

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ПОПОВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

**НОВЫЕ НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ
НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ МАТРИЦ
ДЛЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Специальность – 02.00.02 — Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва — 2022

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель

Чернобровкина Алла Валерьевна

Кандидат химических наук

Официальные оппоненты

Курганов Александр Александрович

*Доктор химических наук, старший научный сотрудник
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт
нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, и.о.
главного научного сотрудника*

Староверов Сергей Михайлович

*Доктор химических наук
Акционерное общество «БиоХимМак СТ», генеральный
директор*

Бессонова Елена Андреевна

*Кандидат химических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
высшего образования Санкт-Петербургский
государственный университет, Институт химии,
кафедра органической химии, доцент*

Защита диссертации состоится «02» марта 2022 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр. 3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, аудитория 337.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на сайте АИС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/420718227/>

Автореферат разослан «27» января 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат химических наук

И.А. Ананьева

ОЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время химическая промышленность ежегодно создает новые уникальные продукты, производство которых нуждается в обеспечении контроля качества высокого уровня. Большинство таких вопросов решаются методом ВЭЖХ, в начале XXI века расширившимся благодаря новому режиму – гидрофильному. Гидрофильная хроматография (ГИХ) – современный метод определения полярных соединений на полярных неподвижных фазах с использованием водно-органической смеси в качестве подвижной фазы. Такой подход обеспечивает альтернативную селективность по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией, благодаря чему метод ГИХ применяется во многих областях: контроль качества в пищевой и фармацевтической промышленности, экологический мониторинг, выявление фальсификатов и анализ биологических жидкостей для диагностирования социально значимых болезней. Актуальность метода также обусловлена простотой пробоподготовки, эффективностью и экспрессностью анализа многокомпонентных проб со сложной матрицей. Получение новых неподвижных фаз является ключевым моментом для расширения области применимости метода ГИХ.

Один из наиболее эффективных методов получения новых сорбентов – покрытие гидрофильным полимерным слоем, что позволяет экранировать влияние матрицы, а также придать или изменить электростатический заряд на поверхности сорбента. Выявление закономерностей между конкретными фрагментами структуры сорбента и его хроматографическими свойствами позволит в будущем создавать неподвижные фазы с заданными параметрами и селективностью по отношению к отдельным классам соединений.

На сегодняшний день на рынке коммерчески доступных неподвижных фаз для ГИХ в основном представлены сорбенты на основе силикагеля, обладающего небольшим диапазоном гидролитической стабильности. Использование оксидов металлов или полимеров, устойчивых в широком диапазоне pH, в качестве матриц сорбентов может способствовать повышению эффективности и обеспечить альтернативную селективность разделения за счет иного электростатического заряда, степени гидрофобности поверхности сорбента и возможности перевода аналитов в подходящую ионную форму, что актуально при разделении полярных соединений в режиме гидрофильной хроматографии.

Цель работы заключалась в изучении свойств неподвижных фаз на основе различных матриц и поиске структур гидрофильных функциональных слоев, обеспечивающих высокую эффективность и селективность сорбентов по отношению к полярным веществам различных химических классов в режиме гидрофильной хроматографии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- Изучить хроматографические свойства сорбентов с использованием теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз и на примере разделения модельных смесей полярных аналитов различных классов, включая кислотные, нейтральные и цвиттер-ионные соединения.
- Изучить влияние структуры и природы спейсеров, полярных полимеров и матриц на хроматографические свойства синтезированных сорбентов в режиме гидрофильной хроматографии.
- Оценить возможности и условия применения в гидрофильном режиме неподвижных фаз на основе диоксида титана, в том числе модифицированных путем адсорбционного закрепления полимерного функционального слоя.
- Установить влияние степени удаленности функционального слоя от поверхности матрицы при варьировании длины и структуры спейсера на хроматографические свойства неподвижных фаз на основе силикагеля и полистирол-дивинилбензола в режиме гидрофильной хроматографии.
- Оценить перспективы применения сорбентов на основе различных матриц для анализа реальных объектов в режиме гидрофильной хроматографии и сравнить возможности синтезированных неподвижных фаз с коммерчески доступными колонками.

Научная новизна

Показано, что использование разветвленного полиэтиленimina для формирования полимерного функционального слоя и диглицидилового эфира 1,4-бутандиола (1,4-БДДГЭ) в качестве спейсера способствует лучшей гидрофилизации и экранированию матрицы силикагеля по сравнению с другими изученными полимерами и спейсерами и потому является наиболее перспективным подходом к созданию новых высокоэффективных и селективных сорбентов для гидрофильной хроматографии.

Установлена и продемонстрирована нецелесообразность увеличения числа циклов модифицирования свыше двух при закреплении спейсера 1,4-БДДГЭ для получения сорбентов на основе силикагеля для гидрофильной хроматографии вследствие снижения эффективности.

Предложено использование диоксида титана, адсорбционно модифицированного полиэтиленимином с последующей сшивкой 1,4-БДДГЭ, в качестве сорбента для определения полярных веществ в режиме гидрофильной хроматографии. Установлены условия модифицирования, обеспечивающие стабильное закрепление функционального слоя на поверхности матрицы, а также условия разделения водорастворимых витаминов в режиме гидрофильной хроматографии.

Оценено влияние моно- и диглицидиловых эфиров в качестве модификаторов поверхности на хроматографические свойства в гидрофильном режиме неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола и установлено, что дополнительное модифицирование поверхности глицидолом и 1,4-БДДГЭ приводит к значительному росту гидрофильности и эффективности по полярным анализам.

Предложен способ управления эффективностью неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола, модифицированного полиэтиленимином, за счет варьирования длины и структуры спейсера. Продемонстрировано, что наилучшую эффективность в режиме гидрофильной хроматографии обеспечивает введение 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера при числе циклов модифицирования, равном двум.

Практическая значимость

Получены новые высокоэффективные сорбенты на основе различных матриц для гидрофильной хроматографии, обладающие альтернативной по отношению к коммерчески доступным сорбентам на основе силикагеля селективностью и характеризующиеся стабильностью в широком диапазоне pH подвижных фаз.

Показано, что сорбенты на основе диоксида титана, адсорбционно модифицированного сшитым 1,4-БДДГЭ полиэтиленимином, обеспечивают экспрессное разделение водорастворимых витаминов менее чем за 4 мин с эффективностью до 24000 тт/м.

Для повышения эффективности в режиме гидрофильной хроматографии неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола рекомендовано формировать функциональный слой с использованием двух циклов модифицирования 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера, а также глицидола или 1,4-БДДГЭ в качестве модификатора поверхности.

Неподвижные фазы с лучшими характеристиками на основе силикагеля, диоксида титана и полистирол-дивинилбензола были применены для анализа реальных объектов: витаминных комплексов, напитков спортивного питания, энергетических напитков, различных сортов меда, ликеро-водочных изделий методом гидрофильной хроматографии.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение диглицидилового эфира 1,4-бутандиола для модифицирования силикагеля и сополимера стирола и дивинилбензола и в качестве спейсера, и в качестве гидрофилизующего модификатора поверхности позволяет достигать улучшенных хроматографических характеристик в гидрофильном режиме по сравнению с исходной матрицей.

2. Гидрофилизация глицидолом сорбента на основе силикагеля, модифицированного разветвленным полиэтиленимином, способствует увеличению гидрофильности поверхности, а также росту эффективности по витаминам, сахарам и аминокислотам до двух раз.

3. Стабильность неподвижных фаз на основе диоксида титана, полученных путем адсорбционного закрепления разветвленного полиэтиленimina с последующей сшивкой диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола достигается при соотношении матрица – полиэтиленимин не менее 1 : 0.5 и матрица – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола не менее 1 : 0.3.

4. Массовое соотношение матрица – полиэтиленимин – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола, равное 1 : 1 : 1, приводит к получению сорбента на основе диоксида титана, способного экспрессно разделить смесь шести водорастворимых витаминов менее чем за 4 мин с эффективностью до 24000 тт/м.

5. Сочетание двух циклов модифицирования диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола в качестве спейсера с присоединением разветвленного полиэтиленimina, дополнительно гидрофилизированного глицидолом, обеспечивает получение неподвижной фазы на основе полистирол-дивинилбензола, которая характеризуется сопоставимой в гидрофильном режиме эффективностью (до 40000 тт/м по витаминам) с коммерчески доступными сорбентами на основе силикагеля.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов обеспечивалась использованием реагентов высокой степени чистоты, проведением анализа реальных объектов, а также применением современного хроматографического оборудования. На момент проведения измерений все используемое оборудование имело актуальное свидетельство о периодической поверке.

Соответствие паспорту научной специальности

Выпускная квалификационная работа соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия по областям исследований:

- методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.);
- анализ органических веществ и материалов;
- анализ пищевых продуктов.

Апробация результатов исследования

Основные результаты работы были представлены на конференциях:

2021 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2021», Москва, Россия, 12-23 апреля; VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, Россия, 26 сентября – 2 октября; Всероссийский симпозиум и школа-конференция молодых ученых «Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях», Севастополь, Россия, 27 октября – 3 ноября;

2020 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», Москва, Россия, 10-17 ноября; IV Всероссийская

Конференция с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез», Краснодар, Россия, 28 сентября – 2 октября;

2019 год: 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Милан, Италия, 16-20 июня; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», Москва, Россия, 8-12 апреля;

2018 год: 32nd International Symposium on Chromatography, Канны, Франция, 23-27 сентября; V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, Россия, 7-13 октября; Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2018», Москва, Россия, 9-13 апреля.

Публикации

По материалам работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе три статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.02 «Аналитическая химия», и 12 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе данных литературы по теме работы, планировании, постановке и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке к публикации результатов проведенных исследований. Представленные результаты исследования получены лично автором или под его руководством. Сорбенты на основе сополимера стирола и дивинилбензола, модифицированные политиленимином, а также с гиперразветвленным функциональным слоем, предоставлены с.н.с. Затираха А.В., м.н.с. Ужель А.С.

