рисунка демонстрируют возможность разделения макромолекул на колонках на основе 1-винил-2-пирролидона.

Пример разделения натурального коровьего молока представлен на рис. 65. Приготовление анализируемой пробы и идентификацию компонентов проводили согласно методике, описанной в работе [367]. Свежее молоко обезжиривали центрифугированием в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отбирали и добавляли к ней 10 об. % раствор уксусной кислоты до достижения рН 4 – 5. После чего, осадок отфильтровывали. Фильтрат анализировали на колонке ВПр30_ДВБ30_П в градиентном режиме. В качестве элюента А использовали смесь ацетонитрила и 0.1 об. % раствора трифторуксусной кислоты в соотношении 5/95 об. % соответственно, элюента Б – смесь тех же компонентов в соотношении 95/5 об. % соответственно.

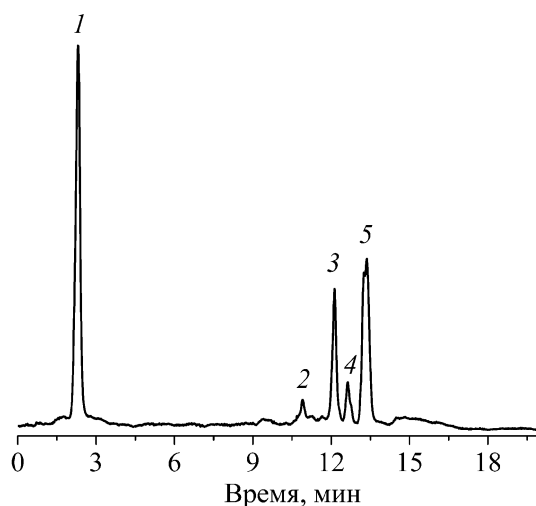


Рис. 65. Пример разделения натурального молока на колонке ВПр30_ДВБ30_П длиной 77 мм. Элюент А – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (5/95 об. %), элюент Б – ацетонитрил/0.1 об. % ТФК (95/5 об. %). Градиент: 0 – 3 мин (15 об. % Б), 3 – 15 мин (70 об. % Б), 17 – 20 мин (70 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 280 нм. 1 – не идентифицированный компонент(-ы), 2 – бычий сывороточный альбумин, 3 – α -лактальбумин, 4 – β -лактоглобулин В, 5 – β -лактоглобулин А.

На рисунке 66 можно видеть хроматограммы полипропиленгликолей (ППГ) с молекулярной массой 250 и 425 г/моль. Растворы полипропиленгликолей концентрацией 5 мг/мл готовили в смеси ацетонитрил/вода в соотношении 10/90 об. об. %. Колонку устанавливали в хроматограф DIONEX UltiMate 3000 (Thermo scientific, США) с детектором заряженных аэрозолей. Пробу объемом 3 мкл вводили в колонку с помощью автодозатора. Разделение ППГ на колонке ВПр30_ДВБ50_П проходит, вероятно, по обращенно-фазовому механизму. Каждая молекула полипропиленгликоля имеет относительно гидрофобную полиэфирную цепь и гидрофильные концевые ОН группы. Чем короче длина цепи ППГ, тем больше влияние на механизм удерживания оказывают концевые группы. Таким образом, чем короче цепь, тем более гидрофильные свойства проявляет макромолекула ППГ. В обращенно-фазовом режиме разделение ППГ происходит по длине цепи макромолекул: первыми элюируются самые короткие молекулы, а в конце самые длинные. Таким образом, по хроматограмме на рис. 66 можно оценить распределение молекул ППГ по молекулярным массам. При сравнении хроматограмм на рис. 66а, можно предположить, что ППГ-250 имеет более однородный изомерный состав, поскольку отчетливо видны основные пики гомологического ряда. ППГ425, наоборот, имеет менее однородный состав (рис. 66б). Между пиками, отвечающими за линейные изомеры, наблюдаются довольно большие пики, которые, по-видимому, отвечают за разветвленные полипропиленгликоли.

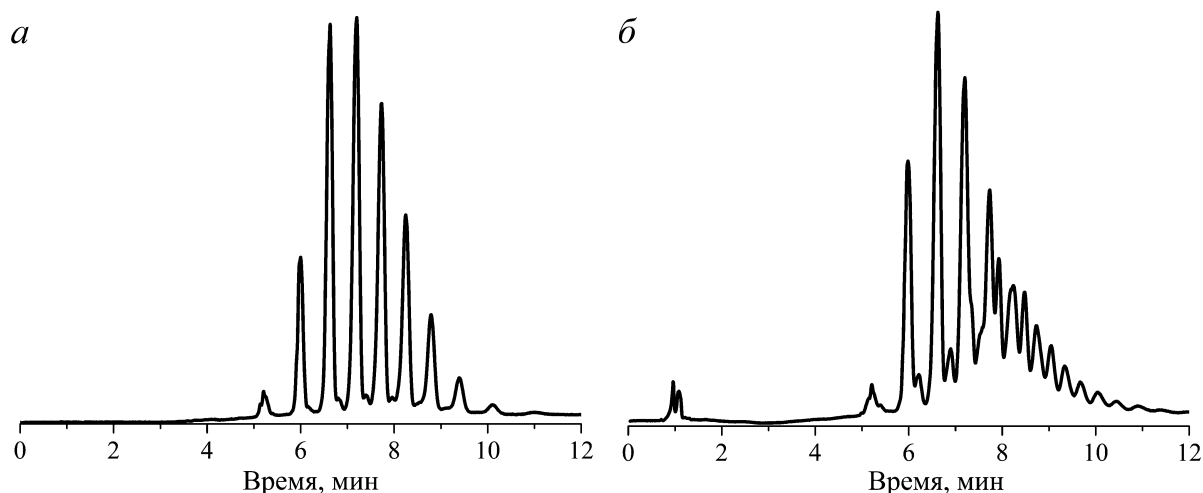


Рис. 66. Хроматограммы полипропиленгликоля с $M_r = 250$ г/моль (Serva) (*а*) и полипропиленгликоля с $M_r = 425$ г/моль (Loba Feinchemie) (*б*). Колонка ВПр30_ДВБ50_П длиной 88 мм. Детектор заряженных аэрозолей. Температура: 30 °С. Элюент А – вода, Б – ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0 – 7 мин (10 – 70 об. % Б), 7 – 12 мин (70 об. % Б). Скорость потока элюента 300 мкл/мин.

Монолитные колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола

Гидрофильные свойства монолитных колонок на основе 1-винил-1,2,4-триазола позволяют проводить разделение малых полярных молекул, которые очень слабо удерживаются в обращенно-фазовой хроматографии. Типичный пример малых полярных молекул – фармацевтические препараты.

На рисунке 67 представлен пример разделения лекарственного препарата «Пенталгин», в состав которого входят следующие компоненты: кофеин (1,3,7-триметилпурин-2,6-дион), парацетамол (N-(4-гидроксифенил)ацетамид), дротаверина гидрохлорид ((1-(3,4-диэтоксibenзилиден)-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин в виде гидрохлорида), напроксен ((S)-6-метокси- α -метил-2-нафталинуксусная кислота в виде натриевой соли). Разделение проводили на колонке ВТр40 длиной 105 мм. В качестве ПФ использовали смесь ацетонитрила (элюент Б) и 0.1 об. % раствора трифторуксусной кислоты (элюент А). Хроматографирование вели при составе ПФ А/Б = 93/7 об. % и скорости потока 200 мкл/мин. Из представленной хроматограммы видно, что компоненты смеси разделяются удовлетворительно.

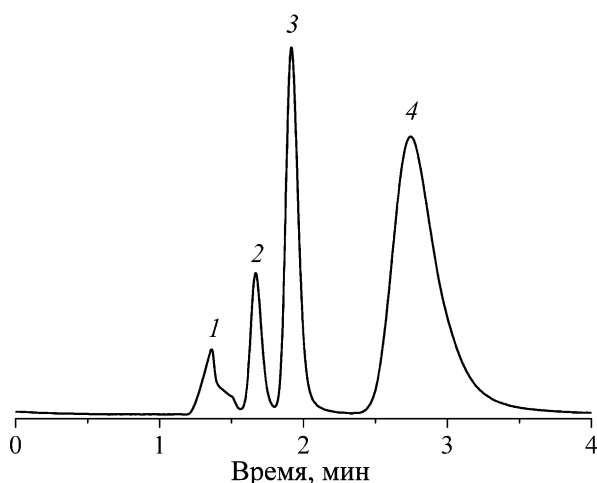


Рис. 67. Пример разделения лекарственного препарата «Пенталгин» на колонке ВТр40 длиной 105 мм. Элюент А – 0.1 % ТФК, элюент Б – ацетонитрил. ПФ: А/Б = 7/93 %. Скорость потока ПФ 200 мкл/мин. 1 – кофеин, 2 – дротаверин, 3 – парацетамол, 4 – напроксен.

Пример разделения лекарственного препарата «Каффетин» представлен на рис. 68. Лекарство «Каффетин» состоит из трех действующих веществ: кофеин (1,3,7-триметилпурин-2,6-дион), парацетамол (N-(4-гидроксифенил)ацетамид), и пропифеназон (4-изопропил-1,5-диметил-2-фенил-1Н-пиразол-3(2Н)-он). Проводили сравнение возможности разделения компонентов данного препарата в обращенно-фазовом и гидрофильном режимах. Хроматографирование проводили на колонке ВТр40 длиной 105 мм при скорости потока элюента 200 мкл/мин. В качестве ПФ использовали смесь ацетонитрила (элюент Б) и 0.1 об. % ТФК (элюент А). Обращено-фазовый режим реализовывали при составе ПФ 60/40 об. % (А/Б), гидрофильный – А/Б = 2/98 об. %. Из представленных хроматограмм видно, что три основных компонента данного препарата удовлетворительно разделяются только в обращено-фазовом режиме (рис. 68а). Это можно объяснить тем фактом, что пропифеназон – гидрофобное вещество ($\lg P = 1.94$) и удерживается согласно обращено-фазовому механизму. Кофеин практически не удерживается на данной колонке во всем диапазоне состава ПФ. Парацетамол – относительно гидрофильное вещество и его время удерживания увеличивается с увеличением доли ацетонитрила в ПФ, начиная с некоторого значения, то есть тогда, когда колонка начинает работать в режиме гидрофильной хроматографии.

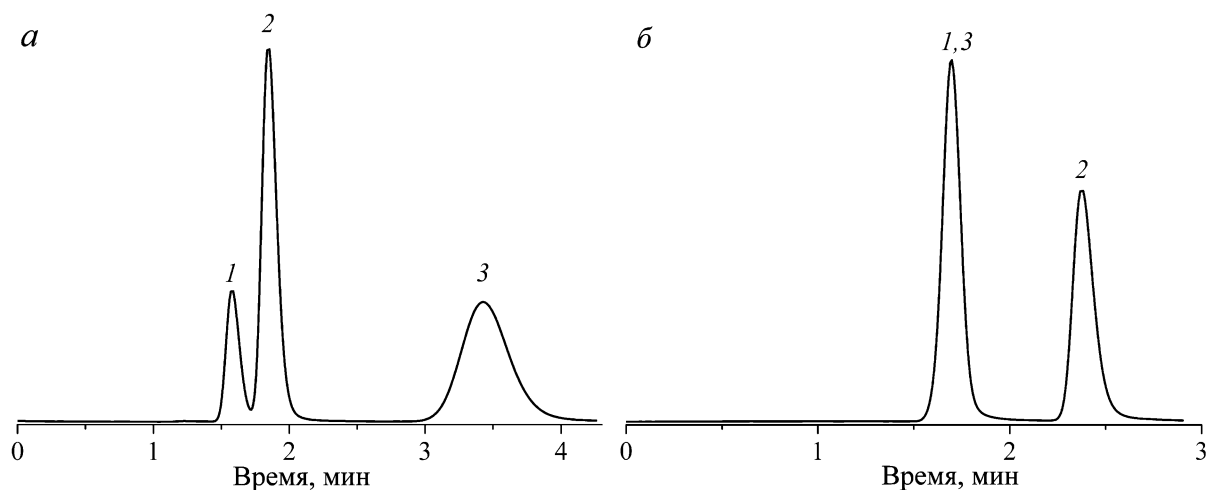


Рис. 68. Пример разделения лекарственного препарата «Каффетин» на колонке ВТр40 длиной 105 мм. Элюент А – 0.1 об. % ТФК, элюент Б – ацетонитрил. Состав ПФ: А/Б = 60/40 об. % (а), А/Б = 2/98 об. % (б). Скорость потока элюента 200 мкл/мин. 1 – кофеин, 2 – парацетамол, 3 – пропифеназон.

К полярным гидрофильным веществам относятся молекулы природных моно- и дисахаридов. На рисунке 69 представлен пример разделения смеси углеводов. Хроматографирование проводили на колонке ВТр40 длиной 105 мм. В качестве ПФ использовали смесь ацетона и воды в соотношении 96/4 об. %. Скорость потока составляла 300 мкл/мин. Было установлено, что данная колонка способна разделять аномеры глюкозы, фруктозы и мальтозы. Разделение проводили в гидрофильном режиме. Из представленной хроматограммы видно, что все компоненты смеси разделены удовлетворительно.

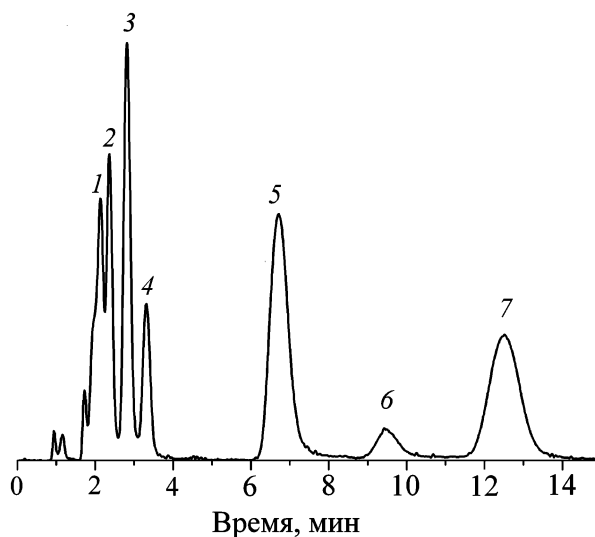


Рис. 69. Пример разделения смеси углеводов на колонке ВТр40 длиной 105 мм. ПФ: ацетон/вода (96/4 об. %). Скорость потока 300 мкл/мин. Детектор заряженных аэрозолей. 1, 2 – аномеры фруктозы, 3 – β -D-глюкоза, 4 – α -D-глюкоза, 5 – сахароза, 6, 7 – аномеры мальтозы.

