

УДК 543.544

НОВЫЕ НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ИОННОЙ И ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2019 г. А. В. Затираха^{1,*}, А. С. Ужель¹, А. А. Лошин¹, А. В. Чернобровкина¹,
А. Д. Смоленков¹, О. А. Шпигун¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
119991 Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: zatirakha@analyt.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 05.03.2018 г.

После доработки 31.05.2018 г.

Принята к публикации 31.05.2018 г.

Обзор охватывает работы коллектива лаборатории хроматографии кафедры аналитической химии химического факультета МГУ в области создания новых неподвижных фаз для гидрофильной и ионной хроматографии, выполненные в период с 2007 по 2017 г. Обсуждаются принципы, которыми руководствовался коллектив при выборе матриц для каждого типа сорбентов, подходов к модифицированию поверхности и способов формирования функциональных слоев. Подробно описаны выявленные закономерности изменения хроматографических свойств материалов при варьировании различных структурных фрагментов функциональных слоев, которые позволили авторам разработать подходы к получению неподвижных фаз, не уступающих коммерческим аналогам по эффективности и селективности.

Ключевые слова: ионная хроматография, гидрофильная хроматография, сорбент, анионообменник, определение анионов, определение полярных соединений.

DOI: 10.1134/S0044450218110142

Высокоэффективная жидкостная хроматография занимает одно из ключевых мест среди существующих аналитических методов. В настоящее время хроматографическим анализом пользуется огромное количество предприятий различных профилей. Общеизвестно, что для решения задач по определению веществ ионной природы (в частности, неорганических анионов и органических кислот) наиболее перспективным и чувствительным методом является ионная хроматография (ИХ), которая представляет собой одну из разновидностей ВЭЖХ. В то же время для определения полярных соединений (аминокислот, сахаров, витаминов, антибиотиков) в мире все чаще применяют метод гидрофильной хроматографии (ГИХ), обеспечивающий уникальную селективность и эффективность определения биологически активных веществ. С учетом постоянного развития хроматографических методов и повышения уровня техники на протяжении многих лет актуальной остается проблема совершенствования неподвижных фаз, а в связи с расширением круга важнейших аналитических задач и их усложнением возникает потребность в повышении эффективности и селективности сорбентов для ИХ и ГИХ, а также чувствительности и экспрессности анализа.

В лаборатории хроматографии на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ с середины 90-х гг. ведется разработка новых неподвижных фаз для ИХ [1, 2]. Первые работы были посвящены получению полиэлектролитных (ПЭ) сорбентов на основе силикагеля для одноколоночной ИХ со спектрофотометрическим детектированием, однако впоследствии предпочтение было отдано более стабильным матрицам на основе сополимеров стирола и дивинилбензола с высокой степенью сшивки, что позволило перейти к более чувствительному варианту ИХ с подавлением фоновой электропроводности элюента и кондуктометрическим детектированием. В последнее десятилетие основной упор в лаборатории был сделан на разработку способов ковалентного закрепления ионообменных слоев на поверхности как полимерных, так и силикагелевых матриц, изучение факторов, влияющих на хроматографические свойства сорбентов, а также на поиск новых типов функциональных слоев, обеспечивающих повышенную селективность и эффективность. Позднее разработка новых ковалентно привитых сорбентов на основе силикагеля положила начало развитию в лаборатории метода ГИХ, что привело к созданию более совершенных неподвижных фаз для определения полярных со-

единений, позволяющих решать самые сложные аналитические задачи в области определения биологически активных соединений.

СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ

Силикагель имеет ряд определенных достоинств, таких как механическая устойчивость к высоким давлениям, стойкость к действию органических растворителей, отсутствие набухания и высокая эффективность, что делает его перспективной матрицей для получения неподвижных фаз для ВЭЖХ. В лаборатории хроматографии силикагель успешно использовали как основу для создания сорбентов с различными способами закрепления функциональных слоев на поверхности (электростатический, ковалентный и адсорбционный механизм).

Анионообменники для ионной хроматографии. Первые работы лаборатории хроматографии в области синтеза неподвижных фаз были направлены на получение нековалентно модифицированных ПЭ-сорбентов на основе силикагеля [3, 4]. Способ электростатического закрепления функционального слоя разрабатывали Крохин [3] и Пирогов с сотр. [4] еще в 90-е гг. прошлого столетия для получения ПЭ-сорбентов, в которых водорастворимый полимер, имеющий положительно заряженные атомы азота в цепи, удерживается за счет электростатических взаимодействий на отрицательно заряженной поверхности матрицы, например, содержащей сульфогруппы. Была продемонстрирована неплохая эффективность такого типа сорбентов – более 10 000 теоретических тарелок на метр (тт/м), а также возможность управления селективностью путем варьирования структуры полимера-модификатора, что наряду с простотой получения относится к преимуществам данного подхода. Однако серьезным недостатком ПЭ-сорбентов являлась их невысокая стабильность в процессе работы, что авторы связывали с изменением конформации полимера-модификатора в процессе эксплуатации, ведущим к падению ионообменной емкости, ухудшению эффективности и селективности разделения, а также заметному росту противодавления хроматографической колонки [4]. В связи с этим коллектив на время отказался от идеи электростатического закрепления функциональных слоев на поверхности силикагеля, и работы по данной теме были приостановлены.

Позднее коллектив лаборатории хроматографии вновь вернулся к идее использования силикагелевых матриц для получения сорбентов для одноколоночной ИХ. Основной целью являлось повышение стабильности полимерного покрытия на поверхности силикагеля, повышение селективности сорбентов, а также оптимизация условий их эксплуатации для решения конкрет-

ных аналитических задач. Продолжая работу в данном направлении, сотрудники лаборатории для синтеза ПЭ-анионообменников вместо сульфированного силикагеля предложили использовать более доступный немодифицированный силикагель. В работе [5] впервые получены ПЭ-сорбенты на несulfированных матрицах (Silasorb 600 и Kromasil), модифицированные кватернизованным поли(4-винилпиридином), не уступающие по хроматографическим характеристикам своим сульфированным аналогам. Кроме того, авторы предложили алгоритм выбора подвижных фаз для определения различных групп анионов (слабо- и сильноудерживаемых). Так, показано, что оптимальным путем решения задач по определению анионов на ПЭ-сорбентах является выбор соответствующей по силе кислоты: например, для детектирования F^- , CH_3COO^- , $HCOO^-$,

BrO_3^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- в качестве подвижной фазы подходящими являются бензойная и толуолсульфоновая кислоты, а для экспрессного определения сильноудерживаемых анионов (I^- , SCN^- , SO_4^{2-} , ClO_4^-) – сульфосалициловая кислота. Гидрофталат калия, элюирующую способность которого можно варьировать в зависимости от pH, оказался универсальной подвижной фазой, которая пригодна для элюирования всего ряда исследованных анионов.

