

На правах рукописи

СЫЧЕВ КОНСТАНТИН СЕРГЕЕВИЧ

**ПРИМЕНЕНИЕ СВЕРХСШИТОГО ПОЛИСТИРОЛА
В ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ**

**Специальность 05 11.11.
Хроматография и хроматографические приборы**

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



Москва-2004

Работа выполнена в лаборатории стереохимии сорбционных процессов ИНЭОС РАН, г. Москва

| | |
|------------------------|--|
| Научный руководитель: | доктор химических наук, профессор Даванков В. А. |
| Официальные оппоненты: | доктор химических наук, Яшин Яков Иванович |
| | доктор химических наук Лавин Сергей Николаевич |
| Ведущая организация: | Институт нефтехимического синтеза РАН |

Защита состоится 7 декабря 2004 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 062.246 03 при Институте физической химии РАН по адресу 119991, Москва, Ленинский проспект, 31, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химической литературы ИОНХ РАН по адресу- Москва, Ленинский проспект, 31.

Автореферат разослан 22 октября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук


Коломиец Л.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Устойчивой тенденцией последнего времени является активное применение полимерных материалов в различных адсорбционных технологиях, как крупномасштабных, промышленных, так и предназначенных для аналитической химии, - в частности, для методов твердофазной экстракции (ТФЭ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Одним из наиболее перспективных полимерных адсорбционных материалов является сверхсшитый полистирол, предложенный В.А. Даванковым и М.П. Цюрупой еще в 70-х годах. Совокупность уникальных свойств выгодно отличает сверхсшитый полистирол от ряда других полимерных материалов, потенциально позволяя применять этот материал фактически во всех сферах адсорбционных технологий, а также в медицине, в гетерогенном катализе, в технологиях синтеза наночастиц и многих других областях науки и промышленности.

В середине 90-х годов различные коммерческие, марки сверхсшитого полистирола стали появляться за рубежом. Однако, с самого начала эти материалы подавались в лучшем случае как «полистирол высокой шивки», а в ряде случаев - как эксклюзивное ноу-хау компании. Ряд уникальных свойств этих материалов так и остался невыявленным для многих потенциальных потребителей; наиболее вероятная причина этого заключается именно в засекреченности структуры коммерческих материалов, являющихся по существу сверхсшитыми полистиролами.

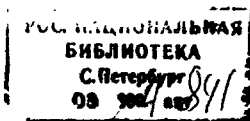
В представленной работе была предпринята попытка систематического изучения особенностей адсорбционных свойств материалов на базе сверхсшитого полистирола, разработанных для аналитических применений В.А. Даванковым и М.П. Цюрупой совместно с Британской фирмой Purolite Int. и любезно предоставленных фирмой, а именно, материала для твердофазной экстракции Purosep-200 с частицами неправильной формы размером 40-120 мкм и экспериментальных колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии с монодисперсным сферическим сорбентом Chromalite 5 HGN (5 μm , Hupercrosslinked, Gel-type, Non-activated).

Цель работы.

- Диссертационная работа посвящена
- исследованию адсорбционных свойств первых коммерчески доступных образцов выпускаемого для аналитических целей нового полимерного, материала - сверхсшитого полистирола;
 - разработке типовых и перспективных хроматографических разделений, сложных смесей органических соединений с применением ВЭЖХ колонок с сорбентом на основе сверхсшитого полистирола;
 - разработке комплексных аналитических методов с применением этого материала для твердофазной экстракции и решением важных в практическом отношении аналитических задач.

Научная новизна. Основным научным достижением работы, по всей видимости, можно считать установление основных механизмов удерживания сорбатов различной природы на сверхсшитом полистироле в самых различных условиях. Установление механизма удерживания открывает возможность предсказывать адсорбционное поведение материала, предлагать оптимальные области его применения с разработкой новых адсорбционных технологий, целенаправленно модифицировать материал с целью усиления каких-либо его желательных свойств, и ослабления нежелательных.

В ходе проведения данного исследования была разработана достаточно общая методология изучения механизмов удерживания сорбатов в хроматографических системах с применением статистического метода обработки параметров удерживания - факторного



Значительное внимание уделено уникальному свойству сверхсшитого полистирола: способности удерживать ненасыщенные соединения в неполярных средах за счет комплексообразования с переносом заряда π - π типа. Разделения в таких хроматографических системах продиктовали необходимость введения нового термина «квази-нормально-фазовый режим хроматографии», так как сочетание неполярного сверхсшитого полистирола с неполярными подвижными фазами невозможно описать в рамках общепринятой терминологии и тривиальных механизмов взаимодействий. Полученные на сверхсшитом полистироле закономерности удерживания за счет π -взаимодействий могут быть также применены для прогнозирования удерживания на иных неподвижных фазах с электрон-донорными/акцепторными фрагментами.

Практическая значимость. Результаты проведенного исследования¹ можно разделить на две категории: методологические и практические. К методологическим результатам можно отнести разработку, методологии исследования механизмов удерживания и установление закономерностей удерживания органических соединений на сверхсшитом полистироле или ином сорбенте. Практические результаты заключаются в разработке ряда аналитических методик с применением сверхсшитого полистирола в ТФЭ и ВЭЖХ.

Приведенные в работе методы подготовки пробы демонстрируют широкие возможности сверхсшитого полистирола: способность эффективно концентрировать целевые аналиты как из водных, так и углеводородных сред, очищать пробы от нежелательных компонентов с последующей легкой регенерацией сорбционного материала; сверхсшитый полистирол может также успешно применяться для замены растворителя пробы, с одновременной ее очисткой.

Применение сверхсшитого полистирола в ВЭЖХ открывает новую страницу в развитии полимерных неподвижных фаз для хроматографии. Уникальный материал, совместимый со всеми видами растворителей, может применяться для хроматографирования самых различных классов органических соединений как полярными, так и неполярными подвижными фазами. Сочетание трех основных механизмов удерживания (π -взаимодействий, дисперсионных и эксклюзионных) обеспечивает значительную гибкость ..аналитических методов с применением сверхсшитого полистирола, позволяющую регулировать в широком интервале селективность разделения.

Разработанные важные комплексные аналитические методики свидетельствуют о широких перспективах применения сверхсшитого полистирола как универсального адсорбента для ТФЭ и ВЭЖХ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработка оригинальной методологии изучения механизмов удерживания сорбатов в жидкостной хроматографии.
2. Результаты изучения механизмов удерживания на сверхсшитом полистироле. Основные закономерности изменения удерживания и селективности в зависимости от типа адсорбатов и состава подвижной фазы.
3. Несколько десятков оригинальных примеров применения сверхсшитого полистирола в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделения выполнены в различных адсорбционных режимах: обращенно-фазовом, квази-нормально-фазовом, смешанном, а также в эксклюзионном режимах.
4. Шесть практически важных комплексных аналитических методик с применением ТФЭ на сверхсшитом полистироле в обращенно-фазовом и квази-нормально-фазовом режимах.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 публикациях и доложены на

1. Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы хроматографии» (к 100-летию со дня рождения К.В.Чмутова), март 2002, г. Москва.
2. 26th International Symposium on High Performance Liquid Separations and Related Techniques, June 2002, Montreal, Canada.
3. "100 Years of Chromatography", 3rd Int. Symposium on Separations in BioSciences, May 2003, Moscow.
4. 27th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 2003, Nice, France.
5. Всероссийской конференции «Иониты-2003», октябрь 2003, г. Воронеж.
6. Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы», март 2004, г. Москва.
7. 43th International Symposium «Analytical Forum 2004», July 2004, Warsaw, Poland.
8. Всероссийской конференции «Иониты-2004», сентябрь 2004, г. Воронеж.

Объем и структура работы. Работа состоит из введения, литературного обзора, результатов и обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 147 страницах текста, содержит 87 рисунков и 14 таблиц. В списке цитируемой литературы 144 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована актуальность работы, поставлены ее цели, а также приведены пояснения относительно ее структуры.

В литературном обзоре освещены основные вопросы, необходимые для понимания сущности работы. Обзор состоит из трех частей. Часть 2.1. посвящена методам твердофазного концентрирования и адсорбционной очистки. Основное внимание уделено применению в ТФЭ полимерных материалов, которые в данное время быстро вытесняют материалы на основе силикагеля. В части 2.2. рассмотрены основные примеры применения полимерных неподвижных фаз в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Поскольку значительная часть исследования посвящена изучению удерживания сверхсшитым полистиролом ненасыщенных соединений за счет π -взаимодействий, в части 2.3. освещены вопросы, касающиеся свойств комплексов с переносом заряда π - π типа, а в части 2.4. перечислены основные типы неподвижных фаз, обладающих способностью образовывать лабильные комплексы π - π типа с адсорбатами.