Модифицированные монолитные колонки

На приготовленных колонках проводили разделение смесей полярных веществ в режиме обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии. На рис. 70 можно видеть хроматограммы смеси производных бензойной кислоты на колонке 2МП. В подвижной фазе, содержащей 50 об. % ацетонитрила (рис. 70б) разделение происходит по обращенно-фазовому механизму. Салициловая кислота выходит последним пиком, а 3-гидроксibenзойная и 3,5-дигидроксibenзойная кислоты не разделены. При повышении доли ацетонитрила в подвижной фазе до 95 об. %, меняется порядок выхода салициловой и 3,5-дигидроксibenзойной кислот. В этом случае все компоненты смеси разделены удовлетворительно.

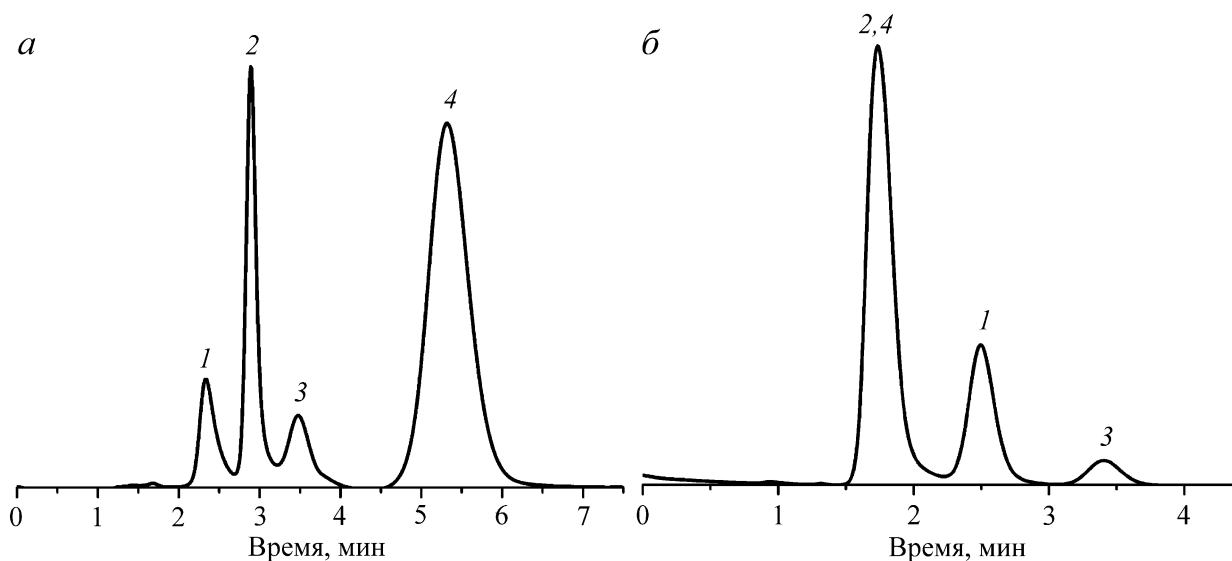


Рис. 70. Разделение смеси бензойных кислот. Состав подвижной фазы: (а) ацетонитрил/0.3 об. % ТФК = 95/5 об. %, (б) – ацетонитрил/0.3 об. % ТФК = 50/50 об. %. Колонка 2МП, длина 60 мм. Скорость потока 150 мкл/мин. 1 – салициловая кислота, 2 – 3-гидроксibenзойная кислота, 3 – 2,4-дигидроксibenзойная кислота, 4 – 3,5- дигидроксibenзойная кислота. Детектор – УФ-спектрометр, $\lambda=220$ нм.

При разделении изомеров нитроанилина на этой же колонке, наоборот, наиболее подходящим режим с относительно небольшим содержанием ацетонитрила в ПФ. На рисунке. 71 представлен пример разделения о, м, п - нитроанилинов при разном составе подвижной фазы. Видно, что при объемной доле ацетонитрила в ПФ 50 об. % все три пика разделяются удовлетворительно, тогда как при объемной доле ацетонитрила 95 об. % разделения изомеров не происходит.

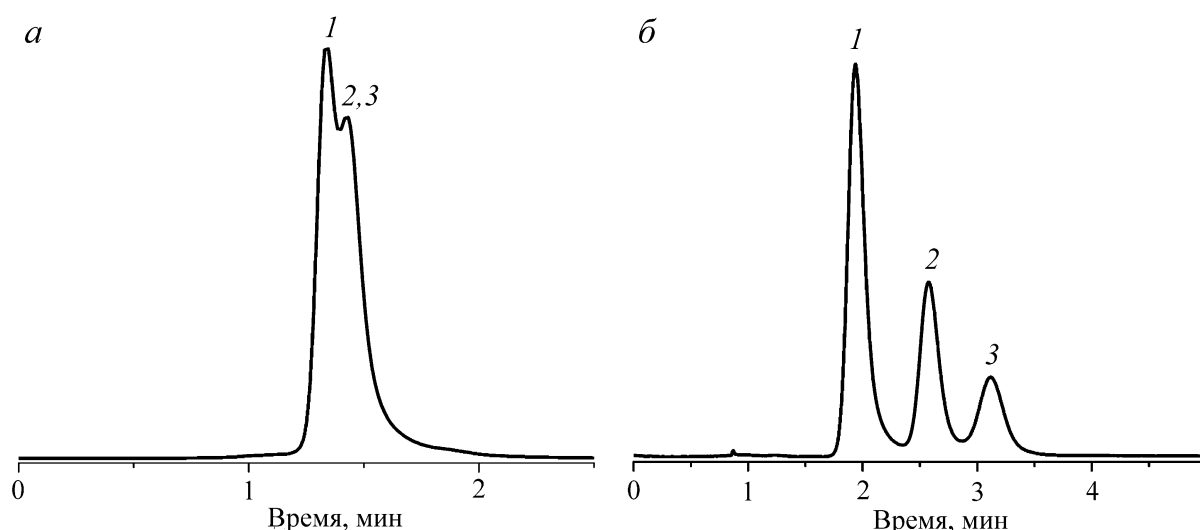


Рис. 71. Разделение нитроанилинов. Колонка 2МР, длина 60 мм, диаметр 1.99 мм. (а) – при 95 об. % ацетонитрила, б – при 50 об. % ацетонитрила в подвижной фазе. Состав элюента: ацетонитрил и 0.3% раствор трифторуксусной кислоты. Скорость потока 150 мкл/мин. 1 – о-нитроанилин, 2 – п-нитроанилин, 3 – м-нитроанилин. Детектор – УФ-спектрометр, $\lambda=260$ нм.

Колонка, модифицированная 1-метилимидазолом, хорошо подходит для быстрого разделения компонентов противовоспалительного лекарственного препарата «Аскофен-П» в режиме гидрофильной хроматографии. Установлено, что в данном препарате помимо перечисленных на упаковке действующих веществ, обнаружена салициловая кислота. Эта кислота появляется в виде примеси при производстве препаратов, содержащих ацетилсалициловую кислоту. Салициловая кислота токсична в больших дозах. В связи с этим необходимо знать, в каких препаратах она присутствует. Её не включают в состав лекарственных препаратов, и её содержание не нормировано в ГФРФ, а задается в Фармакопейной статье предприятия, свободного доступа к которой нет. Однако, согласно Фармакопее США, количество салициловой кислоты в таблетках, содержащих парацетамол, кофеин и ацетилсалициловую кислоту, не должно превышать 3 %.

Для исследования содержания салициловой кислоты выбрали 4 препарата: «Аскофен-П», «Ацетилсалициловая кислота», «Цитрамон-П» и «Ацекардол». Построили градуировочную зависимость. Процесс приготовления пробы лекарственного вещества проводили следующим образом: таблетки препаратов тщательно растирали в ступке и брали навеску массой 0.200 г. Навески растворяли в 10 мл смеси ацетонитрила и 0.5 об. % раствора трифторуксусной кислоты в воде в соотношении 95/5 соответственно. Пробу объемом 1 мкл по 3 раза вводили в монолитную колонку с помощью автоматического дозатора. Для хроматографирования использовали элюент: смесь ацетонитрила и 0.5 об. % раствора трифторуксусной кислоты в воде в соотношении 95/5 соответственно, скорость потока составляла 250 мкл/мин.

Хроматографирование вели на длине волны $\lambda = 238$ нм. Используя уравнение градуировочной зависимости определили концентрацию салициловой кислоты в пробах лекарственных препаратов и стандартное отклонение: «Аскофен-П» 1.16 ± 0.03 %, «Ацетилсалициловая кислота» 0.39 ± 0.03 %, «Цитрамон-П» 1.11 ± 0.02 %, «Ацекардол» 0.13 ± 0.00 %.

На рисунке 72 представлены хроматограммы исследуемых лекарственных препаратов.

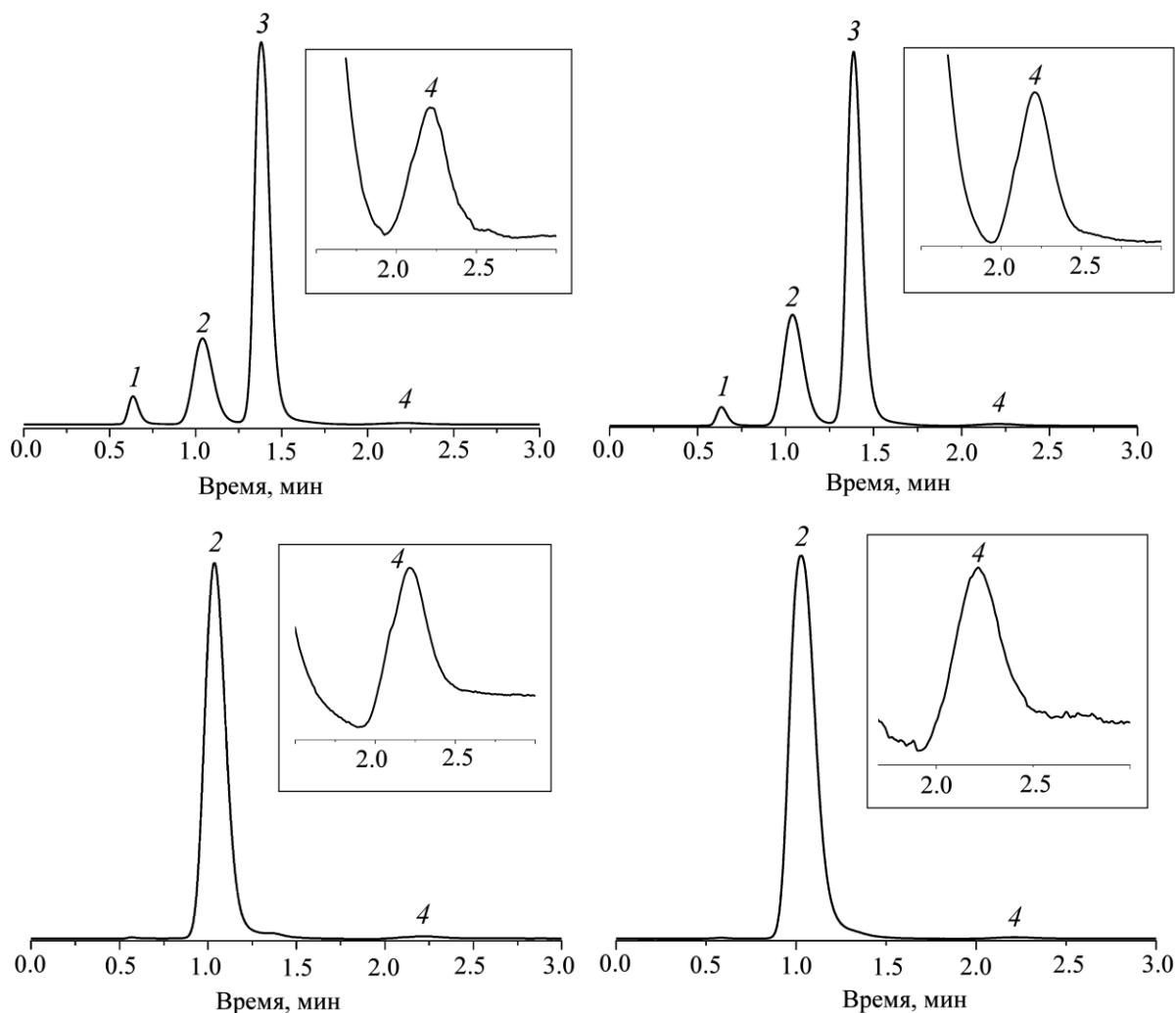


Рис. 72. Хроматограммы лекарственных препаратов. *а* – Аскофен-П, *б* – Цитрамон П, *в* – Ацетилсалициловая кислота, *г* – Ацекардол. Условия хроматографирования: скорость потока 250 мкл/мин. Состав элюента: ацетонитрил и 0.5 об. % ТФК в соотношении 95/5. 1 – кофеин, 2 – ацетилсалициловая кислота, 3 – парацетамол, 4 – салициловая кислота.

Также провели разделение препарата Аскофен-П на коммерческой насадочной колонке ProntoSIL-120-5-C18 в градиентном режиме при следующих условиях: скорость потока подвижной фазы 250 мкл/мин. Элюент А - 0.1 об. % ТФК, элюент Б – ацетонитрил. Из представленной на рисунке 73 хроматограммы видно, что разделение осуществляется за 5 минут и в градиентном режиме. В то время как на монолитной колонке время разделения составляет 2.5 мин и в изократическом режиме. Кроме того, давление на насадочной колонке во

время хроматографирования составляло 50 атм, а на монолитной – 5 атм. Отсюда можно сделать вывод, что монолитная колонка для решения такой задачи лучше подходит, чем коммерческая насадочная колонка, несмотря за более низкую эффективность.

