

На правах рукописи

СОТНИКОВА Юлия Сергеевна

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОНОЛИТНЫХ
КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ С НОВЫМИ
НЕПОДВИЖНЫМИ ФАЗАМИ НА ОСНОВЕ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Института катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук» (ИК СО РАН)

Научный руководитель

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Патрушев Юрий Валерьевич

Официальные оппоненты:

Доктор химических наук, профессор кафедры органической химии
Карцова Людмила Алексеевна
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»
г. Санкт-Петербург

Кандидат химических наук, зав. лабораторией
Тихова Вера Дмитриевна
ФГБУН «Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН», г. Новосибирск

Ведущая организация

ФГБУН «Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина РАН», г. Москва

Защита диссертации состоится «10» февраля 2021 года в 10:00 ч.
на заседании диссертационного совета Д 003.051.01
на базе ИНХ СО РАН
по адресу: просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНХ СО РАН
и на сайте организации по адресу:
<http://niic.nsc.ru/institute/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан «10» декабря 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук

А.С. Потапов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Другим подходом к созданию колонок для ВЭЖХ является технология монолитных колонок. Они позволяют преодолеть отмеченные выше ограничения традиционных насадочных колонок и рассматриваются как дальнейшее развитие колонок для ВЭЖХ. Следует отметить, что монолитные колонки для ВЭЖХ могут быть приготовлены на основе либо диоксида кремния, либо органических полимеров. В отличие от монолитов на основе диоксида кремния, органические монолиты проявляют химическую устойчивость в широком диапазоне pH. Чаще всего для приготовления монолитных колонок используют сополимеры дивинилбензола и стирола, акрилатов, ароматических мономеров с различными функциональными группами, мономеров с гетероатомами или смешанных прекурсоров, в которых присутствуют различные типы мономеров.

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

сокоэффективной жидкостной хроматографии является возможность создания новых монолитных органических колонок с заданными химическими и текстурными характеристиками по единой методике.

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

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

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

— разработка методики синтеза монолитных колонок на основе сополимера стирола, дивинилбензола и одного из следующих функциональных мономеров: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид;

— разработка методики *in situ* модифицирования поверхностных хлорметильных групп монолитного сорбента на основе 4-винилбензилхлорида следующими функциональными реагентами: 1-метилимидазол, 2-метилимидазол, 2-метилпиридин и 4-метилпиридин;

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

— исследование влияния относительного содержания дивинилбензола

в сорбенте, а также природы порообразующего растворителя на текстурные и хроматографические свойства монолитных колонок;

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

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

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

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

Методология и методы диссертационного исследования. Методология исследования включает в себя: разработку синтеза монолитного сорбента внутри стеклянной трубки, а также физико-химическую характеристи-

цию полученных сорбентов. Для достоверного описания свойств полученных сорбентов использовался набор методов – сканирующая электронная микроскопия, низкотемпературная адсорбция азота, СНН-анализ, хроматографические методы анализа.

На защиту выносятся:

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

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

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

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

— данные о хроматографических характеристиках модифицированных монолитных колонок.

Личный вклад автора. Поиск, изучение, анализ и обобщение литературных данных. Синтезированы все описанные в работе монолитные сорбенты и осуществлены хроматографические эксперименты. Постановка цели и задач диссертационной работы проводилась совместно с научным руководителем. Обработка экспериментальных данных, их анализ и интерпретация результатов проводились совместно с научным руководителем. Материалы к публикации подготовлены совместно с соавторами. Вклад соискателя признан всеми соавторами.

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

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены

и обсуждались на X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Барнаул, 2016), XXVI Менделеевской конференции молодых ученых (Самара, 2016), V Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (Сочи, 2016), 55-й международной научной студенческой конференции МНСК-2017 (Новосибирск, 2017), VI, VII, VIII Всероссийских симпозиумах «Кинетика и динамика обменных процессов» (Сочи, 2017; Сочи, 2018; Москва, 2019), 3-ей Всероссийской конференции «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов» (Новосибирск, 2020).

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во *введении* показана актуальность выбранной темы диссертационного исследования, степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи данной работы, представлены научная новизна, практическая значимость работы, и изложены положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор литературы в области приготовления и исследования свойств монокристаллических колонок для ВЭЖХ.

В начале литературного обзора описаны особенности монокристаллических и насадочных неподвижных фаз. Во второй части рассмотрена классификация монокристаллических колонок по геометрической форме, химической природе матрицы и химической функциональности. Описаны сорбенты с различными свойствами: гидрофобные, гидрофильные, с заряженными группами, аффинные, хиральные и со смешанным механизмом удерживания и способы оценки селективности хроматографических колонок. В третьей части изложены основные способы приготовления монокристаллических материалов: свободнорадикальная термически инициированная, фотоиницируемая и радиационная полимеризации. На примере свободнорадикальной полимеризации рассмотрены факторы, влияющие на свойства монокристаллических материалов: температура и время полимеризации, природа и концентрация сшивающего агента, порообразующего растворителя и инициатора. В четвертой части кратко изложены способы модификации монокристаллических сорбентов с целью получения материалов с различной селективностью. Представлено заключение литературного обзора, в котором поясняются поставленные задачи диссертационной работы и объекты исследования.

Вторая глава содержит описание методики получения монокристаллических органических колонок на основе сополимера стирола, дивинилбензола и функциональных мономеров (1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид) внутри стеклянной трубки с внутренним диаметром 2 мм методом свободнорадикальной термически инициируемой полимеризации. Описан состав полимеризационных смесей, в которых варьировали содержание функционального мономера, а на примере колонок с 1-винил-2-пирролидоном варьировали содержание дивинилбензола и природу порообразующего растворителя. Изложена методика функционализации монокристаллических колонок на основе 4-винилбензилхлорида модифицирующими реагентами (производными пиридина и имидазола). Приводится описание применяемых методов физико-химической характеристики: метод сканирующей электронной микроскопии, низкотемпературная адсорбция азота, анализ на элементный CHN-состав, хроматографические методы исследования.

В *третьей главе* представлено описание результатов экспериментов и их обсуждение.

3.1. Обоснование выбора основных объектов исследования.

Приготовили 28 типов новых монолитных колонок. Далее название колонки будет обозначаться аббревиатурой в соответствии с используемым функциональным мономером и числом, равным его содержанию (об. %) в исходной полимеризационной смеси: 1-винилимидазол (**ВИ**), 4-винилпирридин (**ВП**), 1-винил-1,2,4-триазол (**ВТр**), 1-винил-2-пирролидон (**ВПр**), 4-винилбензилхлорид (**ВБХ**). Для сравнения была приготовлена колонка на основе дивинилбензола и стирола (**ДВБ-Ст**). Полученные колонки устанавливали в стандартные фитинги (рис. 1). В работе использовали колонки длиной 50–110 мм.

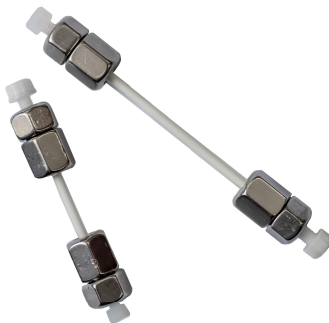


Рис. 1. Внешний вид приготовленных колонок.

Каждую монолитную колонку тестировали на пригодность к дальнейшим исследованиям путем хроматографирования тестовой смеси, состоящей из полярного анализита – фенола и неполярного – бензола. Установлено, что ряд приготовленных колонок имеют неудовлетворительную эффективность, в связи с чем, они были исключены из дальнейшего исследования. Полученные данные по факторам удерживания тестовых веществ позволили установить, что с увеличением доли функционального мономера в полимеризационной смеси удерживание фенола увеличивается, а бензола уменьшается.

3.2. Определение текстурных характеристик хроматографических колонок.

Сканирующая электронная микроскопия. Для всех монолитов наблюдается картина, типичная для классических пористых полимеров на основе дивинилбензола и стирола. Монолитный материал представляет собой ассоциаты из глобул диаметром около 2 мкм, образующие каркас, пронизанный транспортными порами (на примере ВПр30, рис. 2а). Установлено, что колонка ВТр40 отличается от остальных колонок внешним видом глобул: они имеют неправильную форму и шероховатую поверхность (рис. 2б).

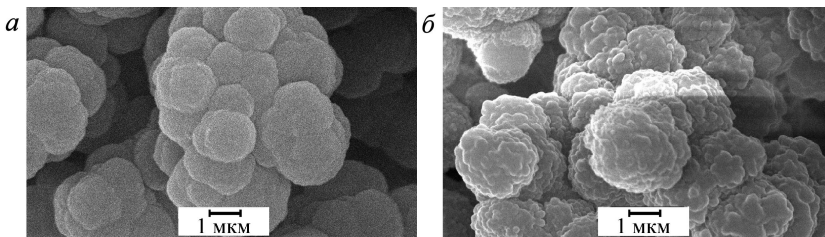


Рис. 2. Микрофотографии монолитных сорбентов: ВР30 (а), ВТр40 (б).

На примере колонок с 1-винил-2-пирролидоном (30 об. %) продемонстрировано, что природа порообразующего растворителя существенно влияет на макроструктуру сорбента. Определено, что наиболее подходящими порообразователями являются: полипропиленгликоль с $M = 2025$ г/моль и триблоксополимер Pluronic 10R5.

Низкотемпературная адсорбция азота. Установлено, что полимеры, приготовленные на основе 1-винилимидазола и 4-винилпиридина относятся к макропористым и имеют низкие величины удельной площади поверхности, не превышающие 6 м²/г. Монолитная колонка ВТр40 имеет достаточно высокую удельную площадь поверхности, равную около 200 м²/г. Исследовали влияние содержания дивинилбензола (ДВБ), которое варьировали в диапазоне 30–70 об. % с шагом 10 об. %, на свойства колонок с 1-винил-2-пирролидоном (30 об. %). Известно, что бифункциональный сомономер влияет на число поперечных сшивок в полимере, и увеличение его содержания приводит к увеличению площади поверхности полимера. Установлено, что для монолитов с содержанием дивинилбензола 30 и 40 об. % характерна малая удельная площадь поверхности ($1-3$ м²/г). При доле дивинилбензола 50, 60 и 70 об. % удельная площадь поверхности полимеров значительно выше (рис. 3).

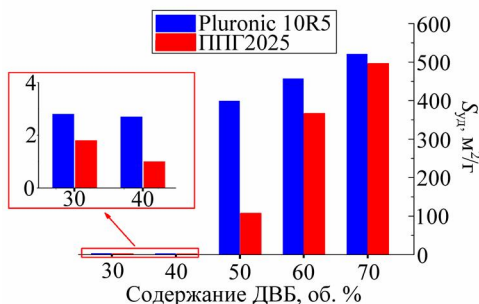


Рис. 3. Зависимость удельной площади поверхности монолитного сорбента с 1-винил-2-пирролидоном (30 об. %) от содержания дивинилбензола в исходной полимеризационной смеси. ППГ2025 – полипропиленгликоль с $M = 2025$ г/моль.

СНН-анализ. С помощью СННС/О-анализатора определяли элементный состав сорбентов (ВИ25, ВП40, ВТр40, ВПр30 (ДБВ 50 об. %)) для того, чтобы оценить степень конверсии используемых функциональных мономеров. Были получены данные, представляющие собой процентные массовые содержания основных элементов (углерод, водород и азот). С учетом количества атомов азота в молекулах функциональных мономеров рассчитывали массовое процентное содержание соответствующего мономера в готовой монолитной колонке. Для колонок ВИ25 и ВПр30 установлено, что содержание функциональных мономеров составляет около 5 %, для колонки ВТр40 – 20 %, для колонки ВП40 – 40 %.

3.3. Исследование хроматографических свойств приготовленных колонок.

Гидродинамические свойства. Высокая гидродинамическая проницаемость монолитных колонок – одно из наиболее существенных их преимуществ по сравнению с насадочными.

Для оценки этого параметра через колонки пропускали ацетонитрил с различными скоростями потока и фиксировали перепад давления на них. По полученным данным строили зависимости перепада давления от объемной скорости потока. Линейный характер полученных зависимостей говорит о механической устойчивости приготовленных колонок (отсутствие деформации монолитного сорбента). По данным зависимостям рассчитывали коэффициенты гидродинамической проницаемости (B_0). Проводили сравнение с коммерческой насадочной колонкой Диасфер-250-Ст с органическим сорбентом (75×2 мм, размер гранул 5 мкм). Установлено, что коэффициенты проницаемости для монолитных колонок примерно на порядок выше, чем для насадочной (табл. 1).

Зависимость эффективности колонки от скорости потока подвижной фазы (ПФ). Для оценки эффективности колонок определяли зависимость вы-
соты, эквивалентной теоретической тарелке (**ВЭТТ**), от скорости потока подвижной фазы по тестовому веществу (бензол). При этом были получены

Таблица 1

Значения коэффициентов проницаемости и эффективности

Колонка	$B_0 \cdot 10^{13}$, м ²	ВЭТТ, мкм
Диасфер-250-Ст	0.12	38
ДБВ-Ст	3.28	40
ВИ10	3.02	57
ВИ17	2.52	50
ВИ25	0.95	38
ВИ40	0.71	115
ВП10	3.94	50
ВП20	3.19	50
ВП30	2.43	40
ВП40	2.25	50
ВТр40	3.00	62
ВПр30	2.05	45

зависимости, типичные для жидкостной хроматографии. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке, составляет от 40 до 60 мкм, что сопоставимо с эффективностью коммерческой насадочной колонки Диасфер-250-Ст (табл. 1). Исключением является колонка ВИ40, для которой характерна аномально низкая эффективность.

Определение загрузочной емкости. Состояние пористой системы полимерного сорбента зависит от растворителя, в который он помещен. Так, в «хорошем» растворителе полимер способен набухать, а в «плохом» растворителе – сжиматься. При этом может изменяться степень доступности адсорбционных пор внутри сорбента для молекул сорбата. Поскольку загрузочная емкость хроматографической колонки зависит от удельной площади поверхности и объема пор сорбента, то уменьшение доступности пор в «плохом» растворителе должно приводить к уменьшению загрузочной емкости колонки. Рассмотрим, как меняется величина загрузки в условиях, когда подвижная фаза хорошо смачивает неподвижную фазу (ацетонитрил/вода = 60/40 об. %) и сравним полученный результат с тем случаем, когда ПФ плохо смачивает сорбент (ацетонитрил/вода = 20/80 об. %). Загрузочная емкость колонок – это максимальное количество вводимого анализа, не вызывающее значительную потерю эффективности. Чтобы оценить этот параметр вводили в колонки нитропропан в количестве от 1 до 160 мкг. Для каждого количества введенной пробы рассчитывали эффективность (число теоретических тарелок). Из представленных зависимостей видно, что загрузочная емкость в элюенте, обогащенном органическим растворителем (рис. 4а), составляет около 100 мкг для монолитных колонок и около 30 мкг для насадочной колонки Диасфер-250-Ст. В элюенте, обогащенном водой, загрузочная емкость монолитных колонок примерно в 3 раза меньше и сопоставима по величине с емкостью насадочной колонки Диасфер-250-Ст. Это можно объяснить тем, что органические сорбенты могут менять свою пористость в зависимости от растворителя, в котором они находятся. Таким образом, исследование загрузочных свойств приготовленных монолитных колонок и коммерческой насадочной колонки показало, что текстурные характеристики (площадь поверхности, объем и размеры пор), полученные для сухого образца, не всегда коррелируют с величиной загрузки. Загрузочные свойства колонок с исследованными монолитными материалами зависят от состава подвижной фазы, используемой при хроматографировании.

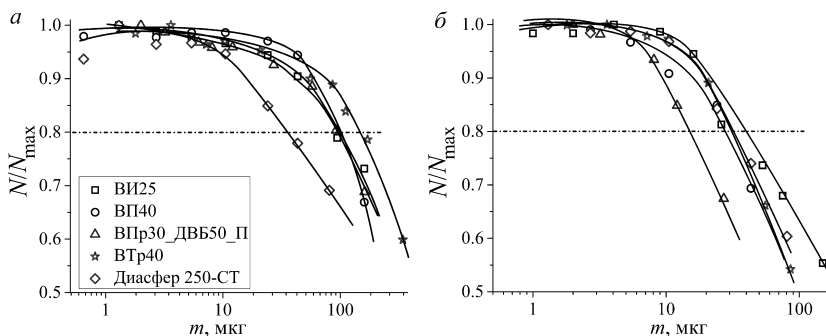


Рис. 4. Зависимости относительной эффективности от величины пробы при составе элюента: ацетонитрил/вода = 60/40 об. % (а), ацетонитрил/вода = 20/80 об. % (б).

Исследование хроматографической селективности приготовленных колонок. Поскольку приготовленные колонки представляют собой неполярную матрицу ДВБ-Ст с введенными в нее полярными группами в виде азотсодержащих гетероциклов, можно сделать предположение, что данные колонки будут способны удерживать вещества по смешанному механизму (обращенно-фазовый/гидрофильный). Для того чтобы оценить вклад того или иного механизма удерживания, исследовали зависимость логарифма фактора удерживания (k) неполярного (бензол) и полярного (фенол) тестовых веществ от состава подвижной фазы (ацетонитрил/вода). Относительное содержание ацетонитрил/вода меняли в диапазоне от 40/60 до 95/5 об. %. Сравнение проводили с обращенно-фазовой колонкой ProntoSIL 120-5-C18, в которой неподвижной фазой является силикагелевый сорбент с химически привитыми к поверхности алкильными радикалами C₁₈. Известно, что для обращенно-фазовых колонок такие зависимости должны иметь линейный характер во всем диапазоне составов элюента. И мы наблюдаем такие зависимости как для неполярного (рис. 5а), так и для полярного тестовых веществ (см. рис. 5б). Для монолитных колонок с полярными функциональными группами наблюдается совершенно другая картина для фенола (см. рис. 5б). Установлено наличие минимума для данных зависимостей. Такая форма графиков показывает, что колонка может работать как в режиме обращенно-фазовой хроматографии (когда k возрастает с увеличением доли воды в ПФ), так и в режиме гидрофильной хроматографии (когда k увеличивается с уменьшением доли воды в ПФ). В точке минимума данной зависимости происходит смена преимущественных механизмов удерживания (5–10 % воды в подвижной фазе).

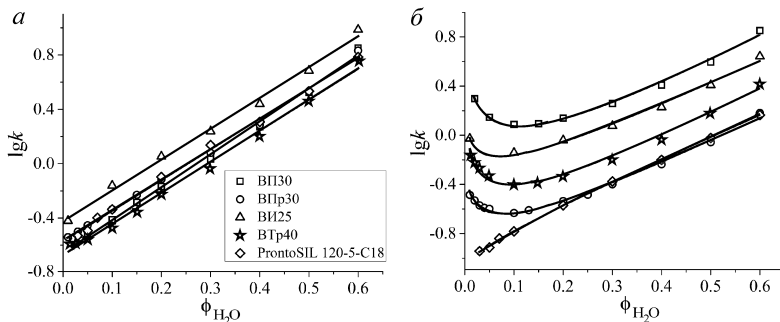


Рис. 5. Зависимости логарифма фактора удерживания от состава элюента для бензола (а) и фенола (б). ϕ_{H_2O} – доля воды в подвижной фазе.

Поскольку приготовленные колонки способны проявлять смешанный механизм удерживания, были исследованы зависимости логарифма фактора удерживания от состава элюента для веществ с различной полярностью (бензойная и ацетилсалициловая кислоты и парацетамол) (рис. 6). Установлено, что данные аналиты лучше всего удерживаются на колонке ВП30. Парацетамол меньше всего удерживается на колонке ВИ25, а кислоты на колонке ВПр30.

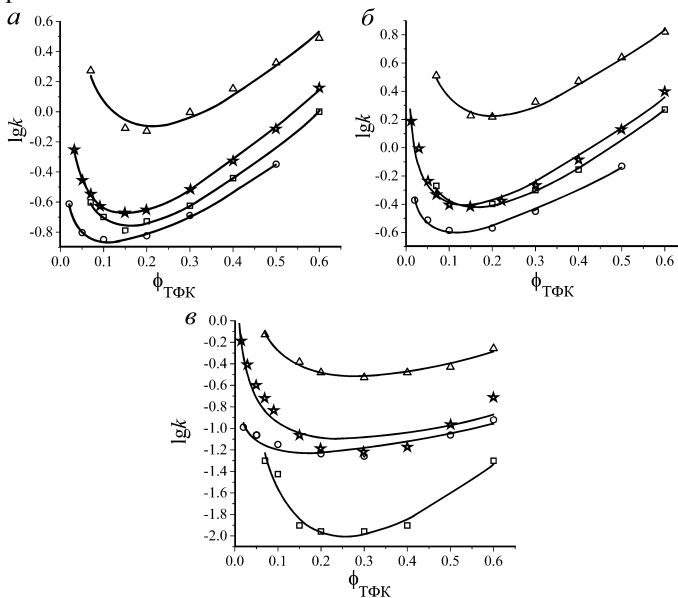


Рис. 6. Зависимости логарифма фактора удерживания от состава ПФ для ацетилсалициловой кислоты (а), бензойной кислоты (б), парацетамола (в). (□) – ВИ25, (○) – ВПр30_ДВБ50_П, (Δ) – ВП30, (☆) – ВТр40.

Данные зависимости являются удобным инструментом для определения состава ПФ, при котором можно удовлетворительно разделить вещества. На примере компонентов лекарственного препарата «Аскофен-П»: ацетилсалициловая кислота, парацетамол, кофеин и салициловая кислота, было установлено, что данную смесь можно разделить в гидрофильном режиме при составе ПФ ацетонитрил/0.3 об. % водный раствор фосфорной кислоты в соотношении 98/2 об. % (рис. 7).

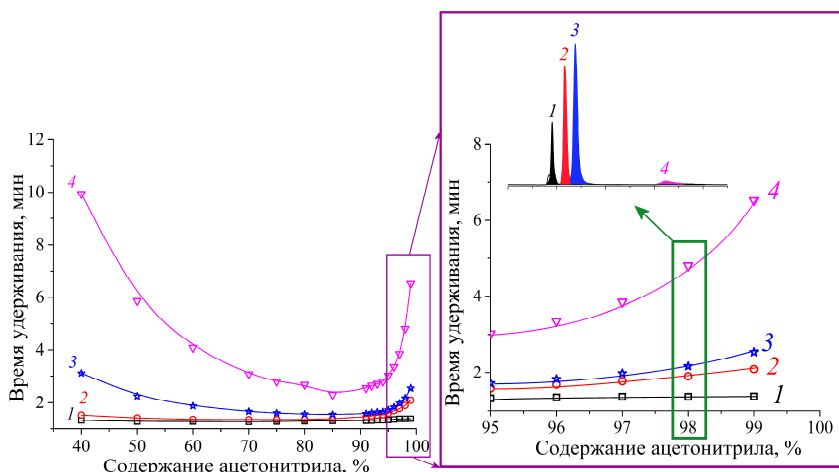


Рис. 7. Зависимости времени удерживания от состава подвижной фазы для колонки ВТр40: кофеин (1), парацетамол (2), ацетилсалициловая кислота (3), салициловая кислота (4). Подвижная фаза: ацетонитрил/ 0.3 об. % H_3PO_4 . Скорость потока 200 мкл/мин.

Модель линейных отношений энергий сольватации (ЛОЭС) в настоящее время является одним из наиболее информативных методов оценки селективности хроматографических колонок с точки зрения типов межмолекулярных взаимодействий. Согласно данной модели, хроматографическое удерживание описывается линейной зависимостью между параметром удерживания SP (время удерживания или фактор удерживания) и параметрами, характеризующими тестовое вещество (дескрипторы) по уравнению:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

Параметры E , S , A , B , V , называемые дескрипторами (литературные данные), являются коэффициентами, учитывающими вклад в межмолекулярные взаимодействия со стороны аналитов, а коэффициенты e , s , a , b , v – параметры, которые описывают вклад в межмолекулярные взаимодействия со стороны неподвижной фазы. Хроматографирование 35 тестовых веществ с различными химическими свойствами проводили при составе элюента ацетонитрил/вода = 60/40 об. %. С помощью множественной линейной регрессии рассчитывали параметры e , s , a , b , v , значения которых представлены в

виде гистограмм на рис. 8.

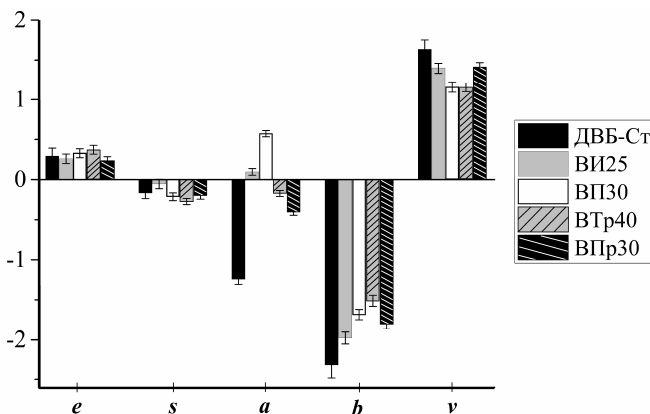


Рис. 8. Гистограммы параметров модели ЛОЭС для приготовленных колонок. Элюент: ацетонитрил/вода (60/40).

Видно, что основной вклад в удерживание вносят коэффициенты v и e . Это говорит о том, что удерживание аналитов на данных неподвижных фазах определяется в основном гидрофобными взаимодействиями и способностью к π - π и n - π взаимодействиям этих неподвижных фаз. Это может быть связано с тем, что основными компонентами для всех сорбентов являются стирол и дивинилбензол, составляющие основу полимерного материала, и, скорее всего, именно эти фрагменты монолита определяют его способность к n - π взаимодействиям. Отрицательные значения коэффициентов s показывают, что данные неподвижные фазы слабо удерживают вещества по диполь-дипольному механизму. Коэффициент b , отвечающий за кислотность неподвижной фазы, имеет отрицательные и большие по модулю значения для всех колонок. Это говорит о том, что аналиты, обладающие протонно-акцепторной способностью, хуже удерживаются на данных неподвижных фазах, чем вещества, не проявляющие основных свойств. Коэффициент a характеризует монолиты как акцепторы протонов. Для колонок ДВБ-Ст, ВТр40 и ВПр30 значения данного коэффициента отрицательные, что говорит о слабых акцепторных свойствах данных монолитов. Положительные значения для колонок ВИ25 и ВП30 указывают на то, что вещества с кислотными свойствами будут удерживаться на этих колонках лучше, чем на колонках ДВБ-Ст, ВТр40, ВПр30.

3.4. Модифицирование монолитных колонок.

Одним из путей изменения селективности колонок для ВЭЖХ является постмодификация поверхности хроматографического сорбента. Для органических монолитов, состоящих из полимера на основе дивинилбензола и стирола, такая модификация возможна в случае введения в монолит реакционных функциональных групп на стадии синтеза полимера. В данной работе в качестве источника функциональных групп был выбран 4-винилбензилхлорид, содержащий хлорметильную группу. Содержание 4-винилбензилхлорида в исходной полимеризационной смеси составляло 40 об. % (ДВБ = 50 об. %, Ст = 10 об. %), поэтому далее данную колонку будем называть исходной ВБХ40.

Исходные колонки ВБХ40 были обработаны растворами производных имидазола и пиридина: 1-метилимидазолом (1МИ), 2-метилимидазолом (2МИ), 2-метилпиридином (2МП) и 4-метилпиридином (4МП). Реакцию проводили в запаянной трубке в течение 15 ч в воздушном термостате при температуре 80 °С.

Установлено, что приготовленные колонки способны работать в режиме смешанного механизма удерживания. Для того чтобы сравнить приготовленные колонки по селективности, хроматографировали тестовую смесь, состоящую из урацила, кофеина, толуола и фенола в режиме обращенно-фазовой или гидрофильной хроматографии. Наиболее показательные отличия колонок наблюдаются в гидрофильном режиме при 93 об. % ацетонитрила в смеси с водой (рис. 9).

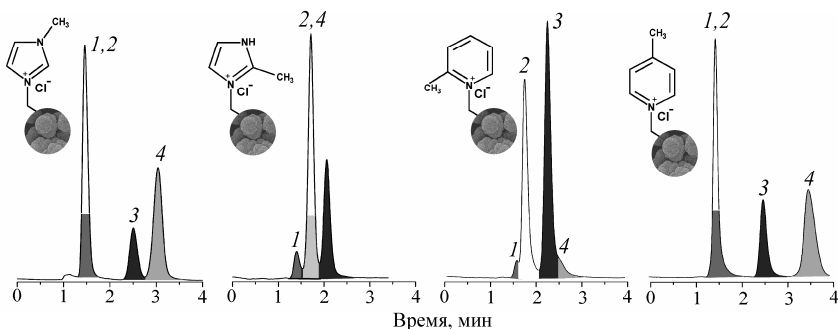


Рис. 9. Хроматограммы тестовой смеси на модифицированных колонках.

Состав смеси: 1 – кофеин, 2 – толуол, 3 – фенол, 4 – урацил. Элюент: ацетонитрил/вода = 93/7 об. %. Скорость потока ПФ 100 мкл/мин. Длина колонок 60 мм, диаметр 2 мм.

Исследование эффективности и загрузочной емкости модифицированных колонок показало, что на данные параметры природа модифицирующего реагента существенного влияния не оказывает.

3.5. Примеры разделения на приготовленных колонках.

Предыдущие разделы настоящей работы были посвящены приготовлению и исследованию свойств монолитных колонок для ВЭЖХ. Полученные результаты показали, что данные колонки имеют хороший потенциал для решения задач разделения веществ различных химических классов методом ВЭЖХ. В зависимости от объекта исследования колонки устанавливали в хроматограф Милихром А-02 со спектрофотометрическим детектором (для детектирования соединений, поглощающих в УФ-диапазоне) или в хроматограф DIONEX UltiMate 3000 (Thermo scientific, США) с детектором заряженных аэрозолей Corona ultra RS (для детектирования нелетучих соединений, не поглощающих в УФ-диапазоне).

Прежде всего приготовленные колонки необходимо было сравнить с единственной существующей коммерческой колонкой ProSwift RP-3U 50×4.6мм с сорбентом ДВБ/Ст. Сравнение проводили на примерах разделений белковых макромолекул (см. рис. 10а, б) и тестовой смеси малых молекул (рис 10в, г). Хроматографирование белков проводилось в градиентном режиме. Подвижная фаза имела следующий состав: элюент А: ацетонитрил (5 об. %)/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (95 об. %); элюент Б: ацетонитрил (80 об. %)/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (20 об. %). Из представленных на рис. 10а, б хроматограмм видно, что на колонке ВИ25 при удовлетворительном разделении время хроматографирования составляет менее 4 мин при скорости потока 300 мкл/мин. В то время, как на коммерческой колонке время разделения составляет около 7 минут при объемной скорости потока ПФ 1 мл/мин. Таким образом, монолитная колонка ВИ25 позволяет разделять данные белки в два раза быстрее. При этом расход подвижной фазы на один анализ примерно в 6 раз меньше, чем на колонке RP-3U. Преимуществом колонки ВИ25 является то, что она, помимо белковых макромолекул, позволяет проводить разделение молекул малого размера (см. рис. 10е). При этом на колонке RP-3U не удается удовлетворительно разделить тестовую смесь малых молекул (см. рис.10г).

Пример разделения натурального коровьего молока представлен на рис. 11а. Подготовленную пробу анализировали на колонке ВПр30 в градиентном режиме. В качестве элюента А использовали смесь ацетонитрила и 0.1 об. % раствора трифторуксусной кислоты в соотношении 5/95 об. % соответственно, элюента Б – смесь тех же компонентов в соотношении 95/5 об. % соответственно.

К полярным гидрофильным веществам относятся молекулы природных моно- и дисахаридов. На рисунке 11б представлен пример разделения смеси углеводов. Хроматографирование проводили на колонке ВТр40 длиной 105 мм. В качестве ПФ использовали смесь ацетона и воды в соотношении 96/4 об. % (гидрофильный режим). Скорость потока ПФ составляла 300

мкл/мин. Было установлено, что данная колонка способна разделять аномеры глюкозы, фруктозы и мальтозы.

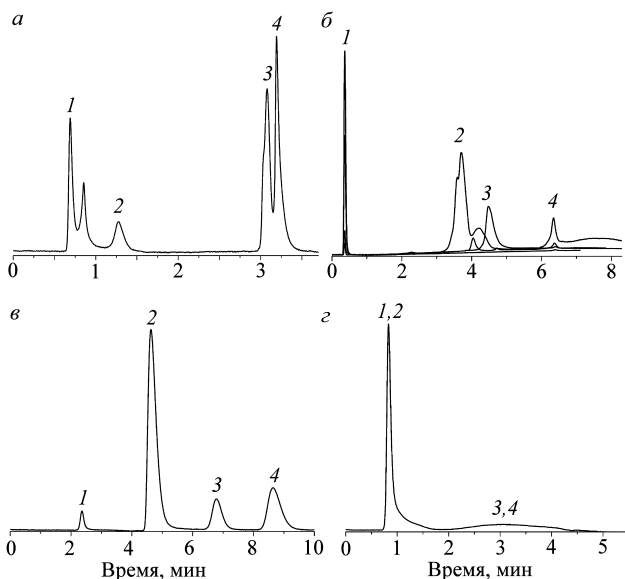


Рис. 10. Пример разделения белковых молекул: 1 – лактальбумин, 2 – лизоцим, 3 – овальбумин, 4 – бычий сывороточный альбумин. Элюент А – ацетонитрил/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (5/95 об. %); элюент Б – ацетонитрил/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (95/5 об. %). (а) – на колонке ВИ25 длиной 90 мм. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны – 280 нм. Градиентное элюирование: 0 – 1.5 мин (16 об. % Б), 1.5 – 2.5 мин (80 об. % Б), 2.5 – 5.0 мин (80 об. % Б). Скорость потока 300 мкл/мин. (б) – на монолитной коммерческой колонке RP-3U 50×4.6мм с сорбентом ДВБ/Ст. Детектор заряженных аэрозолей. Градиентное элюирование: 15 – 80 % Б за 12 мин. Скорость потока 1 мл/мин.

Пример разделения тестовой смеси малых молекул: 1 – КВг, 2 – фенол, 3 – бензол, 4 – толуол. Элюент – ацетонитрил/вода (70/30 об. %). Детектор – УФ-спектрометр, длина волны 254 нм. (в) – на колонке ВИ25 длиной 90 мм. Скорость потока 100 мкл/мин. (г) – на колонке RP-3U. Скорость потока 1 мл/мин.

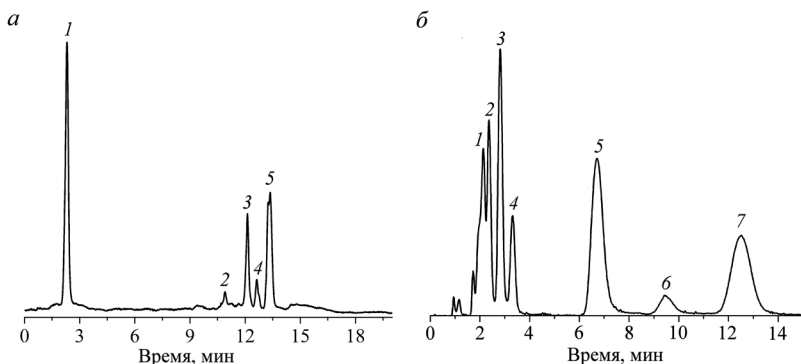


Рис. 11. (а) – пример разделения натурального молока на колонке ВПр30_ДВБ30 длиной 77 мм. Элюент А – ацетонитрил/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (5/95 об. %), элюент Б – ацетонитрил/0.1 об. % раствор трифторуксусной кислоты в воде (95/5 об. %). Градиент: 0 – 3 мин (15 об. % Б), 3 – 15 мин (70 об. % Б), 17 – 20 мин (70 об. % Б). Скорость потока 100 мкл/мин. Детектор – УФ-спектрометр, длина волны 280 нм. 1 – не идентифицированный компонент(-ы), 2 – бычий сывороточный альбумин, 3 – α -лактальбумин, 4 – β -лактоглобулин В, 5 – β -лактоглобулин А.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что органические монолитные материалы на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и гетероциклических азотсодержащих сомономеров являются достойной альтернативой единственной существующей коммерческой монолитной колонке Thermo RP-3U. Так, приготовленные колонки способны разделять как малые молекулы различной полярности, так и макромолекулы, в том числе, белки. Варьирование природы и количества функционального гетероциклического мономера позволило получить широкий набор колонок с различной селективностью. Исследования, посвященные определению загрузочной емкости и гидродинамической проницаемости, показали, что приготовленные монолитные колонки обладают преимуществами по сравнению к коммерческими насадочными колонками аналогичных геометрических параметров. В данной работе продемонстрирован способ получения колонок с различной селективностью путем проведения модифицирования *in situ* производными имидазола и пиридина монолитных колонок на основе 4-винилбензилхлорида. Важной особенностью всех приготовленных колонок с функциональными группами выступает их способность проявлять разный механизм удерживания в зависимости от состава подвижной фазы (обращенно-фазовый или гидрофильный). Благодаря этому расширяются границы их использования в разделении смесей различных составов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые приготовлены монолитные колонки на основе сополимеров стирола, дивинилбензола и одного из функциональных мономеров: 1-винилимидазол, 4-винилпиридин, 1-винил-2-пирролидон, 1-винил-1,2,4-триазол, 4-винилбензилхлорид. Всего было получено 28 типов монолитных колонок по единой методике синтеза.
2. Установлено, что в зависимости от состава подвижной фазы (вода/ацетонитрил) удерживание на приготовленных колонках происходит по обращенно-фазовому (менее 80 об. % ацетонитрила) или гидрофильному (более 80 об. % ацетонитрила) механизму. Определено, что эффективность приготовленных колонок варьируется в диапазоне ВЭТТ от 40 до 60 мкм. Установлено, что коэффициент гидродинамической проницаемости для приготовленных монолитных колонок на порядок выше, чем для коммерческих насадочных колонок с размером гранул 5 мкм. Установлено, что загрузочная емкость при соотношении ацетонитрил/вода = 60/40 составляет 100 мкг для всех колонок, а при соотношении ацетонитрил/вода = 20/80 – 30 мкг.
3. Определено, что удельная площадь поверхности для монолитных колонок на основе 1-винилимидазола и 4-винилпиридина составляет 2–6 м²/г, для колонки с 1-винил-1,2,4-триазолом – 200 м²/г. Установлено, что порообразователи полипропиленгликоль с молекулярной массой 2025 г/моль и триблоксополимер Pluronic 10R5 с молекулярной массой 2000 г/моль позволяют получать колонки с максимальной эффективностью. Исследование влияния количества дивинилбензола в монолите с 1-винил-2-пирролидоном показало, что при доле дивинилбензола 30 и 40 об. % величина удельной площади поверхности составляет около 3 м²/г. При доле дивинилбензола 50, 60 и 70 об. % удельная площадь поверхности составляет 400, 460 и 520 м²/г соответственно (Pluronic 10R5 в качестве порообразователя) и 110, 400, 500 м²/г соответственно (полипропиленгликоль с $M = 2025$ г/моль в качестве порообразователя).
4. Путем *in situ* модифицирования исходной колонки на основе 4-винилбензилхлорида 1-метилимидазолом, 2-метилимидазолом, 2-метилпиридином, 4-метилпиридином получены монолитные колонки с селективностью разделения, отличной как от исходной колонки, так и друг от друга.
5. Установлено, что на *in situ* модифицированных колонках реализуется смешанный механизм удерживания (обращенно-фазовый/гидрофильный). Загрузочная емкость модифицированных колонок составляет 11–17 мкг. Эффективность варьируется в диапазоне ВЭТТ от 43 до 57 мкм в обращенно-фазовом режиме и от 27 до 52 мкм в гидрофильном режиме.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Юдина (Сотникова) Ю.С., Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н. Исследование загрузочных свойств монолитных колонок для ВЭЖХ на основе пористых органических полимеров// Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т.17. – № 1. – С. 37–44.
2. Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н., Юдина (Сотникова) Ю.С. Монолитные колонки с органическим сорбентом на основе поли-1-винилимидазола для высокоэффективной жидкостной хроматографии// Журнал физической химии. – 2017, – Т. 91. – № 3. – С. 544–548.
3. Patrushev Y., Yudina (Sotnikova) Y., Sidelnikov V. Monolithic rod columns for HPLC based on divinylbenzene-styrene co-polymer with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2018. – V. 41. – P. 458–466
4. Юдина (Сотникова) Ю.С., Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н. Сравнительная оценка параметров селективности монолитных колонок для ВЭЖХ с органическими сорбентами // Журнал физической химии. – 2018. – Т. 92. – № 8. – С. 1344–1350.
5. Patrushev Y., Sotnikova Y., Sidelnikov V. Dead volume determination of the HPLC monolithic rod columns with organic sorbents // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2019. – V. 42. – P. 575–581.
6. Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В. Монолитные колонки для ВЭЖХ с сорбентом на основе 1-винил-2-пирролидона // Вестник Томского государственного университета. Серия Химия. – 2019. – № 14. – С. 40–52.
7. Патрушев Ю.В., Сотникова Ю.С., Сидельников В.Н. Монолитная колонка с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для гидрофильной ВЭЖХ // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2020. – Т. 56. – № 1. – С. 53 – 57.
8. Sotnikova Y.S., Patrushev Y.V., Sidelnikov V.N., Mazaeva A.A. In situ functionalization of HPLC monolithic columns based on divinylbenzene-styrene-4-vinylbenzyl chloride // Talanta. – 2020. – V. 220. – 121400.
9. Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н., Юдина (Сотникова) Ю.С. Хроматографические свойства монолитных колонок для ВЭЖХ на основе 1-винилимидазола. Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», 12–17 сентября 2016 г, г. Барнаул.
10. Юдина (Сотникова) Ю. С. Исследование хроматографических свойств монолитной колонки для ВЭЖХ с органическим сорбентом на основе винилимидазола. Материалы 54-й международной научной студенческой конференции МНСК-2016, 16–20 апреля 2016 г, г. Новосибирск.
11. Патрушев Ю.В., Юдина (Сотникова) Ю.С., Сидельников В.Н. Монолитные колонки для ВЭЖХ с сорбентом на основе 1-

- винилпирролидона//Шестой Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов» 29 октября - 6 ноября 2017 г, г. Сочи.
12. Юдина (Сотникова) Ю.С., Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н. Влияние условий синтеза на хроматографические свойства монолитных колонок для ВЭЖХ с органическими сорбентами//XII Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов», 28 октября – 5 ноября 2018 г, г. Сочи.
 13. Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н. Модификация *in situ* монолитных колонок для ВЭЖХ с органическими сорбентами// XIII Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов», 18–22 ноября 2019 г, г. Москва.
 14. Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н., Сотникова Ю.С. Материалы с упорядоченной пористостью в хроматографии//XIII Всероссийский симпозиум «Кинетика и динамика обменных процессов», 18–22 ноября 2019 г, г. Москва.
 15. Сотникова Ю.С., Патрушев Ю.В., Сидельников В.Н. Исследование текстурных характеристик монолитных органических сорбентов для ВЭЖХ//Материалы 3-й Всероссийской конференции «Методы исследования состава и структуры функциональных материалов» 1–4 сентября 2020, г. Новосибирск.

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

Автор благодарит Т.Я. Ефименко и А.А. Леонову (группа исследования структуры и пористости ИК СО РАН) за исследование образцов методом низкотемпературной адсорбции азота, А.Н. Серкову и Н.М. Чеснокову (лаборатория структурных метод исследования ИК СО РАН) за исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии и В.П. Фадееву (лаборатория микроанализа НИОХ СО РАН) за выполнение СНН-анализа.

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

СОТНИКОВА Юлия Сергеевна

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОНОЛИТНЫХ КОЛОНОК
ДЛЯ ВЭЖХ С НОВЫМИ НЕПОДВИЖНЫМИ ФАЗАМИ НА
ОСНОВЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
СОЕДИНЕНИЙ**

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата химических наук.

Подписано в печать 19.11.2020. Заказ № 43. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1.

Тираж 120 экз.

Отпечатано в издательском отделе Института катализа СО РАН 630090,
Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 5

<http://catalysis.ru>