Структура и объем работы

Научно-квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 175 страницах, включая 62 рисунка и 27 таблиц. В списке цитируемой литературы 235 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и поставлены задачи для достижения цели, показана научная новизна работы и ее практическая значимость.

Обзор литературы

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором систематизированы актуальные данные о неподвижных фазах для ГИХ, их классификация, области применения, способы получения и характеристики.

В разделах «Неподвижные фазы на основе силикагеля» и «Неподвижные фазы на основе других матриц» представлена информация о современных сорбентах для ГИХ на основе различных матриц, таких как силикагель, оксиды металлов, графитированная термическая сажа, полимеры, а также приведена классификация гидрофильных сорбентов на основе оксида кремния и области их применения. Показана перспективность диоксида титана и сополимера стирола и дивинилбензола для получения новых неподвижных фаз.

В разделе «Способы химического модифицирования для получения гидрофильных неподвижных фаз» классифицированы и описаны пути ковалентного закрепления модификаторов на поверхности сорбентов, а также способы гидрофилизации: покрытие полярным полимерным слоем, формирование гиперразветвленного функционального слоя и дистанцирование прививаемого функционального слоя от поверхности матрицы.

В разделе «Способы характеристики новых неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии» структурированы подходы к изучению свойств и варианты описания сорбентов для гидрофильной хроматографии. Предложено сравнивать новые неподвижные фазы с использованием наиболее информативных и доступных средств – путем изучения хроматографического поведения полярных аналитов разных классов, а также при помощи теста Танака для гидрофильных сорбентов.

На основании обзора литературы сделаны выводы, которые подтверждают актуальность выбранной темы исследования и способов решения поставленных задач.

Экспериментальная часть

Вторая глава включает описание используемых в работе химических реактивов, материалов и оборудования, условий и техники проведения экспериментов. Эксперименты проводили с помощью системы ВЭЖХ, состоящей из хроматографа «Dionex 3000» с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки и спектрофотометрическим детектором на диодной матрице. Для регистрации хроматограмм использовали персональный компьютер и программный пакет Chromeleon 7 («Thermo Fisher Scientific», США). Для определения сахаров применяли систему ВЭЖХ, состоящую из изократического ВЭЖХ-насоса, шестиходового крана-дозатора и рефрактометрического детектора. Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета ChemStation («Agilent Technologies», США).

Синтез сорбентов

Обозначения синтезированных неподвижных фаз, а также соотношения реагентов, взятых для синтеза сорбентов на основе TiO_2 , представлены в табл. 1.

Таблица 1. Синтезированные сорбенты и их обозначения

Сорбент	Матрица	Стадия синтеза				
		1	2	3	4	5
С-Р	С	РДГЭ				
С-Б	С	Б				
С-ГЛ	С	ГЛ				
С-Б-ПВП ¹	С	Б	ПВП			
С-ПЭГ	С	ПЭГ				
С-Б-ПЭИ _{лин}	С	Б	ПЭИ _{лин}			
С-Б-ПЭИ _{разв}	С	Б	ПЭИ*			
С-Б-ПЭИ-ГЛ	С	Б	ПЭИ	ГЛ		
П-Б-ПЭИ-ГДГЭ	П	Б	ПЭИ	ГДГЭ		
П-Б-ПЭИ-ЭГДГЭ	П	Б	ПЭИ	ЭГДГЭ		
П-1Б-ПЭИ-ГЛ ²	П	Б	ПЭИ	ГЛ		
П-2Б-ПЭИ-ГЛ ²	П	Б+М	Б	ПЭИ	ГЛ	
П-3Б-ПЭИ-ГЛ ²	П	Б+М	Б+М	Б	ПЭИ	ГЛ
П-1Б-ПЭИ-Б ²	П	Б	ПЭИ	Б		
П-2Б-ПЭИ-Б ²	П	Б+М	Б	ПЭИ	Б	
П-3Б-ПЭИ-Б ²	П	Б+М	Б+М	Б	ПЭИ	Б
ТМ4 ²	П	Б+Т	Б+М	Б+М	Б+М	Б+М
TiO_2 -ПЭИ-Б	TiO_2^{**}	1.0×ПЭИ	1×Б			
TiO_2 -ПЭИ-0.1×Б	TiO_2	1.0×ПЭИ	0.1×Б			
TiO_2 -ПЭИ-0.3×Б	TiO_2	1.0×ПЭИ	0.3×Б			
TiO_2 -ПЭИ-0.5×Б	TiO_2	1.0×ПЭИ	0.5×Б			
TiO_2 -ПЭИ-0.7×Б	TiO_2	1.0×ПЭИ	0.7×Б			
TiO_2 -ПЭИ-1.5×Б	TiO_2	1.0×ПЭИ	1.5×Б			
TiO_2 -0.1×ПЭИ-Б	TiO_2	0.1×ПЭИ	1.0×Б			
TiO_2 -0.5×ПЭИ-Б	TiO_2	0.5×ПЭИ	1.0×Б			
TiO_2 -1.5×ПЭИ-Б	TiO_2	1.5×ПЭИ	1.0×Б			

С – силикагель с привитыми аминпропилсиликагельными фрагментами;

РДГЭ (Р) – диглицидиловый эфир резорцина;

Б – диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола (1,4-БДГЭ);

ГЛ – глицидол;

П – полистирол-дивинилбензол (ПС-ДВБ);

ГДГЭ и ЭГДГЭ – диглицидиловые эфиры глицерола и этиленгликоля;

М – метиламин;

Т – таурин;

¹ – сорбент получен и предоставлен к.х.н. Лошиным А.А.;

² – сорбенты получены и предоставлены д.х.н. Затираха А.В. и к.х.н. Ужель А.С.;

* здесь и далее разветвленный ПЭИ;

** TiO_2 модификации *анатаз* и *рутил*; далее – только *анатаз*;

Для проведения синтезов было использовано следующее оборудование: термостат («Mettmert», Германия), механическая мешалка «Eurostar» («IKA-Werke», Германия), ультразвуковая ванна «Сапфир 6580» («Сапфир», Россия), вакуумный насос «Laboport» («KNF Neuberger», Германия). В качестве матрицы были использованы: силикагель с привитыми аминпропильными радикалами Диасфер-110-Амин со сферическими

частицами диаметром 6 мкм, площадью поверхности 200 м²/г и размером пор 110 Å, 1.52 % N («БиоХиммак СТ», Россия); диоксид титана двух полиморфных модификаций: рутил (размер несферических частиц < 5 мкм; Sigma-Aldrich / Merck Millipore, США) и анатаз (размер частиц 5 мкм; размер пор 100 Å, Sachtopore®-NP, Sachtleben Chemie GmbH / ZirChrom Separations, Германия); силикагель Kromasil SIL (Nouryon, Швеция) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, размером пор 100 Å; сополимер стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 50%, средним диаметром частиц 5.5±0.5 мкм, площадью поверхности 670 м²/г и средним размером пор 100 Å, синтезированный в лаборатории хроматографии химического факультета МГУ им. Ломоносова. Полученные в ходе работы сорбенты упаковывали суспензионным способом в стальные колонки размером 100 × 3 мм, с помощью насоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия).

Результаты и их обсуждение

Результаты и их обсуждение представлены в главах 3-7.

На основании обзора литературы сделан вывод, что наиболее перспективными способами гидрофилизации поверхности сорбентов представляются следующие пути: присоединение полярного полимера, формирование гиперразветвленного слоя и дистанцирование функционального слоя от матрицы. Кроме того, решено проводить сравнение хроматографических параметров сорбентов с использованием процедуры теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз, а также на примере разделения модельных смесей полярных нейтральных сахаров, цвиттер-ионных аминокислот и водорастворимых витаминов, характеризующихся большим разнообразием физико-химических свойств.

Третья глава (*«Выбор функционального слоя для гидрофилизации и функционализации различных матриц на примере разработки неподвижных фаз на основе силикагеля»*) посвящена выбору структурных единиц для формирования функционального слоя, способного эффективно гидрофилизировать и функционализировать матрицу сорбента. В качестве матрицы использовали 3-аминопропилсиликагель ввиду его коммерческой доступности, высокой реакционной способности и гидрофильности, обеспечивающей отличные хроматографические характеристики сорбентов в режиме ГИХ и позволяющий удобно наблюдать влияние вводимых структурных фрагментов на свойства получаемых сорбентов.

На первом этапе (раздел *«Выбор спейсера»*) изучали три сорбента, модифицированные глицидолом (С-ГЛ) и диглицидиловыми эфирами 1,4-бутандиола (С-Б) и резорцина (С-Р), рассматриваемыми в роли спейсеров для дальнейших этапов модифицирования матриц. Результаты теста Танака продемонстрировали увеличение гидрофильности для сорбента С-ГЛ по сравнению с матрицей, в то время как присоединение диэпоксидов приводило к ее снижению. Для рассматриваемых сорбентов отмечено значительное увеличение анионообменной селективности, что связано с увеличением степени замещения и кватернизацией атомов азота матрицы после присоединения модификаторов, при этом исходные катионообменные свойства силикагеля подавляются.

Показано, что повышение гидрофильности спейсера (С-ГЛ) приводит к увеличению селективности по нейтральным полярным анализам – углеводам (рис. 1), а также значительному росту факторов их удерживания, в то время как между матрицей, С-Б и С-Р существенных различий не наблюдали. Эффективность по сахарам для С-ГЛ составила до 30000 тт/м, что сопоставимо со значениями для немодифицированной матрицы и в два раза превысило таковую для С-Б и С-Р.