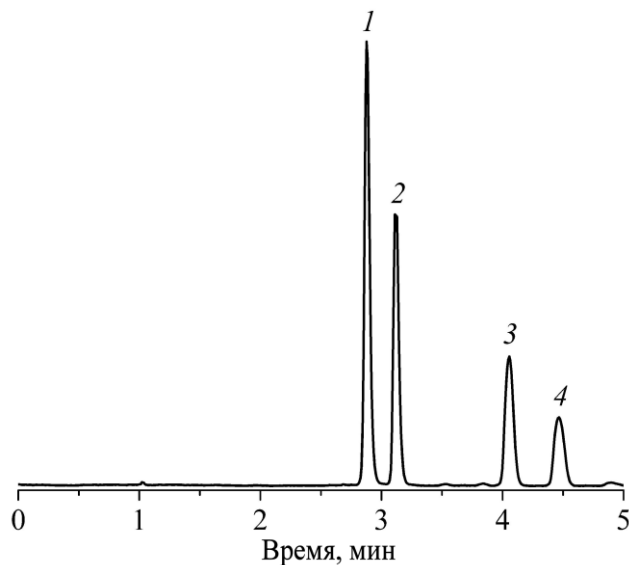


Рис. 73. Хроматограмма лекарственного препарата «Аскофен-П» на коммерческой насадочной колонке ProntoSIL-120-5-C18. Условия хроматографирования: скорость потока подвижной фазы 250 мкл/мин. Элюент А - 0.1 об. % ТФК, элюент Б – ацетонитрил. Условия градиента: 5% – 100 % (Б) за 2000 мкл. Перепад давления 50 атм. 1 – парацетамол, 2 – кофеин, 3 – ацетилсалициловая кислота, 4 – салициловая кислота.

Колонка, модифицированная 4-метилпиридином, также подходит для разделения компонентов препарата «Аскофен-П». На рисунке 74 представлен пример разделения данного препарата. Однако для большей наглядности в раствор препарата был добавлен раствор салициловой кислоты, для увеличения ее содержания в пробе. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и 0.3 % водного раствора трифторуксусной кислоты в соотношении 91/9 об. % соответственно. Скорость потока составляла 300 мкл/мин, при этом перепад давления на колонке был равен 6 атм. Из представленной хроматограммы видно, что все компоненты препарата разделяются удовлетворительно за 2 минуты.

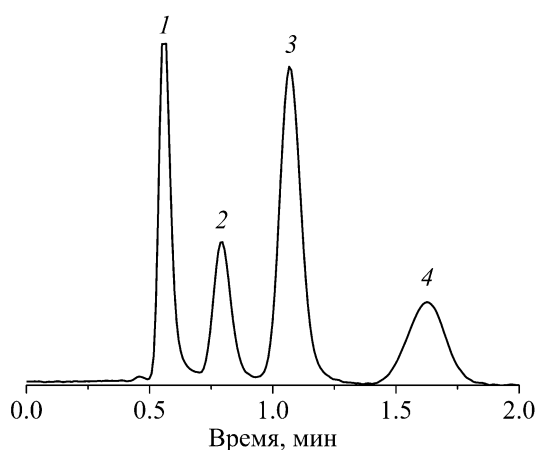


Рис. 74. Разделение компонентов лекарственного препарата «Аскофен-П» на колонке, модифицированной 4-метилпиридином, длиной 75 мм. ПФ: ацетонитрил/0.3 об. % ТФК (91/9 об. %). Скорость потока 300 мкл/мин Детектор – УФ-спектрометр, длина волны 274 нм. 1 – кофеин, 2 – ацетилсалициловая кислота, 3 – парацетамол, 4 – салициловая кислота.

Представленные примеры разделений на приготовленных колонках позволяют сделать вывод, что данные монолитные колонки подходят для решения различных аналитических задач.

Заключение

Современное состояние в области решения задач разделения веществ методом ВЭЖХ требует поиска новых неподвижных фаз для хроматографических колонок, которые будут обладать необходимой селективностью, высокой проницаемостью и достаточной загрузочной емкостью.

Проведенные исследования показали, что органические монолитные материалы на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и гетероциклических азотсодержащих сомономеров являются достойной альтернативой единственной существующей коммерческой монолитной колонке Thermo RP-3U. Так, приготовленные колонки способны разделять как малые молекулы различной полярности, так и макромолекулы, в том числе, белки. Варьирование природы и количества функционального гетероциклического мономера позволило получить широкий набор колонок с различной селективностью. Благодаря изменению количества сшивающего агента (дивинилбензола) в исходной смеси были получены монолитные колонки с разнообразными текстурными характеристиками (размер пор и удельная площадь поверхности). Изучение гидродинамической проницаемости показало, что коэффициенты проницаемости приготовленных монолитных колонок примерно на порядок выше, чем насадочных колонок аналогичных геометрических параметров. Это позволяет увеличивать скорость потока, тем самым, уменьшая время анализа. Другой важной особенностью данных колонок выступает их способность проявлять разный механизм удерживания в зависимости от состава подвижной фазы (обращенно-фазовый или гидрофильный). Исследование загрузочной емкости показало, что пористая структура приготовленных монолитов зависит от растворителя, в котором они работают. Так, в подвижной фазе, обогащенной органическим растворителем ацетонитрилом, загрузочная емкость оказалась в 3 раза выше, чем в подвижной фазе, обогащенной водой.

Монолитные колонки на основе 4-винилбензилхлорида, модифицированные производными имидазола и пиридина, выступают хорошей альтернативой колонкам с гетероциклическими азотсодержащими мономерами, полученными с помощью сополимеризации. Модифицированные колонки проявили новые хроматографические свойства, которые можно им придавать для решения конкретной задачи разделения путем функционализации *in situ* исходных колонок ВБХ40, содержащих хлорметильные группы. Основной особенностью модифицированных колонок является их способность работать в смешанном (обращенно-фазовом/гидрофильном) режиме. Благодаря этому расширяются границы их использования в разделении смесей различных составов.

Основные результаты и выводы

1. Впервые приготовлены монолитные колонки на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и одного из функциональных мономеров: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид. Всего было получено 28 типов монолитных колонок по единой методике синтеза.

2. Установлено, что в зависимости от состава подвижной фазы (вода/ацетонитрил) удерживание на приготовленных колонках происходит по обращенно-фазовому (менее 80 об. % ацетонитрила) или гидрофильному (более 80 об. % ацетонитрила) механизму. Определено, что эффективность приготовленных колонок варьируется в диапазоне ВЭТТ от 40 до 60 мкм. Установлено, что коэффициент гидродинамической проницаемости для приготовленных монолитных колонок на порядок выше, чем для коммерческих насадочных колонок с размером гранул 5 мкм. Установлено, что загрузочная емкость при соотношении ацетонитрил/вода = 60/40 составляет 100 мкг для всех колонок, а при соотношении ацетонитрил/вода = 20/80 – 30 мкг.

3. Определено, что удельная площадь поверхности для монолитных колонок на основе 1-винилимидазола и 4-винилпиридина составляет 2–6 м²/г, для колонки с 1-винил-1,2,4-триазолом – 200 м²/г. Установлено, что порообразователи полипропиленгликоль с молекулярной массой 2025 г/моль и триблоксополимер Pluronic 10R5 с молекулярной массой 2000 г/моль позволяют получать колонки с максимальной эффективностью. Исследование влияния количества дивинилбензола в монолите с 1-винил-2-пирролидоном показало, что при доле дивинилбензола 30 и 40 об. % величина удельной площади поверхности составляет около 3 м²/г. При доле дивинилбензола 50, 60 и 70 об. % удельная площадь поверхности составляет 400, 460 и 520 м²/г соответственно (Pluronic 10R5 в качестве порообразователя) и 110, 400, 500 м²/г соответственно (полипропиленгликоль с М = 2025 г/моль в качестве порообразователя).

4. Путем *in situ* модифицирования исходной колонки на основе 4-винилбензилхлорида 1-метилимидазолом, 2-метилимидазолом, 2-метилпиридином, 4-метилпиридином получены монолитные колонки с селективностью разделения, отличной как от исходной колонки, так и друг от друга.

5. Установлено, что на *in situ* модифицированных колонках реализуется смешанный механизм удерживания (обращенно-фазовый/гидрофильный). Загрузочная емкость модифицированных колонок составляет 11–17 мкг. Эффективность варьируется в диапазоне ВЭТТ от 43 до 57 мкм в обращенно-фазовом режиме и от 27 до 52 мкм в гидрофильном режиме.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н. Патрушеву Юрию Валерьевичу за всестороннюю помощь и поддержку в ходе выполнения работы, приобретённый опыт и знания. Благодарность Сидельникову Владимиру Николаевичу за помощь в подготовке публикаций и ценные советы; всем сотрудникам аналитической лаборатории за доброжелательное отношение и поддержку.

Автор благодарит Ефименко Татьяну Яковлевну и Леонову Александру Александровну (группа исследования структуры и пористости ИК СО РАН) за исследование образцов методом низкотемпературной адсорбции азота, Серкову Александру Николаевну и Чеснокову Наталью Михайловну (лаборатория структурных метод исследования ИК СО РАН) за исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии и Фадееву Валентину Павловну (лаборатория микроанализа НИОХ СО РАН) за выполнение СНН-анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-33-90006.

Список литературы

1. Siouffi A.-M. Silica gel-based monoliths prepared by the sol–gel method: facts and figures // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 1000. – P. 801–818.
2. Bonilla J. V., Srivatsa G.S. Handbook of analysis of oligonucleotides and related products. CRC Press. – 2011. – 511 p.
3. Makarov A.A., Mann B.F., Regalado E.L., Pirrone G.F., Sun C., Sun S., Nowak T., Wang H., Mangion I. Visualizing and studying frictional heating effects in reversed-phase liquid chromatography using infrared thermal imaging // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1018. – P. 1–6.
4. Svec F., Fréchet J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media // *Anal. Chem.* – 1992. – V. 64. – P. 820–822.
5. Nakanishi K., Soga N. Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: systems containing poly(sodium styrenesulfonate) // *J. Am. Ceram. Soc.* – 1991. – V. 74. – P. 2518–2530.
6. Nakanishi K., Soga N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition // *J. Non. Cryst. Solids.* – 1992. – V. 139. – P. 1–13.
7. Wang Q.C., Svec F., Fréchet J.M.J. Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography // *Anal. Chem.* – 1993. – V. 65. – P. 2243–2248.
8. Liu K., Tolley H.D., Lawson J.S., Lee M.L. Highly crosslinked polymeric monoliths with various C6 functional groups for reversed-phase capillary liquid chromatography of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1321. – P. 80–87.
9. Xu Y., Cao Q., Svec F., Fréchet J.M.J. Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – P. 3352–3358.
10. Shu S., Kobayashi H., Kojima N., Sabarudin A., Umemura T. Preparation and characterization of lauryl methacrylate-based monolithic microbore column for reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 5228–5234.
11. Nischang I., Bruggemann O. On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 5389–5397.

12. Xu Z., Yang L., Wang Q. Different alkyl dimethacrylate mediated stearyl methacrylate monoliths for improving separation efficiency of typical alkylbenzenes and proteins // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – P. 3098–3106.
13. Urban J., Svec F., Fréchet J.M.J. Efficient separation of small molecules using a large surface area hypercrosslinked monolithic polymer capillary column // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – P. 1621–1623.
14. Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Telnov M.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A. Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic rod columns for separation of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 5010–5019.
15. Trojer L., Bisjak C.P., Wieder W., Bonn G.K. High capacity organic monoliths for the simultaneous application to biopolymer chromatography and the separation of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – V. 1216. – P. 6303–6309.
16. Skeríková V., Urban J. Highly stable surface modification of hypercrosslinked monolithic capillary columns and their application in hydrophilic interaction chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – P. 2806–2812.
17. Zhou L., He X., Qiao J., Lian H., Ge X., Chen H. A practical interface designed for on-line polymer monolith microextraction: Synthesis and application of poly(4-vinylpyridine-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1256. – P. 15–21.
18. Koeck R., Fischnaller M., Bakry R., Tessadri R., Bonn G.K. Preparation and evaluation of monolithic poly(N-vinylcarbazole-co-14-divinylbenzene) capillary columns for the separation of small molecules // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – P. 5896–5907.
19. Fan Y., Zhang M., Feng Y.-Q. Poly(acrylamide-vinylpyridine-NN'-methylene bisacrylamide) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – V. 1099. – P. 84–91.
20. Svobodová A., Krížek T., Sirc J., Sálek P., Tesarová E., Coufal P., Stulík K. Monolithic columns based on a poly(styrene-divinylbenzene-methacrylic acid) copolymer for capillary liquid chromatography of small organic molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 1544–1547.
21. Zhao J., Carr P.W. An approach to the concept of resolution optimization through changes in the effective chromatographic selectivity // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – P. 2623–2632.
22. Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Telnov M.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A. Effect of monomer mixture composition on structure and chromatographic properties of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic rod columns for separation of

- small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 5010–5019.
23. Vaast A., Terryn H., Svec F., Eeltink S. Nanostructured porous polymer monolithic columns for capillary liquid chromatography of peptides // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1374. – P. 171–179.
24. Unger K.K., Skudas R., Schulte M.M. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1184. – P. 393–415.
25. Svec F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 902–924.
26. Jones A., Pravadali-cekic S., Dennis G.R., Shalliker R.A. Post column derivatisation analyses review. Is post-column derivatisation incompatible with modern HPLC columns? // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 889. – P. 58–70.
27. Gerber F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin C., Spöndlin C. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1036. – P. 127–133.
28. Valko K. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification.* Elsevier Science. – 2000. – 612 p.
29. Maryutina T.A., Savonina E.Y., Fedotov P.S., Smith R.M., Siren H., Hibbert D.B. Terminology of separation methods (IUPAC Recommendations 2017) // *Pure Appl. Chem.* – 2018. – V. 90. – P. 181–213.
30. Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – P. 3498–3501.
31. Tennikova T.B., Svec F., Belenkii B.G. High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation // *J. Liq. Chromatogr.* – 1990. – V. 13. – P. 63–70.
32. Xie S., Allington R.W., Svec F., Fréchet J.M.J. Rapid reversed-phase separation of proteins and peptides using optimized “moulded” monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 865. – P. 169–174.
33. Bidlingmaier B., Unger K.K., Von Doehren N. Comparative study on the column performance of microparticulate 5- μm C18-bonded and monolithic C18-bonded reversed-phase columns in high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 832. – P. 11–16.