Далее следуют результаты и обсуждения. Части 3.1, 3.2. и 3.3 третьей главы посвящены разработке методологии исследования механизмов удерживания; здесь также даны все необходимые пояснения относительно применения в хроматографии терминов, взятых из молекулярной спектроскопии. В части 3.4. описаны эксперименты по установлению механизмов удерживания на сверхсшитом полистироле в средах различной полярности. Глава 4 содержит описание примеров использования сверхсшитого полистирола в высокоэффективной жидкостной хроматографии. В главе 5 приведены разработанные комплексные аналитические методики с применением сверхсшитого полистирола для твердофазной экстракции на стадии подготовки пробы.

В выводах приведены основные результаты работы и оценена ее научная новизна. Практическая значимость полученных результатов отражена в главе 7. Данные по апробации работы приведены в главе 8.

ГЛАВА 3

Специфика сверхсшитого полистирола как адсорбента для ЖХ состоит в том, что соответствующий ему механизм удерживания в любых условиях является сложным, комплексным, часто различным для соединений разных классов даже в одинаковых условиях эксперимента. Некоторая косность современной терминологии, принятой в ЖХ, не позволяет в должной мере отразить все многообразие адсорбционных свойств этого материала. В связи с этим, для обозначения определенного сочетания физико-химических взаимодействий, приводящих к определенному порядку элюирования некоторых тестовых соединений, был введен новый термин «тип удерживания».

Для жидкостной хроматографии можно выделить следующие основные типы удерживания: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, ионообменный, лигандообменный, квази-нормально-фазовый, эксклюзионный. С одной стороны, каждый тип удерживания характеризуется индивидуальным сочетанием физико-химических взаимодействий. С другой стороны, при анализе селективности определенного ряда хроматографических систем каждый тип удерживания проявляет себя как отдельная линейно независимая тенденция, проявляющаяся во всей совокупности систем, или отдельный *фактор*. Факторы не могут быть измерены напрямую, а находятся путем математической обработки матриц параметров удерживания исследуемой выборки адсорбатов в исследуемых хроматографических системах методом *факторного анализа*. В этом случае фактор представляет собой столбец численных значений, каждое из которых соответствует одному из анализов, то есть фактически представляет собой дескриптор каждого типа удерживания, или определенное свойство исследуемых анализов в данной совокупности хроматографических систем.

С математической точки зрения, задача нахождения факторов сводится к задаче нахождения собственных векторов матрицы корреляции исходной матрицы параметров удерживания. Собственные векторы пропорциональны факторам, а собственные значения пропорциональны вкладам факторов в описание исходных данных. Таким образом, вклад данного типа удерживания может быть оценен для любой хроматографической системы исходя из вклада приписываемого ему фактора.

Таким образом, типы удерживания являются своеобразным «базисом» для описания свойств хроматографических систем. Характеристика определенной совокупности систем может быть получена путем обработки параметров удерживания тестовой выборки адсорбатов методом факторного анализа, с последующей идентификацией факторов путем нахождения их корреляций с «типами удерживания».

Как правило, в хроматографических системах существует более одной линейно независимой тенденции - основная, как правило, соответствует доминирующему типу удерживания, а дополнительные соответствуют «сочетаниям» некоторых других типов взаимодействий (которые, возможно, еще следует интерпретировать и назвать). Достаточно опометчиво было бы каждую такую тенденцию называть «типом удерживания»; в дальнейшем, *факторами* будем называть именно такие «минорные» тенденции. Описать «сложную» хроматографическую систему можно будет, установив основной тип удерживания, а также выявив возможные дополнительные факторы, влияющие на селективность системы.

Такое описание имеет важное следствие: нельзя формально утверждать, что какая-либо хроматографическая система является нормально-фазовой, обращенно-фазовой и т.д. лишь на основании марки адсорбента и состава подвижной фазы; каждая система характеризуется определенным типом удерживания в сочетании с определенными факторами, вклад которых в удержание зависит не только от характера двух фаз хроматографической системы, но также и от выборки адсорбатов.

ГЛАВА 4

Ряд экспериментов, проведенных на нейтральном гидрофобном сверхшитом полистироле в рамках данной работы, выявили уникальное свойство этого материала - способность удерживать ненасыщенные соединения, в особенности с сопряженными π -системами, при применении подвижных фаз на основе гексана и других неполярных растворителей.

Такого рода системы не соответствовали «классическим» канонам разделения хроматографических систем на нормально-фазовые («полярная НФ и неполярная ПФ») и обращенно-фазовые («неполярная НФ и полярная ПФ»), так как они соответствовали ситуации «неполярная НФ и неполярная ПФ». Такого рода хроматографические системы были нами названы «квази-нормально-фазовыми» (КНФ).

Основная исходная гипотеза удерживания ненасыщенных соединений на сверхшитом полистироле в квази-нормально-фазовом режиме заключалась в том, что удерживание здесь происходит за счет образования лабильных π -комплексов между адсорбентом и адсорбатами. Для экспериментальной проверки этой гипотезы, а также для возможной оценки вклада π -взаимодействий в удерживание в разных хроматографических режимах, были проведены две серии экспериментов.

Первая серия экспериментов была проведена на фазе 250x4.6 Chromalite 5HGN (сверхшитый полистирол) в квази-нормально-фазовом режиме: были получены значения $\ln k'$ для трех хроматографических систем (системы 1-3, см. табл. 1) на одной модельной смеси адсорбатов (ароматические углеводороды, в том числе монозамещенные бензолы); в дополнение, значения $\ln k'$ были получены и в обращенно-фазовом режиме для сокращенной модельной смеси адсорбатов (системы 4-6, см. табл. 1). Для сравнения, в обращенно-фазовом режиме для сокращенной модельной смеси были получены значения $\ln k'$ на C18 фазе 250x4.6 Zorbax SB-C18 в двух хроматографических системах (системы 7-8, см. табл. 1).

Таблица 1. Составы подвижных фаз, применявшихся в ходе первой серии экспериментов.

| | |
|-----------|---|
| Система 1 | Пентан-хлористый метилен-изопропанол 60:20:20 |
| Система 2 | Пентан-хлористый метилен-изопропанол 70:20:10 |
| Система 3 | Пентан-хлористый метилен-изопропанол 85:5:10 |
| Система 4 | Ацетонитрил-тетрагидрофуран-вода 70:10:20 |
| Система 5 | Ацетонитрил-хлористый метилен-вода 80:10:10 |
| Система 6 | Ацетонитрил-изопропанол-вода 70:20:10 |
| Система 7 | Ацетонитрил-вода 60:40 |
| Система 8 | Ацетонитрил-вода 50:50 |

Из хроматографических данных, полученных в квази-нормально-фазовом режиме, были выделены два фактора: первый $F1_{\text{КНФ}}$ основной, со вкладом 95.8%, и второй $F2_{\text{КНФ}}$ минорный, со вкладом 3.8% (табл. 2). Из данных, полученных на сверхшитом полистироле в обращенно-фазовом режиме, был выделен лишь один фактор $F_{\text{ОФ}}$ со вкладом 99.85%; также один фактор $F_{\text{ОФ-C18}}$ (99.96%) описывал удерживание на C18 фазе в обращенно-фазовом режиме.

Основная гипотеза, таким образом, была переформулирована следующим образом: доминирующий фактор $F1_{\text{КНФ}}$ является дескриптором, отражающим π -взаимодействия в квази-нормально-фазовой хроматографической системе. Доказательство этого утверждения являлось основной целью первой серии экспериментов.

На рисунке 1 показана типичная хроматограмма тестовых адсорбатов в одной из исследованных квази-нормально-фазовых хроматографических систем. Из хроматограммы видно, что наименьшим удерживанием обладают толуол (и бензол); производные бензола с мощными либо электрон-донорными, либо электрон-акцепторными заместителями в ароматическом кольце обладают большим удерживанием. Этот эффект можно интерпретировать, рассматривая лабильные π -комплексы «адсорбат-адсорбент» как комплексы с переносом заряда (КПЗ). В первом приближении, энергия адсорбции в этом случае должна быть пропорциональна разнице в л-электронной плотности ароматических систем адсорбата и адсорбента, или, в терминах теории МО, обратно пропорциональна разнице ВЗМО адсорбента и НСМО адсорбата (если адсорбат - акцептор), или разнице НСМО адсорбента и ВЗМО адсорбата (если адсорбат - донор).

