

УДК 543.544

НОВЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ, КОВАЛЕНТНО МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

А.С. Попов, Г.С. Максимов, А.Д. Смоленков, О.А. Шпигун,
А.В. Чернобровкина*

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии; *e-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru)

Получены новые неподвижные фазы на основе аминопропилсиликагеля, ковалентно модифицированного полиэтиленгликолем с различным массовым соотношением матрицы и полимера. Хроматографические свойства сорбентов изучены с помощью теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз (и на примере разделения модельных смесей сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов). Показано, что варьирование толщины слоя полиэтиленгликоля не только влияет на эффективность, но и позволяет управлять селективностью по полярным веществам в режиме гидрофильной хроматографии.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, синтез сорбентов, полиэтиленгликоль, сахара, аминокислоты, водорастворимые витамины.

Метод гидрофильной хроматографии (ГИХ), в настоящее время широко применяющийся для разделения полярных соединений, впервые был предложен в 1990 г. [1]. Как было установлено в том же году [2], выбор неподвижной фазы играет решающую роль в данном методе. В результате синтез новых сорбентов является востребованной и актуальной задачей [3].

Использование полимеров в синтезе новых сорбентов перспективно в целях получения неподвижных фаз для гидрофильной хроматографии, поскольку создание поверхностного полимерного функционального слоя может позволить экранировать матрицу сорбента и таким образом снизить ее влияние на удерживание аналитов. Такой подход даст возможность применять альтернативные традиционному силикагелю матрицы, превосходящие его по химической стабильности, но уступающие по гидрофильности.

Одним из подходящих полимеров для создания гидрофильного функционального слоя является полиэтиленгликоль (ПЭГ) – легко синтезируемый с заданной массой полимер с линейной архитектурой. Наличие в его структуре оксиэтиленовых групп, склонных к диполь-дипольным взаимодействиям и образованию водородных связей, а также гидрофобных этиленовых фрагментов обуславливает растворимость ПЭГ в воде и органических растворителях и применение модифицированных ПЭГ

сорбентов в режимах гидрофильной и обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ.

Традиционно сорбенты, модифицированные ПЭГ, применяют в основном для проведения ОФ ВЭЖХ. Однако результаты работы [4], где изучали удерживание фенолоксилов путем варьирования доли воды в составе подвижной фазы в диапазоне 0–100 об.% на различных кислородосодержащих неподвижных фазах (Discovery HS PEG, LiChrospher 100 DIOL, Luna HILIC и Purospher STAR) показали эффективность сорбентов, содержащих ПЭГ в функциональном слое, к разделению аналитов различной полярности. Рабочие границы режима гидрофильной хроматографии для колонки Discovery HS PEG составили до 20% водной доли в подвижной фазе. Впервые подход к разделению аналитов по их полярности на неподвижной фазе Discovery HS PEG, содержащей ПЭГ, был описан в [5] на примере разделения смеси фармацевтических субстанций (фенилэфрин, хлорфенамин, ацетаминофен, 4-аминофенол и хлорацетанилид) в режиме ГИХ с использованием 10% 20 мМ фосфатного буферного раствора (pH 7,0) и 90% ацетонитрила в качестве подвижной фазы. В дальнейшем это способствовало разработке ряда подходов к определению фармацевтических субстанций на сорбентах, содержащих ПЭГ, в том числе парацетамола [6, 7], кофеина [6, 8], пропифеназона [9, 10], а также токсичного 4-аминофенола [4, 11–13],

встречающегося в виде примеси вследствие частого применения в многостадийном синтезе. Большинство работ посвящено применению колонок Discovery HS PEG в режиме ОФ ВЭЖХ [6–12], где отмечена экспрессность анализа капсул парацетамола [6] и высокая эффективность (85 000 тт/м) при разделении парацетамола, кофеина, пропифеназона и их сопутствующих примесей в составе таблеток Валетол (Valetol) [7]. В работе [13] описано получение монолитного сорбента на основе ПЭГ. На колонке длиной всего 5,8 см с данным сорбентом авторы добились разделения 4-аминофенола, бензойной кислоты и 3-аминобензойной кислоты в режиме гидрофильной хроматографии при элюировании 10% 20 мМ аммонийно-форматного буферного раствора (рН 3,08) и 90% ацетонитрила, скорости потока 0,5 мл/мин и масс-селективном детектировании.

Отдельную проблему может представлять стабильность получаемых неподвижных фаз. В работе [14] получен сорбент, содержащий ПЭГ, который позволил осуществить чувствительное определение йода в морской воде, предел количественного определения в присутствии посторонних анионов составил 30 мкг/л. Однако из-за адсорбционного модифицирования полиэтиленгликолем срок эксплуатации такого сорбента не превышал двух недель. Переход к ковалентному модифицированию силикагеля полиэтиленгликолем позволил увеличить срок службы сорбента до 2 месяцев [15], при этом порядок элюирования анионов сохранялся с незначительным увеличением предела определения до 43 мкг/л.

Целью работы являлось получение новых сорбентов путем ковалентного закрепления ПЭГ на поверхности 3-аминопропилсиликагеля с различным массовым соотношением матрицы и полимера, установление их хроматографических характеристик в режиме гидрофильной хроматографии, а также оценка влияния толщины функционального слоя полиэтиленгликоля на их хроматографические свойства на примере объектов теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз и полярных веществ различных классов: сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы. В работе использовали *D*-(+)-рибозу, *D*-(+)-глюкозу, *D*-(+)-фруктозу, *D*-(+)-лактозы моногидрат, *D*-(+)-мальтозы моногидрат, *D*-(+)-сахарозу, *D*-(+)-ксилозу, рибофлавин, пиридоксина гидрохлорид, цианокобаламин, аскорбиновую кислоту, тиамин, аденозин, ура-

