

Монолитные стационарные фазы в жидкостной и газовой хроматографии

А.Ю.Канатьева, А.А.Курганов, Е.Н.Викторова, А.А.Королев

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский просп., 29, факс (495) 633–8520*

Обобщены результаты исследований, посвященных использованию в хроматографии стационарных фаз на основе монолитных материалов. Основное внимание уделено современным методам получения монолитных колонок и их применению в различных видах хроматографических разделений — от аналитических до препаративных. Библиография — 97 ссылок.

Оглавление

I. Введение	393
II. Краткий исторический обзор	393
III. Использование монолитных стационарных фаз в жидкостной хроматографии и электрохроматографии	395
IV. Использование монолитных стационарных фаз в ионной хроматографии	397
V. Использование монолитных стационарных фаз в газовой хроматографии	398
VI. Заключение	399

I. Введение

Начиная с первых хроматографических разделений, проведенных М.Цветом более века назад, в хроматографии широко используются колонки, заполненные различными типами гранулированных сорбентов. Повышение эффективности колонок и улучшение селективности сорбентов всегда оставались важнейшими задачами в этой области исследований. Традиционный метод повышения эффективности колонок, заполненных гранулированными сорбентами, связан с применением сорбентов все более узкого гранулометрического состава и со все меньшим размером частиц. Однако

использование мелкодисперсных сорбентов приводит к значительному росту давления, которое приходится прикладывать к колонке, чтобы обеспечить оптимальный расход подвижной фазы. Высокое давление создает большие технические трудности в практической работе, поэтому необходим поиск альтернативных путей повышения эффективности хроматографического анализа.

Примерно в то же время, когда закладывались основы современной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), были начаты исследования другого типа сорбентов, представляющих собой единый полимерный макропористый блок, который был назван монолитом. Изучение этих нетрадиционных для хроматографии материалов с переменным успехом продолжалось в течение последних десятилетий,^{1,2} но лишь недавно было начато их производство. Монолитные колонки успешно используются для быстрого и эффективного разделения сложных смесей биологических молекул,^{3–7} неорганических и органических ионов,^{8–13} полиароматических углеводородов (ПАУ),^{14–16} а также при проведении анализов, связанных с мониторингом окружающей среды.^{17–21}

II. Краткий исторический обзор

История монолитов в хроматографии началась пять десятилетий назад с работ Ричарда Л.М.Синга,^{22,23} награжденного в 1952 г. Нобелевской премией по химии за вклад в развитие науки о разделениях. В 1950-х гг. он впервые описал^{22,23} структуры, которые сейчас называют монолитами. Однако они оказались механически непрочными и разрушались под воздействием гидростатического давления. Кубин с соавт.²⁴

А.Ю.Канатьева. Кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории хроматографии ИНХС РАН.

Телефон: (495)955–4184, e-mail: kanatieva@ips.ac.ru

А.А.Курганов. Доктор химических наук, заведующий той же лабораторией. Телефон: (495)955–4291, e-mail: kurganov@ips.ac.ru

Е.Н.Викторова. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (495)955–4184, e-mail: victorova@ips.ac.ru

А.А.Королев. Старший научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (495)955–4184, e-mail: akorolev@ips.ac.ru
Область научных интересов авторов: хроматография, математическое моделирование хроматографических процессов, физическая химия, аналитическая химия, высокомолекулярные соединения.

Дата поступления 5 октября 2007 г.

позднее подтвердил этот факт при изучении монолита, полученного на основе гидрогеля 2-гидроксиэтилметакрилата. Скорость потока через колонку была слишком мала, чтобы колонку можно было использовать на практике, а эффективность оказалась чрезвычайно низкой (552 теоретические тарелки (ТТ) на 1 метр для колонки, приготовленной путем полимеризации 22%-ного водного раствора 2-гидроксиэтилметакрилата, содержащего 0.2% этиленгликольдиметакрилата, в стеклянной трубке с внутренним диаметром 25 мм с использованием радикального инициирования). В начале 1970-х гг. исследователи вновь обратились к монолитным колонкам, но теперь уже в газовой хроматографии (ГХ).^{25–27} С помощью полимеризации *in situ* (т.е. непосредственно в трубке) были получены монолитные колонки на основе полиуретановых пен. Колонки были успешно использованы для ГХ-разделения различных смесей углеводородов (например, алканов C₆–C₉).²⁵ Было также показано, что удовлетворительное разделение может быть достигнуто и в жидкостной хроматографии.^{26,27} Однако дальнейшего развития это направление в то время не получило из-за нестабильности полученных фаз, не имевших химической связи со стенками колонки и поэтому легко терявшими с ней контакт. Следующие 15 лет публикации на тему монолитных колонок практически отсутствовали.

Ренессанс в исследовании монолитных стационарных фаз наблюдается с середины 1980-х гг., когда были разработаны новые подходы к синтезу пористых монолитных сред, основанные на технологии производства ультрафильтрационных мембран. Новые монолитные неподвижные фазы были предложены в 1989 г. в результате совместной работы Института высокомолекулярных соединений АН СССР (Ленинград) и Института высокомолекулярной химии АН ЧССР (Прага).^{28–31} Данные фазы были проверены³² при разделении высокомолекулярных биологических объектов: пептидов, белков и нуклеиновых кислот. При этом исследователи перенесли богатый опыт разделения биологических образцов на полимерных мембранах^{33,34} на разделения на монолитных колонках.^{35,36} Спектр мономеров, используемых для синтеза монолитных колонок, в течение последующих нескольких лет был значительно расширен.^{37,38} Были также предложены³⁹ удобные методы синтеза монолитов, позволяющие получать их непосредственно в стеклянных и кварцевых трубках, используемых затем в качестве хроматографических колонок. Применение этих методов исключало непростую задачу помещения готового монолита в хроматографическую колонку. Благодаря медленной термически иницируемой полимеризации, осуществляемой в вертикально расположенной трубке, первоначально формирующийся сшитый полимер мог проседать, и жидкая полимеризационная смесь оставалась вокруг полимерного стержня и над ним. Этот механизм успешно компенсировал возможную радиальную усадку полимера, которая в ином случае приводила бы к формированию пустот между монолитом и внутренней поверхностью трубки, что отрицательно сказалось бы на хроматографических свойствах получаемого монолитного сорбента.^{40–42}

Хотя монолитные колонки на основе органических полимеров показали хорошие результаты при разделении и очистке таких высокомолекулярных сорбатов, как белки,^{4,43–45} нуклеиновые кислоты⁶ и синтетические полимеры,^{36–38} их эффективность при разделении низкомолекулярных аналитов оставалась недостаточной. С учетом чрезвычайной популярности в ВЭЖХ сорбентов на основе сили-

кагеля в середине 1990-х гг. были предложены⁴⁶ силикагельные монолитные колонки. Методика их приготовления была основана на золь–гель-процессе, разработанном ранее.^{47,48} Отличительной чертой нового метода являлось образование в результате полимеризации кораллоподобных структур с бимодальным распределением пор: мелкие поры обеспечивали значительную площадь поверхности адсорбции, а крупные поры способствовали легкому протеканию подвижной фазы сквозь структуру монолита.⁴⁹

Недавно были проведены более детальные исследования структуры пор и распределения пор по размерам для монолитов на основе силикагеля.^{50–52} Синтез монолитов проводили путем поликонденсации тетраметоксисилана в присутствии полиэтиленгликоля, мочевины и других реагентов.^{17,53–56} По мере протекания реакции происходило самопроизвольное разделение фаз и возникали структуры, в которых зоны, богатые кремнеземом, чередовались с водными зонами. Последующая гидротермальная обработка продукта приводила к образованию мелких пор в стенках формирующегося неорганического монолита. В результате после удаления водной фазы конечный продукт представлял собой каркас из оксида кремния, пронизанный сквозными каналами диаметром ~1 мкм, стенки которых были покрыты порами диаметром 10–20 нм. Авторы работы⁴⁷ провели модифицирование пористых монолитов на основе силикагеля путем обработки диметилсектадецил(*N,N*-диэтиламино)силаном и оценили эффективность полученных модифицированных фаз в режиме обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ.

Такие модифицированные монолиты позволили провести эффективное разделение как низкомолекулярных (высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), составляла 10–15 мкм для ароматических углеводородов), так и высокомолекулярных сорбатов (ВЭТТ 20–30 мкм для инсулина). Следует отметить, что высокая эффективность стандартных монолитных колонок на основе силикагеля сохраняется и при высоких скоростях потока подвижной фазы, особенно в случае высокомолекулярных сорбатов. Стандартные монолитные колонки имеют более пологую кривую Ван-Деемтера по сравнению с колонками, заполненными гранулированными сорбентами, и, кроме того, минимальная ВЭТТ для монолитных колонок достигается в области более высоких скоростей подвижной фазы. Важнейшее условие проведения высокоэффективных разделений, как отмечалось выше, — обеспечение плотного сцепления монолита со стенками колонки.⁴⁷ Если между монолитом и стенками колонки образуются пустоты, то подвижная фаза будет проходить по этим пустотам, минуя слой монолита. Поэтому либо материал колонки должен иметь одинаковый с монолитом коэффициент термического расширения, либо монолит должен быть химически связан со стенками колонки. В первом случае силикагельный монолит устанавливают в полимерные картриджи (например, из термоусадочного полиэфирэфиркетона (PEEK)). Во втором случае используют предварительно поверхностно-модифицированные стеклянные или кварцевые трубки и капилляры. Оба этих метода обеспечивают прочное соединение монолита со стенками колонки, но каждый из них имеет свои ограничения. Применение PEEK ограничивает набор элюентов, которые могут использоваться в разделениях, поскольку, например, хлористый метилен вызывает его набухание. Химическая прививка к стенкам колонки путем силилирования неустойчива в щелочных средах и разрушается при pH > 10.

III. Использование монолитных стационарных фаз в жидкостной хроматографии и электрохроматографии

1. Разделение белков и пептидов

Изучение протеомики клетки является актуальной задачей биохимии, поскольку образование и разрушение белков представляют собой два взаимосвязанных динамических процесса, позволяющих клеткам адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, таким как температура, pH, присутствие различных биологически активных веществ. В связи с этим исследование белков, а также изучение их метаболических путей представляют собой наиболее важные задачи.⁵⁷ Учитывая сложность большинства биологических образцов, разработаны различные методы разделения белков, среди которых наиболее популярны гель-электрофорез, капиллярный электрофорез (КЭ) и жидкостная хроматография (ЖХ). Гель-электрофорез представляет собой классический метод и широко используется в биохимической практике.^{58, 59} Двумерный (2D) гель-электрофорез рассматривается сегодня как наиболее эффективный метод разделения многокомпонентных смесей, присутствующих в клетке, хотя и у него есть ряд недостатков.^{60–62} Например, метод имеет ограниченный динамический диапазон, что усложняет анализ очень малых количеств проб или проб, содержащих белки с очень высокой молекулярной массой.

Недавно для исследования белкового состава клетки был предложен аналитический метод на основе сочетания жидкостной хроматографии и времяпролетной масс-спектрометрии (метод MALDI-TOF),^{63–65} причем использованы монолитные колонки на основе поли(стирол/дивинилбензола), принадлежащие к последнему поколению колонок для определения белков. Основными их преимуществами являются высокая механическая прочность и селективность при разделении пептидов и белков.^{66–71} Описана⁶³ хроматографическая методика разделения бычьего сывороточного альбумина, яичного альбумина и лизоцима на монолитной капиллярной колонке длиной 5 см с внутренним диаметром 200 мкм в сочетании с триптическим гидролизом разделенных белков. После хроматографического разделения фракции белков собирали в камеру ионизации масс-спектрометра, где на месте проводился триптический гидролиз. Таким образом, все пептиды триптического гидролизата могли быть однозначно приписаны какому-то протеину, что в принципе позволяет проводить сравнительный анализ всех изоформ белка. Разработанный метод оказался более быстрым по сравнению с электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (1D ДСН–ПААГ) или двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле с изоэлектрической фокусировкой в присутствии додецилсульфата натрия (1D ИФ ДСН–ПААГ). Метод может быть улучшен с точки зрения разделения фосфорилированных форм путем применения различных ион-парных реагентов,⁶⁹ или двумерной ЖХ с использованием ионообменных колонок, или аффинной хроматографии для первичного разделения в режиме ЖХ.^{70, 72}

Описаны⁴ монолитные капиллярные колонки для разделения биополимеров, основанные на сополимере метилстирола (МС) и 1,2-бис(*n*-винилфенил)этана (БВФЭ). Монолитные капиллярные колонки проявили чрезвычайную механическую стабильность и минимальное набухание в органиче-

ских растворителях. Возможность применения монолита поли(МС/БВФЭ) в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ была исследована на примере разделения белков и пептидов в режиме ОФ-хроматографии и нуклеиновых кислот в режиме ион-парной ОФ ВЭЖХ. Проницаемость и хроматографическая эффективность монолитных капиллярных колонок оказались сильно зависящими от доли мономеров в исходной полимеризационной смеси. Авторы изготовили колонки с различной проницаемостью и продемонстрировали возможность скоростного разделения биополимеров. При этом тестовая смесь белков, содержащая рибонуклеазу А, гистогематин С, α -лактальбумин, β -лактальбумин В и яичный альбумин, была полностью разделена за 35 с, а ряд гомологов фосфорилированных олиготимидиловых кислот — менее чем за 2 мин.

Другой способ осуществления очень быстрых разделений белков в различных режимах (например, в режиме ионообменной гидрофильной (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) или аффинной хроматографии) — это использование коротких монолитных колонок, в которых осуществляется конвективный массоперенос.⁷³ Они известны под торговой маркой CIM-монолиты (от английского Convective Interaction Media). CIM-Диски и CIM-трубки имеют высокую сорбционную емкость для крупных молекул и позволяют работать с высокими скоростями подвижной фазы.^{73, 74} При использовании в качестве лигандов протеина А или протеина G эти колонки способны работать с большими объемами сложных биологических смесей, содержащих, например, антитела.⁷⁵ Описано⁷⁶ применение коротких монолитных колонок для выделения мембранных белков. Выделено⁷⁷ несколько типов антител из белков плазмы мембран печени за счет их связывания с протеином А или протеином G, нанесенным на CIM-диски. Полученные таким образом иммуноаффинные колонки были использованы, в свою очередь, для целенаправленного выделения антигена. Показано,⁷⁶ что аналогичный метод может применяться для высокоселективного обогащения белков низкого содержания из больших объемов сложных биологических смесей, таких как экстракты мембранных белков печени крыс. Растворенные мембранные белки были впервые разделены с использованием системы, содержащей один анионообменный (с диэтиламиноэтильными группами, ДЭАЭ) и один катионообменный монолитные CIM-диски.⁷⁸ Выделение моноклональных антител (mAb) было проведено на монолитном CIM-диске с G-протеином. Однако антиген элюировался вместе с антителом и должен был отделяться в дополнительном процессе с использованием 1D ДСН–ПААГ. На рис. 1 показан пример хроматограммы (полученной в режиме ионообменной хроматографии) группы белков с приблизительной молекулярной массой ~110 кДа, выделенной из триптического гидролизата ДСН–ПААГ.⁷⁶

Недавно описана⁷⁹ динамическая адсорбция крупных несущих белки частиц на монолитных CIM-дисках, содержащих ДЭАЭ-группы и четвертичные аммониевые группировки. Целью исследования было изучение особенностей динамической адсорбции наночастиц. Подобные вирусам синтетические частицы, несущие различные белки на внешней поверхности, были специально получены с использованием двух различных методик. Первая методика заключалась в создании из протеина химически сшитой структуры, в то время как при использовании другой методики белком модифицировалась поверхность сферических микрочастиц полистирола. Для экспериментального изучения динамической адсорбции были использованы два хроматографических

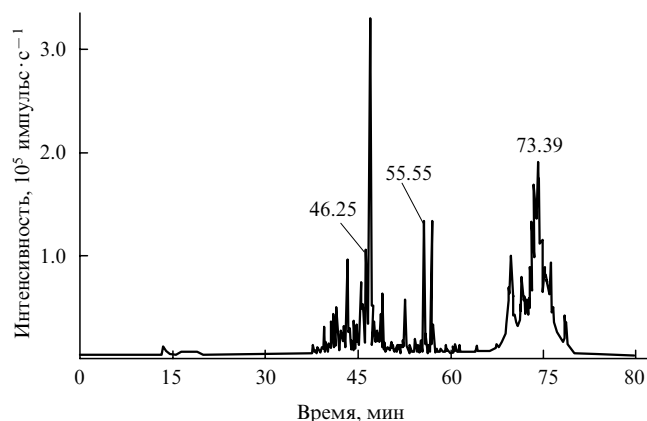


Рис. 1. Идентификация белков с использованием ЖХ – МС/МС.⁷⁶

Хроматограмма триптического гидролиза группы белков со средней молекулярной массой порядка 110 кДа, полученных с помощью ДСН – ПААГ.

режима — ионообменная хроматография и аффинная ЖХ на сверхкоротких монолитных колонках (СИМ-диски с ДЭАЭ-группой или с четвертичной аммониевой группой). Были определены величины максимальной динамической адсорбционной емкости и их зависимость от скорости потока. Проницаемость монолитной пористой среды оказалась достаточной для эффективного разделения крупных частиц.

2. Использование монолитных колонок для разделения полиароматических углеводородов

Полиароматические углеводороды являются широко распространенными ксенобиотиками, образующимися при горении ископаемых топлив, и всегда обнаруживаются в виде смеси компонентов. В связи с низкой растворимостью в воде ПАУ обычно присутствуют в водных пробах в незначительных концентрациях, но иногда могут быть найдены в больших количествах в гидрофобных средах, таких как растительные масла и животные жиры. Некоторые ПАУ, например бенз[а]пирен, являются сильными канцерогенами и лишь незначительно подвергаются распаду в аэробных условиях. Согласно гигиеническим и экологическим требованиям, концентрацию ПАУ в воздухе, воде и пищевых продуктах необходимо тщательно контролировать. Наиболее часто используемыми методами разделения и анализа ПАУ являются жидкостная и газовая хроматография.⁸⁰

Описана¹⁶ методика приготовления силикагельной монолитной колонки с привитыми *n*-октильными (C_8) группами для обращенно-фазовой капиллярной электрохроматографии.⁸¹ Монолитная силикагельная неподвижная фаза была получена в две стадии: кислотнo-основным гидролизом и соконденсацией тетраэтоксисилана (ТЭОС) и *n*-октилтриэтоксисилана (C_8 -ТЭОС). Увеличение соотношения ТЭОС: C_8 -ТЭОС приводило к образованию пор меньшего размера и к росту объема пор. Оптимальное соотношение ТЭОС: C_8 -ТЭОС составило 90:50 (по объему); при этом средний диаметр пор монолита получался ~ 1.0 мкм при общем объеме пор $3.25 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Ароматические соединения, включая алкилбензолы, ПАУ и фенолы, были успешно разделены на модифицированной C_8 -монолитной колонке с высокой эффективностью ($180\,000 \text{ ТТ} \cdot \text{м}^{-1}$).

Монолитные капиллярные колонки на основе органических полимеров также широко применяются для разделения ПАУ. Предложено⁸² использовать в капиллярной электрохроматографии (КЭХ) приготовленные в кварцевом капилляре пористые полимерные монолиты на основе бутилакрилата. Для оценки эффективности колонок были построены кривые Ван-Деемтера для хризена при различных рабочих температурах. При росте температуры минимум кривых смещался в область более высоких скоростей, а величина ВЭТТ в минимуме при этом слегка увеличивалась. Эффективность колонок воспроизводилась для двух различных колонок разного диаметра, используемых в различных хроматографических системах и приготовленных в одинаковых условиях. Однородность монолита по длине колонки была изучена с помощью стандартной смеси полициклических ароматических углеводородов (ЕРА 610). Сохранение величин факторов удерживания ПАУ показало, что колонки однородны по длине. Для веществ с факторами удерживания от 3 до 12 наблюдаемая эффективность колонок составляла $65\,000 - 85\,000 \text{ ТТ} \cdot \text{м}^{-1}$.

В дальнейшем та же группа исследователей предложила¹⁴ монолитные капиллярные колонки на основе лаурил-акрилата для использования в режиме КЭХ. Был синтезирован ряд пористых полимерных монолитов и оценена возможность их использования для разделения в КЭХ. Как и ожидалось, при введении небольшого количества гидрофобного полимера получались колонки, на которых сильнее удерживались нейтральные анализируемые вещества. Однако дальнейшее увеличение доли гидрофобного мономера в полимеризационной смеси приводило к снижению величин удерживания. Нетипичное поведение гидрофобных колонок связано, вероятно, с неоднородной структурой монолита, включающего гидрофобный мономер. Тем не менее кривые Ван-Деемтера, построенные для изученных колонок, показали минимальное значение ВЭТТ от 8.7 до 9.1 мкм ($115\,000 - 110\,000 \text{ ТТ} \cdot \text{м}^{-1}$) и не выявили никаких противоречий.

Определение ПАУ в реальных образцах обычно требует предварительного концентрирования. В обзоре²⁰ описаны современные применения монолитов для предконцентрирования и твердофазной экстракции. Кроме традиционной лабораторной методики, которая все же не является широко распространенным приложением монолитных материалов, рассмотрено сочетание предварительного концентрирования с ВЭЖХ, электрохроматографией, электрофорезом и ферментативным гидролизом в режиме реального времени. Недавно описано¹⁵ оперативное концентрирование следовых количеств канцерогенных ПАУ на микроколонке в режиме ЖХ при вводе больших количеств пробы. Оценена возможность использования предложенной системы для предварительного концентрирования 14 ПАУ в режиме микроколоночной ЖХ. Авторы провели сравнение микропредколонок, заполненных гранулированным силикагелем с группами C_{30} , силикагельных монолитных колонок с группами C_{18} и микроколонок, заполненных кварцевым волокном, модифицированным группами C_{30} . Значительных различий между колонками, модифицированными группами C_{30} и C_{18} , при разделении ПАУ не наблюдалось, но для дальнейших испытаний были выбраны колонки с C_{30} , так как на них получались более воспроизводимые результаты. Из трех сорбентов, использованных для заполнения предколонок, лучшее предварительное концентрирование удалось получить на колонках, заполненных гранулированным C_{30} -силикагелем, и на монолитных капиллярных колонках с C_{18} -силикагелем.

С точки зрения концентрирования и разделения ПАУ лучшие результаты были получены при использовании монолитной предколонки с внутренним диаметром 0.1 мм по сравнению с предколонкой с внутренним диаметром 0.2 мм. Кроме того, был возможен ввод пробы большого объема вплоть до 0.5 мл, т.е. достигалось обогащение в ~ 2500 раз при полном отсутствии отрицательного воздействия на разделение. Разработанная система была затем использована для определения следовых количеств ПАУ в почве, пробы которой были случайным образом отобраны вблизи скоростной автомагистрали.

IV. Использование монолитных стационарных фаз в ионной хроматографии

Определение растворенных ионных соединений в природных и промышленных водах рутинно проводится в различных аналитических лабораториях и является важной задачей как при мониторинге окружающей среды, так и для контроля производственных процессов. В настоящее время простые неорганические ионы определяют главным образом ионной хроматографией (ИХ), капиллярным зонным электрофорезом (КЗЭ) и потенциометрическими методами с ионоселективными электродами. Ионная хроматография уступает КЗЭ по экспрессности анализа, но значительно превосходит его по селективности и, особенно, по воспроизводимости результатов.⁸³ Снизить продолжительность ИХ-анализа можно, если использовать короткие хроматографические колонки. Однако в этом случае для достижения приемлемого разрешения необходимо применять мелкодисперсные сорбенты, что приводит к росту давления, которое необходимо приложить для оптимальной работы колонки. Была предпринята попытка⁸⁴ разработать для эффективного разделения ионов системы низкого давления, основанные на использовании коротких колонок длиной 3–6 см; описаны возникающие при этом трудности, в преодолении которых могут помочь монолитные колонки.

Ионообменные монолитные колонки могут быть получены на основе модифицированного силикагеля или органических полимеров. Ионообменные свойства монолиту придают либо путем обработки различными реагентами уже готовой монолитной матрицы, содержащей реакционноспособные группы, либо посредством адсорбции ионогенных соединений на поверхности монолита.⁸⁵ Использование монолитных сорбентов привело к развитию новых подходов к разделению ионов, а именно: хроматографии низкого и среднего давления, сверхбыстрой ИХ, градиентной ИХ, капиллярной ИХ и, наконец, многоколоночной многомерной ИХ.⁸ Недавно продемонстрировано⁹ разделение простых анионов на ультракоротких (1 см) монолитных колонках при подаче элюента с помощью микроперистальтического насоса. Хотя чувствительность метода еще не очень высока и требует оптимизации, авторам исследования удалось провести разделение простых анионов (фторида, хлорида, нитрата, сульфата) в водных образцах с использованием градиента низкого давления. На рис. 2 показаны хроматограммы, полученные на монолитных анионообменных колонках размером 1×0.4 см (см.⁹). В другом исследовании те же авторы провели¹⁰ модифицирование силикагельной монолитной колонки (Onyx C₁₈, 150 мм $\times$ 0.1 мм) амфотерным ПАВ *N*-додецил-*N,N*-диметиламмонийондеканоематом и оценили способность колонки разделять неорганические ионы с использованием бесконтактного кондуктометрического детектора. Хроматографическая эффективность колонки в опти-

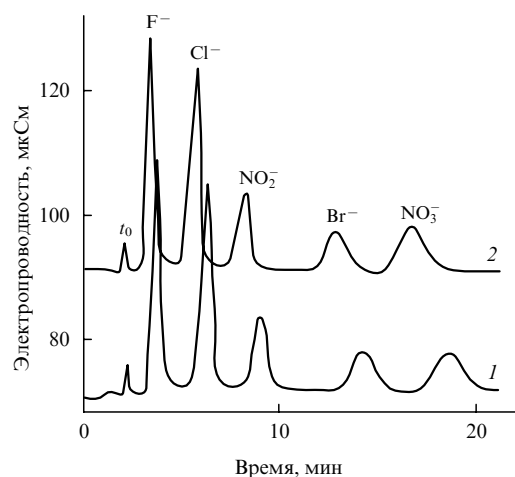


Рис. 2. Разделение стандартной смеси анионов на монолитной анионообменной колонке размером 1.0×0.4 см.⁹

Элюент — 0.002 М раствор *n*-гидроксibenzoата в воде, pH 6.5, скорость подачи элюента $0.33 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$, кондуктометрический детектор: 1 — комнатная температура, 2 — элюент нагрет до 45°C . Концентрации ионов F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- и NO_3^- в стандарте $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$.

мальных условиях составила $56\,200 \text{ ТТ} \cdot \text{м}^{-1}$ (7025 ТТ на колонку в точке детектирования). Прямое соединение капиллярной колонки с микроинжектором и детектирование непосредственно на колонке исключали уширение пиков, связанное с внеколоночными эффектами. Это позволило построить для полученных монолитных капиллярных колонок более точные кривые Ван-Деемтера и определить величину коэффициента C в уравнении Ван-Деемтера, которая оказалась достаточно низкой, что указывает на возможность использования колонок при повышенных скоростях потока элюента без заметной потери эффективности колонки.

По сравнению с монолитами на основе силикагеля монолиты на основе органических полимеров характеризуются большей химической стабильностью и допускают работу с водными элюентами. Недавно были проведены эксперименты^{86,87} по созданию капиллярных колонок для ионной хроматографии на основе органических сополимеров поли(этиленгликольдиметакрилат/глицидилметакрилат) (поли(ЭДМА/ГМА)) и поли(дивинилбензол/хлорметилстирол). Монолитные матрицы были получены путем полимеризации *in situ* в кварцевом капилляре с внутренним диаметром 100 мкм. Внутренняя поверхность капилляра перед проведением полимеризации силанизировалась с помощью 3-(триметоксисилил)пропилметакрилата, чтобы обеспечить ее ковалентное связывание с монолитом.^{86,87} Кроме того, было исследовано влияние условий проведения полимеризации (температуры, времени и т.д.) на эффективность монолитных колонок. Матрицы, показавшие максимальную эффективность, были затем модифицированы с целью введения в структуру монолита четвертичных атомов азота.⁸⁸ На рис. 3 показано разделение модельной смеси анионов на полученной капиллярной монолитной колонке. Смесь анионов делится до базовой линии при времени анализа около 2.5 ч, что значительно дольше, чем в приведенных выше примерах с колонками на основе силикагеля. Авторы отмечают, что коэффициент C в уравнении Ван-Деемтера для полимерных монолитных колонок имеет значение на порядок более высокое, чем оно наблюдалось для колонок на

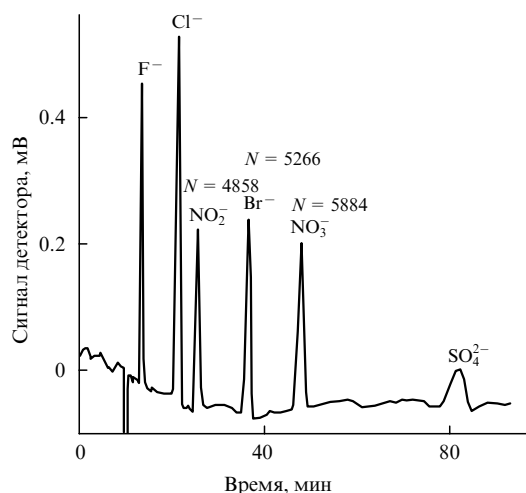


Рис. 3. Разделение смеси анионов на монолитной капиллярной колонке на основе поли(ЭДМА/ГМА).⁸⁸ Внутренний диаметр колонки 100 мкм, поверхность колонки модифицирована амином; элюент — 0.005 М раствор фталата калия в воде, рН 4.25, скорость 0.1 мл·мин⁻¹, давление 700 кПа, *N* — число ТТ на колонку.

основе силикагеля, что препятствует проведению быстрых и эффективных разделений на этих колонках. В то же время селективность разделения ионов на полимерных колонках оказывается существенно более высокой, чем на силикагельных, что позволяет сократить время анализа до 15–20 мин с полным разделением всех ионов стандартной смеси.⁸⁸

V. Использование монолитных стационарных фаз в газовой хроматографии

Первые исследования, посвященные использованию монолитных колонок в газовой хроматографии, относятся к концу 1960-х — началу 1970-х гг.^{25–27} Однако полученные колонки имели низкую эффективность, были нестабильны и очень скоро были полностью вытеснены полыми капиллярными колонками. Недавно описаны^{39,89} монолитные колонки для газодсорбционной хроматографии, полученные на основе поли(дивинилбензола) (ПДВБ). Колонки были приготовлены с использованием новой методики проведения полимеризации и названы авторами «прессованными» монолитными колонками.⁸⁹ Согласно результатам термогравиметрического анализа, монолит в колонке не подвергался разрушению вплоть до 380°C. Высокая термическая стабильность монолита позволяет рутинно эксплуатировать такие колонки при температурах ~300°C без ухудшения их характеристик. Более детально получение и свойства монолитных колонок для газовой хроматографии рассмотрены в работах^{90–97}. Для монолитных капиллярных колонок на основе силикагеля и органических полимеров были исследованы проницаемость,^{90,91} пористость,^{90,91} нагрузочные характеристики⁹⁶ и эффективность.^{92,93} Монолитные капиллярные колонки на основе силикагеля характеризуются высокими значениями пористости (до 95%). Несмотря на то что собственно монолит занимает меньшую часть общего объема колонки, он оказывает значительное сопротивление потоку газа-носителя. В результате проницаемость изученных монолитных капиллярных колонок была на три порядка

ниже, чем проницаемость исходных полых капилляров. В то же время благодаря высоким значениям пористости проницаемость монолитных колонок оказалась на один-два порядка выше, чем проницаемость колонок, заполненных гранулированным сорбентом, размер зерна которого равен размеру доменов монолита. Оценка пористости и проницаемости колонок газохроматографическим методом позволила оценить различия в структуре синтезированного сорбента.⁹⁵

Были рассмотрены также нагрузочные характеристики монолитных колонок. Как известно, нагрузочная характеристика колонки зависит от количества неподвижной фазы в колонке, а также от ее пористости.⁹⁶ Удельная нагрузка монолитной капиллярной колонки (т.е. нагрузка на единицу длины колонки) превышала в 7–10 раз удельную нагрузку полых капиллярных колонок того же внутреннего диаметра. Это свойство монолитных колонок позволило использовать относительно короткие колонки (0.5 м и менее) со стандартными инъекционными системами без опасения перегрузить колонку. Кроме того, показано, что удельная эффективность монолитных капиллярных колонок значительно выше удельной эффективности полых капиллярных колонок. Значения ВЭТТ, полученные на монолитных капиллярных колонках, сильно зависели от природы газа-носителя.⁹⁴ Так, например, замена диоксида углерода на гелий приводила к десятикратному снижению ВЭТТ. Величины ВЭТТ, полученные в оптимальных хроматографических условиях для монолитных колонок с оптимизированной структурой монолита, составляли 10–15 мкм и были сравнимы с величинами ВЭТТ для тех же самых колонок в режиме ВЭЖХ. Низкие значения ВЭТТ и высокая нагрузочная емкость монолитных колонок позволяют использовать в газовой хроматографии колонки малой длины и обеспечивают высокоэффективные и скоростные разделения. На рис. 4 показано разделение тестовой смеси легких углеводородов на монолитной колонке длиной 47 см с внутренним диаметром 50 мкм с использованием традиционной системы детектирования. Все компоненты смеси были разделены до базовой линии за время, не превышающее 20 с, с производительностью ~900 ТТ·с⁻¹ (для *n*-бутана).

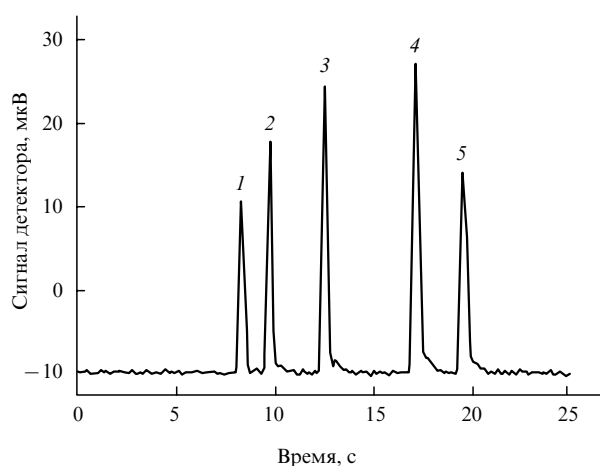


Рис. 4. Разделение смеси легких углеводородов на монолитной капиллярной колонке (47 см × 50 мкм) на основе ПДВБ. 1 — метан, 2 — этан, 3 — пропан, 4 — 2-метилпропан, 5 — *n*-бутан. Газ-носитель CO₂, давление 9 МПа, 80°C.

VI. Заключение

Монолитные неподвижные фазы представляют собой новый тип сорбентов для жидкостной и газовой хроматографии, капиллярного электрофореза, различных систем пробоподготовки, твердофазной экстракции и др. Они обладают большей пористостью и лучшей проницаемостью по сравнению с традиционными колонками, заполненными гранулированным сорбентом такого же зернения. Множество мономеров, которые могут использоваться для синтеза монолита, а также большое разнообразие реагентов для модифицирования поверхности готового монолита позволяют создавать монолитные колонки с различными свойствами, необходимыми для решения самых разных задач. Обладая высокой удельной эффективностью, монолитные колонки могут иметь небольшую длину, а благодаря пологой кривой Ван-Деемтера, часто наблюдаемой у монолитных колонок, они могут эксплуатироваться также при высоких скоростях подвижной фазы, что открывает путь к быстрым и эффективным разделением.

Помимо несомненных преимуществ, главные из которых перечислены выше, монолитные сорбенты обладают и определенными недостатками. Главный из них — трудности воспроизводимого синтеза монолита. Решение этой проблемы заключается в строгом контроле параметров синтеза (температуры и времени полимеризации, состава полимеризационной смеси). Возможность проведения воспроизводимого синтеза позволит наладить серийный выпуск монолитных колонок различного формата.

В последние годы на рынок выпущены различные колонки с монолитными сорбентами. Среди них колонки как для ВЭЖХ, так и для ИХ, колонки на основе силикагелевой и органополимерной матриц, стандартного аналитического и капиллярного форматов, а также монолитные СИМ-диски, использующиеся главным образом при анализе биологических объектов. Быстрое развитие новых методов приготовления хроматографических сорбентов позволяет пользователям решать широкий круг задач без перехода на оборудование для работы с высокими и сверхвысокими давлениями.

Литература

1. F.Švec, C.G.Huber. *Anal. Chem.*, **78**, 2100 (2006)
2. Б.Г.Беленький. *Биоорг. химия*, **32**, 360 (2006)
3. P.Jandera, J.Urban, D.Moravcová. *J. Chromatogr., A*, **1109**, 60 (2006)
4. L.Trojer, S.H.Lubbad, C.P.Bisjak, G.K.Bonn. *J. Chromatogr., A*, **1117**, 56 (2006)
5. L.Rieux, D.Lubda, H.A.G.Niederländer, E.Verpoorte, R.Bischoff. *J. Chromatogr., A*, **1120**, 165 (2006)
6. P.Holdšvendová, J.Suchánková, M.Bunček, V.Bačkovská, P.Coufal. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 23 (2007)
7. R.Skudas, B.A.Grimes, E.Machtejevas, V.Kudirkaite, O.Kornysova, T.P.Hennessy, D.Lubda, K.K.Unger. *J. Chromatogr., A*, **1144**, 72 (2007)
8. B.Paull, P.Nesterenko. *TrAC — Trends Anal. Chem.*, **24**, 295 (2005)
9. D.Victory, P.Nesterenko, B.Paull. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **129**, 700 (2004)
10. C.Ó.Ríordáin, E.Gillespie, D.Connolly, P.N.Nesterenko, B.Paull. *J. Chromatogr., A*, **1142**, 185 (2007)
11. E.Sugrue, P.N.Nesterenko, B.Paull. *J. Chromatogr., A*, **1075**, 167 (2005)
12. L.Barron, P.N.Nesterenko, D.Diamond, M.O'Toole, K.T.Lau, B.Paull. *Anal. Chim. Acta*, **577**, 32 (2006)
13. T.Ikegami, K.Horie, J.Jaafar, K.Hosoya, N.Tanaka. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 31 (2007)
14. B.L.Waguespack, S.A.Hodges, M.E.Bush, L.J.Sondergeld, M.M.Bushey. *J. Chromatogr., A*, **1078**, 171 (2005)
15. L.W.Lim, Y.Okouchi, T.Takeuchi. *Talanta*, (2008) (in the press)
16. L.-J.Yan, Q.-H.Zhang, Y.-Q.Feng, W.-B.Zhang, T.Li, L.-H.Zhang, Y.-K.Zhang. *J. Chromatogr., A*, **1121**, 92 (2006)
17. N.Tanaka, H.Kobayashi, N.Ishizuka, H.Minakuchi, K.Nakanishi, K.Hosoya, T.Ikegami. *J. Chromatogr., A*, **965**, 35 (2002)
18. T.Ikegami, N.Tanaka. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 527 (2004)
19. Z.Jiang, N.W.Smith, P.D.Ferguson, M.R.Taylor. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 39 (2007)
20. F.Švec. *J. Chromatogr., B*, **841**, 52 (2006)
21. A.Maruška, O.Kornysova. *J. Chromatogr., A*, **1112**, 319 (2006)
22. D.L.Mould, R.L.M.Synge. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **77**, 964 (1952)
23. D.L.Mould, R.L.M.Synge. *Biochem. J.*, **58**, 571 (1954)
24. M.Kubin, P.Spacek, R.Chromeczek. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 3881 (1967)
25. W.D.Ross, R.T.Jefferson. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 386 (1970)
26. F.D.Hileman, R.E.Sievers, G.C.Hess, W.D.Ross. *Anal. Chem.*, **45**, 1126 (1973)
27. H.Schnecko, O.Bieber. *Chromatographia*, **4**, 109 (1971)
28. T.B.Tennikova, B.G.Belenkii, F.Švec. *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 63 (1990)
29. Пат. 4889632А США (1989)
30. Пат. 4952349 США (1990)
31. Пат. 4923610 США (1990)
32. D.Josić, J.Reusch, K.Löstner, O.Baum, W.Reutter. *J. Chromatogr., A*, **590**, 59 (1992)
33. T.B.Tennikova, M.Bleha, F.Švec, T.V.Almazova, B.G.Belenkii. *J. Chromatogr., A*, **555**, 97 (1991)
34. T.B.Tennikova, F.Švec. *J. Chromatogr., A*, **646**, 279 (1993)
35. K.Hosoya, Y.Kishii, K.Kimata, T.Araki, N.Tanaka, F.Švec, J.M.J.Frèchet. *J. Chromatogr., A*, **690**, 21 (1995)
36. M.Petro, F.Švec, J.M.J.Frèchet. *J. Chromatogr., A*, **752**, 59 (1996)
37. Q.C.Wang, F.Švec, J.M.J.Frèchet. *J. Chromatogr., A*, **669**, 230 (1994)
38. S.Xie, F.Švec, J.M.J.Frèchet. *J. Chromatogr., A*, **775**, 65 (1997)
39. S.Xie, R.W.Allington, J.M.J.Frèchet, F.Švec. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **76**, 86 (2002)
40. F.Švec, J.M.J.Frèchet. *Anal. Chem.*, **64**, 820 (1992)
41. F.Švec, J.M.J.Frèchet. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**, 34 (1999)
42. S.Hjertén, J.-L.Liao, R.Zhan. *J. Chromatogr., A*, **473**, 273 (1989)
43. S.El Deeb, L.Preu, H.Wätzig. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 85 (2007)
44. J.M.Armenta, B.Gu, C.D.Thulin, M.L.Lee. *J. Chromatogr., A*, **1148**, 115 (2007)
45. J.P.Hutchinson, E.F.Hilder, M.Macka, N.Avdalovic, P.R.Haddad. *J. Chromatogr., A*, **1109**, 10 (2006)
46. H.Minakuchi, K.Nakanishi, N.Soga, N.Ishizuka, N.Tanaka. *Anal. Chem.*, **68**, 3498 (1996)
47. H.Minakuchi, K.Nakanishi, N.Soga, N.Ishizuka, N.Tanaka. *J. Chromatogr., A*, **762**, 135 (1997)
48. N.Ishizuka, H.Minakuchi, K.Nakanishi, K.Hirao, N.Tanaka. *Colloids Surf., A*, **187–188**, 273 (2001)
49. N.Ishizuka, H.Minakuchi, K.Nakanishi, N.Soga, N.Tanaka. *J. Chromatogr., A*, **797**, 133 (1998)
50. W.Gao, G.Yang, J.Yang, H.Liu. *Turk. J. Chem.*, **28**, 379 (2004)
51. R.Takahashi, K.Nakanishi, N.Soga. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **17**, 7 (2000)
52. M.Al-Bokari, D.Cherrak, G.Guiochon. *J. Chromatogr., A*, **975**, 275 (2002)
53. C.Xie, J.Hu, H.Xiao, X.Su, J.Dong, R.Tian, Z.He, H.Zou. *Electrophoresis*, **26**, 790 (2005)

54. C.Xie, J.Hu, H.Xiao, X.Su, J.Dong, R.Tian, Z.He, H.Zou. *J. Sep. Sci.*, **28**, 751 (2005)
55. C.Xie, M.Ye, X.Jiang, W.Jin, H.Zou. *Mol. Cell. Proteom.*, **5**, 454 (2006)
56. K.Nakanishi, H.Shikata, N.Ishizuka, N.Koheiya, N.Soga. *J. High Resolut. Chromatogr.*, **23**, 106 (2000)
57. M.Lubeck, U.Schweiger-Hufnagel, C.Baessmann, R.Rabus, M.Shen. *LC-GC Eur.*, (Suppl. 5), 12 (2003)
58. F.Vanrobaeys, R.van Coster, G.Dhondt, B.Devreese, J.van Beeumen. *J. Proteome Res.*, **4**, 2283 (2005)
59. W.-H.Jin, J.Dai, S.-J.Li, Q.-C.Xia, H.-F.Zou, R.Zeng. *J. Proteome Res.*, **4**, 613 (2005)
60. H.Liu, D.Lin, J.R.Yates III. *BioTechniques*, **32**, 898 (2002)
61. C.C.Wu, J.R.Yates III. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 262 (2003)
62. X.Li, Y.Gong, Y.Wang, S.Wu, Y.Cai, P.He, Z.Lu, W.Ying, Y.Zhang, L.Jiao, H.He, Z.Zhang, F.He, X.Zhao, X.Qian. *Proteomics*, **5**, 3423 (2005)
63. C.Hunzinger, A.Schrattenholz, S.Poznanović, G.P.Schwall, W.Stegmann. *J. Chromatogr., A*, **1123**, 170 (2006)
64. E.Nagele, M.Vollmer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 3008 (2004)
65. E.Mirgorodskaya, C.Brauer, P.Fucini, H.Lehrach, J.Gobom. *Proteomics*, **5**, 399 (2005)
66. H.S.Chen, T.Rejtar, V.Andreev, E.Moskovets, B.L.Karger. *Anal. Chem.*, **77**, 2323 (2005)
67. C.Legido-Quigley, N.Marlin, N.W.Smith. *J. Chromatogr., A*, **1030**, 195 (2004)
68. H.Toll, R.Wintringer, U.Schweiger-Hufnagel, C.G.Huber. *J. Sep. Sci.*, **28**, 1666 (2005)
69. A.Tholey, H.Toll, C.G.Huber. *Anal. Chem.*, **77**, 4618 (2005)
70. B.M.Mayr, O.Kohlbacher, K.Reinert, M.Sturm, C.Gröpl, E.Lange, C.Klein, C.G.Huber. *J. Proteome Res.*, **5**, 414 (2006)
71. A.C.A.Veloso, N.Teixeira, I.M.P.L.Ferreira. *J. Chromatogr., A*, **967**, 209 (2002)
72. T.S.Nühse, A.Stensballe, O.N.Jensen, S.C.Peck. *Mol. Cell. Proteom.*, **2**, 1234 (2003)
73. T.B.Tennikova, J.Reusch. *J. Chromatogr., A*, **1065**, 13 (2005)
74. D.Forcic, K.Branovic-Cakanic, J.Ivancic, R.Jug, M.Barut, A.Strancar. *J. Chromatogr., A*, **1065**, 115 (2005)
75. T.V.Gupalova, O.V.Loikina, V.G.Pălăgnuk, A.A.Totolian, T.B.Tennikova. *J. Chromatogr., A*, **949**, 185 (2002)
76. M.Rucevic, J.G.Clifton, F.Huang, X.Li, H.Callanan, D.C.Hixson, D.Josic. *J. Chromatogr., A*, **1123**, 199 (2006)
77. M.M.Comegys, S.-H.Lin, D.Rand, D.Britt, D.Flanagan, H.Callanan, K.Brilliant, D.C.Hixson. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35063 (2004)
78. D.Josic, M.K.Brown, F.Huang, H.Callanan, M.Ručević, A.Nicoletti, J.Clifton, D.C.Hixson. *Electrophoresis*, **26**, 2809 (2005)
79. I.V.Kalashnikova, N.D.Ivanova, T.G.Evseeva, A.Yu.Menshikova, E.G.Vlakh, T.B.Tennikova. *J. Chromatogr., A*, **1144**, 40 (2007)
80. H.-P.Nirmaier, E.Fischer, A.Meyer, G.Henze. *J. Chromatogr., A*, **730**, 169 (1996)
81. *Capillary Electrochromatography*. (Eds Z.Deyl, F.Švec). Elsevier, Amsterdam, 2001
82. L.J.Sondergeld, M.E.Bush, A.Bellinger, M.M.Bushey. *J. Chromatogr., A*, **1004**, 155 (2003)
83. M.I.H.Helaleh, T.Korenaga. *J. Chromatogr., B*, **744**, 433 (2000)
84. X.Jiang, X.Zhang, M.Liu. *J. Chromatogr., A*, **857**, 175 (1999)
85. J.Weiss, D.Jensen. *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 81 (2003)
86. Е.Н.Викторова, А.Ю.Канатьева, А.А.Королев, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **81**, 507 (2007)
87. А.Ю.Канатьева, А.А.Королев, Е.Н.Викторова, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **81**, 568 (2007)
88. А.Ю.Канатьева, А.А.Королев, Е.Н.Викторова, А.А.Курганов. В кн. *Всероссийский симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях»*, Москва; Клязьма, 2007
89. D.Sykora, E.C.Peters, F.Švec, J.M.J.Frechet. *Macromol. Mater. Eng.*, **275**, 42 (2000)
90. А.А.Королев, Т.П.Попова, В.Е.Ширяева, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **79**, 543 (2005)
91. А.А.Королев, Т.П.Попова, В.Е.Ширяева, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **80**, 132 (2006)
92. А.А.Королев, В.Е.Ширяева, Т.П.Попова, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **80**, 709 (2006)
93. А.А.Королев, В.Е.Ширяева, Т.П.Попова, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **80**, 896 (2006)
94. А.А.Королев, В.Е.Ширяева, Т.П.Попова, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **80**, 1290 (2006)
95. А.А.Королев, В.Е.Ширяева, Т.П.Попова, А.В.Козин, А.А.Курганов. *Высокомолекулярные соединения. Сер. А*, **48**, 1373 (2006)
96. А.А.Королев, Т.П.Попова, В.Е.Ширяева, А.В.Козин, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **81**, 552 (2007)
97. А.В.Козин, А.А.Королев, В.Е.Ширяева, Т.П.Попова, А.А.Курганов. *Журн. физ. химии*, **81**, 512 (2007)

MONOLITHIC STATIONARY PHASES IN LIQUID AND GAS CHROMATOGRAPHY

A.Yu.Kanatyeva, A.A.Kurganov, E.N.Viktorova, A.A.Korolev

*A.V.Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences
29, Leninsky prosp., 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)633-8520*

The results of studies devoted to the use of stationary phases based on monolithic materials in chromatography are summarised. The attention is focused on the advanced methods for preparation of monolithic columns and the use of these columns in various types of chromatographic separation ranging from analytical to preparative ones.

Bibliography — 97 references.

Received 5th October 2007