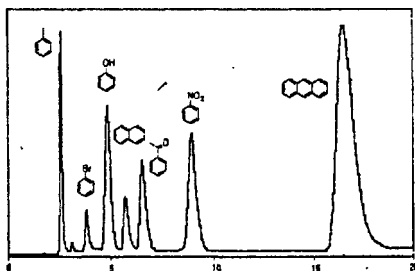


Рисунок 1. Хроматограмма модельной смеси ароматических соединений на сверхсшитом полистироле в квази-нормально-фазовом режиме. ПФ: система 3.

Квантовомеханический расчет энергий молекулярных орбиталей – чрезвычайно непростая задача. С другой стороны, для заместителей в бензольном кольце разработан ряд эмпирических параметров – констант Гаммета-Тафта. В частности, σ_p^0 константа отражает величину мезомерного эффекта заместителя (в этом случае реализуется сопряжение через π -систему кольца с реакционным центром другого заместителя, находящегося в пара-положении). В случае образования комплексов с переносом заряда реакционным центром является сама ароматическая система, а заместитель влияет на процесс образования КПЗ через мезомерный эффект. Таким образом, один и тот же процесс (образование лабильных π -комплексов) может быть описан и с позиции теории МО, и с позиций теории ВС. Теория МО является более фундаментальной, точной, но и более сложной. Теория ВС же позволяет применять для описания межмолекулярных взаимодействий (с некоторым приближением) различные полумпирические схемы, в том числе и такой параметр как константа Гаммета-Тафта.

Корреляция фактора $F_{1\text{КНФ}}$ с σ_p^0 константой свидетельствует о том, что $F_{1\text{КНФ}}$ является дескриптором π -взаимодействий.

На рисунке 2 показаны зависимости $F_{1\text{КНФ}}$ от σ_p^0 для электрон-донорных и электрон-акцепторных заместителей с коэффициентами корреляции 0.991 и 0.997 соответственно. Таким образом, основная гипотеза была подтверждена: взаимодействие «адсорбент-адсорбат» в квази-нормально-фазовом режиме происходит в основном за счет образования лабильных π -комплексов между адсорбентом и адсорбатами; в случае данного эксперимента дескриптором π -взаимодействий являлся фактор $F_{1\text{КНФ}}$, его вклад в удерживание составило значение 95.8%.

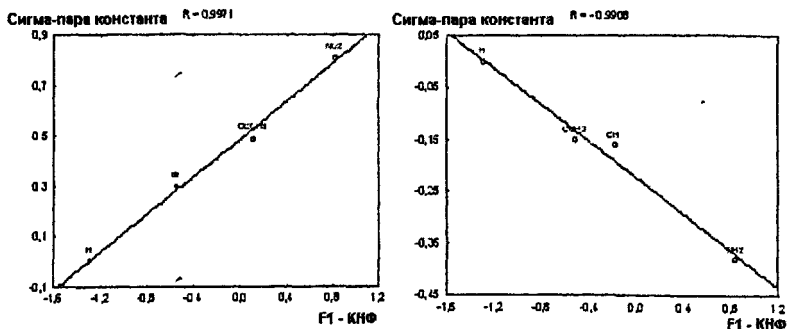


Рисунок 2. Корреляция фактора $F1_{KHФ}$ с σ_p^0 для замещенных бензолов с электроно-акцепторными и электроно-донорными заместителями.

«Обращенно-фазовый» фактор для сверхсшитого полистирола $F_{0Ф}$ хорошо коррелировал с соответствующим фактором для С18 фазы $F_{0Ф-С18}$. Эта корреляция подтверждает, что в типичных обращенно-фазовых условиях свойства сверхсшитого полистирола подобны свойствам С18 фаз, за исключением сильной разницы в гидрофобности, и в некоторых случаях — селективности.

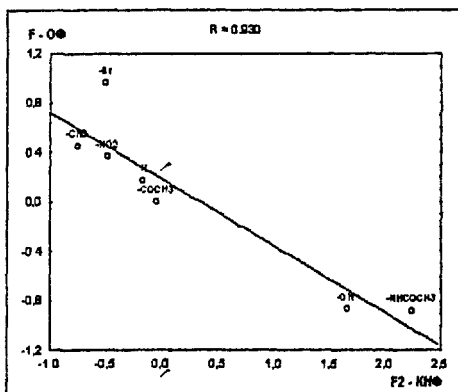


Рисунок 3. Корреляция факторов $F2_{KHФ}$ и $F_{0Ф}$.

системах 1-3: доминирующего (95.8%) типа, включающего взаимодействия с переносом заряда, и дополнительного, обращенно-фазового типа (3.8%).

Вторая серия экспериментов проводилась со следующими двумя целями: подтверждение общности выявленных в первой серии экспериментов закономерностей (на примере более широких выборок адсорбатов, подвижных фаз и неподвижных фаз, проявляющих электрон-донорные/акцепторные свойства), и изучение влияния подвижной фазы на удерживание и селективность хроматографических систем в квази-нормально-фазовом режиме.

Вторая серия экспериментов была проведена на фазе 250x4.6 Chromalite 5HGN (сверхсшитый полистирол) в квази-нормально-фазовом режиме: были получены значения $\ln k'$ для восьми хроматографических систем (системы 1-8, см. табл. 2) на модельной

Одним из наиболее интересных результатов явилась удовлетворительная корреляция минорного «квази-нормально-фазового» фактора $F2_{KHФ}$ с «обращенно-фазовым» фактором $F_{0Ф}$, при удалении из выборки адсорбатов нафталина (рис. 3); при удалении из выборки бромбензола корреляция становилась еще более очевидной. Наиболее простой, «поверхностной» интерпретацией этого результата является предположение о двух типах удерживания в исследованных

смеси адсорбатов (ароматические углеводороды, в том числе монозамещенные бензолы; выборка отличалась от выборки в первой серии экспериментов, и была шире последней).

Основным компонентом подвижных фаз теперь являлся гексан; добавками служили различные полярные органические растворители (табл. 2) При постановке эксперимента учитывалось, что некоторые выбранные полярные модификаторы могут достаточно активно взаимодействовать с адсорбатами, причем эти взаимодействия способны конкурировать со взаимодействиями адсорбатов с адсорбентом.

В эту же серию экспериментов для сравнения со сверхшрифтым полистиролом были включены два хиральных сорбента, 250x4,6 Chiralcel OD-H (диметилбеооилированная целлюлоза) и 250x4 6 Whelk-1,0 (арен-модифицированный силикагель), хиральные селекторы которых включают ароматические фрагменты, способные к образованию комплексов с переносом заряда (системы 9,10, табл. 2).

Таблица 2. Составы подвижных фаз, применявшихся в ходе второй серии экспериментов.

| | | |
|------------|--|-------------------------|
| Система 1 | Гексан-тетрагидрофуран 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 2 | Гексан-этилацетат 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 3 | Гексан-толуол 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 4 | Гексан-хлористый метилен 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 5 | Гексан-ацетон 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 6 | Гексан-хлористый метилен-ацетон 60 25 15 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 7 | Гексан-изопропанол 60 40 | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 8 | Гексан | 250x4 6 Chromalite 5HGN |
| Система 9 | Гексан-изопропанол 90-10 | 250x4 6 Chiralcel OD-H |
| Система 10 | Гексан-изопропанол 80 20 | 250x4 6 Whelk-1,0 |

Из хроматографических данных, полученных в результате данной серии экспериментов, были выделены два фактора: первый F1 основной, со вкладом 86.4%, и второй F2 минорный, со вкладом 10.2%. Факторные нагрузки для F1 оказались фактически одинаковыми и близкими к единице, что свидетельствует о доминировании одного определенного механизма удерживания, описываемого фактором F1 (рис. 4), для всех типов исследованных хроматографических фаз и систем.