34. Choudhury S., Fitzhenry L., White B., Connolly D. Polystyrene-co-divinylbenzene polyHIPE monoliths in 1.0 mm column formats for liquid chromatography // *Materials*. – 2016. – V. 9. – P. 1–14.
35. Hara T., Eeltink S., Desmet G. Exploring the pressure resistance limits of monolithic silica capillary columns // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – V. 1446. – P. 164–169.
36. Alothman Z.A. Preparation and characterization of alkyl methacrylate capillary monolithic columns // *J. Saudi Chem. Soc.* – 2012. – V. 16. – P. 271–278.
37. Nischang I. Porous polymer monoliths: Morphology porous properties polymer nanoscale gel structure and their impact on chromatographic performance // *J. Chromatogr. A*. – 2013. – V. 1287. – P. 39–58.
38. Gritti F., Guiochon G. Mass transfer kinetic mechanism in monolithic columns and application to the characterization of new research monolithic samples with different average pore sizes // *J. Chromatogr. A*. – 2009. – V. 1216. – P. 4752–4767.
39. Josic D., Strancar A. Application of membranes and compact porous units for the separation of biopolymers // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 1999. – V. 38. – P. 333–342.
40. Belenkii B.G., Podkladenko A.M., Kurenbin O.I., Mal'tsev V.G., Nasledov D.G., Trushin S.A. Peculiarities of zone migration and band broadening in gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins with respect to membrane chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 1993. – V. 645. – P. 1–15.
41. Pfliegerl K., Podgornik A., Berger E., Jungbauer A. Screening for peptide affinity ligands on CIM monoliths // *Biotechnol. Bioeng.* – 2002. – V. 79. – P. 733–740.
42. Josic D., Reusch J., Loster K., Baum O., Reutter W. High-performance membrane chromatography of serum and plasma membrane proteins // *J. Chromatogr. A*. – 1992. – V. 590. – P. 59–76.
43. Markovic K., Milacic R., Vidmar J., Markovic S., Ursic K., Zakelj M.N., Cemazar M., Sersa G., Unk M., Scancar J. Monolithic chromatography on conjoint liquid chromatography columns for speciation of platinum-based chemotherapeutics in serum of cancer patients // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2020. – V. 57. – P. 28–39.
44. Munoz A.M., Yourik P., Rajagopal V., Nanda J.S., Lorsch J.R., Walker S.E. Active yeast ribosome preparation using monolithic anion exchange chromatography // *RNA Biol.* – 2017. – V. 14. – P. 188–196.
45. Multia E., Tear C.J.Y., Palviainen M., Siljander P., Riekkola M.L. Fast isolation of highly specific population of platelet-derived extracellular vesicles from blood plasma by affinity monolithic column immobilized with anti-human CD61 antibody // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1091. – P. 160–168.

46. Liangsupree T., Multia E., Metso J., Jauhiainen M., Forssén P., Fornstedt T., Oorni K., Podgornik A., Riekkola M.L. Rapid affinity chromatographic isolation method for LDL in human plasma by immobilized chondroitin-6-sulfate and anti-apoB-100 antibody monolithic disks in tandem // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – 11235.
47. Chankvetadze B. Monolithic chiral stationary phases for liquid-phase enantioseparation techniques // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – P. 305–314.
48. Svec F., Frechet J.M.J. “Molded” rods of macroporous polymer for preparative separations of biological products // *Biotechnol. Bioeng.* – 1995. – V. 48. – P. 476–480.
49. Schulte M., Lubda D., Delp A., Dingenen J. Preparative monolithic silica sorbents (PrepRODs™) and their use in preparative liquid chromatography // *J. High Resolut. Chromatogr.* – 2000. – V. 23. – P. 100–105.
50. Strancar A., Barut M., Podgornik A., Koselj P., Schwinn H., Raspor P., Josic D. Application of compact porous tubes for preparative isolation of clotting factor VIII from human plasma // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – V. 760. – P. 117–123.
51. Gustavsson P.E., Larsson P.O. Continuous superporous agarose beds in radial flow columns // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 925. – P. 69–78.
52. Podgornik A., Barut M., Strancar A., Josic D., Koloini T. Construction of large-volume monolithic columns // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 5693–5699.
53. Jungbauer A., Hahn R. Polymethacrylate monoliths for preparative and industrial separation of biomolecular assemblies // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1184. – P. 62–79.
54. Hasegawa J., Kanamori K., Nakanishi K., Hanada T., Yamago S. Rigid crosslinked polyacrylamide monoliths with well-defined macropores synthesized by living polymerization // *Macromol. Rapid Commun.* – 2009. – V. 30. – P. 986–990.
55. Nandakumar M.P., Pålsson E., Gustavsson P., Larsson P. Superporous agarose monoliths as mini-reactors in flow injection systems // *Bioseparation.* – 2000. – V. 9. – P. 193–202.
56. Sun X., Fujimoto T., Uyama H. Fabrication of a poly(vinyl alcohol) monolith via thermally impacted non-solvent-induced phase separation // *Polym. J.* – 2013. – V. 45. – P. 1101–1106.
57. Yang X., Tan L., Xia L., Wood C.D., Tan B. Hierarchical porous polystyrene monoliths from polyHIPE // *Macromol. Rapid Commun.* – 2015. – V. 36. – P. 1553–1558.
58. Hormann K., Müllner T., Bruns S., Höltzel A., Tallarek U. Morphology and separation efficiency of a new generation of analytical silica monoliths // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1222. – P. 46–58.
59. Zajickova Z., Rubi E., Svec F. In situ sol – gel preparation of porous alumina monoliths for chromatographic separations of adenosine phosphates // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 3555–3558.

60. Liang C., Dai S., Guiochon G. A Graphitized-Carbon Monolithic Column // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – P. 4904–4912.
61. Yu S., Geng J., Zhou P., Wang J., Chen X., Hu J. New hydroxyapatite monolithic column for DNA extraction and its application in the purification of *Bacillus subtilis* crude lysate // – 2008. – V. 1183. – P. 29–37.
62. Kucheyev S.O., Baumann T.F., Wang Y.M., Buuren T. Van, Poco J.F., Satcher Jr J.H., Hamza A.V. Monolithic, high surface area, three-dimensional GeO₂ nanostructures // *Appl. Phys. Lett.* – 2014. – V. 88. – 103117.
63. Konishi J., Fujita K., Oiwa S., Nakanishi K., Hirao K. Crystalline ZrO₂ monoliths with well-defined macropores and mesostructured skeletons prepared by combining the alkoxy-derived sol-gel process accompanied by phase separation and the solvothermal process // *Chem. Mater.* – 2008. – V. 20. – P. 2165–2173.
64. Walsh Z., Paull B., Macka M. Inorganic monoliths in separation science: A review // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 750. – P. 28–47.
65. Zajickova Z. Advances in the development and applications of organic–silica hybrid monoliths // *J. Sep. Sci.* – 2017. – V. 40. – P. 25–48.
66. Zhang J., Chen G., Tian M., Li R., Quan X., Jia Q. A novel organic-inorganic hybrid monolithic column prepared in-situ in a microchip and its application for the determination of 2-amino-4-chlorophenol in chlorzoxazone tablets // *Talanta.* – 2013. – V. 115. – P. 801–805.
67. Okumoto S., Fujita N., Yamabe S. Theoretical study of hydrolysis and condensation of silicon alkoxides // *J. Phys. Chem. A.* – 1998. – V. 102. – P. 3991–3998.
68. Nunez O., Nakanishi K., Tanaka N. Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1191. – P. 231–252.
69. Siouffi A. Silica gel-based monoliths prepared by the sol – gel method: facts and figures // *J. Chromatogr.* – 2003. – V. 1000. – P. 801–818.
70. Sharma M., Jain P., Mishra A., Mehta A., Choudhury D., Hazra S., Basu S. Variation of surface area of silica monoliths by controlling ionic character/chain length of surfactants and polymers // *Mater. Lett.* – 2017. – V. 194. – P. 213–216.
71. Cabrera K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns // *J. Sep. Sci.* – 2004. – V. 27. – P. 843–852.
72. Leinweber F.C., Tallarek U. Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases: Hydrodynamics and adsorption capacity // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – V. 1006. – P. 207–228.
73. Jandera P. Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis. A review // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1313. – P. 37–53.

74. Scherer G.W., Smith D.M. Cavitation during drying of a gel // *J. Non. Cryst. Solids.* – 1995. – V. 189. – P. 197–211.
75. Kozuka H. Stress evolution and cracking in sol-gel-derived thin films // *Handbook of Sol-Gel Science and Technology.* – 2018. – P. 275–311.
76. Sharma G., Tara A., Sharma V.D. Advances in monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography // *J. Anal. Sci. Tech.* – 2017. – V. 8. – 16.
77. Hjertén S., Liao J.L., Zhang R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds // *J. Chromatogr. A.* – 1989. – V. 473. – P. 273–275.
78. Tennikova T.B., Bleha M., Svec F. High-performance membrane chromatography of proteins a novel method of protein separation // *J. Chromatogr. A.* – 1991. – V. 555. – P. 97–107.
79. Masini J.C., Svec F. Porous monoliths for on-line sample preparation: A review // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – V. 964. – P. 24–44.
80. Urban J., Svec F., Fréchet J.M.J. Hypercrosslinking: New approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 8212–8221.
81. Yang J., He S., Liu A., Chen J., Dong Y. Preparation of a poly(1,6-hexylene dimethacrylate) conventional size high performance liquid chromatographic monolithic column for separation of small molecules // *Microchem. J.* – 2019. – V. 146. – P. 1004–1009.
82. Zhong J., Hao M., Li R., Bai L., Yang G. Preparation and characterization of poly (triallyl isocyanurate-co-trimethylolpropane triacrylate) monolith and its applications in the separation of small molecules by liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1333. – P. 79–86.
83. Wang Q., Shen S. Preparation characterization and application of a porous poly(TAIC-co-MMA-co-EDMA) monolithic column for small molecules of aromatics and Chinese herbal medicine notoginseng by HPLC // *Talanta.* – 2018. – V. 194. – P. 649–657.
84. Murauer A., Bakry R., Partl G., Huck C.W., Ganzera M. Optimization of an innovative vinylimidazole-based monolithic stationary phase and its use for pressured capillary electrochromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – V. 162. – P. 117–123.
85. Causon T.J., Nischang I. Critical differences in chromatographic properties of silica- and polymer-based monoliths // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1358. – P. 165–171.
86. Hong T., Yang X., Xu Y., Ji Y. Recent advances in the preparation and application of monolithic capillary columns in separation science // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 931. – P. 1–24.

87. Nischang I., Teasdale I., Brüggemann O. Porous polymer monoliths for small molecule separations: Advancements and limitations // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 400. – P. 2289–2304.
88. Gritti F., Guiochon G. Mass transport of small retained molecules in polymer-based monolithic columns // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1362. – P. 49–61.
89. Mohr J.H., Swart R., Huber C.G. Morphology and efficiency of poly(styrene-co-divinylbenzene)-based monolithic capillary columns for the separation of small and large molecules // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 400. – P. 2391–2402.
90. Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Pirogov A.V., Shpigun O.A. The influence of the synthesis pressure on the chromatographic properties of poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) monolithic columns // *Moscow Univ. Chem. Bull.* – 2011. – V. 66. – P. 351–355.
91. Nevejans F., Verzele M. Swelling propensity (SP factor) of semi-rigid chromatographic packing materials // *J. Chromatogr. A.* – 1985. – V. 350. – P. 145–150.
92. Laher M., Causon T.J., Buchberger W., Hild S., Nischang I. Assessing the nanoscale structure and mechanical properties of polymer monoliths used for chromatography // *Anal. Chem.* – 2013. – V. 85. – P. 5645–5649.
93. Causon T.J., Hilder E.F., Nischang I. Impact of mobile phase composition on the performance of porous polymeric monoliths in the elution of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1263. – P. 108–112.
94. Vailaya A. Fundamentals of reversed phase chromatography: thermodynamic and exothermodynamic treatment // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2005. – V. 28. – P. 965–1054.
95. Shafigulin R. V, Safronova I.A., Krasnova M.S., Bulanova A. V A study of sorption of certain phenylamide derivatives of adamantane from aqueous-acetonitrile solutions using liquid chromatography // *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces.* – 2015. – V. 51. – P. 371–376.
96. Barak J.A., Kennedy J.A. HPLC retention thermodynamics of grape and wine tannins // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – V. 61. – P. 4270–4277.
97. Tsopelas F., Ochsenkuhn-Petropoulou M., Tsantili-Kakoulidou A. Void volume markers in reversed-phase and biomimetic liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 2847–2854.
98. Gritti F., Kazakevich Y., Guiochon G. Measurement of hold-up volumes in reverse-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1161. – P. 157–169.