цил, теобромин, теофиллин, уридин, видарабина моногидрат, 5-метилуридин, 2'-деоксиуридин, *N,N,N*-триметилфенил-аммония хлорид, тозилат натрия (>98,0%, «ТСІ», Япония); *D,L*-фенилаланин, *D,L*-пролин, *D,L*-серин, *L*-изолейцин, *L*-лейцин, *L*-метионин, *L*-аспарагиновую кислоту, *L*-глутаминовую кислоту, *L*-гистидин, *L*-лизин, *L*-аргинин («х.ч.», «Serva», Германия); *L*-аспарагин, β-аланин, глицин («х.ч.», «Merck», Германия); *L*-глутамин, *L*-валин («х.ч.», «Reanal», Венгрия); никотинамид, кислоту никотиновую (>99%, «Sigma-Aldrich», США); толуол («х.ч.», «Компонент-Реактив», Россия), ацетонитрил («HPLCgradientgrade», «Panreac», Германия); кислоту уксусную ледяную (99,5%), кислоту ортофосфорную (85%), «х.ч.», хлорид калия, «ч.д.а.» («Panreac», Испания); этанол, «ч.д.а.», ацетат аммония, «ч.» («Лабтех», Россия); ацетон, «ч.д.а.», «ХимМед», Россия; 1,4-диоксан, «ч.д.а.», «Компонент-Реактив», Россия.

Для синтеза сорбентов использовали силикагель с привитыми аминопропильными радикалами Диасфер-110-Амин («БиоХиммак СТ», Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, *N* = 1,52; диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля, средняя молекулярная масса 500 г/моль («Sigma-Aldrich», США).

Эксперименты проводили с помощью системы ВЭЖХ, состоящей из хроматографа «Dionex 3000» с двухканальным градиентным насосом, автоматической системой ввода пробы, термостатом колонки и спектрофотометрическим детектором. Для регистрации хроматограмм использовали персональный компьютер и программный пакет Chromeleon 7 («Thermo Fisher Scientific», США). Для определения сахаров применяли систему ВЭЖХ, состоящую из изократического ВЭЖХ-насоса, шестиходового крана-дозатора и рефрактометрического детектора («Agilent Technologies», США). Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета ChemStation («Agilent Technologies», США).

Для проведения синтеза использовали следующее оборудование: термостат («Mettler», Германия), вакуумный насос серии «Laboport» («KNF Neuberger», Германия), механическую мешалку «Eurostar» («IKA-Werke», Германия). В работе использовали стальные колонки размером 100×3, заполнение которых осуществляли с помощью пневмонасоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия).

Синтез сорбентов и заполнение хроматографических колонок. Навеску 1,2 г аминопропилсиликагеля помещали в круглодонную колбу

объемом 100 мл, добавляли 0,72 г диглицидилового эфира полиэтиленгликоля, растворенного в 20 мл деионизованной воды (для получения сорбента С-0,6ПЭГ с массовым соотношением матрицы и полимера, равным 1,0:0,6) или 0,12 г ПЭГ для получения сорбента С-0,1ПЭГ (обозначение соответствует массовому соотношению матрицы и полимера, равному 1,0:0,1). Суспензию непрерывно перемешивали в течение 60 мин механической мешалкой при температуре 60 °С. Продукт отфильтровывали на стеклянном фильтре и промывали 100 мл воды, а затем сушили на воздухе. Хроматографические колонки заполняли суспензионным способом при давлении 250 бар, используя в качестве подвижной фазы ацетонитрил.

Схема синтеза представлена на рис. 1. Вторая концевая эпоксидная группа диглицидилового эфира с большой вероятностью также закрепляется на поверхностных аминогруппах силикагеля, таким образом полимерные молекулы оборачивают сферические частицы аминопропилсиликагеля.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе получены две неподвижные фазы, синтезированные с различным массовым отношением матрицы и полимера, на основе 3-аминопропилсиликагеля, ковалентно модифицированного диглицидиловым эфиром ПЭГ. Количество ПЭГ варьировали в целях формирования оптимального функционального слоя на поверхности силикагеля, обеспечивающего изменение его селективности и высокую эффективность полученного сорбента. Изучение хроматографических характеристик новых сорбентов проводили с помощью теста Танака для гидрофильных неподвижных фаз [16, 17] и на примере разделения модельных смесей сахаров, аминокислот и водорастворимых витаминов в режиме гидрофильной хроматографии.

Результаты теста Танака. С целью создать систему, позволяющую выбирать наиболее подходящий материал колонки для определения конкретных аналитов, проводят хроматографическое описание химических свойств колонок разного типа, в ходе которого определяют селективность материала колонки к тем или иным функциональным группам, ионным взаимодействиям, структурным особенностям. Наиболее информативно емкой процедурой является тест Танака для гидрофильных фаз [16] как способ характеристики сорбентов с позиции их применимости для разделения различных групп веществ, позволяющий количественно определить их склонность к участию во взаимодействиях той или иной природы.

В рамках теста Танака количественно оцениваются следующие параметры: $k(U)$ – фактор удерживания уридина, характеризует гидрофильность поверхности сорбента, $\alpha(CH_2)$ – селективность по отношению к метиленовой группе, $\alpha(OH)$ – селективность по отношению к гидроксильной группе, $\alpha(V/A)$ – способность к разделению пространственных изомеров, $\alpha(AX)$ – анионообменные свойства, $\alpha(CX)$ – катионообменные свойства, $\alpha(Tb/Tr)$ – кислотно-основные свойства. Результаты теста Танака для синтезированных неподвижных фаз приведены в табл. 1.

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что в результате ковалентного модифицирования полиэтиленгликолем гидрофильность полученных сорбентов, оцениваемая фактором удерживания уридина $k(U)$, увеличивается по сравнению с аминопропилсиликагелем, что свидетельствует об успешном модифицировании матрицы. Уменьшение параметра $k(U)$ при увеличении количества ПЭГ на поверхности матрицы может быть вызвано экранированием заряженных атомов азота у поверхности матрицы большим количеством привитого ПЭГ. Таким образом, толщина слоя