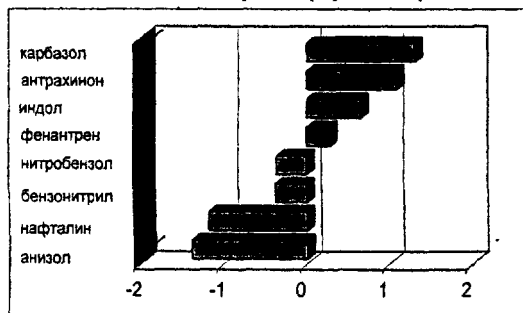


Рисунок 4. Значения первого фактора F1 для нескольких модельных адсорбатов.

Путем корреляция величин фактора F1 второй серии экспериментов с фактором F1_{кнб} первой серии ($R_{xy} = 0.98$) по четырем адсорбатам (анизол, нафталин, нитробензол, фенантрен) было показано, что фактор F1 также является фактором, описывающим

взаимодействия с переносом заряда, и характерным для более широких выборок адсорбатов и хроматографических систем.

Интерпретация фактора F2 представляется значительно более сложной задачей, чем интерпретация минорного фактора F2_{кнф} из первой серии экспериментов, поскольку в данной серии экспериментов были задействованы и хиральные фазы, существенно отличающиеся по химии поверхности. По всей видимости, F2 суммарно отражает «полярные» взаимодействия в исследованных системах, оказывающие влияние на индивидуальную селективность каждой из фаз.

С целью выявления характера и роли взаимодействий адсорбатов с полярным компонентом элюентов, были получены корреляции значений $\ln k'$ нитробензола и нафталина (сверхсшитый полистирол, квази-нормально-фазовый режим, системы 1,3,4,7,8, табл. 2) с наиболее распространенными критериями полярности растворителей (выполнявших роль добавок в исследованных элюентах): критерием полярности Снайдера P', тремя его составляющими $\chi_e P'$, $\chi_d P'$, $\chi_n P'$, отражающими вклад водородных связей протон-донорного $\chi_d P'$ и протон-акцепторного $\chi_e P'$ типов, а также вклад диполь-дипольных взаимодействий $\chi_d P'$; диэлектрической проницаемостью ϵ и элюирующей силой для силикагеля $\epsilon^0(\text{SiO}_2)$ (табл. 3).

Таблица 3. Корреляции между значениями $\ln k'$ для нитробензола и нафталина на сверхсшитом полистироле с различными характеристиками полярности растворителей, применявшихся в качестве добавок к гексану. Выборка растворителей включает хлористый метилен, гексан, изопропанол, ТГФ и толуол.

| | P' | $\chi_e P'$ | $\chi_d P'$ | $\chi_n P'$ | ϵ | $\epsilon^0(\text{SiO}_2)$ | $\ln k'$ нитробензола |
|-----------------------|-------|-------------|-------------|-------------|------------|----------------------------|-----------------------|
| $\ln k'$ нитробензола | -0.68 | -0.29 | -0.70 | -0.95 | -0.08 | -0.44 | 1 |
| $\ln k'$ нафталина | -0.41 | 0.03 | -0.51 | -0.79 | 0.22 | -0.13 | 0.94 |

Удерживание на сверхсшитом полистироле, как видно из таблицы, не коррелирует со значениями $\epsilon^0(\text{SiO}_2)$, что подтверждает неприменимость термина «нормально-фазовая хроматография» к разделению ароматических соединений на неполярных электроно-донорных/акцепторных фазах в неполярных растворителях.

Наибольшая корреляция была получена для значений удерживания нитробензола с $\chi_n P'$ составляющей параметра полярности Снайдера $R_{\text{HY}} = 0.95$, что свидетельствует о преимущественно диполь-дипольном характере взаимодействий «адсорбат-элюент» для полярных адсорбатов в квази-нормально-фазовом режиме с указанными добавками к гексану. Однако, уже для нафталина соответствующая корреляция составляет всего лишь $R_{\text{HY}} = 0.79$, то есть зависимость удерживания от $\chi_n P'$ является лишь тенденцией.

На рисунках 5 и 6 приведены диаграммы зависимости $\ln k'$ нитробензола и нафталина от составляющей параметра полярности Снайдера $\chi_n P'$. Стрелки указывают на существенные отклонения зависимости от «идеальной» для толуола и дихлорметана.

Из рисунков 5 и 6 видно, что толуол и дихлорметан, то есть растворители, способные взаимодействовать с адсорбатами путем образования слабых комплексов с переносом заряда, обладают «аномально» большой элюирующей силой в квази-нормально-фазовом режиме, если исходить только из предположения о диполь-дипольных взаимодействиях «адсорбат-элюент». Эти данные можно интерпретировать таким образом, что в квази-нормально-фазовом режиме не только на поверхности сорбента, но и в подвижной фазе реализуются как минимум два типа взаимодействий «адсорбат-элюент»: диполь-дипольное и с переносом заряда; вклад каждого из них зависит от конкретной системы и адсорбата. Действительно, вполне можно представить себе наличие слабых взаимодействий с переносом заряда между нитробензолом и нафталином с одной стороны и толуолом или дихлорметаном – с другой. Эти взаимодействия конкурируют с взаимодействиями «адсорбат-адсорбент», уменьшая удерживание адсорбатов.

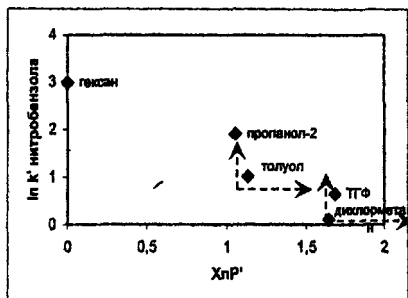


Рисунок 5. Диаграмма зависимости $\ln k'$ нитробензола от составляющей параметра полярности Снайдера $\chi_{\text{п}} P'$, отражающей вклад дипольных взаимодействий в «полярность» растворителя, для нескольких растворителей, применявшихся как добавки в подвижные фазы.

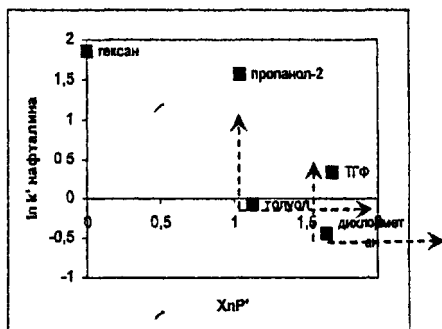
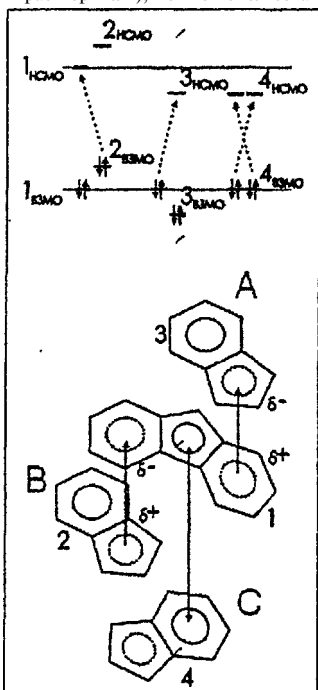


Рисунок 6. Диаграмма зависимости $\ln k'$ нафталина от составляющей параметра полярности Снайдера $\chi_{\text{п}} P'$, отражающей вклад дипольных взаимодействий в «полярность» растворителя, для нескольких растворителей, применявшихся как добавки в подвижные фазы.

В то же время, вывод о влиянии способности модификатора к диполь-дипольным взаимодействиям на удерживание нитробензола и нафталина также согласуется с теоретическими представлениями. Нитробензол сам имеет значительный дипольный момент. Более того, являясь сильным акцептором электронов, он сам образует адсорбционный комплекс со сверхсшитым полистиролом, причем комплекс также имеет дипольный момент. По этой причине для элюирования нитробензола способность модификатора к диполь-дипольным взаимодействиям очень существенна. Нафталин не является ни активным акцептором, ни явным донором электронов; это означает, что дипольный момент комплекса нафталина с адсорбентом очень мал. Сам нафталин не имеет дипольного момента, и, в итоге, для его элюирования способность модификатора к диполь-дипольным взаимодействиям является малосущественной (неудовлетворительная

корреляция удерживания с $\chi_{дP}$ модификатора). Для элюирования нафталина намного более существенна способность модификатора к взаимодействиям с переносом заряда.