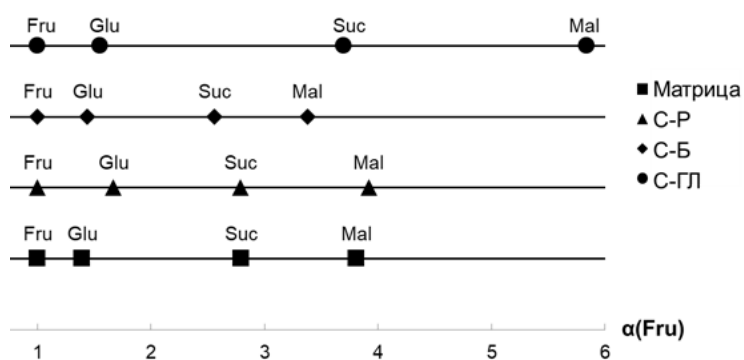


Рис. 1. Шкалы селективности по сахарам относительно фруктозы. П.ф.: вода – ацетонитрил (15 : 85 об. %), скорость потока – 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование.

Согласно представленным на рис. 2 хроматограммам, порядок элюирования аминокислот для всех трех сорбентов соответствует увеличению гидрофильности анализатов. При этом, возрастание времен удерживания и эффективности по аминокислотам коррелировали с увеличением гидрофильности спейсера – самые высокие значения наблюдали для сорбента С-ГЛ. Однако, для разделения модельной смеси восьми аминокислот на С-ГЛ требовалось 60 мин для обеспечения полного разрешения пиков Met/Tyr/Val/Pro. Сорбент С-Б позволил разделить семь аминокислот в тех же условиях в десять раз быстрее с эффективностью выше 30000 тт/м.

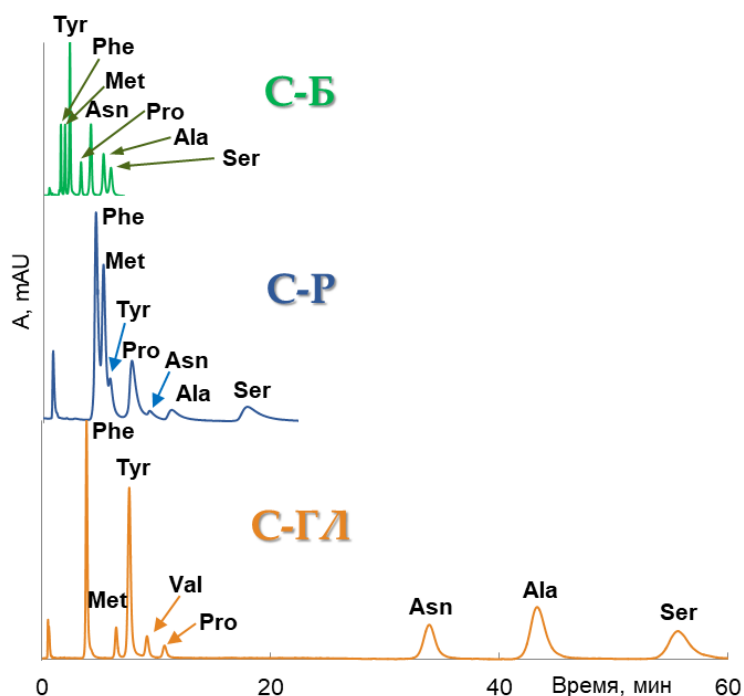


Рис. 2. Хроматограммы смесей аминокислот. П.ф.: 5 мМ фосфатный буферный раствор с pH 6.5 – ацетонитрил (15 : 85 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 210 нм.

Среди рассмотренных диольных сорбентов наибольшую эффективность по витаминам, до 55000 тт/м, продемонстрировал С-ГЛ, в то время как для С-Б и С-Р эффективность достигала только 40000 тт/м. Таким образом, эффективность по витаминам новых сорбентов в основном зависит от гидрофильности спейсера: С-ГЛ > С-Б > С-Р.

Установлено, что на порядок и времена удерживания водорастворимых витаминов на новых диольных фазах влияют два фактора. Первым из них является гидрофильность прививаемого фрагмента. В случае глицидола это приводит к более сильному удерживанию (рис. 3) и высокой эффективности, чем у сорбентов с привитыми диэпоксидами (аналогично другим классам полярных веществ). Второй фактор – заряд поверхности неподвижной фазы. Реализованный при синтезе С-ГЛ, С-Б и С-Р подход позволил создать положительный заряд в функциональном слое сорбента, в результате чего наиболее

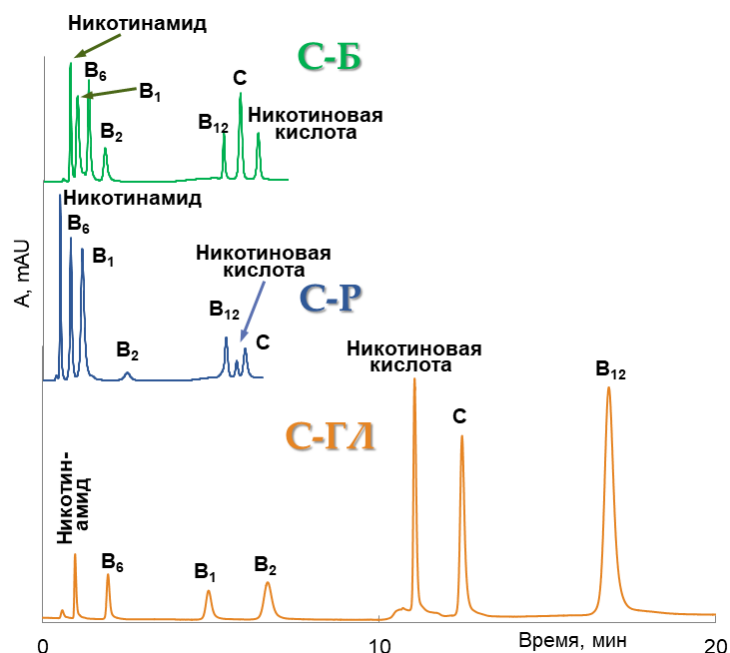


Рис. 3. Хроматограммы модельных смесей витаминов. П.ф.: 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор с рН 5.8 – ацетонитрил, градиентный режим (С-Б: 0-2.5 мин – 8% буф. раствор, 2.5-5 мин – 8-40%, 5-7 мин – 40%; С-Р: 0-3 мин – 7% буф. раствор, 3-4.5 мин – 7-20%, 4.5-6 мин – 20%; С-ГЛ: 0-7 мин – 10% буф. раствор, 7-10 мин – 10-20%, 10-20 мин – 20%), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

гидрофильный положительно заряженный тиамин (B_1 , $\text{Log } P = -4.6$) имел небольшие факторы удерживания. Таким образом, выбранный способ модифицирования обеспечил альтернативный по сравнению с коммерчески доступными колонками для ГИХ порядок удерживания заряженных аналитов, что может быть полезно для решения прикладных задач.

Таким образом, по результатам изучения хроматографических параметров новых диольных сорбентов 1,4-БДДГЭ выбран как наиболее перспективный синтон для роли спейсера, поэтому в дальнейших исследованиях использовали его.

На втором этапе (раздел «Выбор гидрофильного полимера») рассмотрели полярные полимеры: поливинилпиридин (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), линейный и разветвленный полиэтиленимин (ПЭИ_{лин} и ПЭИ_{разв}) в качестве модификаторов поверхности для формирования функционального слоя, способного экранировать матрицу и максимально гидрофилизовать ее поверхность.

Все сорбенты с полимерным покрытием, кроме С-Б-ПВП, продемонстрировали увеличение гидрофильности поверхности по сравнению с матрицей. Кроме того, по результатам теста Танака С-Б-ПВП продемонстрировал неудовлетворительные результаты, поэтому в дальнейшем не рассматривался.

По результатам разделения модельной смеси сахаров установлено, что сорбент С-ПЭГ обладает несколько большим удерживанием дисахаридов Suc, Mal, Lac, чем модифицированные полиэтиленимином сорбенты, а также иным порядком элюирования пары Mal/Lac. Синтезированный сорбент С-Б-ПЭИ_{лин}, обладает лучшей селективностью

в отношении пар Rib/Fru и Lac/Mal, а также сопоставимыми с С-ПЭГ высокими значениями эффективности по сахарам до 16000 тт/м.

Сорбенты с привитыми различными модификациями ПЭИ обладают одинаковой селективностью по отношению к витаминам (рис. 4), однако для более гидрофильного С-Б-ПЭИ_{лин} характерны более высокие значения времен удерживания сильноудерживаемых витаминов: цианокобаламина, аскорбиновой и никотиновой кислот. Кроме того, сорбент С-ПЭГ демонстрирует заметное увеличение времени удерживания положительно заряженного В₁. Эффективность по витаминам на сорбентах С-ПЭГ и С-Б-ПЭИ_{лин} достигает 30000 тт/м, а использование градиентного элюирования позволило в обоих случаях разделить модельную смесь всех семи витаминов менее, чем за 16 мин.

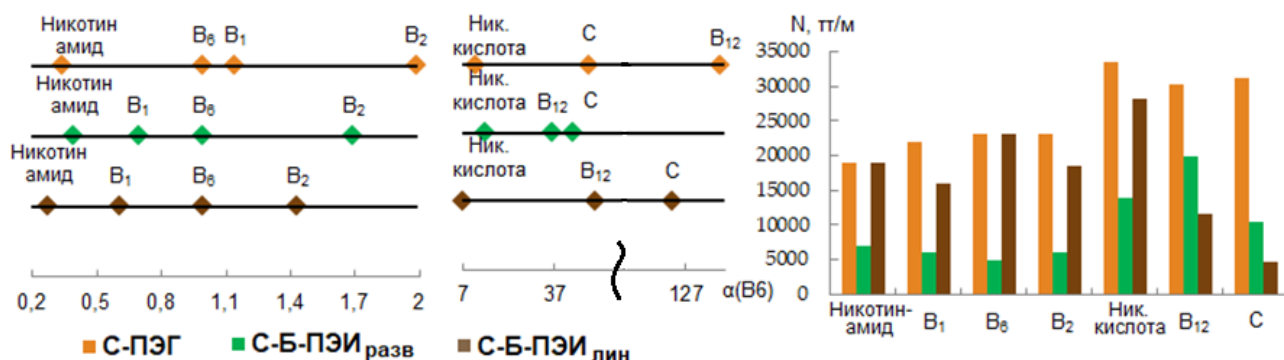


Рис. 4. Шкалы селективности для витаминов относительно пиридоксина и диаграмма эффективности. П.ф.: 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор с рН 5.8 – ацетонитрил (10 : 90 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

На данном этапе показаны возможности гидрофилизации и функционализации сорбентов путем ковалентного присоединения ПЭГ и ПЭИ, установлена нецелесообразность использования ПВП. Установлено, что полиэтиленимин обладает большей перспективностью для формирования гидрофильного функционального слоя. Поскольку использование линейных полимеров представляется малоэффективным и коммерчески нецелесообразным при дальнейших работах с более гидрофобными матрицами, наиболее подходящим представляется использование разветвленного ПЭИ. Для улучшения хроматографических параметров предложено провести дополнительную гидрофилизацию поверхности С-Б-ПЭИ_{разв} путем ковалентного присоединения глицидола.