99. McCormick R.M., Karger B.L. Distribution phenomena of mobile-phase components and determination of dead volume in reversed-phase liquid chromatography // *Anal. Chem.* – 1980. – V. 52. – P. 2249–2257.
100. Al-Thamir W.K., Purnell J.H., Wellington C.A., Laub R.J. Evaluation of dead space in chromatographic systems // *J. Chromatogr. A.* – 1979. – V. 173. – P. 388–391.
101. Rimmer C. a., Simmons C.R., Dorsey J.G. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 965. – P. 219–232.
102. Berendsen G.E., Schoenmakers P.J., Galan L. De, Vigh G., Varga-puchony Z. On the determination of the hold-up time in reversed phase liquid chromatography // *J. Liq. Chromatogr.* – 1980. – V. 3. – P. 1669–1686.
103. Pous-Torres S., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., Garcia-Alvarez-Coque M.C. Alternating iterative regression method for dead time estimation from experimental designs // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – V. 394. – P. 625–636.
104. Hennion M.C., Rosset R. Void volume determination and experimental probes in reversed phase chromatography // *Chromatographia.* – 1988. – V. 25. – P. 43–50.
105. Alhedai A., Martire D.E., Scott R.P.W. Column “dead volume” in liquid chromatography // *Analyst.* – 1989. – V. 114. – P. 869–875.
106. Hayes J.D., Malik A. Sol-gel monolithic columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 4090–4099.
107. Liu S., Peng J., Liu Z., Liu Z., Zhang H., Wu R. One-pot approach to prepare organo-silica hybrid capillary monolithic column with intact mesoporous silica nanoparticle as building block // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – 34718.
108. Fresco-Cala B., Cárdenas S. Potential of nanoparticle-based hybrid monoliths as sorbents in microextraction techniques // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1031. – P. 15–27.
109. Chen Y., Ding X., Zhu D., Lin X., Xie Z. Preparation and evaluation of highly hydrophilic aptamer-based hybrid affinity monolith for on-column specific discrimination of ochratoxin A // *Talanta.* – 2019. – V. 200. – P. 193–202.
110. Li M., Lei X., Huang Y., Guo Y., Zhang B., Tang F., Wu X. Ternary thiol-ene photopolymerization for facile preparation of ionic liquid-functionalized hybrid monolithic columns based on polyhedral oligomeric silsesquioxanes // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – V. 1597. – P. 167–178.
111. Schmidt M., Bottoli C. Synthesis of hybrid monolithic columns using a click chemistry reaction for application in capillary liquid chromatography // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2019. – V. 30. – P. 2590–2598.

- 112.Liu Z., Ou J., Lin H., Wang H., Dong J., Zou H. Preparation of polyhedral oligomeric silsesquioxane-based hybrid monolith by ring-opening polymerization and post-functionalization via thiol-ene click reaction // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1342. – P. 70–77.
- 113.Lin H., Ou J., Zhang Z., Dong J., Zou H. Ring-opening polymerization reaction of polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSSs) for preparation of well-controlled 3D skeletal hybrid monoliths // *Chem. Commun.* – 2013. – V. 49. – P. 231–233.
- 114.Xiong X., Yang Z., Huang Y., Jiang L., Chen Y., Shen Y., Chen B. Organic-inorganic hybrid fluorine monolithic capillary column for selective solid-phase microextraction of perfluorinated persistent organic pollutants // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – P. 923–931.
- 115.Zheng M.M., Lin B., Feng Y.Q. Hybrid organic-inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1164. – P. 48–55.
- 116.Segro S.S., Tran M., Kesani S., Alhendal A., Turner E.B., Malik A. Sol-gel microextraction phases for sample preconcentration in chromatographic analysis // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – P. 3075–3096.
- 117.Wang T., Chen Y., Ma J., Chen M., Nie C., Hu M., Li Y., Jia Z., Fang J., Gao H. Ampholine-functionalized hybrid organic-inorganic silica material as sorbent for solid-phase extraction of acidic and basic compounds // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1308. – P. 63–72.
- 118.Yu S., Geng J., Zhou P., Wang J., Feng A., Chen X., Tong H., Hu J. Application of a new hybrid organic-inorganic monolithic column for efficient deoxyribonucleic acid purification // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – V. 611. – P. 173–181.
- 119.Ou J., Liu Z., Wang H., Lin H., Dong J., Zou H. Recent development of hybrid organic-silica monolithic columns in CEC and capillary LC // *Electrophoresis.* – 2014. – V. 36. – P. 62–75.
- 120.Ou J., Lin H., Zhang Z., Huang G., Dong J., Zou H. Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns // *Electrophoresis.* – 2013. – V. 34. – P. 126–140.
- 121.Nema T., Chan E.C.Y., Ho P.C. Applications of monolithic materials for sample preparation // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1046. – P. 4430–4435.
- 122.Ma S., Zhang L., Wang S., Zhang H., You X., Ou J., Ye M., Wei Y. Preparation of epoxy-functionalized hierarchically porous hybrid monoliths via free radical polymerization and application in HILIC enrichment of glycopeptides // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – V. 1058. – P. 97–106.

123. Yu B., Zhang H., Cong H., Chen G., Xu T., Liu Y. Recent development and application of monolithic columns // *Rev. Adv. Mater. Sci.* – 2017. – V. 49. – P. 58–67.
124. Eeltink S., Wouters S., Dores-Sousa J.L., Svec F. Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies intact proteins oligonucleotides and peptides // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1498. – P. 8–21.
125. Rathnasekara R., Khadka S., Jonnada M., Rassi Z. El Polar and nonpolar organic polymer-based monolithic columns for capillary electrochromatography and high performance liquid chromatography // *Electrophoresis.* – 2017. – V. 38. – P. 60–79.
126. Du K., Zhang Q., Dan S., Yang M., Zhang Y., Chai D. Fabrication and characterization of aligned macroporous monolith for high-performance protein chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1443. – P. 111–117.
127. Vaast A., Tyteca E., Desmet G., Schoenmakers P.J., Eeltink S. Gradient-elution parameters in capillary liquid chromatography for high-speed separations of peptides and intact proteins // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1355. – P. 149–157.
128. Mann B.F., Makarov A.A., Wang H., Welch C.J. Effects of pressure and frictional heating on protein separation using monolithic columns in reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1489. – P. 58–64.
129. Groarke R.J., Brabazon D. Methacrylate polymer monoliths for separation applications // *Materials.* – 2016. – V. 9. – P. 446.
130. Obbed M.S., Aqel A., Al Othman Z.A., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y. Preparation characterization and application of polymethacrylate-based monolithic columns for fast and efficient separation of alkanes alcohols alkylbenzenes and isomeric mixtures by gas chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1555. – P. 89–99.
131. Carrasco-Correa E.J., Vela-Soria F., Ballesteros O., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J.M. Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 2015. – V. 1379. – P. 65–73.
132. Li X., Wang M.M., Zheng G.Y., Ai L.F., Wang X.S. Fast and online determination of five avermectin residues in foodstuffs of plant and animal origin using reusable polymeric monolithic extractor coupled with LC-MS/MS // *J. Agric. Food Chem.* – 2015. – V. 63. – P. 4096–4103.
133. Lin S.L., Wu Y.R., Lin T.Y., Fuh M.R. Preparation and evaluation of poly(alkyl methacrylate-co-methacrylic acid-co-ethylene dimethacrylate) monolithic columns for separating polar small

- molecules by capillary liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2015. – V. 871. – P. 57–65.
134. Puangpila C., Nhujak T., El Rassi Z. Investigation of neutral monolithic capillary columns with varying n-alkyl chain lengths in capillary electrochromatography // *Electrophoresis.* – 2012. – V. 33. – P. 1431–1442.
135. Li W., Wu F., Dai Y., Zhang J., Ni B., Wang J. Poly(octadecyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) monolithic column for hydrophobic in-tube solid-phase microextraction of chlorophenoxy acid herbicides // *Molecules.* – 2019. – V. 24. – 1678.
136. Maya F., Svec F. A new approach to the preparation of large surface area poly (styrene-co-divinylbenzene) monoliths via knitting of loose chains using external crosslinkers and application of these monolithic columns for separation of small molecules // *Polymer.* – 2014. – V. 55. – P. 340–346.
137. Wang X., Li X., Jiang X., Dong P., Liu H., Bai L., Yan H. Preparation of a poly(styrene-co-DPHA-co-EDMA) monolith and its application for the separation of small molecules and biomacromolecules by HPLC // *Talanta.* – 2017. – V. 165. – P. 339–345.
138. Wouters S., Hauffman T., Mittelmeijer-Hazeleger M.C., Rothenberg G., Desmet G., Baron G. V., Eeltink S. Comprehensive study of the macropore and mesopore size distributions in polymer monoliths using complementary physical characterization techniques and liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2014. – V. 39. – P. 4492–4501.
139. Causon T.J., Shellie R.A., Hilder E.F. Kinetic performance appraisal of poly(styrene-co-divinylbenzene) monolithic high-performance liquid chromatography columns for biomolecule analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 3765–3769.
140. Causon T.J., Nordborg A., Shellie R.A., Hilder E.F. High temperature liquid chromatography of intact proteins using organic polymer monoliths and alternative solvent systems // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 3519–3524.
141. Beneito-Cambra M., Herrero-Martínez J.M., Ramis-Ramos G., Lindner W., Lammerhofer M. Comparison of monolithic and microparticulate columns for reversed-phase liquid chromatography of tryptic digests of industrial enzymes in cleaning products // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 7275–7280.
142. Ueki Y., Umemura T., Li J., Odake T., Tsunoda K.I. Preparation and application of methacrylate-based cation-exchange monolithic columns for capillary ion chromatography // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 76. – P. 7007–7012.
143. Sun X., Liu R., He X., Chen L., Zhang Y. Preparation of phenylboronic acid functionalized cation-exchange monolithic columns for protein separation and refolding // *Talanta.* – 2010. – V. 81. – P. 856–864.

144. Bisjak C.P., Bakry R., Huck C.W., Bonn G.K. Amino-functionalized monolithic poly(glycidyl methacrylate-co-divinylbenzene) ion-exchange stationary phases for the separation of oligonucleotides // *Chromatographia*. – 2005. – V. 62. – P. 31–36.
145. Wang M., Xu J., Zhou X., Tan T. Preparation and characterization of polyethyleneimine modified ion-exchanger based on poly(methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith // *J. Chromatogr. A*. – 2007. – V. 1147. – P. 24–29.
146. Bedair M., El Rassi Z. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 1. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes // *Electrophoresis*. – 2002. – V. 23. – P. 2938–2948.
147. Wu R., Zou H., Fu H., Jin W., Ye M. Separation of peptides on mixed mode of reversed-phase and ion-exchange capillary electrochromatography with a monolithic column // *Electrophoresis*. – 2002. – V. 23. – P. 1239–1245.
148. Smith N.W., Jiang Z. Developments in the use and fabrication of organic monolithic phases for use with high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2008. – V. 1184. – P. 416–440.
149. Allmaier G., Blaas D., Bliem C., Dechat T., Fedosyuk S., Gösler I., Kowalski H., Weiss V.U. Monolithic anion-exchange chromatography yields rhinovirus of high purity // *J. Virol. Methods*. – 2018. – V. 251. – P. 15–21.
150. Sviben D., Forcic D., Ivancic-Jelecki J., Halassy B., Brgles M. Recovery of infective virus particles in ion-exchange and hydrophobic interaction monolith chromatography is influenced by particle charge and total-to-infective particle ratio // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2017. – V. 1054. – P. 10–19.
151. Banjac M., Roethl E., Gelhart F., Kramberger P., Jarc B.L., Jarc M., Strancar A., Muster T., Peterka M. Purification of Vero cell derived live replication deficient influenza A and B virus by ion exchange monolith chromatography // *Vaccine*. – 2014. – V. 32. – P. 2487–2492.
152. Zaveckas M., Snipaitis S., Pesliakas H., Nainys J., Gedvilaite A. Purification of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein using ion-exchange monolith chromatography // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2015. – V. 991. – P. 21–28.
153. Smrekar F., Ciringer M., Štrancar A., Podgornik A. Characterisation of methacrylate monoliths for bacteriophage purification // *J. Chromatogr. A*. – 2011. – V. 1218. – P. 2438–2444.
154. Ongkudon C.M., Danquah M.K. Process optimisation for anion exchange monolithic chromatography of 4.2 kbp plasmid vaccine (pcDNA3F) // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2010. – V. 878. – P. 2719–2725.

- 155.Masini J.C. Separation of proteins by cation-exchange sequential injection chromatography using a polymeric monolithic column // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V. 408. – P. 1445–1452.
- 156.Zatirakha A. V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: A review // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 904. – P. 33–50.
- 157.Shi X., Qiao L., Xu G. Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography // *J Chromatogr A.* – 2015. – V. 1420. – P. 1–15.
- 158.Zhou W., Sun W., Liu Y., Mao Z., Chen Z. Ionic liquid-copolymerized monolith based porous layer open tubular column for CEC-MS analysis // *Talanta.* – 2019. – 120556.
- 159.Chen R., Zhou H., Liu M., Yan H., Qiao X. Ionic liquids-based monolithic columns: Recent advancements and their applications for high-efficiency separation and enrichment // *Trends Anal. Chem.* – 2019. – V. 111. – P. 1–12.
- 160.Wang Y., Deng Q.L., Fang G.Z., Pan M.F., Yu Y., Wang S. A novel ionic liquid monolithic column and its separation properties in capillary electrochromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 712. – P. 1–8.
- 161.Li Y., Qi L., Shen Y., Zhang H., Ma H. Facile fabrication of polymeric ionic liquid grafted porous polymer monolith for mixed-mode high performance liquid chromatography // *Chinese J. Chem.* – 2014. – V. 32. – P. 619–625.
- 162.Feng J., Sun M., Bu Y., Luo C. Development of a functionalized polymeric ionic liquid monolith for solid-phase microextraction of polar endocrine disrupting chemicals in aqueous samples coupled to high-performance liquid chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V. 407. – P. 7025–7035.
- 163.Liu C., Deng Q., Fang G., Huang X., Wang S., He J. A novel poly(ionic liquid) interface-free two-dimensional monolithic material for the separation of multiple types of glycoproteins // *Appl. Mater. Interfaces.* – 2015. – V. 7. – P. 20430–20437.
- 164.Liu S., Zong J., Wei Z., Zhang H., Bai L., Liu H., Yan H. Determination of trace macrolide antibiotics in milk with online solid-phase extraction with an ionic-liquid-based monolithic column // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2016. – V. 133. – P. 1–7.
- 165.Wang T.T., Chen Y.H., Ma J.F., Hu M.J., Li Y., Fang J.H., Gao H.Q. A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – P. 4955–4963.
- 166.Wang J., Wu F., Xia R., Zhao Q., Lin X., Xie Z. Rapid fabrication of ionic liquid-functionalized monolithic column via in-situ urea-formaldehyde polycondensation for

- pressurized capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1449. – P. 100–108.
- 167.Liu C., Deng Q., Fang G., Lin H., Wu J., Pan M., Wang S. Ionic liquids monolithic columns for protein separation in capillary electrochromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. – V. 804. – P. 313–320.
- 168.Alpert A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A.* – 1990. – V. 499. – P. 177–196.
- 169.Philibert G.S., Olesik S. V. Characterization of enhanced-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography for the separation of nucleosides and nucleotides // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 8222–8230.
- 170.Langrock T., Czihal P., Hoffmann R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry // *Amino Acids.* – 2006. – V. 30. – P. 291–297.
- 171.Yoshida T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: A review // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2004. – V. 60. – P. 265–280.
- 172.Strege M.A., Stevenson S., Lawrence S.M. Mixed-mode anion–cation exchange/hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray mass spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 4629–4633.
- 173.Zhu B.Y., Mant C.T., Hodges R.S. Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns // *J. Chromatogr. A.* – 1991. – V. 548. – P. 13–24.
- 174.Risley D.S., Strege M.A. Chiral separations of polar compounds by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 1736–1739.
- 175.McCalley D. V. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1193. – P. 85–91.
- 176.Zywicki B., Catchpole G., Draper J., Fiehn O. Comparison of rapid liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 336. – P. 178–186.
- 177.McCalley D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1523. – P. 49–71.
- 178.Nguyen H.P., Schug K.A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications // *J. Sep. Sci.* – 2008. – V. 31. – P. 1465–1480.