Значения логарифмов факторов емкости нитробензола и нафталина, полученные на различных подвижных фазах «гексан-добавка» 6:4 (где «добавка» - другой органический растворитель), можно использовать для расположения растворителей в ряд по



возрастающей элюирующей силе этих растворителей в квази-нормально-фазовой хроматографии на сверхсшитом полистироле. Элюотропные ряды растворителей для нитробензола и нафталина показаны на рисунках 8 и 9.

Следует заметить, что энергии взаимодействия нафталина и нитробензола с адсорбентом достаточно близки. Сказанное следует из рассмотрения схем взаимодействия орбиталей адсорбента и различных типов (А, В, С) адсорбатов при образовании комплексов с переносом заряда (рис.7). По элюирующей силе в квази-нормально-фазовом режиме на сверхсшитом полистироле самым активным элементом оказывается дихлорметан. За ним следует ацетон для полярных сорбатов и толуол - для неполярных.

Добавки же изопропанола как модификатора подвижной фазы, столь эффективные в стандартной нормально-фазовой хроматографии, оказываются несущественными в квази-нормально-фазовой системе.

Рисунок 7. Схема взаимодействий орбиталей адсорбента с орбиталями различных типов адсорбатов при образовании комплексов с переносом заряда π - π типа. А - адсорбат является акцептором электронов; В - донором электронов; С - не является ни донором, ни акцептором электронов.

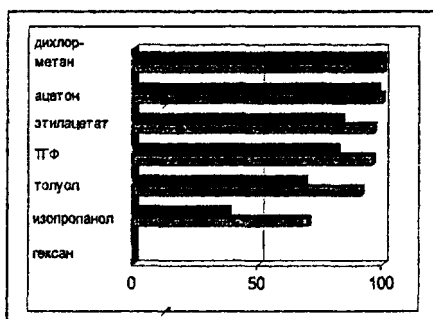


Рисунок 8. Элюотропный ряд, составленный согласно экспериментальным значениям I_g k' (верхние столбцы) и k' (нижние столбцы) нитробензола. Для гексана принято значение 0, для дихлорметана - 100.

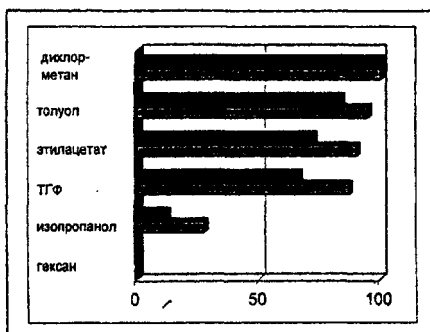


Рисунок 9. Элюотропный ряд, составленный согласно экспериментальным значениям $lg k'$ (верхние столбцы) и k' (нижние столбцы) нафталина. Для гексана принято значение 0, для дихлорметана – 100.

ГЛАВА 5

Сверхсшитый полистирол является перспективным адсорбционным материалом для жидкостной хроматографии, поскольку он механически прочен, химически инертен, устойчив к агрессивным средам, совместим с неполярными и полярными органическими растворителями, а также с водой. В то же время, этот материал обладает рядом особенностей, существенно отличающих его от широко применяемых типов адсорбентов на основе силикагеля; ряд уникальных свойств позволяют разработать новые применения сверхсшитого полистирола для ВЭЖХ анализа различных типов образцов.

Изменение порядков элюирования в различных режимах хроматографии на сверхсшитом полистироле. В водно-органических средах при хроматографировании на сверхсшитом полистироле реализуется обращенно-фазовый режим хроматографирования; в неполярных органических растворителях реализуется квази-нормально-фазовый режим. В элюентах промежуточной полярности, к примеру, хлористый метилен-метанол, удерживание обусловлено как «полярными» взаимодействиями в системе, так и взаимодействиями с переносом заряда. Как результат, подобные хроматографические системы оказываются чрезвычайно «гибкими», то есть селективность таких систем может быть значительным образом изменена, путем изменения количественного состава подвижной фазы. Такой, режим элюирования, может быть назван «смешанным», то есть промежуточным между обращенно-фазовым и квази-нормально-фазовым.

Кардинальное изменение селективности системы при переходе от обращенно-фазовой к квази-нормально-фазовой хроматографии на сверхсшитом полистироле может быть проиллюстрировано на примере разделения тестовой смеси (см. рис. 10). «Смешанный» режим, в котором реализуются оба механизма удерживания, представлен системой хлористый метилен-метанол 50:50.

Типичным примером практического применения «смешанного» режима хроматографии с применением системы хлористый метилен-метанол может служить групповое разделение углеводородов в топливах. Так, в системе хлористый метилен-метанол 50:50 удастся хорошо разделить группы алифатических, моно- и бициклических ароматических углеводородов, практически полностью подавив при этом расщепление внутри каждой из групп.

Эффект может быть объяснен следующим образом. В обращенно-фазовых условиях удерживание возрастает при увеличении алкильного заместителя в ароматическом ядре по причине увеличения гидрофобности сорбата. В квази-нормально-фазовых условиях замещенные ароматические углеводороды удерживаются слабее незамещенных; причиной чего, по всей видимости, является значительный вклад эксклюзионного механизма в удерживание. В «смешанных» условиях «обращенно-

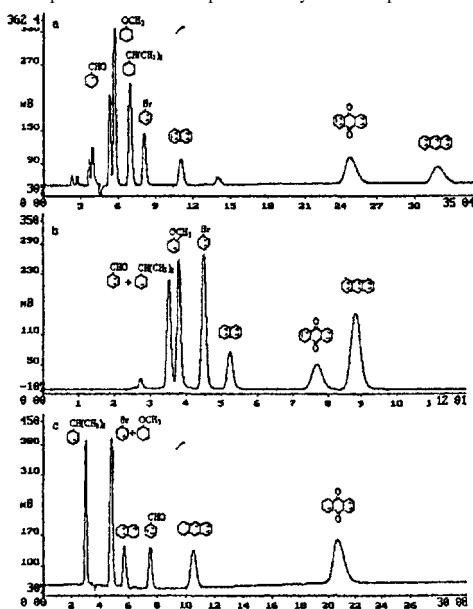
фазовый» инкремент алкильного заместителя компенсирует его отрицательный эксклюзионный инкремент, и все ароматические углеводороды одной группы элюируются примерно в одно и то же время

«Смешанные» системы элюентов, как правило, обладают максимальной элюирующей силой по сравнению с обращенно-фазовыми и квази-нормально-фазовыми системами. На сверхсшитом полистироле может быть реализовано градиентное элюирование, в котором начальной подвижной фазой может служить типичная КНФ или ОФ система, а конечной подвижной фазой - «смешанная» система. В этом случае ее активность разделения, и даже порядок элюирования компонентов, можно плавно регулировать путем соответствующего изменения профиля градиента.

Применение сверхсшитого полистирола для обращенно-фазовой хроматографии. При хроматографировании в обращенно-фазовом режиме сверхсшитый полистирол обладает двумя явными преимуществами перед алкилмодифицированными силикагелями. Во-первых, гидрофобность сверхсшитого полистирола соответствует гидрофобности современных полимерных адсорбционных материалов, **соответственно, неподвижные фазы подобного типа в перспективе являются идеальными фазами для анализов в режиме он-лайн концентрирования.** Поскольку сверхсшитый полистирол является фазой с ограниченно доступной поверхностью (см. далее), анализы с он-лайн концентрированием характеризуются дополнительной селективностью, поскольку многие мешающие определению высокомолекулярные компоненты пробы элюируются с нулевым объемом.

Во-вторых, большая гидрофобность сверхсшитого полистирола позволяет проводить разделения чрезвычайно полярных соединений без применения неорганических буферов высокой концентрации. Кроме того, при необходимости pH буфера может быть установлен на любое значение в широком интервале 1-14.

На экспериментальной фазе Chromahte 5HGN было продемонстрировано, что сверхсшитый полистирол может успешно применяться в обращенно-фазовом режиме



ВЭЖХ для разделения полиароматических углеводородов, фенолов (см. рис. 11), токсичных веществ, загрязняющих природные и сточные воды пестицидов, фенолов и ароматических углеводородов. В системе ацетонитрил-вода (0,1% HClO₄) 15:85 был разделен ряд гидрофильных органических кислот.