Позднее был предложен и реализован альтернативный вариант нековалентного закрепления функционального слоя (ранее описанный для получения сорбентов для разделения биомолекул [1]), включающий адсорбцию полиэтиленimina (ПЭИ) на поверхности силикагеля и его последующую сшивку 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром (1,4-БДДГЭ). В результате проведения этих двух последовательных стадий получен сорбент [6], по своей разделяющей способности заметно превосходящий доступные коммерческие аминопропилсиликагели. Данный анионообменник обеспечивал разделение до 9 органических и неорганических анионов менее чем за 15 мин с эффективностью до 42 000 тт/м (по нитрат-иону). Кроме того, сорбенты такого типа по эксплуатационным характеристикам значительно превосходили ПЭ-анионообменники на основе сульфированного и немодифицированного силикагеля.

Параллельно с разработкой силикагелевых анионообменников с нековалентным закреплением функционального слоя коллектив лаборатории хроматографии начал активно реализовывать вариант ковалентной прививки ПЭИ на поверхности аминированной силикагелевой матрицы с использованием 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера [7]. Помимо того, что полученный таким образом анионообменник имел небольшую толщину ионообменного слоя, что гарантировало высокую эф-

фективность, ковалентное закрепление на поверхности силикагеля также позволило обеспечить фиксированную конформацию полирамодификатора и исключить возможность десорбции функционального слоя, что в итоге привело и к улучшению эксплуатационных характеристик неподвижной фазы. Стоит отметить, что использование 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера для закрепления полимеров также обеспечило пространственное удаление полимерного анионообменного слоя от активной поверхности силикагеля, что позволило снизить ее влияние на удерживание анионов. В результате полученные анионообменники с привитым ПЭИ имели высокую стабильность, эффективность до 70000 тт/м и высокую селективность, что позволило определять до 12 органических и неорганических анионов за 20 мин.

Создание высокоэффективных сорбентов на основе силикагеля с привитым ПЭИ стало отправной точкой для развития метода ГИХ в лаборатории, а предложенный подход к синтезу предопределил дальнейшее направление исследований и разработок в этой области.

Сорбенты для гидрофильной хроматографии. Среди простых и доступных неподвижных фаз для ГИХ распространены немодифицированный силикагель и аминопропилсиликагель. Недостатком таких сорбентов является затрудненный массоперенос определяемых компонентов в порах матрицы, что выражается в виде несимметричных пиков на хроматограмме. Отсюда следует и другой недостаток — длительное время уравнивания таких неподвижных фаз при смене состава элюента (часто более 40 мин), что особенно критично при использовании градиентного элюирования, необходимого при разделении сложных смесей. Известно, что модифицированные сорбенты на основе силикагеля с пространственно удаленными функциональными группами (ФГ) обладают преимуществами перед немодифицированным силикагелем или аминопропилсиликагелем, обеспечивая быстрое уравнивание после использования градиентного элюирования (в ряде случаев это 10–15 мин по сравнению с 40 мин и более для немодифицированного силикагеля) и, как следствие, более стабильные времена удерживания и симметричные пики. Другим преимуществом является возможность легкого варьирования ФГ на поверхности неподвижной фазы путем варьирования структуры спейсеров и/или аминов, полиаминов и других фрагментов, что может обеспечить большую селективность и эффективность разделения определяемых компонентов.

В связи с этим полученные в лаборатории хроматографии анионообменники для ИХ на основе силикагеля с пространственно удаленным с помощью 1,4-БДДГЭ слоем ПЭИ, обеспечиваю-

щим положительный заряд поверхности за счет аминогрупп разной степени замещенности и эффективное экранирование отрицательно заряженной силикагелевой матрицы, также представлялись перспективными неподвижными фазами для работы в режиме ГИХ. Для обеспечения наилучшей эффективности таких фаз сотрудники лаборатории варьировали толщину слоя ПЭИ, синтезируя серию из 6 сорбентов с соотношением матрица : полимер от 1 : 0.001 до 1 : 1 [8]. В качестве модельных объектов использовали сахара как нейтральные аналиты, цвиттер-ионные соединения — аминокислоты, а также водорастворимые витамины, обладающие разнообразием физико-химических свойств и структур. Для витаминов и аминокислот установлено, что оптимальные показатели эффективности колонки (до 40000 тт/м), асимметрии пиков и экспрессности разделения достигаются на неподвижной фазе с тонким слоем ПЭИ (1 : 0.01), что согласуется с теорией об ускорении массопереноса в тонком функциональном слое сорбента. Для нейтральных молекул — углеводов — характеристики разделения не изменялись при варьировании толщины слоя ПЭИ, что согласуется с распределительным механизмом их удерживания в тонком приповерхностном слое воды на поверхности неподвижной фазы в режиме ГИХ.

Для работы в режиме ГИХ также успешно был применен промежуточный продукт синтеза, содержащий диольные группы, который получили после стадии модифицирования аминопропилсиликагеля 1,4-БДДГЭ. Сравнение сорбентов с привитым 1,4-БДДГЭ и с закрепленным через спейсер ПЭИ с коммерческими аналогами показало, что разработанные сорбенты не уступают коммерческому по эффективности, а также превосходят их по селективности и экспрессности анализа. Так, на сорбенте, модифицированном ПЭИ, разделение семи аминокислот (фенилаланин, метионин, тирозин, гидроксипролин, аспарагин, аланин, серин) до базовой линии реализуется менее чем за 9 мин по сравнению с 65 мин, необходимыми для разделения этой смеси аминокислот на колонке УМС Polyamine II (УМС, Япония), также содержащей ПЭИ в структуре сорбента (рис. 1).