179. Godejohann M. Hydrophilic interaction chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectroscopy-A new approach for the separation and identification of extremely polar analytes in bodyfluids // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1156. – P. 87–93.
180. Cavazzini A., Felinger A. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography // *Liq. Chromatogr.* – 2013. – P. 147–169.
181. McCalley D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1171. – P. 46–55.
182. Xie S., Svec F., Frechet J.M.J. Preparation of porous hydrophilic monoliths: effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly (acrylamide-co-NN'-methylenebisacrylamide) monolithic rods // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 1997. – V. 35. – P. 1013–1021.
183. Zhu G., Yuan H., Zhao P., Zhang L., Liang Z., Zhang W., Zhang Y. Macroporous polyacrylamide-based monolithic column with immobilized pH gradient for protein analysis // *Electrophoresis.* – 2006. – V. 27. – P. 3578–3583.
184. Hoegger D., Freitag R. Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 914. – P. 211–222.
185. Hoegger D., Freitag R. Investigation of conditions allowing the synthesis of acrylamide-based monolithic microcolumns for capillary electrochromatography and of factors determining the retention of aromatic compounds on these stationary phases // *Electrophoresis.* – 2003. – V. 24. – P. 2958–2972.
186. Chen M.-L., Li L.-M., Yuan B.-F., Ma Q., Feng Y.-Q. Preparation and characterization of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1230. – P. 54–60.
187. Kip Ç., Erkakan D., Gökaltun A., Çelebi B., Tuncel A. Synthesis of a reactive polymethacrylate capillary monolith and its use as a starting material for the preparation of a stationary phase for hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2015. – V. 1396. – P. 86–97.
188. Holdsvendova P., Suchankova J., Buncek M., Backovska V., Coufal P. Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2007. – V. 70. – P. 23–29.

- 189.Lin S.L., Fuh M.R. Preparation and characterization of vinylimidazole-based polymer monolithic stationary phases for reversed-phase and hydrophilic interaction capillary liquid chromatography // *Talanta*. – 2018. – V. 187. – P. 73–82.
- 190.Liu C., Li H., Wang Q., Crommen J., Zhou H., Jiang Z. Preparation and evaluation of 400 μ m I.D. polymer-based hydrophilic interaction chromatography monolithic columns with high column efficiency // *J. Chromatogr. A*. – 2017. – V. 1509. – P. 83–90.
- 191.Liu C., Chen W., Yuan G., Xiao Y., Crommen J., Xu S., Jiang Z. Influence of the crosslinker type on the chromatographic properties of hydrophilic sulfoalkylbetaine-type monolithic columns // *J. Chromatogr. A*. – 2014. – V. 1373. – P. 73–80.
- 192.McCalley D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2017, – V. 1523. – P. 49–71.
- 193.McCalley D. V. Managing the column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2020. – V. 1612. – P. 460655.
- 194.Li Z., Rodriguez E., Azaria S., Pekarek A., Hage D.S. Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications // *Electrophoresis*. – 2017. – V. 38. – P. 2837–2850.
- 195.Mallik R., Jiang T., Hage D.S. High-performance affinity monolith chromatography: Development and evaluation of human serum albumin columns // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 76. – P. 7013–7022.
- 196.Tetala K.K.R., Van Beek T.A. Bioaffinity chromatography on monolithic supports // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – P. 422–438.
- 197.Vergara-Barberán M., Carrasco-Correa E.J., Lerma-García M.J., Simó-Alfonso E.F., Herrero-Martínez J.M. Current trends in affinity-based monoliths in microextraction approaches: A review // *Anal. Chim. Acta*. – 2019. – V. 1084. – P. 1–20.
- 198.Leblebici P., Leblebici M.E., Ferreira-da-Silva F., Rodrigues A.E., Pais L.S. Separation of human immunoglobulin G subclasses on a protein A monolith column // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2014. – V. 962. – P. 89–93.
- 199.Lecas L., Randon J., Berthod A., Dugas V., Demesmay C. Monolith weak affinity chromatography for μ g-protein-ligand interaction study // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – V. 166. – P. 164–173.
- 200.Parker E.K., Nielsen A. V., Beauchamp M.J., Almughamsi H.M., Nielsen J.B., Sonker M., Gong H., Nordin G.P., Woolley A.T. 3D printed microfluidic devices with immunoaffinity monoliths for extraction of preterm birth biomarkers // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2019. – V. 411. – P. 5405–5413.

201. Wang L., Zhao Y., Zhang Y., Zhang T., Kool J., Somsen G.W., Wang Q., Jiang Z. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1563. – P. 135–143.
202. Pfaunmiller E.L., Paulemond M.L., Dupper C.M., Hage D.S. Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – V. 405. – P. 2133–2145.
203. Zhang C., Rodriguez E., Bi C., Zheng X., Suresh D., Suh K., Li Z., Elsebaei F., Hage D.S. High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents // *Analyst.* – 2018. – V. 143. – P. 374–391.
204. Hage D.S., Anguizola J.A., Jackson A.J., Matsuda R., Papastavros E., Pfaunmiller E., Tong Z., Vargas-Badilla J., Yoo M.J., Zheng X. Chromatographic analysis of drug interactions in the serum proteome // *Anal. Methods.* – 2011. – V. 3. – P. 1449–1460.
205. Ghanem A., Ahmed M., Ishii H., Ikegami T. Immobilized β -cyclodextrin-based silica vs polymer monoliths for chiral nano liquid chromatographic separation of racemates // *Talanta.* – 2015. – V. 132. – P. 301–314.
206. Xu D., Shao H., Luo R., Wang Q., Sánchez-López E., Fanali S., Marina M.L., Jiang Z. A facile and efficient single-step approach for the fabrication of vancomycin functionalized polymer-based monolith as chiral stationary phase for nano-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1557. – P. 43–50.
207. Echevarria R.N., Keunchkarian S., Villarroel-Rocha J., Sapag K., Reta M. Organic monolithic capillary columns coated with cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) for enantioseparations by capillary HPLC // *Microchem. J.* – 2019. – V. 149. – P. 104011.
208. Lämmerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 814–856.
209. Guo J., Lin Y., Xiao Y., Crommen J., Jiang Z. Recent developments in cyclodextrin functionalized monolithic columns for the enantioseparation of chiral drugs // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 130. – P. 110–125.
210. Guo J., Zhang Q., Peng Y., Liu Z., Rao L., He T., Crommen J., Sun P., Jiang Z. A facile and efficient one-step strategy for the preparation of β -cyclodextrin monoliths // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – P. 2441–2449.
211. Deng M., Li M., Zhao Y., Jiang Z., Guo X. A novel one-pot strategy to prepare β -cyclodextrin functionalized capillary monoliths for enantioseparation of basic drugs // *Talanta.* – 2018. – V. 189. – P. 458–466.

212. Guo J., Xiao Y., Lin Y., Zhang Q., Chang Y., Crommen J., Jiang Z. Influence of the linking spacer length and type on the enantioseparation ability of β -cyclodextrin functionalized monoliths // *Talanta*. – 2016. – V. 152. – P. 259–268.
213. Guo J., Xiao Y., Lin Y., Crommen J., Jiang Z. Effect of the crosslinker type on the enantioseparation performance of β -cyclodextrin functionalized monoliths prepared by the one-pot approach // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – V. 1467. – P. 288–296.
214. Ghanem A., Adly F.G., Sokerik Y., Antwi N.Y., Shenashen M.A., El-Safty S.A. Trimethyl- β -cyclodextrin-encapsulated monolithic capillary columns: Preparation characterization and chiral nano-LC application // *Talanta*. – 2017. – V. 169. – P. 239–248.
215. Xu S., Wang Y., Li W., Ji Y. Covalent organic framework incorporated chiral polymer monoliths for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2019. – V. 1602. – P. 481–488.
216. Fouad A., Marzouk A.A., Ibrahim S.M., El-Adl S.M., Ghanem A. Functionalized polymer monoliths with carbamylated amylose for the enantioselective reversed phase nano-liquid chromatographic separation of a set of racemic pharmaceuticals // *J. Chromatogr. A*. – 2017. – V. 1515. – P. 91–99.
217. Li Z., Mao Z., Zhou W., Chen Z. Incorporation of homochiral metal-organic cage into ionic liquid based monolithic column for capillary electrochromatography // *Anal. Chim. Acta*. – 2020. – V. 1094. – P. 160–167.
218. Miao C., Bai R., Xu S., Hong T., Ji Y. Carboxylated single-walled carbon nanotube-functionalized chiral polymer monoliths for affinity capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2017. – V. 1487. – P. 227–234.
219. Hong T., Chen X., Xu Y., Cui X., Bai R., Jin C., Li R., Ji Y. Preparation of graphene oxide-modified affinity capillary monoliths based on three types of amino donor for chiral separation and proteolysis // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – V. 1456. – P. 249–256.
220. Deng M., Li S., Cai L., Guo X. Preparation of a hydroxypropyl- β -cyclodextrin functionalized monolithic column by one-pot sequential reaction and its application for capillary electrochromatographic enantiomer separation // *J. Chromatogr. A*. – 2019. – V. 1603. – P. 269–277.
221. Wang Q., Zhu P., Ruan M., Wu H., Peng K., Han H., Somsen G.W., Crommen J., Jiang Z. Chiral separation of acidic compounds using an O-9-(tert-butylcarbamoyl)quinidine functionalized monolith in micro-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2016. – V. 1444. – P. 64–73.
222. Wu H., Wang Q., Ruan M., Peng K., Zhu P., Crommen J., Han H., Jiang Z. Enantioseparation of N-derivatized amino acids by micro-liquid chromatography/laser induced fluorescence

- detection using quinidine-based monolithic columns // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 121. – P. 244–252.
223. Wang Q., Sánchez-López E., Han H., Wu H., Zhu P., Crommen J., Marina M.L., Jiang Z. Separation of N-derivatized di- and tri-peptide stereoisomers by micro-liquid chromatography using a quinidine-based monolithic column - Analysis of l-carnosine in dietary supplements // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1428. – P. 176–184.
224. Lammerhofer M., Nogueira R., Lindner W. Multi-modal applicability of a reversed-phase/weak-anion exchange material in reversed-phase anion-exchange ion-exclusion hydrophilic interaction and hydrophobic interaction chromatography modes // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – V. 400. – P. 2517–2530.
225. Jiang Z., Smith N.W., Ferguson P.D., Taylor M.R. Mixed-mode reversed-phase and ion-exchange monolithic columns for micro-HPLC // *J. Sep. Sci.* – 2008. – V. 31. – P. 2774–2783.
226. Lin J., Liu S., Lin J., Lin X., Xie Z. Novel highly hydrophilic methacrylate-based monolithic column with mixed-mode of hydrophilic and strong cation-exchange interactions for pressurized capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 4671–4677.
227. Zhang M., Gong L., Liu G., Kang J. Preparation of a monolithic column with mixed-mode stationary phase of reversed-phase/hydrophilic-interaction for capillary liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2019. – V. 42. – P. 662–669.
228. Liu X., Pohl C., Woodruff A., Chen J. Chromatographic evaluation of reversed-phase/anion-exchange/cation-exchange trimodal stationary phases prepared by electrostatically driven self-assembly process // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – V. 1218. – P. 3407–3412.
229. Poole C.F., Lenca N. Reversed-phase liquid chromatography // *Liquid Chromatography.* – 2017. – P. 91–123.
230. Jandera P. Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography // *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques.* – 2017. – P. 39–87.
231. Galaon T., Medvedovici A., David V. Hydrophobicity parameter ($\log K_{ow}$) estimation for some phenolic compounds of pharmaceutical interest from retention studies with mobile phase composition in reversed-phase liquid chromatography // *Sep. Sci. Technol.* – 2008. – V. 43. – P. 147–163.
232. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – P. 231–247.
233. Jandera P., Hájek T. Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants // *J. Sep. Sci.* – 2009. – V. 32. – P. 3603–3619.