Рисунок 10. Хроматограмма модельной смеси в различных режимах элюирования. А) Обращенно-фазовый режим, ПФ: ацетонитрил-изопропанол-вода 80:15:5, В) «Смешанный» режим, ПФ: хлористый метилен-метанол 1:1; С) Квази-нормально-фазовый режим, ПФ: гексан-хлористый метилен 80:20. НФ: 250x4.6 Chromahte 5-HGN.

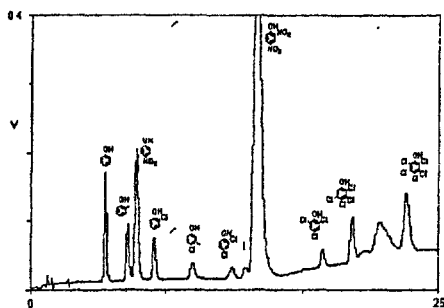


Рисунок 11. Хроматограмма стандартной смеси 10 приоритетных фенолов. Градиентный режим. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. ПФ А: ацетонитрил-ТГФ-вода-уксусная к-та 40:15:40:2, ПФ В: ацетонитрил-ТГФ-уксусная к-та 85:15:2, 0-20% В за 15 мин., 20-100% В за 10 мин.

Применение сверхсшитого полистирола для гель-фильтрационной хроматографии. В режиме гель-фильтрационной ВЭЖХ, к примеру, при применении хлористого метилена в качестве подвижной фазы, сверхсшитый полистирол проявляет свои эксклюзионные свойства по отношению к низкомолекулярным соединениям, что становится возможным благодаря «порам» со средним размером порядка 20 ангстрем.

Другое интересное свойство состоит в наличии двух пределов эксклюзии при гель-фильтрации на сверхсшитом полистироле. Первый предел эксклюзии порядка 1000 Да обусловлен микропорами; второй предел порядка 1,000,000 Да обусловлен «порами», которые по сути являются пустотами между частицами адсорбента.

Сказанное может быть проиллюстрировано разделением стандартов полистирола. В этом случае при применении хлористого метилена в качестве подвижной фазы адсорбционный механизм полностью подавляется. Из хроматограммы видно, что в гель-фильтрационном режиме стирол может быть достаточно полно отделен от димера. Дифференциация в области олигомеров также примечательна (рис. 12).

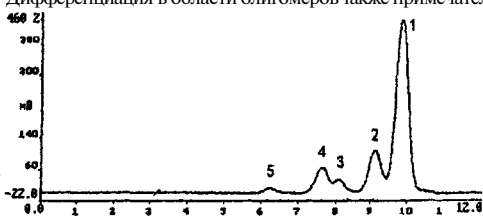


Рисунок 12. Хроматограмма стандартов полистирола. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. ПФ: хлористый метилен. 1 – стирол, 2 – димер, 3 – 980, 4 – 10,100, 5 – 330,000.

Применение сверхсшитого полистирола в квази-нормально-фазовой хроматографии. Квази-нормально-фазовая хроматография на сверхсшитом полистироле является удобным методом разделения ароматических и многих других ненасыщенных (в особенности карбонилсодержащих) органических соединений. Метод характеризуется значительной гибкостью; варьирование добавок различных органических растворителей в подвижной фазе на основе гексана позволяет плавно регулировать селективность разделения.

Хроматографирование на сверхсшитом полистироле в квази-нормально-фазовых условиях может также применяться для подготовки пробы - отделения целевых аналитов от сопутствующей матрицы и их фракционирования с последующим анализом фракций другим методом, к примеру, газовой хроматографией.

В квази-нормально-фазовом режиме равновесие в хроматографической системе устанавливается достаточно быстро, что позволяет проводить градиентные элюирования (рис. 13), характеризующиеся высокой воспроизводимостью времен удерживания.

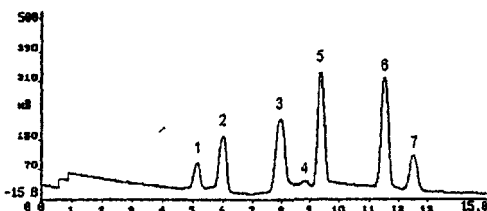


Рисунок 13. Хроматограмма модельной смеси ароматических соединений в режиме градиентного элюирования. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. ПФ А: гексан-хлористый метилен 95:5, ПФ В: гексан-хлористый метилен 60:40, 100% А в течение 1 мин., затем 0-100% В за 15 мин. 1 – бензол, 2 – стирол, 3 – анизол, 4 – нафталин, 5 – фенилизотиоцианат, 6 – нитробензол, 7 – фенафрен.

Сверхсшитый полистирол как фаза с ограничено доступной поверхностью (**restricted access packing**). Поскольку наиболее распространенный размер «пор» сверхсшитого полистирола составляет величину 2.0 - 4.0 нм, многие крупные молекулы не могут в них проникнуть, что приводит к отсутствию их удерживания. Фазы, проявляющие подобное свойство не удерживать крупные молекулы, называют фазами с ограничено доступной поверхностью (**restricted access packings**).

В обращенно-фазовых условиях это свойство сверхсшитого полистирола значительно увеличивает селективность анализов с применением он-лайн концентрирования из различных сложных природных матриц, поскольку многие мешающие определению целевых аналитов контаминанты, к примеру, гуминовые кислоты и фульвокислоты, элюируются с нулевым объемом (рис. 14).

Применение сверхсшитого полистирола для анализа состава топлив в обращенно-фазовом, квази-нормально-фазовом и «смешанном» режимах. Сверхсшитый полистирол может с успехом применяться для анализа ароматических углеводородов в самых различных видах промышленных топлив и машинных масел. В зависимости от поставленной задачи для разделения может применяться как обращенно-фазовый режим, так и квази-нормально-фазовый и «смешанный» режимы.

В квази-нормально-фазовом режиме группы моно и бициклических ароматических углеводородов разделяются по механизму взаимодействий с переносом заряда: удерживание увеличивается с увеличением числа или размера ароматических циклов в структуре соединения. Внутри же каждой группы алкилзамещенные углеводороды разделяются по эксклюзионному механизму. В результате наибольшим удерживанием внутри каждой группы обладают незамещенные соединения (рис. 15).

В «смешанном» режиме значительное влияние на удерживание начинают оказывать дисперсионные («гидрофобные») взаимодействия, что прежде всего сказывается в появлении положительного инкремента алкильных групп в удерживание. Можно подобрать такие условия, в которых положительный «гидрофобный» инкремент алкильного заместителя компенсирует его отрицательный эксклюзионный инкремент, и ароматические углеводороды одной группы элюируются практически в одном пике. «Смешанный» режим может, таким образом, применяться для фракционирования групп ароматических углеводородов с последующим анализом фракций методом ГХ (рис. 15).

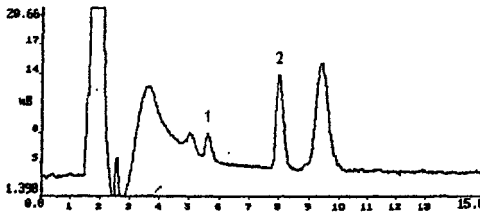


Рисунок 14. Хроматограмма *p*-хлорфенола и толуола на фоне матрикса почвы. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. ПФ: ацетонитрил-метанол-вода 45:50:5 (0.1% HClO_4). 1 – *p*-хлорфенол, 2 – толуол. Детекция – 260 нм.

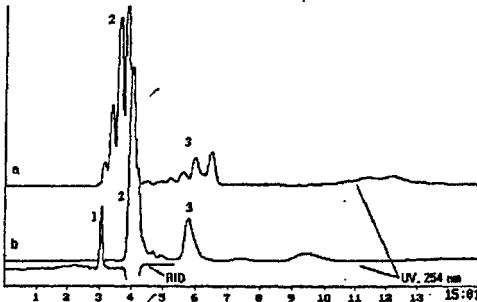


Рисунок 15. Хроматограммы топлива Аи-92 в квази-нормально-фазовом и «смешанном» режимах. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. А) ПФ: гексан-хлористый метилен 80:20, В) ПФ: хлористый метилен-метанол 1:1. 1 – алифатические углеводороды, 2 – моноароматические углеводороды, 3 – бициклические углеводороды.

В обращенно-фазовом режиме сверхсшитый полистирол проявляет уникальную по сравнению с алкилмодифицированными силикагелями межгрупповую селективность. На С18 и подобных фазах зоны элюирования моно-, би- и трициклических углеводородов сильно перекрываются; на сверхсшитом полистироле группы элюируются последовательно друг за другом, внутри же группы разделение соответствует разделению на алкилмодифицированных силикагелях (рис. 16).