На третьем этапе (раздел «Дополнительная гидрофилизация глицидолом») с целью повышения эффективности сорбента С-Б-ПЭИ_{разв} проводили модифицирование

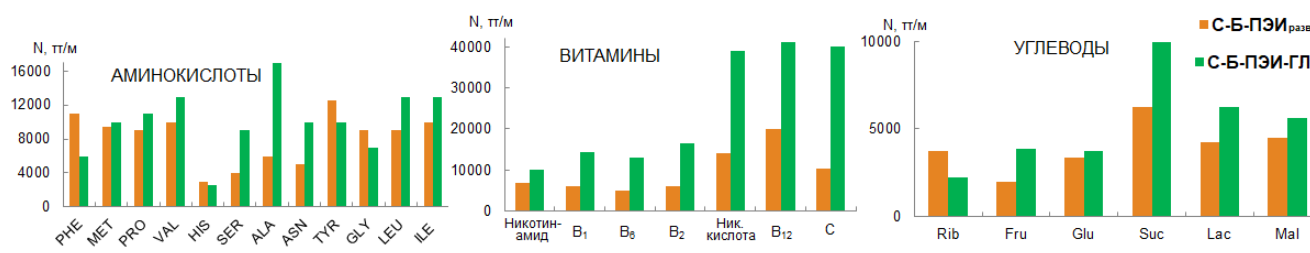


Рис. 5. Изменение эффективности в результате глицидирования С-Б-ПЭИ_{разв}. Условия: см. рис. 1, 2 и 4.

сорбента глицидолом для повышения гидрофильности поверхности. Установлено, что глицидирование поверхности сорбента С-Б-ПЭИ_{разв} не влияет на селективность и времена удерживания веществ, но эффективность по всем классам аналитов увеличилась в 1,5 – 2 раза (рис. 5).

Таким образом, из рассмотренных полимерных материалов разветвленный полиэтиленимин, дополнительно модифицированный глицидолом, обладает лучшим потенциалом для формирования гидрофилизующего функционального слоя, поэтому в дальнейших исследованиях для построения архитектуры новых сорбентов на основе альтернативных матриц использовали разветвленный ПЭИ в сочетании с глицидолом.

Четвертый этап (раздел «Дистанцирование функционального слоя»). Помимо природы присоединяемых спейсера и полимера, значительное влияние может оказывать пространственное удаление функционального слоя от поверхности матрицы, регулируемое длиной спейсера. В связи с этим для установления оптимального количества циклов присоединения спейсера были получены С-1Б-ПЭИ-ГЛ, С-2Б-ПЭИ-ГЛ и С-3Б-ПЭИ-ГЛ с одним, двумя и тремя слоями спейсера в структуре, соответственно. Сравнение хроматографических параметров разделения модельных смесей полярных аналитов показало, что дистанцирование функционального слоя способствует росту гидрофильности поверхности, но не влияет на селективность и лишь незначительно увеличивает эффективность на 5-10%, а также приводит к заметному ухудшению базовой линии при работе в градиентном режиме.

На основании данных литературы установлено, что диоксид титана демонстрирует альтернативную силикагелю селективность благодаря возможности вступать в ионо- и лигантообменные взаимодействия. Кроме того, высокая гидролитическая стабильность TiO_2 позволяет работать во всем диапазоне pH подвижной фазы, что подчеркивает перспективность диоксида титана в качестве матрицы для гидрофильных сорбентов.

Четвертая глава («Разработка неподвижных фаз на основе диоксида титана») посвящена получению неподвижных фаз на основе TiO_2 путем покрытия частиц диоксида титана различным количеством полиэтиленимина с последующей сшивкой 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром и установлению их хроматографических характеристик в режиме ГИХ.

На первом этапе работы (раздел «Неподвижные фазы на основе рутила») оценивали хроматографические характеристики несферических частиц TiO_2

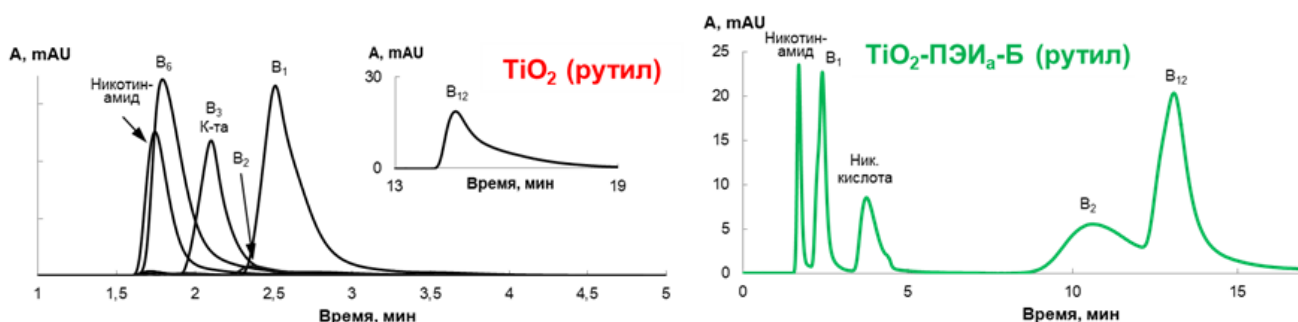


Рис. 6. Хроматограммы водорастворимых витаминов на сорбентах TiO_2 (рутил). П.ф.: 20 mM ацетатный буферный раствор с pH 5.8 – ацетонитрил (10 : 90 об. % - для TiO_2 , для TiO_2 -ПЭИ_{а-Б} – градиентный режим), скорость потока – 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

модификации *рутил* и подбирали условия разделения модельной смеси витаминов группы В путем варьирования pH, концентрации буферной системы и доли воды в элюенте. Однако даже в лучших условиях добиться разделения модельной смеси не удалось (рис. 6). Поэтому следующим шагом стало модифицирование частиц диоксида титана, что привело к значительному росту факторов удерживания анализов, в результате чего стало возможно разделение модельной смеси 5 витаминов в градиентном режиме за 15 минут с эффективностью до 14000 тт/м.

Таким образом, модифицирование диоксида титана путем инкапсулирования TiO_2 слоем ПЭИ, дополнительно сшитым 1,4-БДДГЭ, позволило увеличить времена удерживания витаминов группы В, улучшить эффективность и селективность их разделения. Можно заключить, что адсорбционное закрепление функционального слоя с последующей сшивкой представляет перспективный подход для создания новых неподвижных фаз для ГИХ.

На *следующем этапе* (раздел «Неподвижные фазы на основе анатаза») использовали сферические частицы диоксида титана с более гидрофильной полиморфной модификацией *анатаз*. Выбор оптимальных условий для разделения водорастворимых витаминов проводили путем варьирования pH буферного раствора в диапазоне 3.0 – 11.0 с использованием подходящих буферных систем (формиатной, ацетатной, фосфатной, карбонатной), концентрации буферного раствора и доли воды в составе подвижной фазы, в результате чего был выбран элюент следующего состава: 7 мМ фосфатный буферный раствор с pH 8.0 – ацетонитрил (18:82 об. %).

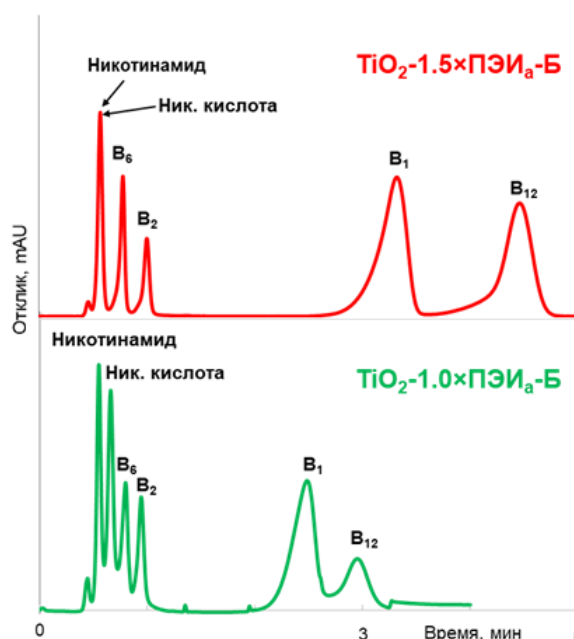


Рис. 7. Хроматограммы модельной смеси витаминов на сорбентах TiO_2 - $n \times \text{ПЭИ}_a$ -Б. П.ф.: 7 мМ фосфатный буферный раствор с pH 8.0 – ацетонитрил (18 : 82 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

Варьирование количества сшивающего агента 1,4-БДДГЭ. Установлено, что селективность разделения витаминов на колонках с сорбентами TiO_2 -ПЭИ_a- $n \times \text{Б}$ возросла, что обеспечило полное разрешение пары B_1/B_{12} . Среди синтезированных неподвижных фаз сорбент TiO_2 -ПЭИ_a-Б (с массовым соотношением реагентов TiO_2 -ПЭИ-1,4-БДДГЭ 1 : 1 : 1) продемонстрировал лучшую селективность и позволил разделить модельную смесь шести водорастворимых витаминов (никотинамид, никотиновая кислота, B_6 , B_2 , B_1 , B_{12}) за 4 мин с эффективностью до 25000 тт/м при выбранных условиях изократического режима элюирования.