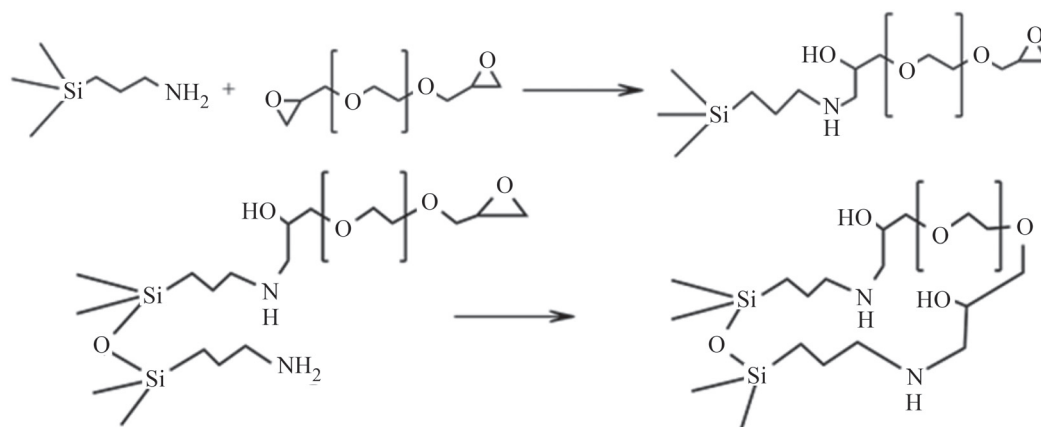


Рис. 1. Схема синтеза и предполагаемые структуры сорбентов С-ПЭГ

Т а б л и ц а 1

Результаты теста Танака

Селективность Параметр	Сорбент		
	Матрица	С-0,1ПЭГ	С-0,6ПЭГ
$k(U)$	1,94	2,88	2,44
$\alpha(CH_2)$	1,27	1,32	1,29
$\alpha(OH)$	1,94	1,87	1,87
$\alpha(V/A)$	1,23	1,37	1,39
$\alpha(AX)$	2,98	20,23	18,09
$\alpha(CX)$	1,12	0	0
$\alpha(Tb/Tr)$	0,82	0,64	0,60

Примечание. Элюент – 10% 20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (pH 4,7) / 90% ацетонитрил, скорость потока 0,5 мл/мин; УФ-детектирование, 254 нм.

модификатора может влиять на механизм удерживания и вклад различных типов взаимодействий, реализующихся на полученных сорбентах с разным соотношением матрицы и ПЭГ.

Для сорбентов и матрицы получены идентичные значения селективностей по отношению к метиленовым ($\alpha(CH_2)$) и гидроксильным группам ($\alpha(OH)$), отличные от единицы, прогнозирующие хорошую селективность по отношению к гомологам гидрофильной природы и не зависящие от толщины функционального слоя ПЭГ на поверхности неподвижной фазы. Стереоселективные свойства $\alpha(V/A)$ полученных сорбентов также не зависят от количества ПЭГ и выражены лучше, чем в случае немодифицированной матрицы.

Оба сорбента продемонстрировали высокую избирательность к анионообменным взаимодействиям $\alpha(AX)$ – на порядок выше таковой для матрицы, что является результатом доступности для анионного обмена замещенных атомов азота аминопропилсиликагеля, положительно заряженных в условиях эксплуатации. В то же время органический катион N,N,N-триметилфениламмония (ТМФА), удерживаемый матрицей ($\alpha(CX) = 1,12$), элюируется на новых сорбентах с мертвым объемом ($\alpha(CX) = 0$). Полученные величины обоих параметров могут быть обусловлены кватернизацией атомов азота при модифицировании и полной пространственной недоступностью диссоциированных силанольных групп матрицы ввиду экранирования ПЭГ. Таким образом, отсутствие катионообменной селективности полученных сорбентов свидетельствует об эффективном экранировании матрицы силикагеля ПЭГ, что позволяет трактовать увеличение количества ПЭГ как увели-

чение толщины его функционального слоя на поверхности сорбента. Величины показателя кислотно-основных свойств полученных сорбентов $\alpha(Tb/Tr) < 1$ и их снижение по сравнению с матрицей подтверждают увеличение степени замещения атомов азота аминопропилсиликагеля и основного характера фаз при модифицировании ПЭГ.

Для сорбента С-0,1ПЭГ отмечена более высокая эффективность по тестовым анализам и лучшая симметрия пиков (табл. 2) по сравнению с сорбентом С-0,6ПЭГ, что согласуется с кинетической теорией Ван-Деемтера и свидетельствует о меньшем сопротивлении массопереносу в тонком функциональном слое сорбента.

Углеводы. Углеводы представляют собой класс полярных нейтральных веществ и являются удобными модельными анализитами для изучения свойств и возможностей гидрофильных сорбентов с использованием рефрактометрического или испарительного детектора светорассеяния. В литературе часто описывают удерживание сахаров по распределительному механизму, т.е. их распределение в приповерхностном слое воды, адсорбированном на полярной неподвижной фазе. Однако адсорбционный механизм и образование водородных связей с ОН-группами тоже вносит существенный вклад. Авторы работы [18] показали, что образование водородных связей между молекулами сахаров и неподвижной фазой Click Maltose играет большую роль в удерживании веществ данного класса. Для определения углеводов в гидрофильном режиме используют подвижные фазы, состоящие из ацетонитрила и деионизованной воды (10–35 об.%) [19, 20]. Неудовлетворительная форма пиков восстанавли-