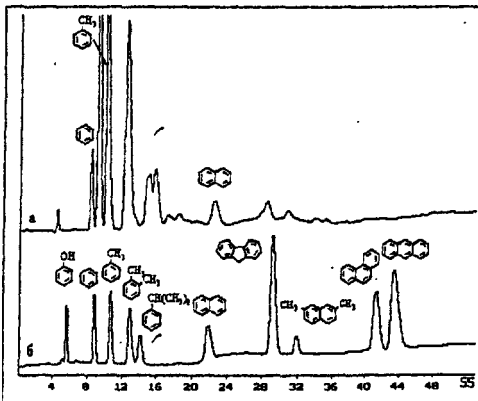


Рисунок 16. а) Хроматограмма топлива Аи-95, б) хроматограмма модельной смеси ароматических соединений. НФ: 250x4.6 Chromalite 5-HGN. ПФ А: ацетонитрил-изопропанол-вода 55:25:20, ПФ В: ацетонитрил-изопропанол 70:30, 100% А в течение 20 мин., затем 0-100% В за 35 мин.

ГЛАВА 6

Как материалы для твердофазной экстракции сверхшшитые полистиролы уже зарекомендовали себя с лучшей стороны, что видно по резкому увеличению числа работ с их применением за последние несколько лет. Тем не менее, круг аналитических задач, решаемых с использованием сверхшшитых полистиролов на стадии пробоподготовки, все еще остается достаточно узким, - основным типом объекта являются различные образцы вод, в частности питьевых, грунтовых, сточных и т.д. Кроме того, до сих пор в полной мере не осознаны возможности сверхшшитого полистирола к экстракции ароматических соединений из неполярных сред; примеры применения этих материалов в квази-нормально-фазовом режиме сорбции являются единичными. В данной работе предпринята попытка расширить круг аналитических задач, решаемых с применением ТФЭ на сверхшшитом полистироле.

Определение остаточных количеств пестицидов в продуктах питания (совместно с С.В. Волковичем и К.И. Эллером, Институт питания РАМН). Контроль содержания остаточных количеств пестицидов в продуктах питания составляет одну из основных задач экологического мониторинга, целью которой является обеспечение безопасности жизнедеятельности и здоровья населения. В связи с этим на первый план выходит разработка надежных методов группового определения пестицидов в пищевых продуктах, как для рутинного мониторинга, так и арбитражного решения.

Для проведения рутинных групповых определений пестицидов в растительных образцах нами была предложена методика, основанная на применении метода ТФЭ. Измерение степеней извлечения аналитов проводилось с применением метода ГХ-ДЭЗ. Исходный образец представлял собой пюре из овощей и фруктов. В освобожденный от твердых остатков (после высаливания сульфатом магния) ацетонитрильный экстракт добавлялись тестовые пестициды на уровне 1 мг/кг. После пятикратного разбавления 50мМ водным раствором хлорида натрия 20 мл экстракта концентрировались на картридже с 1 мл адсорбента R18sep-200. Аналиты смывались 10 мл (или 20 мл) этилацетата, смыв сушился над 200 мг безводного сульфата магния. После этого экстракт подвергался дополнительной очистке на DEAE-силикагеле и анализировался методом ГХ-МС. Итоговые степени извлечения тестовых аналитов приведены в таблице 4.

Таблица 4. Степени извлечения аналитов в случаях очистки пробы на DEAE силикагеле и окиси алюминия, в скобках приведены значения, полученные при смыве аналитов с полистирольного картриджа 20 см³ (в остальных случаях - 10 см³) этилацетата.

| Аналит | Степени извлечения при очистке на DEAE силикагеле | Степени извлечения при очистке на окиси алюминия |
|----------------------|---|--|
| Трифлуралин | 81 (85) | 18 |
| Атразин | 81(81) | 74 |
| Базудин (диазинон) | 87(87) | 47 |
| Линдан | 80 (84) | 29 |
| Дурбан (хлорпирифос) | 85 (90) | 60 |
| ДДТ | 78 (86) | 82 |

Определение пренилированных флавоноидов в пиве методом ОФ ВЭЖХ-УФ(ФЛД) с применением твердофазного концентрирования на сверхшшитом полистироле (совместно с М. Алексеевой и К.И. Эллером, Институт питания РАМН). Пренилированные флавоноиды относятся к природным полифенольным соединениям - флавоноидам, замощенным по углеродным или кислородным центрам пренильными группировками. Пренилированные флавоноиды, агликоны классов халконов и флавонолов, наряду с гликозидами кверцетина и кемпферола относятся к основным флавоноидным соединениям хмеля. Актуальность разработки метода определения пренильных флавоноидов хмеля прежде всего обусловлена возможностью ее применения

для экспертизы подлинности и качества биологически активных добавок на хмелевой основе. Определение пренилфлавоноидного состава пива может применяться для контроля за соблюдением условий технологического процесса пивоварения.

Картридж со сверхшпшитым полистиролом регенирировали 10 мл этилацетата, кондиционировали 5 мл ацетонитрила и 5 мл воды. 20 мл пива дегазировали и пропускали через картридж с объемной скоростью 3 мл/мин, затем картридж промывали 5 мл воды. Воду выгесняли из картриджа током азота, флавоноиды элюировали 10 мл этилацетата. Этилацетат отгоняли в токе азота, сухой остаток перерастворяли в 200 мкл ацетонитрила, аликвоту 20 мкл вводили в хроматограф.

По результатам исследования, основным пренилфлавоноидом, содержащимся в пиве, является изоксантогулом. Каждый образец пива характеризуется индивидуальными соотношениями между исследуемыми компонентами - пренилфлавоноидами ряда флавонов и халконов; таким образом, полученные хроматограммы образцов пива можно применять для экспертизы пива по методу «отпечатков пальцев». При концентрировании на сверхшпшитом полистироле достигаются количественные значения степеней извлечения пренилированных флавоноидов.

Определение микотоксина патулина во фруктах и соках методом НФ ВЭЖХ с применением твердофазной экстракции на сверхшпшитом полистироле (совместно с К.И. Эллером, Институт питания РАМН). Патулин является токсичным метаболитом - продуктом жизнедеятельности многих видов плесеней *Penicillium* и *Aspergillus*. Установлено, что патулин является естественным контаминантом различной фруктовой продукции; его присутствие может служить признаком некачественного фруктового сырья.

20 г гомогенизированных фруктов (пюре, соки с мякотью) помещались в плоскодонную колбу 200 мл, добавлялось 50 мл воды, 15 мл раствора Карреза 1 и 15 мл раствора Карреза 2. Осадок отделялся центрифугированием (3000 об/мин за 10 мин), аликвота 50 мл отбиралась для твердофазной экстракции.

20 г сока *бр* мякоти, или 50 мл аликвоты, пропускаются через патрон с «Puroser-200» на вакуумном манифолде при объемной скорости не выше 5 мл/мин, затем с той же скоростью патрон промывается 10 мл воды. Основная часть воды из патрона удаляется под вакуумом, затем патрон сушится током азота в течение 5-10 минут. Патулин вымывается из картриджа последовательно 2,5 см³, 0,3 см³ и 0,3 см³ этилацетата в виал объемом 5 мл, каждый раз верхний (этилацетатный) слой декантируется с остаточной воды (капля на дне виала). Этилацетатные слои объединяются, растворитель отгоняется током азота при комнатной температуре или при слабом нагревании досуха. Сухой остаток перерасторяется в 200 мкл этилацетата, 20 мкл пробы вводится в хроматографическую колонку, или наносится на хроматографическую пластину. В случае применения ТСХ сухой остаток допускается перерасторвать в 100 мкл этилацетата для увеличения чувствительности метода. Образцы проб хранятся при -18 °С.

Для регенерации картридж промывается последовательно 5 мл этилацетата, 3 мл ацетонитрила, 10 мл смеси ацетонитрил-5% водная фосфорная кислота 1:1, 10 мл воды, после чего может применяться для новой твердофазной экстракции.

Степени извлечения патулина из яблочных, виноградных и апельсиновых соков в экспериментах изменялись от 82% до 93%, среднее значение составило 86% (СКО 3%, $p = 6$). Эти значения являются в среднем на 10 % выше, чем степени извлечения в методиках с жидкостной экстракцией. Нептательное просушивание патрона с полистиролом после экстракции (до элюирования патулина) может стать причиной повышенного количества в нем остаточной воды, что в целом приводит к понижению степени извлечения на 10%. В случае же очень тщательной сушки картриджа азотом степень извлечения - довольно стабильна и, как правило, выше 90%, однако время анализа при этом неоправданно увеличивается.

Определение ПАУ бенз[а]пирена в образцах сухих копильных препаратов. Уникальная способность сверхсшитого полистирола адсорбировать ПАУ из гексановых экстрактов была использована при разработке методики контроля за содержанием канцерогена бенз[а]пирена в образцах сухих копильных препаратов.

5 г копильного препарата экстрагировали 50 мл гексана, к экстракту добавляли 1 мл изопропанола. Экстракт пропускали через слой DEAE-силикагеля, а затем через картридж со сверхсшитым полистиролом. Концентрирующий картридж промывали 1 мл метанола и сушили в токе азота; анализы смывали 10 мл хлористого метилена. Растворитель отгоняли в токе азота, сухой остаток перерастворяли в 100 мкл хлористого метилена; пробу анализировали методом ГХ-МС.

Целью адсорбционной очистки гексанового экстракта на DEAE-силикагеле в данном случае является удаление из образца фенольных соединений, содержание которых в копильных препаратах очень велико. Проведение стадии очистки образца до твердофазной экстракции предотвращает перегрузку концентрирующего картриджа веществами матрицы образца, и таким образом увеличивает практические значения объема проскаки анализов. Добавка 2% изопропанола в гексановый экстракт предотвращает адсорбцию ПАУ на DEAE-силикагеле; промывка картриджа 1 мл метанола дополнительно очищает пробу от фенолов.

Данная методика позволяет достичь достаточно высоких степеней извлечения ПАУ. Частично теряются лишь би и трициклические ПАУ; бенз[а]пирен извлекается количественно.

Определение ПАУ в образцах рыбы. Возможности сверхсшитого полистирола в извлечении ПАУ из жира и жиросодержащих образцов были использованы при разработке методики анализа ПАУ в образцах рыбы. Подготовка пробы проводилась следующим образом. 20 г рыбного фарша смешивали с 3 г сульфата натрия, добавляли 50 мл циклогексана, экстракционную емкость помещали в ультразвуковую баню для экстракции в течение 10 минут, затем циклогексановый экстракт отделяли, и рыбный фарш экстрагировали еще раз 50 мл циклогексана по приведенной схеме. 100 мл экстракта упаривали под вакуумом до 15 мл и со скоростью 3 мл/мин пропускали через картридж с 200 мг сверхсшитого полистирольного сорбента Isolute ENV+ (Великобритания). Картридж промывали 2 мл циклогексана, анализы смывали 10 мл дихлорметана. Элюат очищали пропуская через слой окиси алюминия, растворитель отгоняли в токе азота до 1 мл, пробу анализировали методом ГХ-МС.

Для сравнения пробы подготавливали обычным способом с применением жидкостной переэкстракции ПАУ из циклогексанового экстракта в ацетонитрил, с последующим отгоном ацетонитрила на роторном испарителе досуха и с последующим перерастворением сухого остатка в дихлорметане.

Результаты измерения степеней извлечения по двум методикам, с применением ТФЭ на сверхсшитом полистироле и жидкостной переэкстракции, суммированы в таблице 5. По методике с ТФЭ уже для трициклических ПАУ наблюдаются практически количественные степени извлечения, тогда как в методе с применением жидкостной переэкстракции степени извлечения не превышают 20%. Кроме того, методика с жидкостной переэкстракцией является чрезвычайно сложно осуществимой техникой при анализе проб с большим содержанием жира из-за отсутствия 'раслаивания' в системе циклогексан-ацетонитрил, даже после центрифугирования.

Таблица 5. Степени извлечения некоторых ПАУ по описанной методике с применением ТФЭ на сверхшитом полистироле и по стандартной методике с применением жидкостной перекрестации.

| Аналит | Степень извлечения при ТФЭ, % | Степень извлечения при ЖЭ, % | Отношение степеней извлечения, ТФЭ/ЖЭ |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Нафталин | 68 | 21 | 3,2 |
| Ацетнафтилен | 79 | 16 | 4,9 |
| Фенантрен | 94 | 15 | 6,3 |
| Хризен | 93 | 14 | 6,6 |

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная методология изучения механизма удерживания сорбатов в жидкостной хроматографии. Основная идея подхода состоит в сопоставлении понятия «тип удерживания» с линейно независимыми дескрипторами хроматографической системы (факторами), которые вычисляются из хроматографических данных с помощью метода факторного анализа. Интерпретация факторов осуществляется путем анализа их корреляций с известными физико-химическими свойствами (параметрами) адсорбатов. Даже при невозможности однозначной интерпретации физического смысла факторов, этот метод позволяет (за счет значительной свертки информации) выделить минимальное количество линейно независимых тенденций в хроматографической системе, влияющих на селективность разделения.

2. Сделаны первые шаги в изучении механизма удерживания на сверхшитом полистироле. Установлены основные закономерности изменения удерживания и селективности в зависимости от типа адсорбата и состава подвижной фазы. Удерживание сорбатов на сверхшитом полистироле в широких рамках полярности подвижных фаз можно описать комбинацией π -взаимодействий, дисперсионных и «гидрофобных» взаимодействий с сорбентом, а также эксклюзионных эффектов. Результирующий тип удерживания зависит от структуры адсорбата и состава подвижной фазы. В случае неполярных смешанных элюентов (квази-нормально-фазовый тип удерживания) для сверхшито полистирола характерны два различных ряда изменения элюотропной силы органических растворителей, относящиеся к полярным и неполярным ароматическим адсорбатам. Установлено, что для этого типа удерживания основную роль играют π -взаимодействия адсорбатов с адсорбентом. Высказано предположение о зависимости устойчивости адсорбционных π - π комплексов «адсорбент-адсорбат» от взаимного расположения ВЗМО и НСМО орбиталей адсорбента и адсорбата.

3. Установление механизмов удерживания на сверхшитом полистироле позволило целенаправленно разработать около пятидесяти оригинальных хроматографических методик с применением этой неподвижной фазы в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделения выполнены в различных адсорбционных режимах: обращенно-фазовом, квази-нормально-фазовом, смешанном, а также в эксклюзионном режиме. Для обращенно-фазового и квази-нормально-фазового режимов предложены тестовые смеси для оценки эффективности различных сверхшитых полистирольных неподвижных фаз.

4. Твердофазная экстракция на сверхшитом полистироле была применена для адсорбционного концентрирования и очистки проб в пяти разработанных практически важных комплексных аналитических методах. ТФЭ впервые проводилась не только в обращенно-фазовом, но и в квази-нормально-фазовом режимах, т.е. не только из водных, но и из неполярных органических сред. Разработанные методики с применением ТФЭ на сверхшитом полистироле демонстрируют неоспоримые преимущества по сравнению с «классическими» методами с использованием жидкостно-жидкостной экстракции.

Основные результаты диссертации изложены в следующих статьях:

1. Davankov V.A., Sychov C.S., Пуш М.М., Sochilina K.O. Hypercrosslinked polystyrene as a novel type of high-performance liquid chromatography column packing material Mechanisms of retention. // J. Chromatogr. A. 2003. V. 987. P. 67-75.
2. Даванков В.А., Сычев К.С., Ильин М.М. Применение сверхсшитых полистирольных сорбентов в высокоэффективной жидкостной хроматографии. // Заводская лаборатория. 2003. № 4. С. 3-7.
3. Sychov C.S., Пум М.М., Davankov V.A, Sochilina K.O. Elucidation of retention mechanisms on hypercrosslinked polystyrene used as column packing material for high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1030. P. 17-24.
4. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазная экстракция и адсорбционная очистка. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т. 4. № 1. С. 5-21.
5. Сычев К.С., Эллер К.И., Даванков В.А. Определение микотоксина патулина во фруктах и еоках методом НФ ВЭЖХ с применением твердофазной экстракции на сверхсшитом полистироле. // Заводская лаборатория. 2004. № 10.

Подписано в печать 18/07. 2004 года. Заказ № 49.
Формат 60x90/16. Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз.

Отпечатано на ризографе в отделе оперативной печати и информации
Химического факультета МГУ.

№ 2 1 0 1 6