234. Qiao X., Zhang L., Zhang N., Wang X., Qin X., Yan H., Liu H. Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed-phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2015. – V. 1400. – P. 107–116.
235. Liu S., Xu H., Yu J., Li D., Li M. Novel imidazolium-embedded N N -dimethylaminopropyl-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction / reversed-phase mixed-mode chromatography // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V. 407. – P. 8989–8997.
236. Ohyama K., Takasago S., Kishikawa N., Kuroda N. Poly(L-lactic acid)-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2015. – V. 38. – P. 720–723.
237. Wang Q., Long Y., Yao L., Xu L., Shi Z.G., Xu L. Preparation characterization and application of a reversed phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography mixed-mode C18-DTT stationary phase // *Talanta.* – 2016. – V. 146. – P. 442–451.
238. Zheng Y., Liu H., Ma G., Yang P., Zhang L., Gu Y., Zhu Q., Shao T., Zhang P., Zhu Y., et al. Determination of S-propargyl-cysteine in rat plasma by mixed-mode reversed-phase and cation-exchange HPLC-MS/MS method and its application to pharmacokinetic studies // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V. 54. – P. 1187–1191.
239. Gilar M., Yu Y.Q., Ahn J., Fournier J., Gebler J.C. Mixed-mode chromatography for fractionation of peptides phosphopeptides and sialylated glycopeptides // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1191. – P. 162–170.
240. Andric F., Héberger K. How to compare separation selectivity of high-performance liquid chromatographic columns properly? // *J. Chromatogr. A.* – 2017. – V. 1488. – P. 45–56.
241. Engelhardt H., Jungheim M. Comparison and characterization of reversed phases // *Chromatographia.* – 1990. – V. 29. – P. 59–68.
242. Haghedooren E., Janssens T., Nijs R., Park S.K., Farkas E., Dragovic S., Noszál B., Hoogmartens J., Adams E. Selecting a suitable LC column for pharmaceutical separations using a column characterisation system // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* – 2009. – V. 32. – P. 747–771.
243. Euerby M.R., Petersson P., Campbell W., Roe W. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1154. – P. 138–151.
244. Kimata K., Iwaguchi K., Onishi S., Jinno K., Eksteen R., Hosoya K., Araki M., Tanaka N. Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase // *J. Chromatogr. Sci.* – 1989. – V. 27. – P. 721–728.

245. Kaliszan R. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships // *Chem. Rev.* – 2007. – V. 107. – P. 3212–3246.
246. Goryński K., Bojko B., Nowaczyk A., Bucíński A., Pawliszyn J., Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships models for prediction of high performance liquid chromatography retention time of small molecules: Endogenous metabolites and banned compounds // *Anal. Chim. Acta.* – 2013. – V. 797. – P. 13–19.
247. Wen Y., Talebi M., Amos R.I.J., Szucs R., Dolan J.W., Pohl C.A., Haddad P.R. Retention prediction in reversed phase high performance liquid chromatography using quantitative structure-retention relationships applied to the Hydrophobic Subtraction Model // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1541. – P. 1–11.
248. Abraham M.H., Poole C.F., Poole S.K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 842 79–114
249. Kamlet M.J., Abboud J.-L.M., Abraham M.H., Taft R.W. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation // *J. Org. Chem.* – 1983. – V. 48. – P. 2877–2887.
250. Abraham M.H. Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes // *Chem. Soc. Rev.* – 1993. – V. 22. – P. 73–83.
251. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M. Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1037. – P. 29–47.
252. McGowan J.C. Molecular volumes and structural chemistry // *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas.* – 1956. – V. 75. – P. 193–208.
253. Abraham M.H., Ibrahim A., Acree W.E. Partition of compounds from gas to water and from gas to physiological saline at 310 K: Linear free energy relationships // *Fluid Phase Equilib.* – 2007. – V. 251. – P. 93–109.
254. Нестеренко Е.П., Скорняков В.И., Нестеренко П.Н., Иванов А.В. Применение метода линейных отношений энергий сольватации для получения характеристики сорбентов на основе сверсшитого полистирола // *Вестник московского университета. Серия 2. Химия.* – 2008. – Т. 49. – С. 28–38.
255. Xie S., Allington R.W., Fréchet J.M.J., Svec F. Porous polymer monoliths: an alternative to classical beads // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2002. – V. 76. – P. 87–125.
256. Arrua R.D., Strumia M.C., Igarzabal C.I.A. Macroporous monolithic polymers: Preparation and applications // *Materials.* – 2009. – V. 2. – P. 2429–2466

257. Arrua R.D., Talebi M., Causon T.J., Hilder E.F. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – V. 738. – P. 1–12.
258. Mihelic I., Krajnc M., Koloini T. Kinetic model of a methacrylate-based monolith polymerization // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2001. – V. 40. – P. 3495–3501.
259. Odian G. Principles of polymerization. Wiley-Interscience. – 2004. – 848 p.
260. Барг Э.И. Технология синтетических пластических масс. Госхимиздат. – 1954. – 656 с.
261. Cheah P., Bhikha C.N., Haver J.H.O., Smith A.E. Effect of oxygen and initiator solubility on admicellar polymerization of styrene on silica surfaces // *Int. J. Polym. Sci.* – 2017. – V. 2017. – 6308603.
262. Alshitari W., Legido C., Smith N. Fabrication and evaluation of an organic monolithic column based upon the polymerisation of hexyl methacrylate with 1,6-hexanediol ethoxylate diacrylate for the separation of small molecules by capillary liquid chromatography // *Talanta.* – 2015. – V. 141. – P. 103–110.
263. Yuan K., Wang J., Zhai H., Chen Z., Huang L., Su Z. Sensitive determination of rose bengal in brown sugar by molecularly imprinted solid-phase extraction monolithic capillary column coupled with capillary electrophoresis // *Anal. Methods.* – 2015. – V. 7. – P. 8297–8303.
264. Zhang L., Chen B., He M., Liu X., Hu B. Hydrophilic polymer monolithic capillary microextraction online coupled to ICPMS for the determination of carboxyl group-containing gold nanoparticles in environmental waters // *Anal. Chem.* – 2015. – V. 87. – P. 1789–1796.
265. Zhang L., Chen B., He M., Hu B. Polymer monolithic capillary microextraction on-line combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of trace rare earth elements in biological samples // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – P. 2158–2167.
266. Chen M., Wei S., Yuan B., Feng Y. Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1228. – P. 183–192.
267. Gunasena D.N., Rassi Z. El Neutral charged and stratified polar monoliths for hydrophilic interaction capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1317. – P. 77–84.
268. Maksimova E., Vlach E., Sinitsyna E., Tennikova T. HPLC analysis of synthetic polymers on short monolithic columns // *J. Sep. Sci.* – 2013. – V. 36. – P. 3741–3749.
269. Bai X., Liu H., Wei D., Yang G. Preparation of a novel porous poly(trimethylol propane triacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic column for highly efficient HPLC separations of small molecules // *Talanta.* – 2014. – V. 119. – P. 479–484.

- 270.Lv C., Heiter J., Haljasorg T., Leito I. Covalent attachment of polymeric monolith to polyether ether ketone (PEEK) tubing // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 932. – P. 114–123.
- 271.Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Nagayama H., Hosoya K., Tanaka N. Performance of a monolithic silica column in a capillary under pressure-driven and electrodriven conditions // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 1275–1280.
- 272.Iacono M., Connolly D., Heise A. Fabrication of a GMA-co-EDMA monolith in a 2.0 mm i.d. polypropylene housing // *Materials.* – 2016. – V. 9. – P. 1–10.
- 273.Bandari R., Buchmeiser M.R. Ring-opening metathesis polymerization-derived large-volume monolithic supports for reversed-phase and anion-exchange chromatography of biomolecules // *Analyst.* – 2012. – V. 137. – P. 3271–3277.
- 274.Catala-Icardo M., Torres-Cartas S., Meseguer-Lloret S., Gómez-Benito C., Carrasco-Correa E., Simó-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J.M. Preparation of organic monolithic columns in polytetrafluoroethylene tubes for reversed-phase liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – V. 960. – P. 160–167.
- 275.Danquah M.K., Forde G.M. Preparation of macroporous methacrylate monolithic material with convective flow properties for bioseparation: Investigating the kinetics of pore formation and hydrodynamic performance // *Chem. Eng. J.* – 2008. – V. 140. – P. 593–599.
- 276.Bisjak C.P., Trojer L., Lubbad S.H., Wieder W., Bonn G.K. Influence of different polymerisation parameters on the separation efficiency of monolithic poly (phenyl acrylate-co-1 4-phenylene diacrylate) capillary columns // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1154. – P. 269–276.
- 277.Ding X., Yang J., Dong Y. Advancements in the preparation of high-performance liquid chromatographic organic polymer monoliths for the separation of small-molecule drugs // *J. Pharm. Anal.* – 2018. – V. 8. – P. 75–85.
- 278.Li R., Zhong J., Hao M., Bai L., Yang G. Preparation of a porous functional polymer and its application in the separation of small molecules in conjunction with HPLC // *Anal. Methods.* – 2014. – V. 6. – P. 589–595.
- 279.Svec F., Frechet J.M.J. Kinetic control of pore formation in macroporous polymers. formation of “molded” porous materials with high flow characteristics for separations or catalysis // *Chem. Mater.* – 1995. – V. 7. – P. 707–715.
- 280.Nischang I., Teasdale I., Brüggemann O. Towards porous polymer monoliths for the efficient retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 7514–7522.
- 281.Wu Z., Frederic K.J., Talarico M., De Kee D. Porous polymer monolith templated by small polymer molecules // *Can. J. Chem. Eng.* – 2009. – V. 87. – P. 579–583.

282. Stankova M., Jandera P., Veronika S., Jiri U. Cross-linker effects on the separation efficiency on (poly)methacrylate capillary monolithic columns. Part II. aqueous normal-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – V. 1289. – P. 47–57.
283. Zalusky a. S., Olayo-Valles R., Taylor C.J., Hillmyer M.A. Mesoporous polystyrene monoliths // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – P. 1519–1520.
284. Li Y., Tolley H.D., Lee M.L. Preparation of polymer monoliths that exhibit size exclusion properties for proteins and peptides // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – P. 4406–4413.
285. Matusova S.M., Ivanova K.I., D I.A., Smolenkov A.D., Pirogov A. V, Shpigun O.A. Poly(alkyl methacrylate) monolithic columns for HPLC // *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* – 2008. – V. 57. – P. 2554–2560.
286. Merhar M., Podgornik A., Barut M., Zigon M., Strancar A. Methacrylate monoliths prepared from various hydrophobic and hydrophilic monomers – Structural and chromatographic characteristics // *J. Sep. Sci.* – 2003. – V. 26. – P. 322–330.
287. Svec F., Huber C.G. Monolithic materials: Promises challenges achievements // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – P. 2100–2107.
288. Korolev A.A., Shiryayeva V.E., Popova T.P., Kurganov A.A. Polar monolithic capillary columns: Analysis of light hydrocarbons // *Russ. J. Phys. Chem. A.* – 2013. – V. 87. – P. 120–124.
289. Liu H., Bai X., Wei D., Yang G. High-performance liquid chromatography separation of small molecules on a porous poly (trimethylol propane triacrylate-co-N-isopropylacrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monolithic column // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1324. – P. 128–134.
290. Shang P., Pang Q., Zhang L., Huang Y., Liu Z. Supermacroporous polymer monolith prepared with polymeric porogens via viscoelastic phase separation for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – V. 1369. – P. 170–180.
291. Cooper A.I., Wood C.D., Holmes A.B. Synthesis of well-defined macroporous polymer monoliths by sol-gel polymerization in supercritical CO₂ // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2000. – V. 39. – P. 4741–4744.
292. Cooper A.I., Holmes A.B. Synthesis of molded monolithic porous polymers using supercritical carbon dioxide as the porogenic solvent // *Adv. Mater.* – 1999. – V. 11. – P. 1270–1274.
293. Du K.F., Yang D., Sun Y. Fabrication of high-permeability and high-capacity monolith for protein chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1163. – P. 212–218.
294. Santora B.P., Gagne M.R., Moloy K.G., Radu N.S. Porogen and cross-linking effects on the surface area pore volume distribution and morphology of macroporous polymers obtained by bulk polymerization // *Macromolecules.* – 2001. – V. 34. – P. 658–661.

- 295.Okay O. Macroporous copolymer networks // *Prog. Polym. Sci.* – 2000. – V. 25. – P. 711–779.
- 296.Liu K., Tolley H.D., Lee M.L. Highly crosslinked polymeric monoliths for reversed-phase capillary liquid chromatography of small molecules // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – V. 1227. – P. 96–104.
- 297.Grushka E., Grinberg N., Group F. *Advances in chromatography.* CRC Press. – 2019. – 461 p.
- 298.Mansour F.R., Waheed S., Paull B., Maya F. Porogens and porogen selection in the preparation of porous polymer monoliths // *J. Sep. Sci.* – 2019. – V. 43. – P. 56–69.
- 299.Kučerova Z., Szumski M., Buszewski B., Jandera P. Alkylated poly(styrene-divinylbenzene) monolithic columns for μ -HPLC and CEC separation of phenolic acids // *J. Sep. Sci.* – 2007. – V. 30. – P. 3018–3026.
- 300.Aoki H., Tanaka N., Kubo T., Hosoya K.E.N. Poly(glycerin 1,3-dimethacrylate)-based monolith with a bicontinuous structure tailored as HPLC column by photoinitiated in situ radical polymerization via viscoelastic phase separation // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 2008. – V. 2. – P. 4651–4673.
- 301.Courtois J., Byström E., Irgum K. Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation // *Polymer.* – 2006. – V. 47. – P. 2603–2611.
- 302.SinitSYna E.S., Vlakh E.G., Rober, M.Y., Tennikova T.B. Hydrophilic methacrylate monoliths as platforms for protein microarray // *Polymer.* – 2011. – V. 52. – P. 2132–2140.
- 303.Aoki H., Kubo T., Ikegami T., Tanaka N., Hosoya K., Tokuda D., Ishizuka N. Preparation of glycerol dimethacrylate-based polymer monolith with unusual porous properties achieved via viscoelastic phase separation induced by monodisperse ultra high molecular weight poly(styrene) as a porogen // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – V. 1119. – P. 66–79.
- 304.Li X., Man J., Zhao Y., Liu Z., Aisa H.A. Preparation of phenylboronate affinity rigid monolith with macromolecular porogen // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1438. – P. 171–178.
- 305.Acquah C., Moy C.K.S., Danquah, M.K., Ongkudon C.M. Development and characteristics of polymer monoliths for advanced LC bioscreening applications: A review // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2016. – V. 1015–1016. – P. 121–134.
- 306.Zhang D., Zhao Y., Lan D., Pang X., Bai L., Liu H., Yan H. Fractionation separation of human plasma proteins using HPLC with a homemade iron porphyrin based monolithic column // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2017. – V. 1068–1069. – P. 358–364.
- 307.Svec F., Frechet J.M.J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers // *Macromolecules.* – 1995. – V. 28. – P. 7580–7582.
- 308.Viklund C., Ponten E., Glad B., Irgum K., Horstedt P., Svec F. “Molded” macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) materials with fine