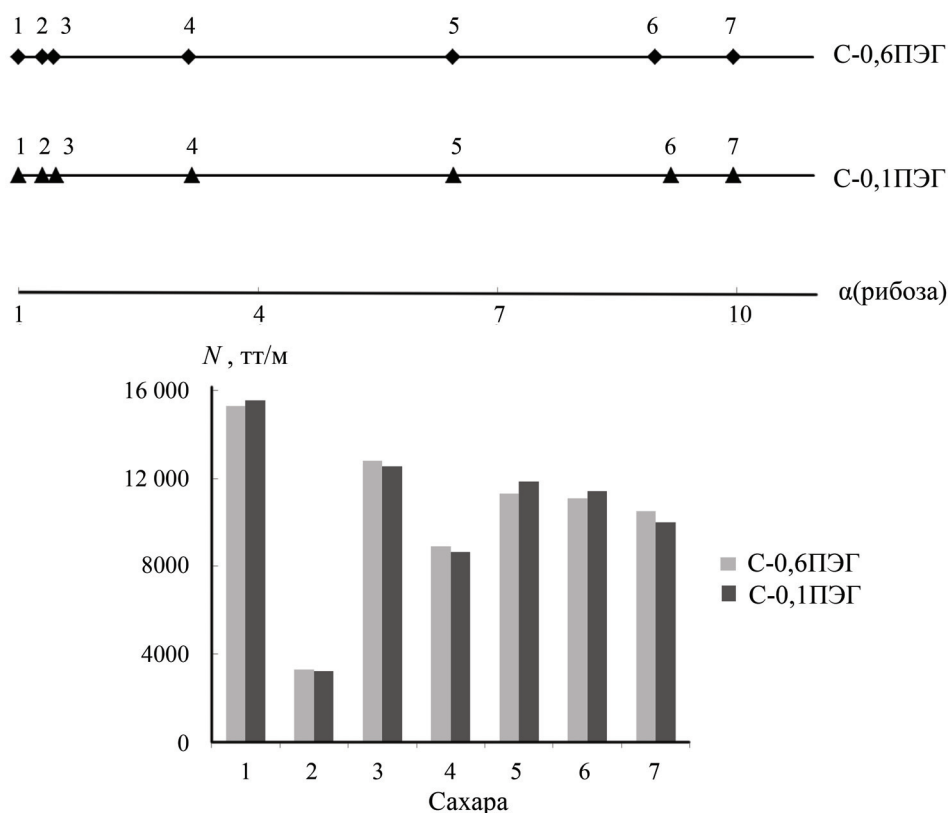


Рис. 2. Шкалы селективности относительно рибозы и диаграммы эффективности по сахарам (1 – рибоза, 2 – фруктоза, 3 – ксилоза, 4 – глюкоза, 5 – сахароза, 6 – мальтоза, 7 – лактоза). Подвижная фаза – деионизованная вода : ацетонитрил (15:85 об.%), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование

вающих сахаров может наблюдаться из-за разрешения их аномерных форм вследствие малой скорости мутаротации [21, 22].

Селективность и эффективность по сахарам для сорбентов с разным количеством ПЭГ представлены на рис. 2. Факторы удерживания углеводов в гидрофильном режиме коррелируют с числом гидроксильных групп в структуре аналита (k' (гексоз) > k' (пентоз)) и увеличиваются с уменьшением его параметра гидрофобности Ханша ($\log P$): рибоза (–2,66, Eriweb 4.1) < ксилоза (–2,21) < фруктоза (–1,78) < глюкоза (–3,12) < сахароза (–4,50) < мальтоза (–5,26) \approx лактоза (–5,26). В случае сорбентов, модифицированных ПЭГ, наблюдали обращенный порядок удерживания для пары ксилоза / фруктоза (k' (Xyl) > k' (Fru)), который соответствует увеличению гидрофильности (но не числа ОН-групп), что может свидетельствовать о большем вкладе распределительного механизма в удерживание сахаров на сорбентах с ПЭГ в функциональном слое. Отсутствие зависимости факторов удерживания, селективности и эффективности по сахарам от толщины полимерного слоя ПЭГ также свидетельствует о

реализации распределения низкомолекулярных углеводов в приповерхностном водном слое неподвижной фазы.

Разделение шести сахаров на сорбенте C-0,1PЭГ можно осуществить за 18 мин с использованием подвижной фазы состава вода : ацетонитрил при соотношении 12:88 об.% (рис. 3). При этом обеспечиваются полное разрешение пиков и эффективность до 15 000 тт/м.

Аминокислоты. В настоящее время определение аминокислот методом ГИХ обрело большую популярность благодаря возможности их селективного разделения без предварительной дериватизации даже при анализе объектов со сложной матрицей. Использование масс-селективного детектирования позволяет определять большое число аминокислот, в частности с помощью градиентного элюирования, например, 36 аминокислот в образце плазмы крови на колонке Acquinity VEN Amide column [23], 16 аминокислот в экстракте почвы с использованием колонки ZIC-HILIC [24], 23 аминокислоты в экстракте растений на колонке Poroshell 120 HILIC-Z [25]. В этих и подобных работах в качестве подвижной фазы используют ацетонитрил и 10–15 об.% фор-

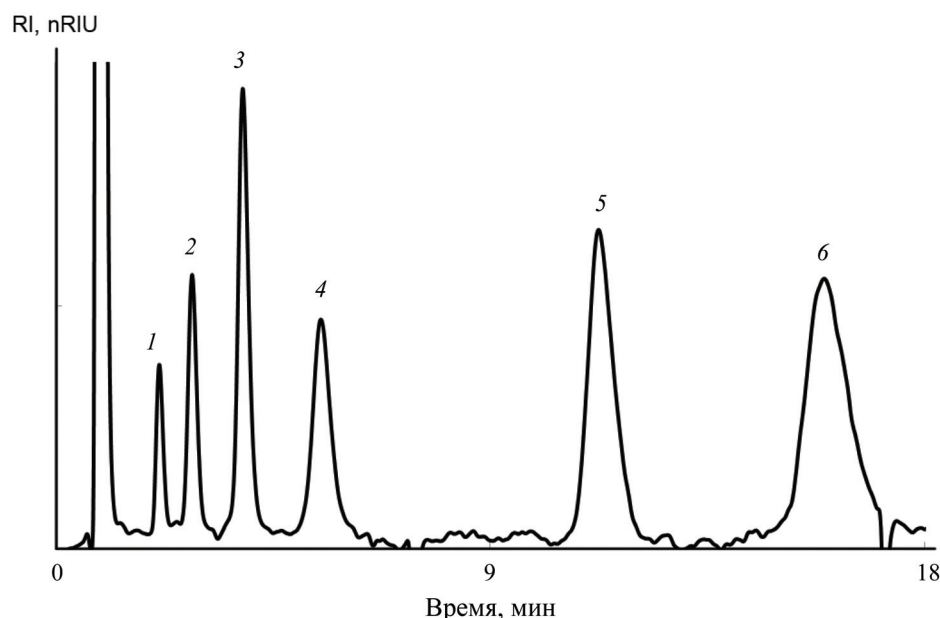


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси углеводов на сорбенте С-0,1ПЭГ (1 – рибоза, 2 – фруктоза, 3 – ксилоза, 4 – глюкоза, 5 – сахароза, 6 – лактоза). Подвижная фаза – деионизованная вода : ацетонитрил (15:85 об.%), скорость потока 1 мл/мин, рефрактометрическое детектирование