Варьирование количества ПЭИ. Варьирование толщины полимерного слоя ПЭИ может способствовать повышению эффективности сорбента, так как толщина функционального слоя влияет на скорость массопереноса. Лучшую селективность и

наибольшую эффективность по витаминам до 24000 тт/м продемонстрировали сорбенты $\text{TiO}_2\text{-}0.1 \times \text{ПЭИ}_a\text{-Б}$ и $\text{TiO}_2\text{-}1.0 \times \text{ПЭИ}_a\text{-Б}$ (рис. 7). Для сорбента $\text{TiO}_2\text{-}1.5 \times \text{ПЭИ}_a\text{-Б}$ установили снижение эффективности. В ходе эксплуатации колонки с $\text{TiO}_2\text{-}0.1 \times \text{ПЭИ}_a\text{-Б}$ наблюдали снижение эффективности и времен удерживания модельных анализов, а также рост давления в системе. Благодаря большей селективности на сорбенте $\text{TiO}_2\text{-}1.0 \times \text{ПЭИ}_a\text{-Б}$ удалось разделить смесь из шести водорастворимых витаминов за 4 мин в изократическом режиме элюирования.

Таким образом, впервые показано применение модифицированного диоксида титана в качестве сорбента для гидрофильной хроматографии. Установлено, что адсорбционное закрепленное ПЭИ с последующей сшивкой 1,4-БДДГЭ приводит к получению стабильных сорбентов при массовом соотношении матрица - ПЭИ не менее 1:0.5 и матрица - 1,4-БДДГЭ не менее 1:0.3. По результатам поиска условий модифицирования выявлены способы управления селективностью и эффективностью путем варьирования количества сшивающего агента 1,4-БДДГЭ и ПЭИ, а также подобраны условия определения водорастворимых витаминов на новых сорбентах. В результате получен сорбент $\text{TiO}_2\text{-}1.0 \times \text{ПЭИ}_a\text{-}1.0 \times \text{Б}$, позволяющий экспрессно разделить модельную смесь шести витаминов менее чем за 4 мин с эффективностью до 25000 тт/м.

Пятая глава (*«Разработка неподвижных фаз на основе сополимера стирола и дивинилбензола»*) посвящена получению новых неподвижных фаз для ГИХ на основе гидролитически стабильной, но гидрофобной матрицы ПС-ДВБ с использованием различных способов гидрофилизации, установленных на основании обзора литературы.

На первом этапе (раздел *«Оценка хроматографических свойств модифицированного полиэтиленгликолем сорбента, гидрофилизованного глицидолом»*) получили сорбент П-Б-ПЭИ-ГЛ со структурой функционального слоя, установленной в главе 3 как наиболее подходящей для гидрофилизации. Первым шагом стало установление состава подвижной фазы для определения водорастворимых витаминов путем варьирования pH и концентрации буферного раствора, а также соотношения вода – ацетонитрил. Использование 100 мМ формиатного буферного раствора с pH 3.0 позволило добиться полного разрешения 7 витаминов. Кроме того, установлен характерный для ГИХ порядок элюирования анализов и зависимость факторов их удерживания от состава элюента. Таким образом, показана перспективность предложенной структуры функционального слоя для создания гидрофильных сорбентов на основе ПС-ДВБ, однако, отмечена необходимость повышения достигнутой невысокой (до 10000 тт/м) эффективности.

На втором этапе (раздел *«Получение гидрофильной неподвижной фазы с гиперразветвленным функциональным слоем»*) опробовали другой способ гидрофилизации матрицы ПС-ДВБ путем формирования гиперразветвленного функционального слоя. Для оценки применимости такого подхода были изучены хроматографические свойства сорбента ТМ4, полученного путем пятикратного повторения циклов алкилирования 1,4-БДДГЭ и аминирования, где в первом цикле использовали аминокислоту таурин Т, а в последующих четырех – метиламин М. Для

формирования гиперразветвленной структуры на каждом последующем цикле использовали в два раза большее количество реагентов, чем в предыдущем.

Показан диапазон реализации ГИХ и ОФ ВЭЖХ режимов для различных по структуре гидрофильных аналитов – аспарагина, рибофлавина и урацила (рис. 8). Установлено, что механизм удерживания аналитов на колонке с сорбентом ТМ4 определяется не составом подвижной фазы, но природой самого определяемого соединения. Это делает неподвижную фазу ТМ4 перспективной для одновременного определения высокополярных и гидрофобных соединений.

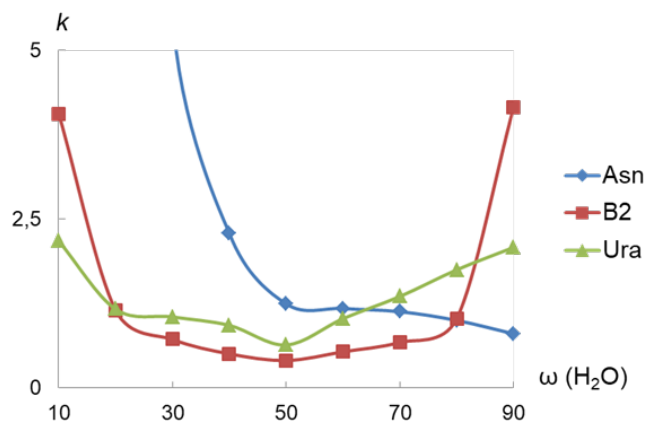


Рис. 8. Влияние состава подвижной фазы на удерживание полярных аналитов на ТМ4. П.ф.: вода –ацетонитрил, скорость потока 1 мл/мин, УФ при 210 нм.

Невысокая эффективность - до 14000 тт/м по аминокислотам и 11000 тт/м по витаминам (табл. 2) - и невозможность дальнейшего модифицирования такого функционального слоя вследствие увеличения количества сшивок и ухудшения характеристик сорбентов свидетельствует о нецелесообразности использования большого числа циклов модифицирования.

Таблица 2. Хроматографические характеристики ТМ4 в ГИХ

Сахара	k	N, тт/м	Log P*	Витамины	k	N, тт/м	Log P
Рибоза	2.0	7000	-2.66	Никотинамид	1.27	9000	-0.37
Ксилоза	2.5	5000	-2.21	Тиамин	0.48	5000	-4.60
Фруктоза	2.8	9000	-1.78	Пиридоксин	3.61	5000	-0.77
Глюкоза	3.7	4000	-3.12	Рибофлавин	5.53	4000	-1.46
Сахароза	5.9	9000	-4.50	Цианокобал-амин**	0.46	10000	-0.90
Лактоза	6.6	6000	-5.26	Аскорб. кислота**	17.71	9000	-1.85
Мальтоза	7.2	6000	-5.26	Ник. кислота**	35.77	11000	0.36
Аминокислоты							
Валин	7.57	7000	-2.31	Фенилаланин	7.09	4000	-1.51
Тирозин	13.06	6000	-1.99	Серин	46.11	14000	-3.69
Пролин	6.43	7000	-2.38	Аспарагин	21.59	11000	-5.22
Лейцин	7.39	6000	-1.82	Аланин	28.82	12000	-3.22
Метионин	7.07	5000	-2.64	Глицин	25.40	13000	-3.64

Условия для сахаров: вода–ацетонитрил (15:85 об. %), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование. Условия для витаминов: 100 мМ аммонийно-формиатный буферный раствор с рН 3.0 (7:93 об. % и 30:70 об. % для **), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм. Условия для аминокислот: 5 мМ фосфатный буферный раствор с рН 6.5 – ацетонитрил (12:88 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 210 нм. *Расчет выполнен в EPIWEB 4.1.

Перспективным подходом для создания высокоэффективных неподвижных фаз для ГИХ в таком случае может быть сочетание нескольких циклов модифицирования 1,4-

БДДГЭ с закреплением гидрофильного полимера (ПЭИ) и гидрофилизующего модификатора М во внешней части функционального слоя.

На третьем этапе (раздел «Выбор модификатора поверхности для неподвижных фаз на основе сополимера стирола и дивинилбензола») изучили влияние гидрофилизующего агента, закрепленного на поверхности функционального слоя ПЭИ, на хроматографические свойства неподвижных фаз в гидрофильном режиме. Получили три сорбента типа П-Б-ПЭИ-М, где в качестве модификатора М поверхности были использованы 1,4-БДДГЭ, а также его аналоги – диглицидиловые эфиры этиленгликоля (ЭГДГЭ) и глицерина (ГДГЭ), различающиеся длиной углеродной цепи и гидрофильностью.

Установлено, что лучшей селективностью по отношению к сахарам обладают более гидрофильные сорбенты П-Б-ПЭИ-ГЛ и П-Б-ПЭИ-Б, причем значительно большим удерживаем углеводов характеризуется П-Б-ПЭИ-ГЛ. Для сорбентов П-Б-ПЭИ-ЭГДГЭ и П-Б-ПЭИ-ГДГЭ эффективность по сахарам составила 3000-5000 тт/м, а для более гидрофильных П-Б-ПЭИ-ГЛ и П-Б-ПЭИ-Б – до 10000 тт/м. Высокая селективность П-Б-ПЭИ-ГЛ обеспечила разделение модельной смеси 6 сахаров за 12 минут, в том числе и трудноразделимой пары Lac/Mal (рис. 9).

Низкие факторы удерживания аминокислот в сочетании с худшей эффективностью до 2000 тт/м и асимметрией пиков демонстрируют сорбенты П-Б-ПЭИ-ЭГДЭ и П-Б-ПЭИ-ГДГЭ, в то время как для П-Б-ПЭИ-ГЛ наблюдаются лучшие селективность и симметрия пиков ($A_s = 0.9-1.2$). Для сорбента П-Б-ПЭИ-Б получены меньшие факторы удерживания аминокислот по сравнению с П-Б-ПЭИ-ГЛ, однако более высокая эффективность – до 18000 тт/м для ряда аналитов (пролин, серин, аланин, глицин) – позволила экспрессно разделить модельную смесь из шести аминокислот менее чем за 8 минут, в то время как в этих же условиях разделение смеси пяти

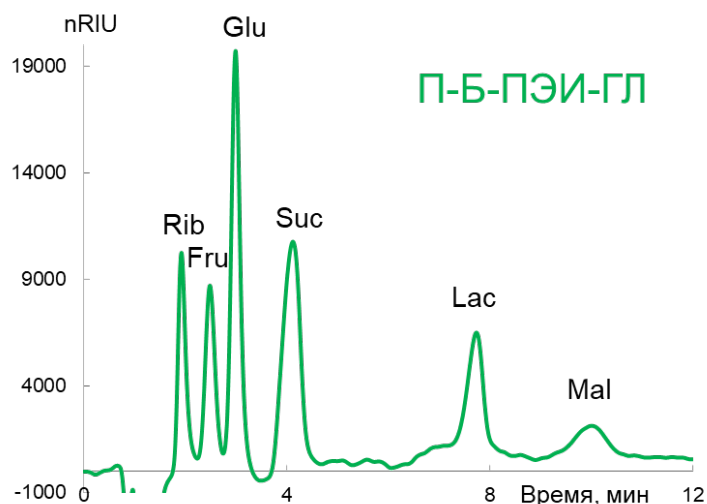


Рис. 9. Хроматограмма модельной смеси сахаров на сорбенте П-Б-ПЭИ-ГЛ. П.ф.: вода – ацетонитрил (12 : 88 об. %), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование.

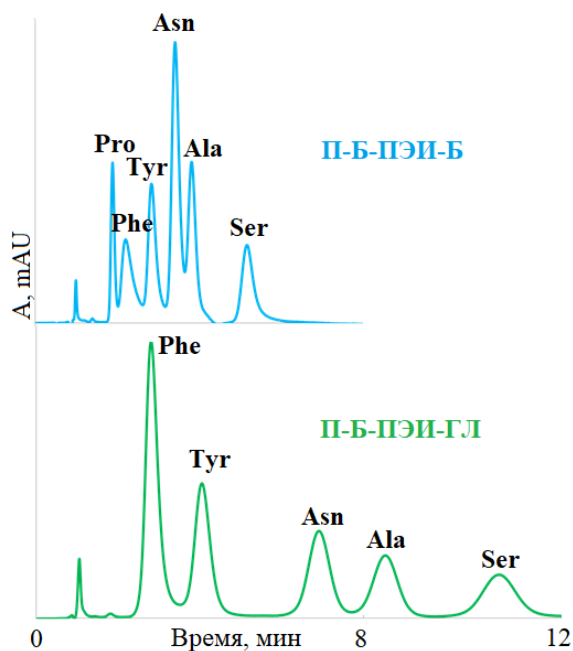


Рис. 10. Хроматограммы модельных смесей аминокислот. П.ф.: 10 мМ фосфатный буферный раствор с pH 6.5 – ацетонитрил (18 : 82 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 210 нм.

аминокислот на сорбенте П-Б-ПЭИ-ГЛ составило 12 минут (рис. 10). Отдельно стоит отметить, что для сорбентов, поверхность которых модифицировали диэпоксидами, наблюдали более сильное удерживание фенилаланина по сравнению с П-Б-ПЭИ-ГЛ, в результате чего он элюировался после пролина, метионина и валина.

Сорбенты П-Б-ПЭИ-ЭГДЭ и П-Б-ПЭИ-ГДГЭ продемонстрировали слабое удерживание витаминов, низкую эффективность и плохую симметрию пиков, в результате чего подобрать условия для разделения модельной смеси не удалось. Сорбент П-Б-ПЭИ-Б обладает сопоставимыми значениями факторов удерживания витаминов с П-Б-ПЭИ-ГЛ, однако в 2-3 раза превосходит его в эффективности, значения которой достигают 30000 тт/м. Разделение модельной смеси 7 витаминов в градиентном режиме составило 40 минут (рис. 11).

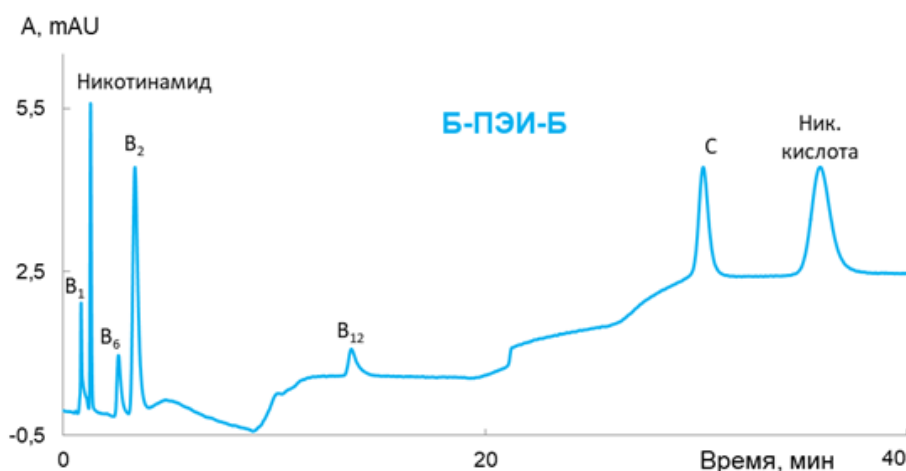


Рис. 11. Хроматограмма модельной смеси витаминов. П.ф.: 100 мМ аммонийно-формиатный буферный раствор с pH 3.0 – ацетонитрил, градиентный режим (0-5 мин – 7% буф. раствор, 5-12 мин – 7-15%, 12-16 мин – 15%, 16-20 мин – 15-25%, 20-40 мин – 25%), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

Таким образом, показана нецелесообразность введения диэпоксидов ЭГДГЭ и ГДГЭ в структуру функционального слоя неподвижных фаз на основе ПС-ДВБ. Поскольку использование в качестве модификатора поверхности глицидола и 1,4-БДДГЭ показало получение эффективных сорбентов для разделения разных классов гидрофильных соединений, в дальнейшей работе оба соединения будут задействованы в поисках путей улучшения хроматографических параметров новых сорбентов на основе ПС-ДВБ для гидрофильной хроматографии.

На четвертом этапе (раздел «Пространственное дистанцирование функционального слоя») изучили влияние пространственного удаления функционального слоя от поверхности матрицы ПС-ДВБ путем увеличения числа слоев спейсера, для чего были получены две серии сорбентов: П- $n \times$ Б-ПЭИ-ГЛ и П- $n \times$ Б-ПЭИ-Б, где число циклов присоединения спейсера $n = 1-3$.

Приведенные в табл. 3 результаты теста Танака демонстрируют резкое увеличение параметра гидрофильности k_U в обеих сериях при переходе к двойному спейсеру. Все шесть сорбентов обладают высокой анионообменной селективностью $\alpha(AX)$ и основной природой $\alpha(Tb/Tr) < 1$. Отсутствие отрицательно заряженных функциональных групп объясняет близкие к нулю значения катионообменной селективности $\alpha(CX)$. Кроме того,

для всех сорбентов характерны отличные от 1 значения метиленовой $\alpha(\text{CH}_2)$, гидроксильной $\alpha(\text{OH})$ и пространственной $\alpha(\text{V/A})$ селективностей.

Таблица 3. Результаты теста Танака для П-п×Б-ПЭИ-ГЛ и П-п×Б-ПЭИ-Б

Сорбент	kU	$\alpha(\text{CH}_2)$	$\alpha(\text{OH})$	$\alpha(\text{V/A})$	$\alpha(\text{AX})$	$\alpha(\text{CX})$	$\alpha(\text{Tb/Tr})$
П-1Б-ПЭИ-ГЛ	2.18	1.26	1.72	1.37	121.01	0.26	0.40
П-2Б-ПЭИ-ГЛ	7.72	1.23	1.60	1.40	67.03	0.21	0.50
П-3Б-ПЭИ-ГЛ	8.03	1.26	1.67	1.42	105.42	0.21	0.39
П-1Б-ПЭИ-Б	5.30	1.07	1.42	1.37	69.78	0.25	0.47
П-2Б-ПЭИ-Б	6.08	1.17	1.48	1.38	81.54	0.24	0.42
П-3Б-ПЭИ-Б	6.12	1.23	1.60	1.42	93.19	0.23	0.44

Условия: п.ф. – 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор с pH 4.7 – ацетонитрил (10:90 об. %), скорость потока 0.5 мл/мин, УФ при 254 нм

Установлено, что варьирование длины спейсера практически не влияет на факторы удерживания сахаров – синтезированные сорбенты демонстрируют сопоставимые значения времен элюирования. Кроме того, порядок удерживания сахаров для сорбентов с удаленным функциональным слоем аналогичен их прототипам с единичным спейсером и соответствует гидрофильному режиму. Однако следует отметить, что сорбенты серии П-п×Б-ПЭИ-Б демонстрируют меньшие времена удерживания, но при этом большую эффективность. В обеих группах сорбенты с двойным спейсером демонстрируют лучшую в серии эффективность: до 8000 тт/м и 13000 тт/м для П-п×Б-ПЭИ-ГЛ и П-п×Б-ПЭИ-Б соответственно. Несмотря на это, достичь разделения пары Мал/Лас, как на сорбенте П-1Б-ПЭИ-ГЛ, не удалось.

Времена удерживания аминокислот в серии П-п×Б-ПЭИ-ГЛ имеют сопоставимые значения для всех трех сорбентов, только для П-3Б-ПЭИ-ГЛ наблюдается незначительное увеличение (рис. 12). В то время как для группы П-п×Б-ПЭИ-Б характерен рост времен удерживания вместе с увеличением числа слоев спейсера (рис. 13) Стоит отметить, что порядок удерживания аминокислот идентичен и коррелирует с уменьшением параметра Ханша аналитов.

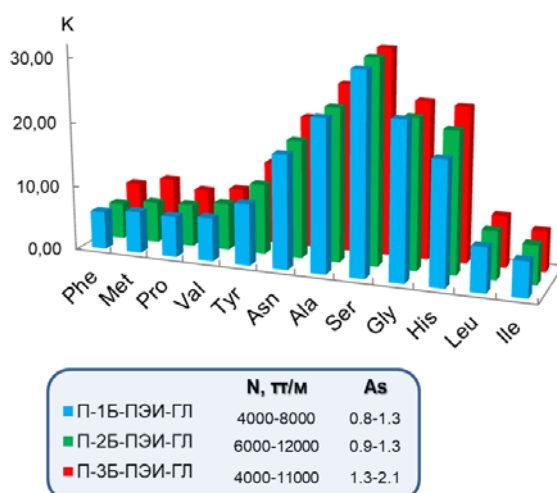


Рисунок. 12. Результаты определения аминокислот на П-п×Б-ПЭИ-ГЛ. П.ф.: 5 мМ фосфатный буферный раствор с pH 6.5 – ацетонитрил (15 : 85 об. %), скорость потока 1 мл/ мин, УФ при 210 нм.

спейсером, обладающим лучшей эффективностью и симметрией пиков, представлена на рис. 16.

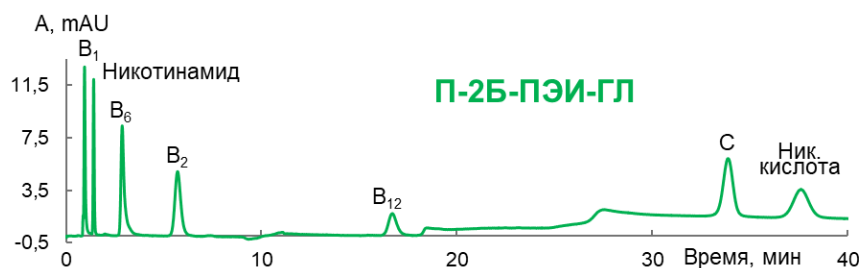


Рис. 16. Хроматограмма модельной смеси витаминов на П-2Б-ПЭИ-ГЛ.
П.ф.: 100 мМ формиатный буферный раствор с pH 3.0 – ацетонитрил, градиентный режим (0-7 мин – 7% буф. раствор, 7-10 мин – 7-15%, 10-17 мин – 15%, 17-25 мин – 15-30%, 25-40 мин – 30%), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

В ходе работы показана перспективность формирования гидрофильного функционального слоя на матрице ПС-ДВБ путем ковалентного закрепления разветвленного ПЭИ для создания сорбентов для ГИХ. Путем варьирования модификатора поверхности установлено, что дальнейшее модифицирование слоя ПЭИ глицидолом приводит к получению неподвижной фазы с высокой эффективностью по витаминам, а дополнительное сшивание слоя ПЭИ диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола обеспечивают лучшую эффективность при разделении сахаров. Кроме того, впервые показано влияние пространственного удаления функционального слоя на характеристики сорбентов на основе ПС-ДВБ в режиме гидрофильной хроматографии. Установлено, что увеличение числа слоев спейсера до двух и трех не оказывает влияния на селективность и времена удерживания полярных аналитов, однако использование двойного спейсера позволяет значительно увеличить эффективность. Так, сорбент П-2Б-ПЭИ-ГЛ продемонстрировал эффективность по витаминам до 40000 тт/м, что сопоставимо с эффективностью сорбентов на основе силикагеля.

Кроме того, показана применимость к ГИХ сорбента на основе ПС-ДВБ с гиперразветвленным функциональным слоем. Установлено, что хроматографическое поведение аналитов зависит в большей мере от природы определяемых соединений, а не от состава подвижной фазы, что делает возможным одновременное разделение гидрофильных и гидрофобных аналитов.

На пятом этапе (раздел «Возможности и перспективы неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола с гидрофильным функциональным слоем в режиме ГИХ») продемонстрировали возможности расширения рабочего диапазона кислотности подвижных фаз и обеспечения селективности одновременного определения гидрофильных и гидрофобных веществ для сорбентов на основе гидрофобной матрицы с привитым гидрофильным функциональным слоем П-2Б-ПЭИ-ГЛ, продемонстрировавшим лучшие характеристики в ГИХ среди рассмотренных сорбентов на основе полимерной матрицы.

На примере разделения модельной смеси фенолов показан, что увеличение pH буферной системы в составе подвижной фазы с 7.0 (рис. 17 А) до 11.0 (рис. 17 Б) обеспечило приемлемые факторы удерживания аналитов и привело к повышению

селективности и эффективности, улучшению симметрии пиков фенолов, сокращению времени анализа. При этом варьирование доли воды в элюенте также способствует изменению факторов удерживания аналитов, однако улучшению формы пиков, селективности и росту эффективности не способствует. Определение фенолов в режиме гидрофильной хроматографии на сорбентах на основе силикагеля сильно затруднено ввиду их слабого удерживания на полярных неподвижных фазах (для фенолов $\lg P > 1$), что было подтверждено на примере использования сорбента с привитым глицидолом С-ГЛ, для которого факторы удерживания фенолов не превышали 1.0 при составе подвижной фазы вода – ацетонитрил, 20:80 об. %.

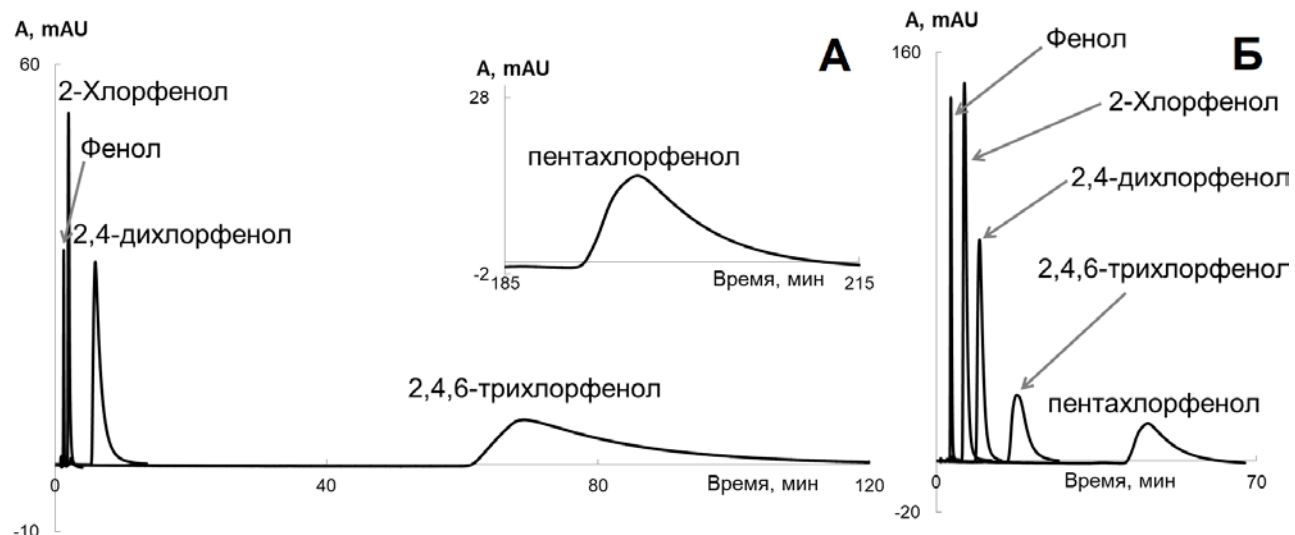


Рис. 17. Хроматограммы смеси хлорфенолов на П-2Б-ПЭИ-ГЛ. А: 10 мМ фосфатный буферный раствор с pH 7.0 – ацетонитрил; Б: 10 мМ карбонатный буферный раствор с pH 11.0 – ацетонитрил; общие условия: п.ф. 20:80 об. %, скорость потока 1 мл/мин, УФ при 254 нм.

Кроме того, сочетание гидрофобной матрицы и гидрофильного привитого функционального слоя может способствовать удерживанию аналитов за счет различных типов взаимодействий, тем самым обеспечивая одновременное определение полярных гидрофильных и высокогидрофобных веществ без предварительной специальной пробоподготовки, такой как дериватизация или образование микроэмульсий (рис. 18).

Таким образом, показано, что неподвижные фазы на основе гидрофобного ПС-ДВБ с гидрофильным функциональным слоем применимы не только для определения гидрофильных соединений в режиме ГИХ, но и для одновременного определения различных классов веществ, характеризующихся как положительными, так и отрицательными значениями параметра Ханша.

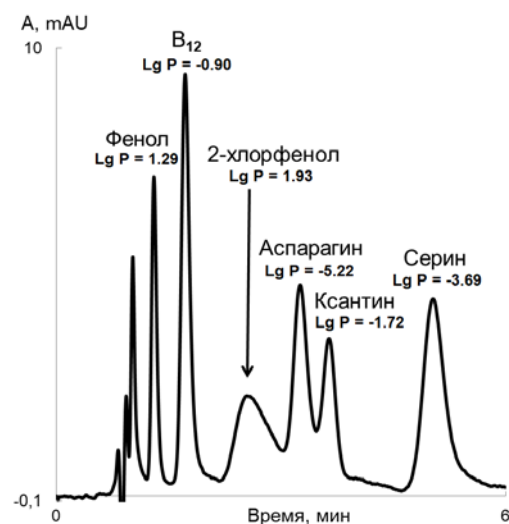


Рис. 18. Хроматограмма смеси гидрофобных и гидрофильных соединений на П-2Б-ПЭИ-ГЛ. П.ф.: 10 мМ фосфатный буферный раствор с pH 6.5 – ацетонитрил (20 : 80 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 210 нм.

Шестая глава посвящена сравнению характеристик полученных гидрофильных неподвижных фаз с коммерчески доступными сорбентами, обладающими похожими функциональными группами. Продemonстрировано, что полученные в работе фазы не уступают по хроматографическим свойствам коммерчески доступным колонкам и в ряде случаев превосходят их по селективности и эффективности.

Седьмая глава посвящена оценке применимости новых сорбентов на основе различных матриц к анализу реальных объектов, которую проводили на примере определения полярных компонентов в составе объектов с различной по сложности матрицей: витаминсодержащие БАД, питьевое спортивное питание, энергетические напитки, различные сорта меда, ликеро-водочные изделия. Содержание определяемых компонентов находили методом абсолютной калибровки. Достоверность полученных результатов устанавливали методом «введено-найдено». Пример анализа БАД «COMPLEX B» на сорбенте П-2Б-ПЭИ-ГЛ, полученном на основе сополимера стирола и дивинилбензола, представлен на рис. 19. Метрологические характеристики определения компонентов и результаты анализа представлены в табл. 4 и 5.

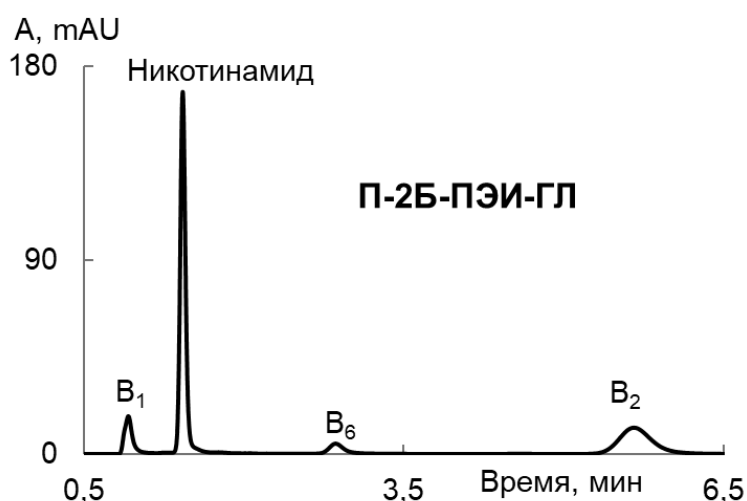


Рис. 19. Хроматограммы анализа «COMPLEX B» на П-2Б-ПЭИ-ГЛ. П.ф.: 100 мМ аммонийно-форматный буферный раствор с pH 3.0 (7:93 об. %), скорость потока 1 мл/мин, УФ при 270 нм.

Таблица 4. Метрологические характеристики определения компонентов «COMPLEX B»

Аналит	Диапазон линейности, мг/л	S_r^*	C_{min} , мг/л	a^{**}	r
Никотинамид	1.00 – 50.00	0.17	0.05	0.3149	0.999
Пиридоксин	1.00 – 25.00	0.05	0.01	0.2863	0.999
Рибофлавин	1.00 – 5.00	0.06	0.05	1.632	0.999
Тиамин	3.00 – 25.00	0.15	1.0	0.6626	0.997

* при концентрации 4 мг/л

** вид градуировочной кривой $y = a \cdot x$

Таблица 5. Результаты анализа БАД «COMPLEX B» ($n = 3$, $P = 0.95$)

Компонент	Найдено, мг	Заявлено, мг
Никотинамид	32±3	32
Пиридоксин	2.6±0.3	2.8
Рибофлавин	2.8±0.3	2.8
Тиамин	2.2±0.3	2.2

В заключении описаны основные *результаты*, полученные в работе.

ВЫВОДЫ

1. Изучены в гидрофильном режиме хроматографические свойства ковалентно модифицированных сорбентов на основе силикагеля, различающихся структурой и гидрофильностью спейсера – на примере трех неподвижных фаз, а также четырех сорбентов, модифицированных различными по природе и структуре полярными полимерами. Предложено использование разветвленного полиэтиленимина в сочетании с диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола в роли спейсера для формирования гидрофильного функционального слоя.

2. В работе показано применение модифицированных частиц диоксида титана в режиме гидрофильной хроматографии. Установлено, что стабильное адсорбционное закрепление полимерного функционального слоя обеспечивается при массовом соотношении матрица : полиэтиленимин не менее чем 1 : 0.5 с последующей его сшивкой диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола не менее чем 1 : 0.3 по отношению масс матрица : сшивающий агент. Сорбент с массовым соотношением матрица : полимер : сшивающий агент равным 1 : 1 : 1 обеспечил экспрессное разделение модельной смеси шести витаминов менее чем за 4 мин с эффективностью до 24000 тт/м.

3. Изучено влияние дистанцирования ковалентно закрепленного функционального слоя полиэтиленимина от поверхности матрицы на хроматографические свойства сорбентов в режиме гидрофильной хроматографии. На примере девяти неподвижных фаз показано, что удаленность полимерного слоя не оказывает значительного влияния на факторы удерживания и селективность в отношении полярных анализов для сорбентов на основе различных матриц, но позволяет существенно изменять эффективность в случае гидрофобного полистирол-дивинилбензола.

4. Сорбент, полученный в результате двух циклов присоединения диглицидилового эфира 1,4-бутандиола, модифицированный разветвленным полиэтиленимином и глицидолом, продемонстрировал максимальную гидрофильность среди изученных неподвижных фаз на основе полистирол-дивинилбензола, а также лучшую селективность и эффективность в гидрофильном режиме. Использование 100 мМ аммонийно-формиатного буферного раствора с pH 3.0 и ацетонитрила в качестве подвижной фазы в градиентном режиме позволило разделить модельную смесь семи водорастворимых витаминов за 30 минут с эффективностью до 40000 тт/м.

5. Показана применимость полученных сорбентов на основе различных матриц к анализу реальных объектов: витаминных комплексов, спортивного питания, энергетических напитков, меда, ликеро-водочных изделий.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.02 – «Аналитическая химия»:

1. Попов А.С., Максимов Г.С., Смоленков А.Д., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Новые сорбента для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, ковалентно модифицированного полиэтиленгликолем // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2: Химия. 2021. Т. 62. № 2. С. 164-174. Импакт-фактор RSCI – 0.695. (70%)

2. Попов А.С., Царенко Е.А., Чернобровкина А.В. Сорбенты на основе диоксида титана для гидрофильной хроматографии // Журн. Аналит. Химии. 2021. Т. 76. № 10, С. 916-926. Импакт-фактор RSCI – 0.996. (50%)

3. Popov A.S., Spiridonov K.A., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Chernobrovkina A.V., Zatirakha A.V. Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly (styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography // J. Chromatogr. A. 2021 Vol. 1642. P. 462010. Импакт-фактор Web of Science – 4.759, **Q1**. (40%)

Иные публикации:

1. Попов А.С. Синтез и изучение новых диольных неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии со спейсерами различной гидрофобности // Материалы IX научной конференции молодых ученых "Инновации в химии: достижения и перспективы - 2018". Москва, Россия. 2018. С. 78.

2. Попов А.С., Царенко Е.А., Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Изучение альтернативных матриц сорбентов для гидрофильной хроматографии // Материалы V Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. Краснодар, Россия. 2018. С. 168.

3. Popov A., Chernobrovkina A., Domnikov K., Smolenkov A., Shpigun O. Evaluating the Applicability of alternative substrates in Hydrophilic interaction Chromatography // Book of Abstract 32d International Symposium on Chromatography. Cannes-Mandelieu, France. 2018. P. 76.

4. Царенко Е.А., Попов А.С. Изучение хроматографических свойств неподвижных фаз на основе диоксида титана в режиме гидрофильной хроматографии // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019». Москва, Россия. 2019. С. 99.

5. Попов А.С. Изучение влияния длины спейсера на хроматографические свойства новых сорбентов с различной матрицей для гидрофильной хроматографии // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019». Москва, Россия. 2019. С. 73.

6. Popov A., Chernobrovkina A., Zatirakha A., Smolenkov A., Shpigun O. The Influence of Linker's Structure on the Performance of Novel HILIC Silica- and PS-DVB-

based Stationary Phases // 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. Milan, Italy. 2019. P. 1-2.

7. Чернобровкина А.В., Попов А.С., Смоленков А.Д., Затираха А.В. Синтез и изучение новых сорбентов для гидрофильной хроматографии на основе сополимера стирола и дивинилбензола // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез". Краснодар, Россия. 2020. С. 168.

8. Попов А.С., Чернобровкина А.В., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Новые сорбенты на основе различных матриц для гидрофильной хроматографии // Материалы IV Всероссийской конференции с международным участием "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез". Краснодар, Россия. 2020. С. 156.

9. Попов А. С. Изучение влияния структуры сшивающего агента на хроматографические свойства новых сорбентов на основе сополимера стирола и дивинилбензола для гидрофильной хроматографии // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020». Москва, Россия. 2020. С. 116.

10. Попов А.С., Царенко Е.А., Чернобровкина А.В., Шпигун О.А. Синтез и изучение свойств сорбентов на основе диоксида титана в режиме гидрофильной хроматографии // Материалы VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. Краснодар, Россия. 2021. С. 67.

11. Максимов Г.С., Попов А.С. Синтез и изучение новых сорбентов для гидрофильной хроматографии на основе силикагеля, ковалентно модифицированного полиэтиленгликолем // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021». Москва, Россия. 2021. С. 59.

12. Попов А.С., Горбовская А.В. Разработка многофункционального гиперразветвленного сорбента на основе сополимера стирола и дивинилбензола // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021». Москва, Россия. 2021. С. 72.

Благодарности

Автор выражает признательность и благодарность научному руководителю к.х.н. Чернобровкиной А.В. за помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследования; д.х.н., проф., член-корр. РАН Шпигуну О.А. и д.х.н., проф. Пирогову А.В. за помощь и консультацию по тематике работы, д.х.н. Затираха А.В. и к.х.н. Ужель А.С. за любезно предоставленные сорбенты; всем членам лаборатории хроматографии за помощь в работе и поддержку; д.х.н. Яшкину С.Н. за бесценный опыт и чуткое наставничество.