- controlled porous properties: Preparation of monoliths using photoinitiated polymerization // *Chem. Mater.* – 1997. – V. 9. – P. 463–471.
309. Lin S., Fuh M. Separation of inorganic anions by capillary ion chromatography with UV detection using poly (vinylimidazole- co -ethylene dimethacrylate) monolithic column // *Talanta.* – 2019. – V. 194. – P. 73–78.
310. Wang X., Dong S., Li, F. A miniaturized analysis system composed of monolith-based microchip electrochromatography coupled with on-line chemiluminescence detection for amino acids // *Sensors and Actuators, B Chem.* – 2016. – V. 225. – P. 529–534.
311. Knob R., Hanson R.L., Tateoka O.B., Wood R.L., Guerrero-Arguero I., Robison R.A., Pitt W.G., Woolley A.T. Sequence-specific sepsis-related DNA capture and fluorescent labeling in monoliths prepared by single-step photopolymerization in microfluidic devices // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – V. 1562. – P. 12–18.
312. Araya-Farias M., Taverna M., Woytasik M., Bayle F., Guerrouache M., Ayed I., Cao H.H., Carbonnier B., Tran N.T. A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips // *Polymer.* – 2015. – V. 66. – P. 249–258.
313. Kendall E.L., Wienhold E., Rahmanian O.D., Devoe D.L. Sensors and Actuators B : Chemical Ex situ integration of multifunctional porous polymer monoliths into thermoplastic microfluidic chips // *Sensors Actuators B. Chem.* – 2014. – V. 202. – P. 866–872.
314. Kang Q.-S., Shen X.-F., Hu N.-N., Hu M.-J., Liao H., Wang H.-Z., He Z.-K., Huang W.-H. A 3D porous polymer monolith-based platform integrated in poly(dimethylsiloxane) microchips for immunoassay // *Analyst.* – 2013. – V. 138. – P. 2613–2619.
315. Wang H., Ou J., Bai J., Liu Z., Yao Y., Chen L., Peng X., Zou H. Improving permeability and chromatographic performance of poly(pentaerythritol diacrylate monostearate) monolithic column via photo-induced thiol-acrylate polymerization // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1436. – P. 100–108.
316. Bai J., Wang H., Ou J., Liu Z., Shen Y., Zou H. Rapid “one-pot” preparation of polymeric monolith via photo-initiated thiol-acrylate polymerization for capillary liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 925. – P. 88–96.
317. Ou J., Gibson G.T.T., Oleschuk R.D. Fast preparation of photopolymerized poly(benzyl methacrylate-co-bisphenol A dimethacrylate) monoliths for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 3628–3634.
318. Yu C., Xu M., Svec F., Fréchet J.M.J. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 2002. – V. 40. – P. 755–769.

319. Deverell J.A., Rodemann T., Smith J.A., Canty A.J., Guijt R.M. Sensors and Actuators B: Chemical UV initiated formation of polymer monoliths in glass and polymer microreactors // Sensors Actuators B. Chem. – 2011. – V. 155. – P. 388–396.
320. Proczek G., Augustin V., Descroix S., Hennion M.C. Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography // Electrophoresis. – 2009. – V. 30. – P. 515–524.
321. Bernabe-Zafon V., Canto-Mirapeix A., Simo-Alfonso E.F., Ramis-Ramos G., Herrero-Martinez J.M. Comparison of thermal- and photopolymerization of lauryl methacrylate monolithic columns for CEC // Electrophoresis. – 2009. – V. 30. – P. 1929–1936.
322. Safrany A., Beiler B., Laszlo K., Svec F. Control of pore formation in macroporous polymers synthesized by single-step γ -radiation-initiated polymerization and cross-linking // Polymer. – 2005. – V. 46. – P. 2862–2871.
323. Grasselli M., Smolko E., Hargittai P., Safrany A. From microspheres to monoliths: Synthesis of porous supports with tailored properties by radiation polymerization // Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms. – 2001. – V. 185. – P. 254–261.
324. Beiler B. Polymer monoliths synthesized by radiation co-polymerization in solution // Radiat. Phys. Chem. – 2007. – V. 76. – P. 1351–1354.
325. Baccaro S., Casieri C., Cemmi A., Chiarini M., Aiuto V.D. Characterization of γ -radiation induced polymerization in ethyl methacrylate and methyl acrylate monomers solutions // Radiat. Phys. Chem. – 2017. – V. 141. – P. 131–137.
326. Badaloni E., Barbarino M., Cabri W., Acquarica I.D., Forte M., Gasparrini F., Giorgi F., Pierini M., Simone P., Ursini O., Villani C. Efficient organic monoliths prepared by γ -radiation induced polymerization in the evaluation of histone deacetylase inhibitors by capillary (nano)-high performance liquid chromatography and ion trap mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2011. – V. 1218. – P. 3862–3875.
327. Chuda K., Jasik J., Carlier J., Tabourier P., Druon C., Coqueret X. Characteristics and fluidic properties of porous monoliths prepared by radiation-induced polymerization for Lab-on-a-Chip applications // Radiat. Phys. Chem. – 2006. – V. 75. – P. 26–33.
328. Currivan S., Jandera P. Post-polymerization modifications of polymeric monolithic columns: A Review // Chromatography. – 2014. – V. 1. – P. 24–53.
329. Svec F., Lv Y. Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography // Anal. Chem. – 2015. – V. 87. – P. 250–273.
330. Hoyle C.E., Bowman C.N. Thiol-ene click chemistry // Angew. Chemie - Int. Ed. – 2010. – V. 49. – P. 1540–1573.

331. Xi W., Scott T.F., Kloxin C.J., Bowman C.N. Click chemistry in materials science // *Adv. Funct. Mater.* – 2014. – V. 24. – P. 2572–2590.
332. Lv Y., Lin Z., Svec F. “Thiol-ene” click chemistry: A facile and versatile route to functionalization of porous polymer monoliths // *Accept. Manusc. Anal.* – 2015. – V. 137. – P. 4114–4118.
333. Preinerstorfer B., Bicker W., Lindner W., Lammerhofer M. Development of reactive thiol-modified monolithic capillaries and in-column surface functionalization by radical addition of a chromatographic ligand for capillary electrochromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1044. – P. 187–199.
334. Tjunelyte I., Babinot J., Guerrouache M., Valincius G., Carbonnier B. Hydrophilic monolith with ethylene glycol-based grafts prepared via surface confined thiol-ene click photoaddition // *Polymer.* – 2012. – V. 53. – P. 29–36.
335. Sykora D., Svec F., Fréchet J.M.J. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 852. – P. 297–304.
336. Luo Q., Zou H., Xiao X., Guo Z., Kong L., Mao X. Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – V. 926. – P. 255–264.
337. Bedair M., El Rassi Z. Affinity chromatography with monolithic capillary columns: I. Polymethacrylate monoliths with immobilized mannan for the separation of mannose-binding proteins by capillary electrochromatography and nano-scale liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1044. – P. 177–186.
338. Даванков В.А., Рогожин С.В., Цюрупа М.П. Новый подход к созданию равномерно сшитых макросетчатых полистирольных структур // *Высокомолекулярные соединения.* – 1973. – Т. 15. – С. 463–465.
339. Davankov V.A., Pastukhov A. V., Tsyurupa M.P. Unusual mobility of hypercrosslinked polystyrene networks: swelling and dilatometric studies // *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* – 2000. – V. 38. – P. 1553–1563.
340. Дмитриенко С.Г., Тихомирова Т.И., Апяри В.В., Толмачева В.В., Кочук Е.В., Золотов Ю.А. Применение сверхсшитых полистиролов для концентрирования и разделения органических соединений и ионов элементов // *Журнал аналитической химии.* – 2018. – Т. 73. – С. 830–842.
341. Tsyurupa M.P., Davankov V.A. Porous structure of hypercrosslinked polystyrene: State-of-the-art mini-review // *React. Funct. Polym.* – 2006. – V. 66. – P. 768–779.

342. Павлова Л.Д., Маерле К.В., Ильин М.М., Даванков В.А. Новый тип сорбционной монолитной фазы на основе N-алкилированного 4-винилпиридина для капиллярной электрохроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8. – С. 707–716.
343. Павлова Л.А., Даванков В.А. Синтез и сорбционные свойства сверхсшитых анионообменных полимеров на основе 4-винилпиридина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10. С. 165–173.
344. Ganewatta N., El Rassi Z. Organic polymer-based monolithic stationary phases with incorporated nanostructured materials for HPLC and CEC // *Electrophoresis*. – 2018. – V. 39. – P. 53–66.
345. Lv Y., Alejandro F.M., Fréchet J.M.J., Svec F. Preparation of porous polymer monoliths featuring enhanced surface coverage with gold nanoparticles // *J. Chromatogr. A*. – 2012. – V. 1261. – P. 121–128.
346. Cao Q., Xu Y., Liu F., Svec F., Fréchet J.M.J. Polymer monoliths with exchangeable chemistries: Use of gold nanoparticles as intermediate ligands for capillary columns with varying surface functionalities // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – P. 7416–7421.
347. Grabar K.C., Hommer M.B., Natan M.J., Freeman R.G. Preparation and characterization of Au colloid monolayers // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67. – P. 735–743.
348. Xu Y., Cao Q., Svec F., Fréchet J.M.J. Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – P. 3352–3358.
349. Chambers S.D., Svec F., Fréchet J.M.J. Incorporation of carbon nanotubes in porous polymer monolithic capillary columns to enhance the chromatographic separation of small molecules // *J. Chromatogr. A*. – 2011. – V. 1218. – P. 2546–2552.
350. Li Y., Chen Y., Xiang R., Ciuparu D., Pfefferle L.D., Horváth C., Wilkins J.A. Incorporation of single-wall carbon nanotubes into an organic polymer monolithic stationary phase for μ -HPLC and capillary electrochromatography // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – P. 1398–1406.
351. Yaping L., Qi L., Ma H. Preparation of porous polymer monolithic column using functionalized graphene oxide as a functional crosslinker for high performance liquid chromatography separation of small molecules // *Analyst*. – 2013. – V. 138. – P. 5470–5478.
352. Zhang P., Chen J., Jia L. N-Methylimidazolium-functionalized monolithic silica column for mixed-mode chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2011. – V. 1218. – P. 3459–3465.
353. Zhang M., Chen J., Gu T., Qiu H., Jiang S. Novel imidazolium-embedded and imidazolium-spaced octadecyl stationary phases for reversed phase liquid chromatography // *Talanta*. – 2014. – V. 126. – P. 177–184.

354. Isokawa M., Kanamori T., Funatsu T., Tsunoda M. Recent advances in hydrophilic interaction chromatography for quantitative analysis of endogenous and pharmaceutical compounds in plasma samples // *Bioanalysis*. – 2014. – V. 6. – P. 2421–2439.
355. Corradini D. *Handbook of HPLC*. Second Edition. CRC Press. – 2010. – 716 p.
356. Torres-Lapasió J., García-Alvarez-Coque M., Rosés M., Bosch E., Zissimos A., Abraham M. Analysis of a solute polarity parameter in reversed-phase liquid chromatography on a linear solvation relationship basis // *Anal. Chim. Acta*. – 2004. – V. 515. – P. 209–227.
357. Zissimos A.M., Abraham M.H., Du C.M., Valko K., Bevan C., Reynolds D., Wood J., Tam K.Y. Calculation of Abraham descriptors from experimental data from seven HPLC systems, evaluation of five different methods of calculation // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. – 2002. – V. 12. P. 2001–2010.
358. Abraham M.H., Chadha H.S., Leitao R.A., Mitchell R.C., Lambert W.J., Kaliszan R., Nasal A., Haber P. Determination of solute lipophilicity, as logP(octanol) and logP(alkane) using poly(styrene–divinylbenzene) and immobilised artificial membrane stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 1997. – V. 766. – P. 35–47.
359. Brunauer S., Emmett P.H., Teller E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers // *J. Am. Chem. Soc.* – 1938. – V. 60. – P. 309–319.
360. Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. computations from nitrogen isotherms // *J. Am. Chem. Soc.* – 1951. – V. 73. – P. 373–380.
361. Sing K.S.W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity // *Pure Appl. Chem.* – 1982. – V. 54. – P. 2201–2218.
362. Poole C.F., Lenca N. Reversed-phase liquid chromatography // *Liquid Chromatography*. – 2017. – P. 91–123.
363. Jiang Z., Smith N.W., Ferguson P.D., Taylor M.R. Hydrophilic interaction chromatography using methacrylate-based monolithic capillary column for the separation of polar analytes // *Anal. Chem.* – 2007. – V. 79. – P. 1243–1250.
364. Buckenmaier S.M.C., McCalley D. V., Euerby M.R. Overloading study of bases using polymeric RP-HPLC columns as an aid to rationalization of overloading on Silica-ODS phases // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – P. 4672–4681.
365. Xue H., Wang S., Yuan C. “Green” synthesis of nitro alcohols catalyzed by solid-supported tributylammonium chloride in aqueous medium // *Chem. Biodivers.* – 2005. – V. 2. – P. 1195–1199.

- 366.Theodore P.J. All About Albumin. Biochemistry Genetics and Medical Applications. 1 edition. Academic Press. –1995. – 432 p.
- 367.Ruprichova L., Kralova M., Borkovcova I., Vorlova L., Bedanova I. Determination of whey proteins in different types of milk // Acta Vet. Brno. – 2014. – V. 83. – P. 67–72.