миатного буферного раствора. Однако, если высокая чувствительность не требуется, то можно использовать УФ-детектирование при длине волны 200 нм для ряда задач, например для анализа БАД на содержание аминокислот [26]. В качестве

подвижной фазы при УФ-детектировании следует использовать смесь ацетонитрила и фосфатного буферного раствора, рН которого выбирают в соответствии с зарядом неподвижной фазы, с небольшой концентрацией, обеспечивающей его

Т а б л и ц а 2

Хроматографические параметры определения аналитов теста Танака

Аналит теста Танака	С-0,1ПЭГ			С-0,6ПЭГ		
	<i>k</i>	N, тг/м	As	<i>k</i>	N, тг/м	As
Уридин	2,88	25000	1,20	2,44	20000	1,58
5-Метилуридин	2,18	23000	1,24	1,90	18000	1,57
2'-Деоксиуридин	1,54	21000	1,29	1,31	16000	1,57
Теобромин	0,49	16000	1,47	0,44	12000	1,59
Теофиллин	0,76	14000	1,47	0,73	12000	1,54
ТМФА	0	6000	1,12	0	7000	1,34
Урацил	1,08	15000	1,37	0,98	12000	1,63
Толуол	0	3000	2,02	0	2000	2,06
Аденозин	2,49	23000	1,21	2,44	17000	1,52
Видарабин	3,42	25000	1,17	3,38	18000	1,56
НПТС	21,89	2000	0,59	17,64	2000	0,66

П р и м е ч а н и е. Элюент – 10% 20 мМ ацетатно-аммонийного буферного раствора (рН 4,7) и 90% ацетонитрила; скорость потока 0,5 мл/мин; УФ-детектирование, 254 нм; НПТС – натрий *n*-толуолсульфонат.

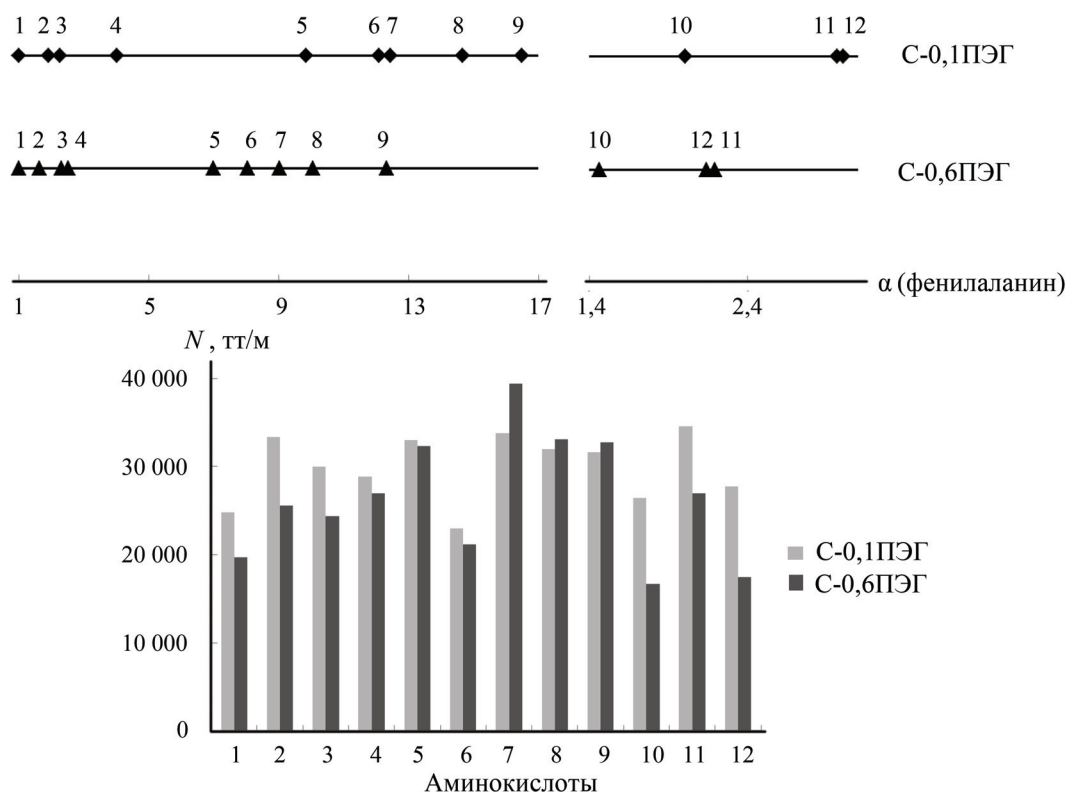


Рис. 4. Шкалы селективности относительно фенилаланина и диаграммы эффективности по аминокислотам (1 – фенилаланин, 2 – метионин, 3 – тирозин, 4 – пролин, 5 – аспарагин, 6 – гистидин, 7 – глицин, 8 – аланин, 9 – серин, 10 – изолейцин, 11 – валин, 12 – лейцин). Подвижная фаза – 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6,5) : ацетонитрил (15:85 об.%); скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 210 нм