При разделении аминокислот на сорбентах с диольными группами сравнили сорбент, модифицированный 1,4-БДДГЭ, с диольной фазой Luna HILIC (Phenomenex, США). Как видно из рис. 2, полученный в лаборатории сорбент демонстрирует хорошую селективность при разделении семи аминокислот, в то время как Luna HILIC позволяет разделить только четыре аминокислоты: триптофан, тирозин, гидроксипролин и аспарагин.

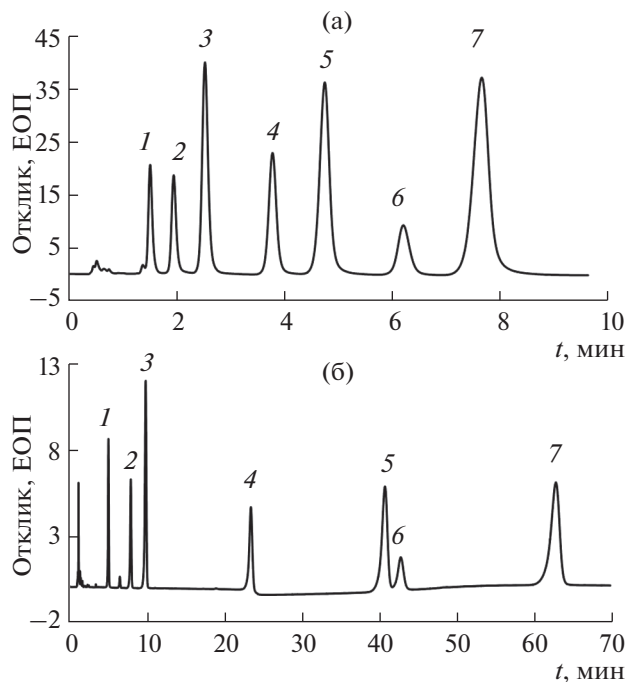


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси аминокислот на сорбентах с поверхностным слоем ПЭИ при элюировании подвижной фазой, содержащей 20 об. % 2 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6.5 и 80 об. % ацетонитрила: (а) — колонка с сорбентом, разработанным в лаборатории хроматографии (100 × 3 мм), расход подвижной фазы 1.0 мл/мин; (б) — колонка YMC Polyamine II (250 × 4.6 мм) (YMC, Япония), расход подвижной фазы 2.0 мл/мин. Длина волны детектора 210 нм: 1 — фенилаланин, 2 — метионин, 3 — тирозин, 4 — гидроксипролин, 5 — аспарагин, 6 — аланин, 7 — серин.

Разработанные неподвижные фазы перспективны и для определения полярных соединений других классов — сахаров и водорастворимых витаминов. Так, показана возможность определения шести витаминов менее чем за 7 мин в градиентном режиме элюирования, при этом для уравнивания колонки между анализами оказалось достаточно 10 мин. Это достигается за счет пространственного удаления функциональных групп от поверхности силикагелевой матрицы и является существенным преимуществом для гидрофильных сорбентов, обычно характеризующихся более длительным временем уравнивания (более 30 мин для аминопропилсиликагеля). Сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза и мальтоза) могут быть разделены менее чем за 6 мин, при этом эффективность составляет до 50000 тт/м.

Полученные уже на начальном этапе работ по ГИХ результаты показали перспективность применения разработанных сорбентов и предложенных методов модифицирования силикагелевых матриц для определения полярных веществ. Создание сорбентов для ГИХ стало одним из важ-

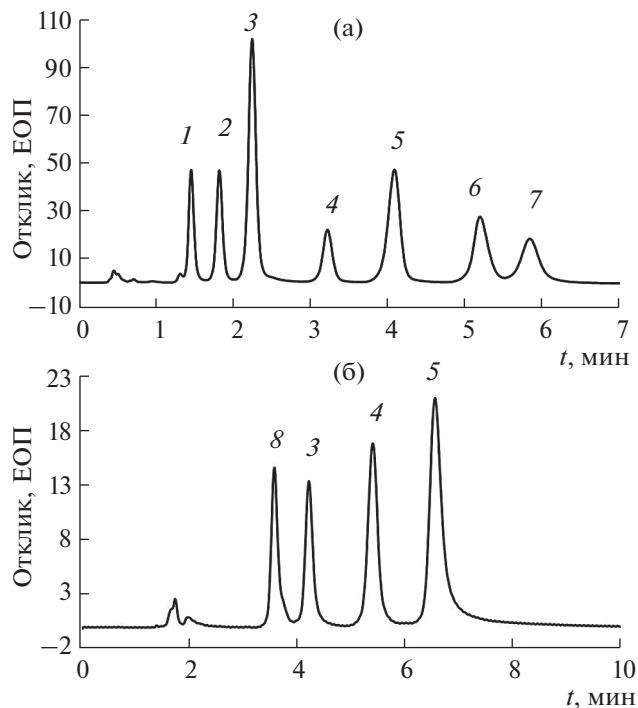


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси аминокислот на сорбентах с поверхностными диольными группами при элюировании подвижной фазой, содержащей 20 об. % 2 мМ фосфатного буферного раствора с pH 6.5 и 80 об. % ацетонитрила: (а) — колонка с сорбентом с привитым 1,4-БДГЭ (100 × 3 мм), расход подвижной фазы 1.0 мл/мин; (б) — колонка Luna HILIC (150 × 4.6 мм) (Phenomenex, США), расход подвижной фазы 1.5 мл/мин. Длина волны детектора 210 нм: 1 — фенилаланин, 2 — метионин, 3 — тирозин, 4 — гидроксипролин, 5 — аспарагин, 6 — аланин, 7 — серин, 8 — триптофан.

нейших направлений работ коллектива лаборатории хроматографии. Текущие исследования в этой области направлены на разработку методов конструирования новых функциональных слоев для повышения селективности сорбентов, а также на использование альтернативных силикагелю более стабильных матриц, таких как полистирол-дивинилбензол (ПС-ДВБ) и другие неорганические оксиды, позволяющих работать в более широком диапазоне pH.

СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ

Выбор способа введения аминокруппы в полимерный каркас. Сорбенты на основе силикагеля из-за ограничений стабильности матрицы в диапазоне pH 2–8 невозможно использовать в наиболее чувствительном варианте ИХ с подавлением фоновой электропроводности и кондуктометрическим детектированием. Сделана попытка получения ПЭ-сорбентов на основе полимер-

ной матрицы путем обработки сульфированного ПС-ДВБ различными полимерами, и исследовано влияние строения полимера-модификатора на селективность сорбента [9]. Полученные сорбенты использованы для работы в режиме ИХ с подавлением, однако селективность анионообменников ограничена разделением пяти неорганических анионов. Кроме того, отмечено, что функциональный слой, электростатически закрепленный на поверхности матрицы, может легко изменять свою конформацию в процессе эксплуатации, что может также приводить к снижению ионообменной емкости и, как следствие, к ухудшению селективности.

С целью повышения стабильности привитого слоя сорбентов для ИХ в последние 10 лет исследования лаборатории были сфокусированы на получении ковалентно модифицированных анионообменников на основе ПС-ДВБ с высокой степенью сшивки. Первые работы в этом направлении были посвящены поиску способов введения аминогруппы в полимерный каркас, которые позволили бы избежать дополнительной сшивки сополимера в процессе синтеза, побочных реакций, а также обеспечить бы оптимальное расположение функционального слоя относительно поверхности. В дальнейшем исследование связи между структурой функционального слоя и хроматографическими характеристиками получаемых анионообменников позволило усовершенствовать подходы к химическому модифицированию и значительно повысить селективность и эффективность получаемых в лаборатории сорбентов.

В первых экспериментах лаборатории по хлорметилированию полимерных матриц попытались заменить высокотоксичный хлорметиловый эфир, для чего использовали хлористый тионил и водный раствор формальдегида, при этом в качестве катализатора выбрали хлорсульфоновую кислоту. Полученный продукт обрабатывали аминами различной структуры, такими как триметиламин, триэтиламин, трипропиламин, пиридин, N,N-диэтилэтанолламин, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, N,N,N',N'-тетраметилдиаминометан, N,N-диметилгидразин [10]. Исследование полученных анионообменников позволило авторам оценить влияние структуры третичного амина на свойства анионообменников и сделать вывод, что повышение гидрофильности функциональной четвертичной аммониевой группы приводит к росту эффективности сорбента. Анионообменник, модифицированный N,N-диметилгидразином, показал наилучшую селективность и эффективность, что позволило разделить 4 неорганических аниона. Однако метод хлорметилирования имеет ряд недостатков, к которым относятся высокая вероятность протекания побочных реакций и сшивок полимерных цепей, а также низкая по-

движность ФГ, приводящая к ограничению ее доступности реагентам и растворителям.

В качестве альтернативы хлорметилированию для получения анионообменников на полимерной был опробован метод нитрования с последующим восстановлением нитрогрупп и алкилированием иодистым метилом [11]. Однако введенная таким образом четвертичная аммониевая группа также обладала низкой подвижностью, для повышения которой предложен способ пространственного удаления функциональной группы от поверхности матрицы с помощью спейсера. Так, сополимер с восстановленными аминогруппами обрабатывали 1,6-дибромгексаном с последующим аминированием концевого атома брома триметиламином. Действительно, удаление функциональной группы позволило повысить эффективность и селективность анионообменника и разделить 5 неорганических анионов с эффективностью по неполяризуемому фосфат-иону до 20000 тт/м. Данный подход открыл возможность варьирования длины алкильного спейсера за счет использования различных дигалогеналканов, однако основным недостатком метода нитрования оказалось наличие остаточных нитрогрупп на поверхности из-за их неполного восстановления, что приводило к дополнительным неионообменным взаимодействиям поляризуемых анионов с поверхностью и снижению эффективности сорбентов по нитрат- и бромид-ионам.

В отличие от хлорметилирования и нитрования, метод ацилирования по Фриделю–Крафтсу позволяет получать сорбенты с пространственно удаленной ФГ без использования дополнительного алкилирования дигалогеналканами. Этот подход в варианте ацилировании матрицы ω -галогенацилхлоридами с последующим аминированием третичным амином описан в работе [12]. Получены сорбенты, содержащие спейсеры с тремя, четырьмя и пятью атомами углерода. Установлено, что при увеличении длины цепочки между ФГ и ядром анионообменника повышается селективность сорбентов, а также улучшается симметрия пиков. Наибольшей эффективностью обладал анионообменник, полученный при модифицировании матрицы 5-хлорвалероилхлоридом и содержащий спейсер с пятью атомами углерода.

Ацилирование ПС-ДВБ ω -галогенацилхлоридами с последующим аминированием первичным амином и кватернизацией полученных вторичных аминогрупп эпихлоргидрином или глицидом предложено в работе [13]. Анионообменник с двумя дигидроксиалкильными заместителями у четвертичной аммониевой группы, закрепленной на поверхности матрицы с помощью ацильного спейсера с пятью атомами углерода в цепи, обеспечивал разделение 6 неорганических анионов за

20 мин с использованием карбонатного буферного раствора в качестве элюента. Несмотря на то, что данный сорбент превосходил по эффективности анионообменники с более короткими спейсерами, его эффективность по поляризуемым анионам не превышала 10000 тт/м, что, наряду с возможностью протекания побочных реакций, оказалось существенным недостатком метода ацилирования с использованием ω -галогенацилхлоридов.

В наших дальнейших исследованиях для химического модифицирования полимерных матриц использовали метод ацилирования уксусным ангидридом, который позволяет избежать протекания побочных реакций, а разработка подходов последующего модифицирования, включающих пространственное удаление ФГ и ее гидрофилизацию, а также создание разветвленного слоя, помогает повысить селективность и эффективность сорбентов.

Выбор структуры функционального слоя. Разработка методики модифицирования [14] включала ацилирование полимерной матрицы уксусным ангидридом и последующее восстановительное аминирование карбонильной группы. При использовании гидрохлорида диметиламина и цианоборгидрида натрия в качестве реагентов на стадии аминирования образуются третичные аминогруппы, а в случае использования муравьиной кислоты и формамида на поверхности полимера получали первичные аминогруппы. Воспроизводимость и выход синтеза при использовании первого подхода значительно выше. Кватернизация первичных и третичных аминогрупп на третьей стадии иодистым метилом обеспечила получение сильноосновных анионообменников, характеризующихся невысокой эффективностью по поляризуемым анионам (не более 3000 тт/м для нитрата) и позволяющих разделять не более 5 неорганических анионов. Тем не менее, данный подход открыл широкие возможности для варьирования структуры и гидрофильности ФГ за счет использования других галоген- и дигалогеналканов, а также более гидрофильных соединений, например моноэпоксидов. Так, в работе [15] продемонстрирована перспективность гидрофизации функциональной группы за счет алкилирования эпихлоргидрином третичных аминогрупп, полученных в результате ацилирования матрицы уксусным ангидридом с последующим восстановительным аминированием гидрохлоридом диметиламина. Полученный таким образом сорбент позволил разделить 7 стандартных неорганических анионов при использовании раствора гидрокарбоната натрия в качестве элюента, при этом эффективность по поляризуемому нитрат-иону в 4 раза превосходила значения эффективности для анионообменника, кватернизованного метилиодидом.