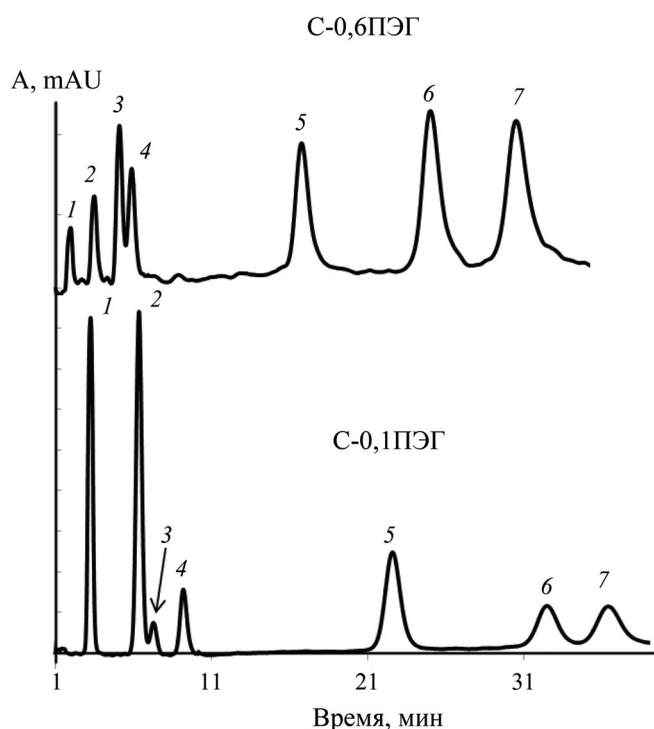


Рис. 5. Хроматограммы модельных смесей аминокислот (1 – фенилаланин, 2 – метионин, 3 – валин, 4 – тирозин, 5 – аспарагин, 6 – аланин, 7 – серин). Подвижная фаза – 5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6,5) : ацетонитрил (15:85 об.%); скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 254 нм

растворимость в водно-органическом элюенте. В работе [26] для разделения аминокислот на силикагеле использовали 12,5 мМ фосфатный буферный раствор (рН 2,8) с ацетонитрилом в соотношении 15:85 об. %.

Аминокислоты представляют собой класс полярных цвиттер-ионных соединений и служат хорошими модельными объектами для изучения свойств гидрофильных неподвижных фаз. В данной работе они использованы в качестве модельных объектов для установления характеристик полученных сорбентов и оценки влияния количества ПЭГ на разделение веществ цвиттер-ионного характера. В качестве подвижной фазы для разделения аминокислот использовали смесь ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (85:15 об. %), не поглощающего электромагнитного излучения при длине волны 210 нм, при которой проводили детектирование аминокислот. Использование буферного раствора с рН 6,5 обеспечивает суммарно нулевой заряд аминокислот, изоэлектрические точки которых находятся в интервале 5,5–6,5. В данных условиях наблюдаются большие факторы удерживания аминокислот и лучшая селективность по сравнению с таковыми при меньших значениях рН элюента, когда положительно заряженные аминокислоты могут

отталкиваться от положительно заряженных анионообменных центров – атомов азота в структуре синтезированных сорбентов. Хроматографические параметры разделения аминокислот приведены на рис. 4.

На представленных шкалах селективности показано, что изменение толщины полимерного слоя не влияет на порядок элюирования аминокислот, который согласуется с увеличением гидрофильности анализов. В целом для неподвижной фазы с меньшим количеством ПЭГ наблюдается лучшее удерживание, что подтверждается результатами теста Танака, согласно которым сорбент С-0,1ПЭГ обладает большей гидрофильностью. Несколько худшая селективность для пар метионин / тирозин и гистидин / глицин в сравнении с С-0,6ПЭГ может быть скомпенсирована более высокой эффективностью, а большие значения времени удерживания позволяют потенциально улучшить разрешение путем варьирования состава подвижной фазы. Большая эффективность для сорбента с меньшей толщиной полимерного слоя согласуется с кинетической теорией хроматографии, согласно которой размывание увеличивается с ростом толщины функционального слоя за счет сопротивления массопереносу. Представленные на рис. 5 хроматограммы по-

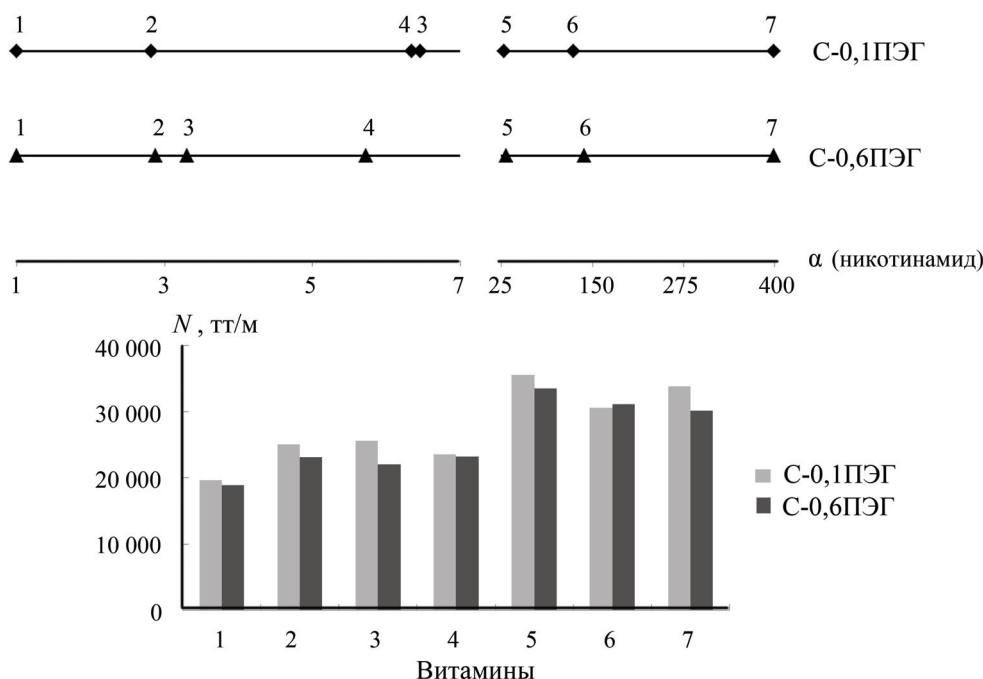


Рис. 6. Шкалы селективности относительно никотинамида и диаграммы эффективности по витаминам (1 – никотинамид (никотинамид), 2 – пиридоксин (В₆), 3 – тиамин (В₁), 4 – рибофлавин (В₂), 5 – никотиновая кислота (В₃), 6 – аскорбиновая кислота (С), 7 – цианокобаламин (В₁₂)). Подвижная фаза – 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (рН 5,8) : ацетонитрил (10:90 об. %); скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 270 нм

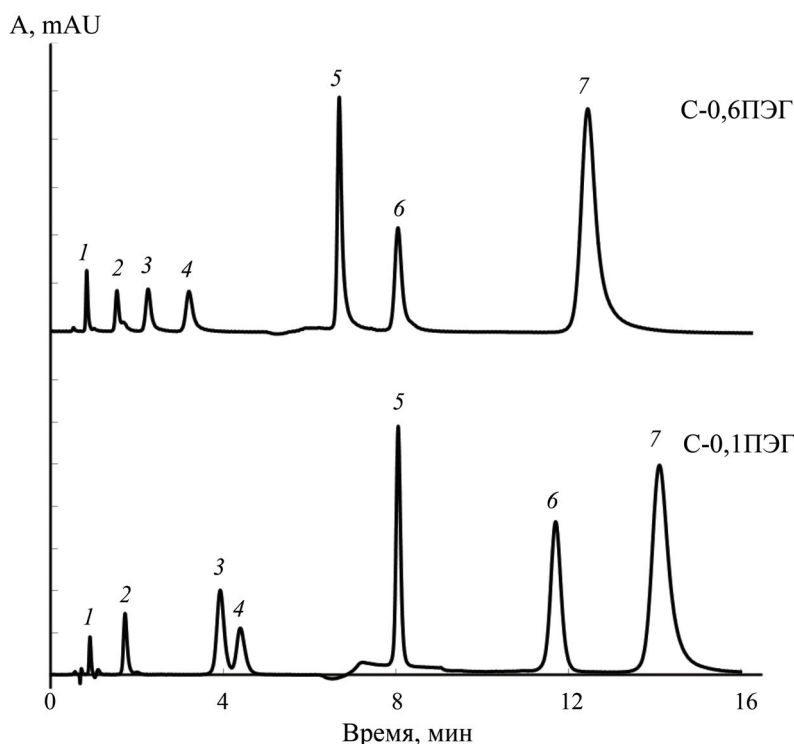


Рис. 7. Хроматограммы модельных смесей витаминов (1 – никотинамид, 2 – пиридоксин, 3 – тиамин, 4 – рибофлавин, 5 – никотиновая кислота, 6 – аскорбиновая кислота, 7 – цианокобаламин). Подвижная фаза – 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (рН 5,8): ацетонитрил; градиентный режим для С-0,6ПЭГ: 0–4 мин 8% буферного раствора, 4–5 мин 8–20% буферного раствора, 5–18 мин 20% буферного раствора; градиентный режим для С-0,1ПЭГ: 0–5 мин 8% буферного раствора, 5–6 мин 8–20% буферного раствора, 6–18 мин 20% буферного раствора; скорость потока 1 мл/мин, УФ-детектирование, 270 нм

казывают возможность определения аминокислот на полученных сорбентах. Разделение семи аминокислот достигается за 40 мин с эффективностью до 40 000 тт/м.

Водорастворимые витамины. Водорастворимые витамины обладают разнообразными физико-химическими свойствами и различаются по гидрофильности, что делает их удобными модельными анализитами для изучения свойств неподвижных фаз в режиме гидрофильной хроматографии. Их разделение успешно реализуется на сорбентах различной природы – диольных, аминированных и цвиттер-ионных [27–30]. Чаще всего в качестве подвижной фазы используют ацетатно-аммонийный буферный раствор с ацетонитрилом в градиентном режиме элюирования. Выбор буферного раствора обусловлен высокой растворимостью ацетата аммония в присутствии ацетонитрила.

Разделение семи водорастворимых витаминов на сорбентах, ковалентно модифицированных ПЭГ, проводили с использованием подвижной фазы следующего состава: 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (рН 5,8) и ацето-

нитрил (10:90 об.%). УФ-детектирование осуществляли при длине волны 270 нм.

Порядок элюирования витаминов (рис. 6) отличается от такового для силикагеля, в том числе из-за наличия в структуре сорбентов С-ПЭГ доступных анионообменных центров – положительно заряженных атомов азота, что подтверждают результаты теста Танака. Поэтому положительно заряженный тиамин имеет невысокие факторы удерживания, а никотиновая и аскорбиновая кислоты, имеющие диссоциировавшие в условиях определения карбоксильные группы, сильно удерживаются на сорбентах С-ПЭГ и элюируются только в градиентном режиме.

На приведенных шкалах селективности (рис. 6) показано, что синтезированные сорбенты демонстрируют одинаковый порядок элюирования и схожее время удерживания витаминов при 10% буферного раствора в подвижной фазе, за исключением тиамина В1. Вероятно, уменьшение гидрофильности при увеличении толщины слоя ПЭГ сорбента С-0,6ПЭГ оказывает наибольшее влияние на удерживание более гидрофильного среди рассмотренных

витаминов тиамин ($\log P = -4,8$), что согласуется с ранее описанными данными теста Танака. При этом селективность для пары тиамин / рибофлавин уменьшается. Факторы удерживания всех витаминов на сорбенте С-0,1ПЭГ выше, чем на С-0,6ПЭГ, что согласуется с большей гидрофильностью сорбента с меньшим количеством ПЭГ.

Хроматографические параметры удерживания легко элюируемых водорастворимых витаминов (никотинамид, В1, В2 и В6) для сорбентов, модифицированных ПЭГ, имеют схожий отклик на изменение состава подвижной фазы вне зависимости от толщины слоя модификатора. При увеличении доли буферного раствора в составе элюента от 8 до 10% для обеих неподвижных фаз факторы удерживания слабоудерживаемых витаминов уменьшаются в среднем на 30–35% (например, с 6,79 до 4,23 для В2). Таким образом, варьирование состава элюента с шагом в 1–2% позволяет существенно изменять удерживание ряда витаминов на полученных сорбентах с сохранением эффективности. Для неподвижной фазы с меньшим количеством полимера в функциональном слое отмечены несколько лучшая эффективность (до 35 000 тт/м) и симметрия пиков водорастворимых витаминов (коэффициенты асимметрии 1,0–1,5 и 1,1–2,0 для С-0,1ПЭГ и С-0,6ПЭГ соответственно). При этом селективность С-0,6ПЭГ несколько выше, чем С-0,1ПЭГ. Таким образом, увеличение количества ПЭГ в функциональном слое может улучшить селек-

тивность по полярным, в том числе заряженным, анализам, а для обеспечения высокой эффективности и симметрии пиков следует снижать относительное количество ПЭГ в процессе модифицирования.