Авторы работы [16] расширили круг модификаторов для аминогруппы и помимо метилиодида и эпихлоргидрина использовали также 1,3-дибромпропан и глицидол, в результате чего получили набор анионообменников с ФГ различной гидрофильности. Показано, что увеличение поляриности ФГ приводит к существенному снижению неионообменных взаимодействий поляризуемых анионов с полимерной матрицей. Кроме того, при увеличении количества гидроксильных групп в алкильном заместителе при атоме азота возрастала селективность и эффективность сорбента, а также улучшалась симметрия пиков.

Перспективность увеличения числа дигидроксисилкисильных заместителей в ФГ обусловила замену диметиламина на метиламин в реакции восстановительного аминирования [17], что позволило получать вторичные аминогруппы на поверхности полимерной матрицы. Последующее алкилирование эпихлоргидрином привело к получению четвертичной аммониевой группы с двумя 2,3-дигидроксипропильными заместителями. Благодаря повышенной гидрофильности ФГ такой сорбент показал лучшую эффективность и симметрию пиков поляризуемых анионов по сравнению с анионообменниками, полученными в работе [16].

Установлено, что хроматографические характеристики анионообменника можно улучшить не только путем изменения гидрофильности ФГ, но и за счет ее пространственного удаления от ядра сорбента. Так, в работе [18] сначала алкилировали эпихлоргидрином вторичные аминогруппы на поверхности ПС-ДВБ, а затем проводили аминирование диметиламином и последующую кватернизацию концевых аминогрупп эпихлоргидрином. В такой схеме эпихлоргидрин выступал и в качестве спейсера для пространственного удаления ФГ, и в качестве гидрофильного заместителя у концевого атома азота. Полученные анионообменники позволили разделить смесь стандартных неорганических анионов и формиата при использовании карбонатного элюента, а также показали высокую эффективность (более 62000 тт/м) по фосфату. Однако эффективность сорбентов по поляризуемым анионам не превышала 20000 тт/м, что авторы объяснили наличием неионообменных взаимодействий этих анионов с гидрофобной матрицей, обусловленных ее недостаточным экранированием функциональным слоем.

Дальнейшие исследования лаборатории были посвящены разработке методов синтеза, обеспечивающих лучшее экранирование гидрофобной поверхности матрицы с одновременным удалением ФГ от ее поверхности с помощью спейсеров. В работе [19] описано образование ковалентно привитого разветвленного функционального слоя на поверхности ПС-ДВБ с

пространственно удаленными ФГ и гидрофильным спейсером за счет использования хлорида глицидилтриметиламмония и хлорида (3-хлор-2-гидроксипропил)триметиламмония. Данные реагенты использовали для алкилирования вторичных аминогрупп, полученных в результате ацилирования ПС-ДВБ и последующего восстановительного аминирования, что привело к одновременному введению гидрофильного спейсера и ФГ, а также к созданию разветвленной структуры слоя. Такой подход позволил получить анионообменник, обладающий высокой эффективностью как по неполяризуемым, так и по поляризуемым анионам (53000 тт/м для хлорида и нитрита) и позволяющий разделять 7 стандартных анионов менее чем за 10 мин в градиентном режиме элюирования гидроксидом калия. Таким образом, создание гидрофильного разветвленного слоя с пространственно удаленными ФГ впервые позволило авторам получить химически модифицированные полимерные анионообменники, сравнимые по эффективности с описанными в литературе пелликулярными сорбентами.

В работе [19] впервые использованы диглицидиловые эфиры в качестве спейсеров для пространственного удаления ФГ и гидрофилизации линейного и разветвленного функционального слоя. Полимерную матрицу ацилировали искусственным ангидридом с последующим восстановительным аминированием гидрохлоридом метиламина или диметиламина, что привело к образованию вторичных или третичных аминогрупп соответственно. Затем проводили алкилирование 1,4-БДДГЭ или резорциндиглицидиловым эфиром (РДГЭ) и аминирование концевых эпоксидных колец с использованием триметиламина, при этом алкилирование третичных аминогрупп привело к образованию линейной структуры функционального слоя, а вторичных — к разветвленной структуре.

Установлено [19], что повышение разветвленности функционального слоя при сохранении структуры спейсера приводит к росту селективности и эффективности сорбентов. Так, анионообменник с 1,4-БДДГЭ в разветвленном функциональном слое имел высокие значения эффективности (55000 тт/м для хлорида) и обеспечивал разделение 7 анионов за 8 мин в изократическом режиме элюирования с использованием гидроксидного элюента (рис. 3).

В дальнейшем способ формирования на поверхности полимерной матрицы линейных и разветвленных функциональных слоев усовершенствовали за счет варьирования структуры ФГ. В работе [20] помимо триметиламина для раскрытия концевого эпоксидного кольца 1,4-БДДГЭ использовали диметилэтаноламин. Вполне закономерно, что сорбент, модифицированный более

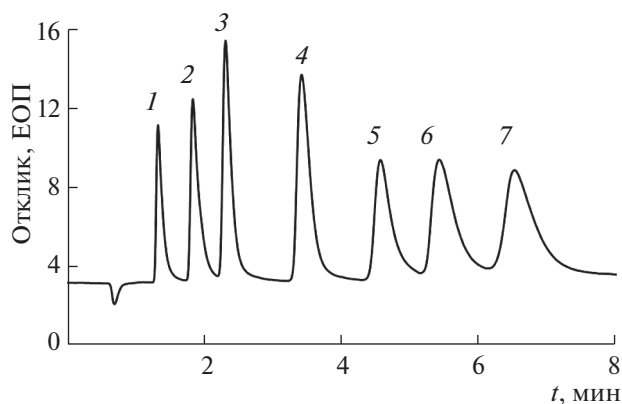


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси анионов на анионообменнике с разветвленным гидрофильным функциональным слоем при элюировании 40 мМ раствором КОН (расход подвижной фазы 0.5 мл/мин): 1 — фторид, 2 — формиат, 3 — хлорид, 4 — нитрит, 5 — бромид, 6 — сульфат, 7 — нитрат [19].

гидрофильным диметилэтаноламином, показал лучшую симметрию пиков и эффективность. Для анионообменников с линейной структурой функционального слоя значения эффективности различаются незначительно, в то время как сорбент с разветвленной структурой и с более гидрофильной ФГ по эффективности превосходил анионообменник с триметиламмониевой функциональной группой более чем в 2 раза, что можно объяснить лучшим экранированием матрицы разветвленным гидрофильным функциональным слоем. Семь стандартных анионов разделены на анионообменнике с разветвленным функциональным слоем и диметилэтаноламмониевой ФГ за 16 мин в изократическом режиме и за 9 мин в градиентном режиме с использованием гидроксидного элюента.

В последующих исследованиях структуру функционального слоя варьировали уже не только за счет выбора амина, но и за счет использования различных диглицидиловых эфиров. В работе [21] описано получение восьми анионообменников с разветвленной структурой функционального слоя различной гидрофильности за счет использования РДГЭ и 1,4-БДДГЭ в качестве спейсеров и четырех аминов для раскрытия концевых эпоксидных колец (триметиламин, диметилэтаноламин, метилдиэтаноламин и триэтаноламин). Тестирование полученных анионообменников с использованием гидроксидного элюента выявило снижение селективности по поляризуемым анионам при увеличении гидрофильности ФГ, что особенно ярко проявляется в случае сорбентов с 1,4-БДДГЭ в качестве спейсера. На анионообменниках с более гибким и гидрофильным спейсером 1,4-БДДГЭ наблюдали меньшие факторы удерживания для большинства аналитов по сравнению с сорбентами с РДГЭ, имеющими ту же концевую ФГ. Для ани-

анонообменников с 1,4-БДДГЭ также получены более высокие значения эффективности и более симметричные пики поляризуемых анионов. Так, для сорбентов с 1,4-БДДГЭ, модифицированных диметилэтаноламином и метилдиэтаноламином, эффективность по поляризуемым нитрату и бромиду достигала 49 000 и 53 000 тт/м соответственно, что почти в 2 раза выше значений эффективности для анионообменников, модифицированных РДГЭ. Смесь 7 стандартных неорганических анионов и формиата разделена в градиентном режиме элюирования за 12 мин на анионообменниках, модифицированных 1,4-БДДГЭ и за 18 мин на сорбентах с РДГЭ.

Таким образом, экспериментально установлено, что введение гидрофильного спейсера и объемных гидрофильных заместителей у концевых атома азота, а также создание разветвленного функционального слоя с пространственно удаленными от поверхности ФГ приводят к значительному повышению эффективности химически модифицированных сорбентов на основе ПС-ДВБ, при этом эффективность таких неподвижных фаз сравнима с эффективностью большинства коммерчески доступных анионообменников. Тем не менее, использование такого подхода не позволило значительно повысить селективность сорбентов и разделять многокомпонентные смеси, содержащие наряду со стандартными неорганическими анионами широкий спектр органических кислот.

Формирование ковалентно привитого гиперразветвленного функционального слоя. Поскольку в работах [19–21] показано, что повышение степени разветвленности ионообменного слоя позволяет существенно повысить эффективность сорбентов, исследования в этом направлении были продолжены. Известно, что одними из наиболее селективных и эффективных в настоящее время анионообменников являются гиперразветвленные сорбенты, получаемые путем пошагового наращивания функционального слоя за счет повторения стадий алкилирования диглицидиловым эфиром и аминирования первичным амином. В коммерческих колонках такие анионообменники получены путем электростатического закрепления гиперразветвленного функционального слоя на поверхности сульфированной полимерной матрицы. В работах, выполненных в лаборатории хроматографии, впервые предложено ковалентное закрепление таких слоев на поверхности ПС-ДВБ для повышения стабильности получаемых сорбентов.

В работе [22] гиперразветвленный слой формировали на предварительно аминированной матрице, содержащей вторичные аминогруппы, путем последовательного чередования реакций алкилирования 1,4-БДДГЭ и аминирования ме-

тиламином. В результате получены анионообменники с тремя, четырьмя и пятью циклами модифицирования, позволяющие разделять до 9 анионов, включая стандартные неорганические анионы, формиат и пропионат или бромат, при использовании карбонатных и гидроксидных элюентов. Авторы отметили вероятность появления сшивок соседних цепей на каждом цикле модифицирования, начиная со второго, что ведет к повышению относительного удерживания поляризуемых анионов [22]. Показано, что увеличение числа циклов модифицирования с трех до четырех приводит к улучшению селективности анионообменников, в то время как дальнейшее модифицирование (до пяти циклов) позволяет лишь повысить емкость при незначительном изменении селективности. Тем не менее, использование только 1,4-БДДГЭ и метиламина при формировании гиперразветвленного функционального слоя не позволило существенно повысить селективность химически модифицированных сорбентов.

Кроме гиперразветвленных сорбентов с электростатически закрепленным функциональным слоем, одними из наиболее селективных анионообменников являются сорбенты с агломерированными латексами. Данные анионообменники представляют собой латексные частицы с четвертичными аммониевыми группами, электростатически закрепленными на поверхности матрицы, содержащей отрицательно заряженные сульфогруппы [1]. Наличие сульфогрупп как в латексных, так и в гиперразветвленных анионообменниках с электростатически закрепленным функциональным слоем, дает возможность дополнительно ограничивать диффузию аналита в поры сорбента и получать высокоэффективные и высокоселективные сорбенты. Однако введение отрицательно заряженных групп напрямую в случае химически модифицированных сорбентов не представляется возможным. В лаборатории хроматографии впервые предложено использовать глицин в качестве первичного амина для формирования гиперразветвленного слоя на поверхности полимера с целью ограничения диффузии анионов в поры сорбента [23]. Поскольку в щелочной среде элюента карбоксильные группы аминокислот заряжены отрицательно, авторы предположили, что введение таких групп во внутреннюю часть ионообменного слоя, ближе к поверхности матрицы, будет способствовать отталкиванию анионов и препятствовать их диффузии в поры частицы, а также снижать влияние матрицы на удерживание поляризуемых анионов.

Для оптимизации структуры функционального слоя, содержащего глицин, изучено [23] влияние положения глицина в гиперразветвленном функциональном слое, количества циклов модифицирования с глицином и общего числа циклов

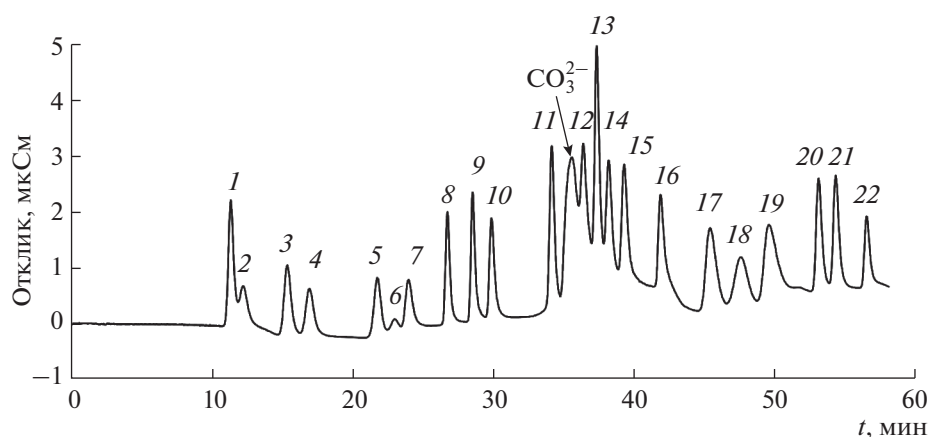


Рис. 4. Хроматограмма модельной смеси анионов на колонке с глицином в первом цикле модифицирования в режиме градиентного элюирования раствором КОН (расход подвижной фазы 1.0 мл/мин): 1 – фторид, 2 – хинат, 3 – гликолят, 4 – ацетат, 5 – формиат, 6 – галактуронат, 7 – пропионат, 8 – хлорит, 9 – хлорид, 10 – бромат, 11 – нитрит, 12 – сульфат, 13 – малонат, 14 – глутарат, 15 – бромид, 16 – фосфат, 17 – нитрат, 18 – фумарат, 19 – хлорат, 20 – цитрат, 21 – изоцитрат, 22 – *транс*-аконитат.

модифицирования на хроматографические свойства полученных гиперразветвленных анионообменников. Показано, что введение глицина в первом цикле модифицирования позволяет существенно повысить селективность, в особенности по слабоудерживаемым анионам, однако увеличение числа циклов с аминокислотой или ее удаление от поверхности матрицы приводит к обратному эффекту из-за слишком сильного отталкивания анионов от отрицательных групп в функциональном слое. Анионообменник, полученный в результате одного цикла модифицирования с глицином и четырех последующих с метиламином обладал наилучшей селективностью и при длине колонки 25 см позволил разделять до 22 анионов, включая стандартные неорганические анионы, одно- и многозарядные органические кислоты, оксигалогениды, а также некоторые другие многозарядные анионы (рис. 4). Полученные ковалентно привитые гиперразветвленные анионообменники показали высокую стабильность при работе в градиентном режиме безреагентной ИХ. Стоит отметить, что использование других классов соединений в качестве первичных аминов при формировании гиперразветвленного слоя оказалось весьма перспективным для управления селективностью анионообменников, и именно на это и направлены текущие исследования в лаборатории хроматографии.

В качестве альтернативы пошаговому формированию гиперразветвленного функционального слоя, экранирующего матрицу, коллектив лаборатории позднее предложил закрепление готового разветвленного полимера на поверхности полимерной частицы [24] для получения анионообменников, позволяющих работать с высокими концентрациями гидроксидного элюента. Пред-

варительно аминированную полимерную матрицу модифицировали 1,4-БДДГЭ, выступающим спейсером для дальнейшего закрепления разветвленного ПЭИ. Для кватернизации закрепленного ПЭИ использовали несколько реагентов, выполняющих различные функции. Так, глицидол позволил дополнительно гидрофилизовать функциональный слой, а 1,4-БДДГЭ, который также использовали для алкилирования ПЭИ, выступал в качестве сшивающего агента. В результате сорбент, кватернизованный глицидолом, позволил разделять до 16 анионов, включая слабо- и сильноудерживаемые поляризуемые анионы, за 26 мин в градиентном режиме элюирования.

Следует отметить, что анионообменник с привитым ПЭИ, сшитым 1,4-БДДГЭ, обладал лучшей селективностью к слабым органическим кислотам, что авторы связывали с меньшей степенью гидратации функционального слоя и, как следствие, повышенным сродством однозарядных анионов к нему [24]. Однако по этой же причине данный сорбент, в отличие от анионообменника, кватернизованного глицидолом, не обеспечивал возможности элюировать сильнополяризуемые иодид- и роданид-ионы за приемлемое время даже при использовании высоких концентраций гидроксидного элюента. Таким образом, использование различных алкилирующих агентов открыло возможности для управления селективностью получаемых анионообменников. Полученные анионообменники могут быть использованы как с карбонатными, так и с гидроксидными элюентами, характеризуются селективностью и эффективностью, не уступающей коммерческим сорбентам с привитым полимерным слоем, а также

демонстрируют высокую стабильность в процессе эксплуатации.

* * *

Таким образом, за последние десять лет коллективу лаборатории хроматографии химического факультета МГУ удалось значительно усовершенствовать известные подходы для получения ковалентно привитых сорбентов на основе полимерных и неорганических матриц для ИХ и ГИХ, а также предложить принципиально новые способы формирования функциональных ионообменных слоев для обеспечения высочайшей селективности и эффективности анионообменников. Можно утверждать, что накопленный коллективом лаборатории опыт в области разработки неподвижных фаз для ИХ и ГИХ позволил получать химически модифицированные сорбенты, сравнимые с наиболее селективными на настоящий момент коммерческими сорбентами, полученными с использованием других подходов к модифицированию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: a review // *Anal. Chim. Acta.* 2016. V. 904. P. 33.
2. *Затираха А.В., Ужель А.С., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Методы получения высокоэффективных неподвижных фаз для анионообменной хроматографии // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2018. Т. 59. № 1. С. 3. (*Zatirakha A.V., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Methods for preparing high performance stationary phases for anion-exchange chromatography // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2018. V. 72. № 6. P. 289.)
3. *Krokhin O.V., Smolenkov A.D., Svintsova N.V., Obrezkov O.N., Shpigun O.A.* Modified silica as a stationary phase for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 706. P. 93.
4. *Pirogov A.V., Svintsova N.V., Kuzina O.V., Krokhin O.V., Platonov M.M., Shpigun O.A.* Silicas modified by polyelectrolyte complexes for the ion chromatography of anionic complexes of transition metals // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. V. 361. P. 288.
5. *Лошин А.А., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Хроматографическое поведение анионов на полиэлектролитных сорбентах на основе силикагеля // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. № 56. С. 12. (*Loshin A.A., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Chromatographic behavior of anions on polyelectrolyte sorbents based on silica-gel // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2014. V. 70. P. 9.)
6. *Лошин А.А., Глазков Е.С., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Хроматографические свойства анионообменников на основе силикагеля, поверхностно модифицированных полиэтиленимином // *Сорбц. и хроматогр. процессы.* 2015. Т. 15. № 3. С. 390.
7. *Лошин А.А., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Новый анионообменный сорбент для ионной хроматографии на основе ковалентно модифицированного аминированного силикагеля // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2014. № 55. С. 327. (*Loshin A.A., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* A novel covalently modified aminated silica-based anion exchanger for ion chromatography // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2014. V. 69. P. 245.)
8. *Chernobrovkina A.V., Zatirakha A.V., Sedov Y.R., Yandukin Y.A., Kovalenko I.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Revealing the trends in selectivity changes altering the functional layer of novel HILIC stationary phases / Abstract book of the 45th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques. Prague (Czech Republic). 17–22 June, 2017. P. 46.
9. *Касьянова Т.Н., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А.* Полиэлектролитные сорбенты для ионной хроматографии на основе полистирол-дивинилбензольной матрицы // *Сорбц. и хроматогр. процессы.* 2007. Т. 7. № 1. С. 52.
10. *Касьянова Т.Н., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А.* Синтез и сравнение хроматографических свойств полимерных анионообменников с диметилгидразиниевыми и алкиламмониевыми функциональными группами // *Журн. аналит. химии.* 2008. Т. 63. № 1. С. 47. (*Kasiyanova T.N., Smolenkov A.D., Pirogov A.V., Shpigun O.A.* Synthesis of polymeric anion exchangers bearing dimethylhydrazine and alkylammonium functional groups and comparison of their chromatographic properties // *J. Analyt. Chem.* 2008. V. 63. № 1. С. 41.)
11. *Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Синтез новых полимерных анионообменников с использованием реакции нитрования // *Сорбц. и хроматогр. процессы.* 2011. Т. 11. № 4. С. 473.
12. *Касьянова Т.Н., Смоленков А.Д., Пирогов А.В., Шпигун О.А.* Влияние ацилирующего агента на селективность анионообменников и эффективность разделения // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2007. Т. 48. № 5. С. 347. (*Kas'yanova T.N., Smolenkov A.D., Pirogov A.V., Shpigun O.A.* Effect of the acylating agent on the selectivity of anion-exchange resins and separation efficiency // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2007. V. 62. P. 1.)
13. *Кузнецова О.И., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Новые анионообменники на основе сополимера стирола и дивинилбензола с гидрофильными пространственно удаленными функциональными группами // *Сорбц. и хроматогр. процессы.* 2012. Т. 12. С. 940.
14. *Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Синтез и хроматографические свойства новых полимерных анионообменников // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2011. Т. 52. № 3. С. 194. (*Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Synthesis and chromatographic properties of new polymer-based anion exchangers // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2011. V. 66. P. 161.)

15. *Затираха А.В., Смоленков А.Д., Дьячков И.А., Шпигун О.А.* Влияние алкилирующего агента на селективность и эффективность новых полимерных анионообменников // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. Т. 52. № 5. С. 375. (*Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., D'yachkov I.A., Shpigun O.A.* The effect of alkylating agent on the efficiency and selectivity of new polymeric anion exchangers // Moscow Univ. Chem. Bull. 2011. V. 66. P. 309.)
16. *Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Влияние строения функциональной группы на свойства новых полистирол-дивинилбензольных анионообменников // Сорбц. и хроматогр. процессы. 2011. Т. 11. № 4. С. 235.
17. *Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Pirogov A.V., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Preparation and characterisation of anion exchangers with dihydroxy-containing alkyl substitutes in the quaternary ammonium functional groups // J. Chromatogr. A. 2014. V. 1323. P. 104.
18. *Шукина О.И., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Использование эпихлоргидрина для одновременного повышения гидрофильности и пространственного удаления функциональных групп анионообменников для ионной хроматографии // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2014. Т. 55. № 4. С. 219. (*Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Using epichlorohydrin for a simultaneous increase of functional group hydrophilicity and spatial separation from the matrix of anion exchangers for ion chromatography // Moscow Univ. Chem. Bull. 2014. V. 69. P. 168.)
19. *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Novel anion exchangers with spatially distant trimethylammonium groups in linear and branched hydrophilic functional layers // Chromatographia. 2015. V. 78. P. 147.
20. *Ужель А.С., Шукина О.И., Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.* Новые полимерные сорбенты с повышенной гидрофильностью для ионной хроматографии. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 1. С. 23. (*Uzhel A.S., Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* New polymeric sorbents with increased hydrophilicity for ionic chromatography // Moscow Univ. Chem. Bull. 2015. V. 70. P. 19.)
21. *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Novel anion exchangers with branched functional ion exchange layers of different hydrophilicity for ion chromatography // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1408. P. 78.
22. *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Shchukina O.I., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Covalently-bonded hyperbranched poly(styrene-divinylbenzene)-based anion exchangers for ion chromatography // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1470. P. 97.
23. *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Smirnov K.N., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Anion exchangers with negatively charged functionalities in hyperbranched ion-exchange layers for ion chromatography // J. Chromatogr. A. 2017. V. 1482. P. 57.
24. *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Novel polymer-based anion exchangers with covalently-bonded functional layers of quaternized polyethyleneimine for ion chromatography // Anal. Chim. Acta. 2017. V. 964. P. 187.