Хроматограммы модельных смесей витаминов в выбранных оптимальных условиях градиентного элюирования представлены на рис. 7. Время разделения семи витаминов в обоих случаях составляет 16 мин, однако более высокая эффективность и лучшая симметрия пиков позволяют выделить сорбент С-0,1ПЭГ как наиболее перспективный для анализа витаминсодержащих объектов.

Таким образом, изучение синтезированных в работе неподвижных фаз на основе силикагеля, ковалентно модифицированного различным количеством ПЭГ, показало отсутствие различий хроматографических параметров при определении полярных нейтральных анализатов (сахаров) от количества ПЭГ в функциональном слое. Показано, что сорбент с меньшим количеством полимера в функциональном слое С-0,1ПЭГ обладает лучшими характеристиками при разделении цвиттер-ионных анализатов – аминокислот, а также водорастворимых витаминов – веществ, удерживающихся по адсорбционному механизму в режиме гидрофильной хроматографии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-13-00140).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alpert A.J.* // J. Chromatogr. A. 1990. Vol. 499. P. 177.
2. *Huber J.F.K., Pawlowska M., Markl P.* // J. Chromatogr. A. 1990. Vol. 500. P. 280.
3. *Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шнигун О.А.* // Лаборатория и производство. 2018. № 4. С. 76.
4. *Jandera P., Hájek T.* // J. Sep. Sci. 2009. Vol. 32. P. 3619.
5. *Garcia A., Rupérez F.J., Marin A., De la Maza A., Barbas C.* // J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 785. P. 237.
6. *Marín A., Barbas C.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. Vol. 40. P. 262.
7. *Šatínský D., Brabcová I., Maroušková A., Chocholouš P., Solich P.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. Vol. 405. P. 6105.
8. *West C., Lesellier E.* // J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1110. P. 200.
9. *Pragst F.* // Handbook of Analytical Separations. 2008. Vol. 6. P. 447.
10. *Mansour F.R., Zhou L., Danielson N.D.* // Chromatographia. 2015. Vol. 78. P. 1427.
11. *Wyszecka-Kaszuba E., Warowna-Grzeškiewicz M., Fijałek Z.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. Vol. 32. P. 1081.
12. *Marin A., Barbas C.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2004. Vol. 35. P. 1035.
13. *Dewoolkar V.C., Jeong L.N., Cook D.W., Ashraf K.M., Rutan S.C., Collinson M.M.* // Anal. Chem. 2016. Vol. 88. P. 5941.
14. *Rong L., Takeuchi T.* // J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1042. P. 131.
15. *Rong L., Wah Leem L., Takeuchi T.* // J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1128. P. 68.
16. *Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N.* // J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. P. 5903.
17. *Dolci M.* Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK. Chromatographic Characterization of Stationary Phases for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography.
18. *Fu Q., Guo Z., Liang T., Zhang X., Xua Q., Liang X.* // Anal. Methods. 2010. Vol. 2. P. 217.
19. *Padivitage N. L. T., Armstrong D.W.* // J. Sep. Sci. 2011. Vol. 34. P. 1636.

20. Fu Q., Liang T., Li Z., Xu X., Ke Y., Jin Y., Liang X. // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 379. P. 13.
21. Jenkins K. // J. Chromat. Today. 2015. Vol. 8. P. 14.
22. Kottoni D., D'Acquarica I., Ciogli A., Villani C., Capitani D., Gasparrini F. // J. Chromatogr. A. 2012. Vol. 1232. P. 196.
23. Prinsen H. C.M.T., Schiebergen-Bronkhorst B. G.M., Roeleveld M.W., Jans J.J.M., de Sain-van der Velden M.G.M., Visser G. van Hasselt P.M., Verhoeven-Duif N.M. // J. Inherit. Metab. Dis. 2016. Vol. 39. P. 651.
24. Dell'mour M., Jaitz L., Oburger E., Puschenreiter M., Koellensperger G., Hann S. // J. Sep. Sci. 2010. Vol. 33. P. 911.
25. https://www.agilent.com/cs/library/applications/59918922EN_Plant_Amino_Acids_Quant_Poroshell_120_HILICZ_Application.pdf
26. Themelis T., Gotti R., Gatti R. // J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 2017. Vol. 145. P. 751.
27. Langer S., Lodge J.K. // J. Chromatogr. B. 2014. Vol. 960. P. 73.
28. Jandera P., Hajek T., Skerikova V., Soukup J. // J. Sep. Sci. 2010. Vol. 33. P. 841.
29. <http://www.ymc.co.jp/data/appli/F121012A.pdf>
30. Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D. // J. Sep. Sci. 2009. Vol. 32. P. 909.

Поступила в редакцию 10.10.2020
Получена после доработки 12.10.2020
Принята к публикации 20.11.2020

NOVEL STATIONARY PHASES FOR HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY BASED ON SILICA COVALENTLY MODIFIED WITH POLYETHYLENE GLYCOL

A.S. Popov, G.S. Maksimov, A.D. Smolenkov, O.A. Shpigun, A.V. Chernobrovkina*

(Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, analytical chemistry chair;
*e-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru)

Novel stationary phases based on aminopropyl silica covalently modified with polyethylene glycol with different matrix to polymer mass ratio were obtained. Chromatographic properties of the prepared adsorbents were studied using Tanaka test procedure for hydrophilic stationary phases and on the example of separating model mixtures of sugars, amino acids, and water-soluble vitamins. It was shown that polyethylene glycol layer thickness variation not only affects efficiency, but allows one to tailor selectivity toward the polar analytes in hydrophilic interaction liquid chromatography mode.

Key words: HILIC, stationary phase synthesis, polyethylene glycol, sugars, amino acids, water-soluble vitamins.

Сведения об авторах: Попов Александр Сергеевич – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (aspopov.anchem.msu@mail.ru); Максимов Григорий Сергеевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (grigoriymaksimov576@gmail.com); Смоленков Александр Дмитриевич – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, доцент (smolenkov@bk.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, член-корр. РАН, докт. хим. наук (spigun@analyt.chem.msu.ru); Чернобровкина Алла Валерьевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru).