

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13417

Установление факторов влияния на селективность разделения карбоновых кислот на многофункциональном сорбенте на основе полистирол-дивинилбензола в смешанном режиме ВЭЖХ

Григорий Сергеевич Максимов, Илья Андреевич Дубинин,
Анастасия Владимировна Горбовская, Андрей Владимирович Пирогов,
Олег Алексеевич Шпигун, Алла Валерьевна Чернобровкина[✉]

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,
chernobrovkina@analYT.chem.msu.ru[✉]

Аннотация. Произведена характеристика ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе полистирол-дивинилбензола путем независимого варьирования параметров подвижной фазы в режиме гидрофильной хроматографии. Продemonстрировано существенное снижение анионообменной емкости сорбента в исследуемом диапазоне ${}^w\text{pH}$ 2.85-5.76, вероятно, вызванное наличием в функциональном слое аминокрупп разной степени замещенности, депротонируемых при повышении pH. Для органических кислот разной силы с ${}^w\text{p}K_a$ 1-5 зарегистрированы зависимости факторов удерживания от pH, а также определены величины относительных вкладов ионообменного механизма в общее удерживание. С ростом pH продемонстрировано снижение времен удерживания анионов и кислот с ${}^w\text{p}K_a < 4$ и увеличение для кислот с ${}^w\text{p}K_a > 4$, при этом первые преимущественно удерживались по ионообменному механизму во всем диапазоне, в то время как для кислот с ${}^w\text{p}K_a > 4$ вклад ионного обмена существенно снижался при повышении концентрации элюирующего иона (90-0%) при ${}^w\text{pH}$ 2.85. Показано, что для подобных анионообменников с высокой емкостью состояние аналита, зависящее от соотношения ${}^w\text{pH}$ подвижной фазы и ${}^s\text{p}K_a$ соединения, оказывает большее влияние на вид зависимости $k' - \text{pH}$, чем изменение заряда сорбента. Оптимальным условием разделения кислот разной силы является кислая среда ($\text{pH} \leq \text{p}K_a$), обеспечивающая удерживание по совокупности разных механизмов, а также контроль вклада электростатических взаимодействий путем варьирования концентрации элюирующего иона. Подобраны условия высокоэффективного (до 32 000 тт/м) и селективного разделения смеси 5 кислот за 5 мин. Показана возможность разделения ионизируемых соединений на базовом жидкостном хроматографе с применением новой многофункциональной колонки без привлечения оборудования для ионной хроматографии.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, ионная хроматография, ионный обмен, ионообменники, полистирол-дивинилбензол, карбоновые кислоты, смешанный режим ВЭЖХ.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 25-13-00132, с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука» и в рамках Программы развития МГУ.

Для цитирования: Максимов Г.С., Дубинин И.А., Горбовская А.В., Пирогов А.В., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Установление факторов влияния на селективность разделения карбоновых кислот на многофункциональном сорбенте на основе полистирол-дивинилбензола в смешанном режиме ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2025. Т. 25, № 5. С. 675-686. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13417>

Original article

Governing the separation selectivity of carbon acids on a novel poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phase in mixed-mode HPLC

Grigorii S. Maksimov, Ilya A. Dubinin, Anastasia V. Gorbovskaia,
Andrei V. Pirogov, Oleg A. Shpigun, Alla V. Chernobrovkina[✉]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru[✉]

Abstract. The ion-exchange features of a new multifunctional polymer column in HILIC mode were examined by varying the mobile phase pH and counter ion concentration. A significant decrease in the column anion-exchange capacity was demonstrated in the range of ${}^w\text{pH}$ 2.85–5.76 which was attributed to the presence of secondary and tertiary amino groups in the functional layer. The k' -pH trends in the corresponding range were built for different organic acids (${}^w\text{p}K_a$ 1–5) additionally the relative contributions of the ion-exchange to the overall retention were determined by eluting ion concentration altering. A decrease in the retention of anions and acids with ${}^w\text{p}K_a < 4$ and an increase for acids with ${}^w\text{p}K_a > 4$ was shown with rising pH. The ion-exchange impact in the retention of the latter ones significantly decreased by concentration rise at ${}^w\text{pH}$ 2.85, while the former being predominantly retained by the ion-exchange mechanism in the entire pH range. For such a high-capacity anion exchangers, the type of the k' -pH dependence was shown to be mostly determined by the analyte state, which in its turn depends on the ${}^s\text{pH}$ and ${}^s\text{p}K_a$ values. Mobile phase of $\text{pH} \leq \text{p}K_a$ was found to be the most appropriate for separation of acids, providing retention by different mechanisms and allows practitioners to master electrostatic interactions by varying the concentration of the eluting ion. A mixture of 5 acids was entirely separated in five minutes with an efficiency of up to 32 000 plates/m in mixed-mode HPLC. A beneficial option of ionizable compounds separation on a novel polymer multifunctional column with no ion chromatography equipment being engaged has been shown in this work.

Keywords: hydrophilic interaction liquid chromatography, ion chromatography, ion exchange, electrostatic interactions, anion exchangers, poly (styrene-divinylbenzene), carbon acids, mixed-mode.

Acknowledgments: the work was carried out with the support of the Russian Science Foundation, grant No. 25-13-00132, using the equipment of the MSU CCP "Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive research", acquired by MSU under the instrument base upgrade program as part of the national project "Science" and as part of the MSU Development Program.

For citation: Maksimov G.S., Dubinin I.A., Gorbovskaia A.V., Pirogov A.V., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Governing the separation selectivity of carbon acids on a novel poly(styrene-divinylbenzene)-based stationary phase in mixed-mode HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 675–686. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13417>

Введение

Гидрофильная хроматография (ГИХ) представляет собой активно развивающийся метод одновременного разделения и определения полярных гидрофильных соединений, к числу которых относятся многие биологически активные вещества, компоненты лекарств и их метаболиты [1]. Современным направлением развития метода ГИХ является применение в качестве неподвижных фаз ионообменников низкой емкости на основе полистирол-дивинил бензола (ПС-ДВБ), характеризующихся более широким диапазоном гидролитической устойчивости по

сравнению с силикагелем. Подобные сорбенты способны работать в смешанном режиме ВЭЖХ, осуществляя разделение соединений разной гидрофильности и заряда в ходе одного анализа [2]. Для этих целей гидрофобная полимерная матрица может быть эффективно экранирована гидрофильными полимерными слоями заданной архитектуры, наиболее подходящими для конкретной аналитической задачи [3]. В качестве модификатора, в частности, могут быть использованы полиэлектролитные цепочки, обеспечивающие высокую гидрофильность поверхности за счет кватернизованного азота в структуре функционального слоя [4]. При

этом удерживание вещества также может осуществляться за счет стэкинг-взаимодействий, например, $\pi - \pi$ типа, реализуемых между ароматической системой аналита и матрицей ПС-ДВБ. Для эффективной эксплуатации такого сорбента необходимо правильно оценивать его разделяющую способность в широком диапазоне рабочих условий.

Современным ограничением широкому распространению метода гидрофильной хроматографии является сложный механизм удерживания, сочетающий распределение, адсорбцию, а также электростатические взаимодействия [5], соотношение вкладов которых изменяется при смене рабочих условий, недостаточно описано в литературе и на практике значительно сказывается на результатах хроматографического анализа, сопровождаясь сложностями выбора колонки и условий определения. Существующие на настоящий момент способы описания колонок в ГИХ не предоставляют исчерпывающую информацию о свойствах сорбента и доминирующем механизме удерживания в разных условиях [6,7]. Для расширенной характеристики свойств неподвижной фазы был предложен подход, основанный на получении зависимостей факторов удерживания модельных аналитов от независимо варьируемых параметров подвижной фазы (доли сильного элюента, кислотности, концентрации элюирующего иона) [8-10]. Структура тестовых соединений, используемых для описания механизма удерживания, должна соответствовать минимальному числу реализуемых взаимодействий сорбат-сорбент. Полученные зависимости факторов удерживания интерпретируют в совокупности с применением основных физико-химических моделей удерживания. Общее удерживание представляют в виде суммы трех компонентов: ионного обмена, распределения и адсорбции (1).

$$k' = k'_{\text{ГИХ}} + k'_{\text{ИЭХ}} + k'_{\pi-\pi} = k'_{(\text{adsorption})} + D \frac{V_s}{V_m} + \frac{b_{\text{ИЭХ}}}{[\text{M}^-]} + k'_{\pi-\pi} \quad (1)$$

Углубленное изучение электростатических взаимодействий в рамках данного подхода позволяет установить условия разделения заряженных соединений в режиме ГИХ, что дает преимущества использования широко распространенного и доступного оборудования для ВЭЖХ без необходимости эксплуатации ионохроматографических систем, а также в перспективе – экспрессного прогнозирования условий одновременного определения соединений разного заряда в одном анализе.

Разделение органических кислот представляет собой важную аналитическую задачу [11-13]. Было продемонстрировано успешное разделение соединений данного класса на колонках на основе силикагеля в гидрофильном режиме [14]. При этом наилучшая селективность достигалась при условии $\text{pH} > \text{pK}_a$. Для колонок данного типа уже существуют зависимости удерживания от параметров подвижной фазы, позволяющие подобрать условия разделения. В то же время, для сорбентов на полимерной основе на настоящий момент такие сведения отсутствуют, что ограничивает возможности их применения. Целью данной работы является описание ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе ПС-ДВБ, а также выбор условий разделения смеси органических кислот.

Экспериментальная часть

Неподвижная фаза. В данной работе использовали сорбент, синтезированный согласно [4] путем модифицирования аминированного полистирол-дивинилбензола, полученного в результате восстановительного аминирования продукта реакции Фриделя-Крафтса, полиэлектролитными цепочками, предварительно синтезированными по реакции 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира и диметиламина (обозначен в [6] как Р-DMA x3, рис. 1). Параметры исходной матрицы ПС-ДВБ – степень сшивки 50%, диаметр

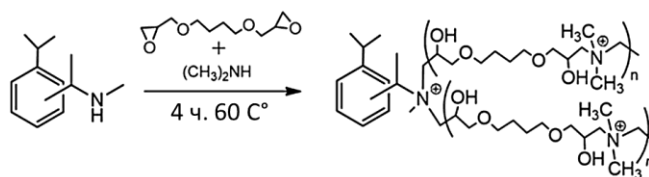


Рис. 1. Схема синтеза сорбента и его ожидаемая структура.
 Fig. 1. Adsorbent synthesis and the expected layer structure.

зерна 5,5 мкм, удельная площадь поверхности 650 м²/г, диаметр пор 4 нм. Заполнение хроматографической колонки 100 × 4 мм суспензией 1 г сорбента в 20 мл деионизованной воды проводили под давлением 400 бар аналогично [15]. В качестве подвижной фазы использовали 15 мМ раствор карбоната натрия.

Подвижная фаза. Для приготовления буферных растворов использовали следующие реактивы: ледяная уксусная кислота (w_pK_a 4.76), 99.5%; муравьиная кислота (w_pK_a 3.75), ч.д.а.; гидроксид натрия, ч.д.а. (Компонент-Реактив, Россия). Буферные растворы готовились *in situ* методом титрования 0.5 М раствором щелочи необходимого количества кислоты до заданной величины w_pH . Регистрировали значения времен удерживания при $w_pH=2.85$ (форматные буферные растворы); 4.76 и 5.76 (ацетатные буферные растворы) при постоянной концентрации элюирующего иона 2.5 мМ в подвижной фазе. Измеряли и учитывали значения w_pH , относящиеся к подвижной фазе, а также с помощью уравнений Гендерсона-Хассельбаха и Дебая-Хюккеля рассчитывали погрешности их определения, вызванные варьированием концентрации. При w_pH 2.85 и 5.76 удерживание регистрировали при концентрациях элюирующего иона: 1.25; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 мМ в подвижной фазе. Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил 99.9%, (Компонент-Реактив, Россия). Для всех экспериментов подвижная фаза состояла из 90% ацетонитрила и 10% буферного раствора по объему.

Модельные соединения. В качестве тестовых соединений в работе использовали набор органических кислот разной

силы и гидрофильности и их солей: анионы (тозилат натрия – SPTS, п-стиролсульфонат натрия – SPSS), кислоты (2,4-динитробензойная, салициловая, п-нитробензойная, м-нитробензойная, бензойная, п-метилбензойная, п-метоксибензойная, никотиновая, п-аминобензойная, 3,4-диаминобензойная, фенилаланин, 2,4-динитрофенол) производства Sigma Aldrich (США) и TCI (Япония), со степенью чистоты >99.9%. Времена удерживания определяли по вводу пробы индивидуального соединения с концентрацией 100 мг/дм³ в среде, соответствующей составу подвижной фазы. Величины pK_a , а также параметры гидрофильности $\log P$ и $\log D$ рассчитывали с помощью программы ACD/Labs 12.0 (Канада) или платформы PubChem (NIH, USA).

Оборудование. Взятие навесок проводили на весах Explorer Pro («Ohaus Corporation», США), с точностью 0.0001 г. Для отбора аликвот использовали автоматические дозаторы LABMATE объемом 10-100, 100-1000 и 1000-5000 мкл («НТЛ», Польша) с пределом допустимой погрешности измерения не более 5%. Измерение pH растворов проводили с помощью pH -метра « pH -420» («Аквилон», Россия), откалиброванного по буферным растворам с w_pH 4.01, 6.86, 9.18. Дегазацию растворов осуществляли при помощи ультразвуковой ванны «Сапфир 6580» («Сапфир», Россия).

Для проведения экспериментов использовали жидкостной хроматограф ХРОМАТРОН-1411 производства АО «Лабтех», оснащенный четырехканальным насосом LC-1411QUA, автосамплером с термостатированием проб LC-1411ASCOL и детектором на диодной

матрице LC-1411DAD; жидкостной хроматограф Vanquish Flex с флуоресцентным детектором FLD и диодно-матричным детектором DAD; жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000, оснащенный термостатируемым автосамплером, двухканальным насосом и диодно-матричным детектором. Регистрацию и обработку хроматограмм проводили при помощи ПО Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, США). Измерение времени удерживания осуществляли по хроматограммам индивидуальных веществ относительно воды как маркера мертвого времени для многофункциональной неподвижной фазы при скорости потока $1 \text{ см}^3/\text{мин}$, температуре колонки 25°C , УФ-детектировании при длинах волн 254, 220, 270 нм.

Для подтверждения результативности синтеза сорбента структуру привитых фрагментов изучали методом ГХ-МС с термодесорбцией с помощью системы Agilent GC (8890)-MS (5977B) (Agilent Technologies, США), состоящей из моноквадрупольного МС-детектора с источником электронной ионизации, термостата колонки, охлаждаемого узла ввода пробы, термодесорбера (TDU 2), автоматической роботизированной системы ввода пробы (Gerstel, Германия) и линии подачи газов (He , $1 \text{ см}^3/\text{мин}$). Использовали две соединенные последовательно колонки HP-5MS $15 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм}$, 0.25 мкм (Agilent Technologies, США), а также стеклянные термодесорбционные трубки ($5 \times 0.5 \text{ см}$), кварцевую стекловату ч.д.а. (TRAJAN, Австралия).

Описание механизма удерживания. Для заряженных соединений регистрировали зависимости факторов удерживания от концентрации элюирующего иона [ЭИ] в форме уравнения ионного обмена: $k' = f(1/[\text{ЭИ}])$. При экстраполяции на бесконечно большую концентрацию ЭИ получали факторы удерживания, вызванные неэлектростатическими взаимодействиями ($k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$). Принимая посто-

янными величины $k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$, определяли вклады ионного обмена в удерживание соединений для всех величин концентрации элюирующего иона. При этом общее удерживание рассматривали как сумму ($k'_{\text{ГХХ}} + k'_{\pi-\pi}$) и $k'_{\text{ГЕХ}}$.

Обсуждение результатов

Согласно структуре, предполагаемой на основе элементного анализа и ГХ-МС с термодесорбцией, а также результатам теста Танака для гидрофильных сорбентов [4,6], используемая хроматографическая колонка характеризуется высокой анионообменной селективностью ($\alpha(\text{AX})=140$). С этой величиной согласуется отсутствие удерживания органических катионов и сильных оснований вследствие их электростатического отталкивания, экспериментально наблюдаемое во всем диапазоне рассматриваемых рабочих условий (^wpH 2.85-5.76 (^spH 5.5-9.2); $[\text{A}^-]$ 1.25-10 мМ). Сорбент продемонстрировал повышенную гидрофильность ($k'_U=1.5$), а также селективность по отношению к гидроксигруппам ($\alpha(\text{OH})=1.9$), что свидетельствовало об эффективном экранировании гидрофобной матрицы ПС-ДВБ полиэлектролитными цепочками с кватернизованным азотом в структуре функционального слоя. Эти параметры характеризуют перспективность данной неподвижной фазы для разделения кислотных соединений в режиме ГИХ.

Методология. Важным фактором, влияющим как на электростатические взаимодействия, так и на гидрофильность неподвижной фазы, является pH подвижной фазы. Определение кислотности в ГИХ осложнено тем, что подвижная фаза содержит превалирующую долю апротонного органического растворителя, что приводит к снижению силы кислот и оснований. Наиболее информативным подходом является использование двух шкал, первая из которых ^wpH относится к чистой воде, а вторая ^spH – к водно-органи-

ческой подвижной фазе конкретного состава [16-18]. Зависимость фактора удерживания аналита от pH в простейшем виде, когда аналит или сорбент нейтрален, описывается уравнением, введенным Хорватом и соавт. [19, 20]. В общем виде реальные зависимости являются комбинацией графиков соответствующего уравнения и представляют собой, как правило, кривые с максимумом, расположенным вблизи величины ${}^w\text{p}K_a$ [21].

Зависимость удерживания от концентрации элюирующего иона в форме уравнения ионного обмена (2) позволяет оценить относительный вклад последнего в удерживание ионизируемых аналитов путем экстраполяции факторов их удерживания на бесконечно большую концентрацию элюирующего иона, когда ионный обмен подавлен [11, 22, 23]. Угол наклона уравнения ионного обмена в логарифмическом виде соответствует отношению зарядов аналита и элюирующего иона (3). Электростатические взаимодействия могут оказывать определяющее влияние на разделение, возможность их контролировать позволяет добиться высокой селективности разделения ионизируемых аналитов в смешанном режиме ВЭЖХ. К такому типу задач относится определение органических кислот [11, 24, 25].

$$k' = \frac{V_S}{V_M} K_{\text{IEX}} \frac{[-NR_3^+]}{[M^-][H^+]} + k'_{\text{ГИХ}}, \quad (2)$$

$$\lg k'_{\text{IEX}} = \lg b_{\text{IEX}} + a \quad (3)$$

Зависимость удерживания от кислотности подвижной фазы. Варьирование pH подвижной фазы производили с использованием буферных растворов на основе формиата и ацетата аммония с постоянной концентрацией элюирующего иона, равной 2.5 мМ в подвижной фазе. Тозил-(SPTS) и стиролсульфоокислоты (SPSS) в соответствии с величинами их ${}^w\text{p}K_a \approx -2.8$ находятся в форме анионов во всем исследуемом диапазоне pH подвижной фазы. Для данного класса соединений наблюдали существенное снижение факторов удерживания при увеличении pH

элюента, что может быть вызвано снижением эффективного положительного заряда поверхности сорбента (рис. 2А). Вероятно, это связано с неполным алкилированием аминогрупп сорбента в процессе синтеза, в результате чего в функциональном слое могут присутствовать аминогруппы разной степени замещенности, способные протонироваться при низких значениях pH подвижной фазы. Соответственно, при повышении pH происходит снижение анионообменной емкости колонки в результате депротонирования. Несмотря на величину $\log D$, наблюдали большее удерживание 2,4-динитробензойной кислоты (${}^w\text{p}K_a=1.4$) по сравнению с сульфонатами, при этом зависимость от pH была аналогичной. В то же время, для более слабых кислот (п-нитробензойная (${}^w\text{p}K_a=3.4$), м-нитробензойная (${}^w\text{p}K_a=3.5$) и никотиновая (${}^w\text{p}K_a=4.8$)) наблюдали увеличение времен удерживания с повышением pH, что связано, в первую очередь, с усилением ионного обмена, вызванным увеличением степени диссоциации аналита по мере приближения pH элюента к величине $\text{p}K_a$. Равнозначное удерживание п- и м-нитробензойных кислот отражает отсутствие селективности колонки к структурным изомерам за счет неспецифических электростатических взаимодействий.

Салициловая кислота (${}^w\text{p}K_a=3.0$) и 2,4-динитрофенол (${}^w\text{p}K_a=4.0$) показали аномально высокое удерживание при ${}^w\text{pH}$ 2.85, учитывая величины $\log D$, а также пониженный вклад ионного обмена по сравнению с сульфонатами и нитробензойными кислотами. При повышении ${}^w\text{pH}$ до 4.26 регистрировали снижение их факторов удерживания, несмотря на ожидаемое увеличение вклада ионного обмена, при этом дальнейшего изменения удерживания не наблюдали. Такая необычная зависимость может быть вызвана изменением доминирующего механизма удерживания соединений в данном диапазоне, осложненным

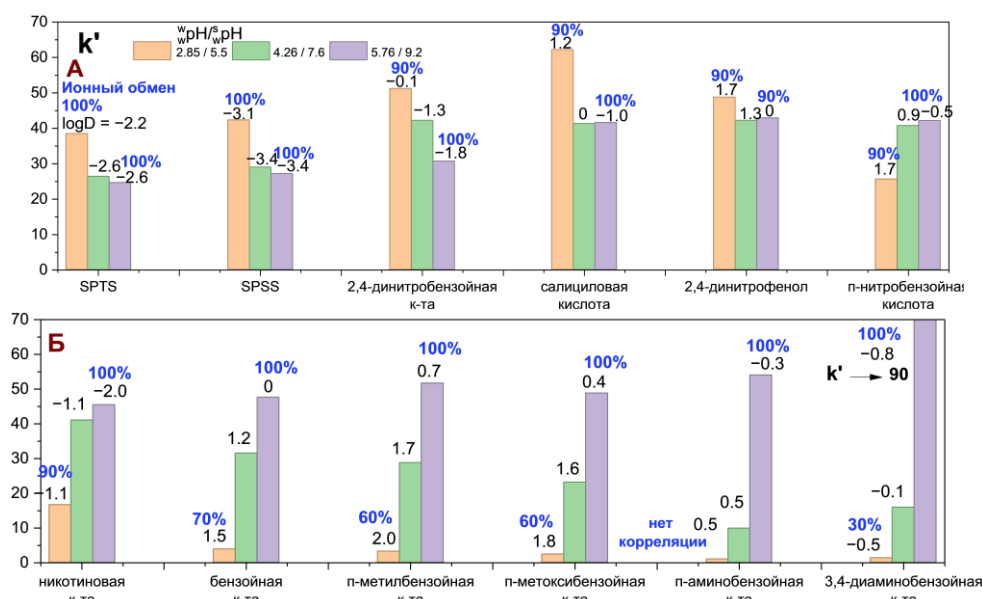


Рис. 2. Гистограммы зависимостей фактора удерживания от pH подвижной фазы с относительным вкладом ионного обмена в удерживание (%) при 2.5 мМ [HCOO⁻]; А – $w_pK_a < 4$, Б – $w_pK_a > 4$. Подвижная фаза: HCOOH/HCOONa $w_pH = 2.85$, ($s_pH = 5.5$) и CH₃COOH/CH₃COONa $w_pH = 5.76$ ($s_pH = 9.2$); (2.5 мМ [HCOO⁻] в ПФ) – CH₃CN 10:90 об.%; скорость потока 1 см³/мин; Т(колонки)=25 С°; УФ-детектирование 254; 220 нм. Параметры logD для соединений рассчитаны с помощью программы ACD/Labs 12.0 для всех значений w_pH .

Fig. 2. Retention factor vs. pH histograms with relative ion exchange impact to retention (%) at 2.5 mM [HCOO⁻]; А) – $w_pK_a < 4$, Б) – $w_pK_a > 4$. Mobile phase: HCOOH/HCOONa $w_pH = 2.85$, ($s_pH = 5.5$) and CH₃COOH/CH₃COONa $w_pH = 5.76$ ($s_pH = 9.2$); (2.5 mM [HCOO⁻] in mobile phase) – CH₃CN 10:90 vol. %; flow rate 1 ml/min; T(column)=25 C°; UV detection at 254; 220 nm. logD values were calculated with the aid of ACD/Labs 12.0 for each analyte corresponding to w_pH range.

возможностью образования внутримолекулярных водородных связей, ослабляющих как ионный обмен, так и способность к образованию водородных связей с функциональными группами сорбента.

Лучшие условия разделения кислот данной группы ($w_pK_a \leq 4$) достигались при $w_pH = 2.85$, но времена удерживания салициловой и динитробензойной кислот при этих условиях достаточно велики (более 45 мин), что выражалось в длительности анализа.

Для бензойной ($w_pK_a = 4.2$), п-метилбензойной ($w_pK_a = 4.4$) и п-метоксибензойной ($w_pK_a = 4.5$) кислот наблюдали увеличение факторов удерживания с повышением pH подвижной фазы, что связано с усилением ионного обмена, а также повышением гидрофильности ана-

лита (logD) вследствие увеличения степени диссоциации (рис. 26). При $w_pH = 2.85$ все рассматриваемые кислоты практически не диссоциированы и удерживаются благодаря неэлектростатическим взаимодействиям, обусловленным взаимодействиями молекулярной формы с матрицей и приповерхностными слоями – функциональным и адсорбированным водным. При этом, селективность их разделения по оставшимся механизмам при сходстве структуры низка. Лучшие условия разрешения кислот данной группы ($4 \leq w_pK_a \leq 5$) достигнуты при pH, близком к их pKa ($w_pH = 4.26$), за счет различной способности к ионному обмену, а также взаимодействиям неэлектростатической природы.

Таблица 1. Изменение вклада ионного обмена в удерживание в зависимости от концентрации элюирующего иона для тестовых аналитов при $w\text{pH} = 2.85$, $s\text{pH} = 5.5$; $[\text{HCOO}^-] = 1.25$; 2.5; 5.0; 7.5 mM; $n = 4$, $P = 0.95$. Остальные условия указаны в подписи к рис. 2.

Table 1. Relative ion exchange impacts in test analytes' retention at varied counter ion concentration at $w\text{pH} = 2.85$, $s\text{pH} = 5.5$; $[\text{HCOO}^-] = 1.25$; 2.5; 5.0; 7.5 mM; $n = 4$, $P = 0.95$. Other conditions are listed in Fig. 2.

Аналит	$w\text{p}K_a$	a	$k'_{\text{гх}}$	r	Вклад ионного обмена в удерживание, %			
					1.25 mM	2.5 mM	5 mM	7.5 mM
SPSS	Анион	$-(0.9 \pm 0.2)$	1.5	0.999	98 \pm 6	100 \pm 10	90 \pm 20	90 \pm 30
SPTS	Анион	$-(0.9 \pm 0.2)$	1.8	0.999	97 \pm 8	90 \pm 20	90 \pm 30	90 \pm 30
2,4-динитробензойная к-та	1.4	$-(0.9 \pm 0.2)$	3.0	1.000	96 \pm 6	90 \pm 10	90 \pm 20	80 \pm 30
салициловая к-та	3.0	$-(0.9 \pm 0.2)$	3.8	1.000	96 \pm 4	92 \pm 7	90 \pm 10	80 \pm 20
п-нитробензойная к-та	3.4	$-(0.87 \pm 0.05)$	2.5	1.000	93 \pm 3	88 \pm 6	80 \pm 10	70 \pm 20
м-нитробензойная к-та	3.5	$-(0.86 \pm 0.04)$	2.3	1.000	94 \pm 2	89 \pm 4	81 \pm 6	73 \pm 9
2,4-динитрофенол	4.0	$-(0.9 \pm 0.1)$	3.0	1.000	96 \pm 3	92 \pm 6	90 \pm 10	80 \pm 20
бензойная к-та	4.2	$-(0.6 \pm 0.2)$	1.0	1.000	81 \pm 3	68 \pm 5	53 \pm 7	41 \pm 8
п-метилбензойная к-та	4.4	$-(0.5 \pm 0.2)$	1.1	1.000	74 \pm 3	59 \pm 5	43 \pm 7	31 \pm 8
п-метоксибензойная к-та	4.5	$-(0.5 \pm 0.2)$	0.9	1.000	71 \pm 3	55 \pm 5	39 \pm 7	28 \pm 8
никотиновая к-та	4.8	$-(0.84 \pm 0.08)$	1.9	0.999	92 \pm 8	90 \pm 20	70 \pm 30	60 \pm 30
п-аминобензойная к-та	4.9	$-(0.3 \pm 0.2)$	0.5	0.994	50 \pm 10	–	–	–
3,4-диаминобензойная к-та	5.0	$-(0.3 \pm 0.2)$	0.7	1.000	46 \pm 2	30 \pm 2	18 \pm 2	13 \pm 3
фенилаланин	амфолит	$-(0.23 \pm 0.09)$	3.5	0.997	40 \pm 6	25 \pm 7	–	–

Частичная диссоциация 3,4-диаминобензойной ($w\text{p}K_a = 5.0$) и 4-аминобензойной ($w\text{p}K_a = 4.9$) кислот наблюдалась только при $w\text{pH} = 5.76$. При этом регистрировали аномальное увеличение времени удерживания по сравнению с более сильными кислотами, что может быть связано со специфическими взаимодействиями, в частности, образованием комплексного соединения. Вероятно, в данном случае реализуется сочетание гидрофильных, гидрофобных и специфических взаимодействий, приводящих в совокупности с усиливающимся ионным обменом к увеличению удерживания в 7-8 раз, что важно принимать во внимание при определении соединений данного типа на колонках схожей функциональности. Аналогичную зависимость фактора удерживания от pH продемонстрировал фенилаланин.

Таким образом, в силу высокой анионообменной емкости сорбента во всем диапазоне условий, профиль зависимости удерживания от pH элюента определяется в первую очередь состоянием аналита, в то время как изменение состояния функционального слоя сорбента влияет на величину изменения фактора удерживания.

Механизм удерживания кислотных соединений на данной колонке является комплексным. Кроме ионного обмена, а также удерживания за счет распределения в приповерхностный водный слой, диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей имеет место взаимодействие с матрицей. Более точное определение относительных вкладов взаимодействий каждого типа в удерживание рассматриваемых соединений, а также их изменение в широком диапазоне условий требует дальнейших исследований.

Электростатические взаимодействия. Варьируя концентрацию элюирующего иона независимо от pH подвижной фазы, согласно используемому подходу, можно управлять вкладом ионного обмена в удерживание ионизируемых аналитов, тем самым моделируя селективность. В таблицах 1 и 2 приведены относительные вклады ионного обмена, а также величины угловых коэффициентов (a) для кислот разной силы, полученные по результатам статистической обработки зависимостей удерживания от концентрации элюирующего иона в граничных точках диапазона $w\text{pH}$ 2.85 и 5.76. Ионный

Таблица 2. Изменение вклада ионного обмена в удерживание в зависимости от концентрации элюирующего иона для тестовых аналитов при $w\text{pH} = 5.76$, $s\text{pH} = 9.2$; $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 2.5; 5.0; 7.5; 10.0$ mM. Остальные условия указаны в подписи к рис. 2, табл.1.

Table 2. Relative ion exchange impacts in test analytes' retention at varied counter ion concentration at $w\text{pH} = 5.76$, $s\text{pH} = 9.2$; $[\text{HCOO}^-] = 2.5; 5.0; 7.5; 10.0$ mM. Other conditions are listed in Fig. 2 and Table 1.

Аналит	$w\text{pK}_a$	a	$k'_{\text{гх}}$	r	Вклад ионного обмена в удерживание, %			
					2.5 mM	5 mM	7.5 mM	10 mM
SPSS	Анион	$-(0.91 \pm 0.08)$	1.2	1	95 \pm 4	91 \pm 7	90 \pm 10	80 \pm 10
SPTS	Анион	$-(0.9 \pm 0.1)$	1.1	1	95 \pm 3	91 \pm 6	87 \pm 8	80 \pm 10
2,4-динитробензойная к-та	1.4	$-(0.90 \pm 0.09)$	1.3	0.999	95 \pm 3	91 \pm 6	86 \pm 9	80 \pm 10
салициловая к-та	3.0	$-(0.93 \pm 0.04)$	1.3	1	96 \pm 3	93 \pm 6	89 \pm 8	90 \pm 10
п-нитробензойная к-та	3.4	$-(0.93 \pm 0.06)$	1.2	1	96 \pm 3	93 \pm 5	90 \pm 7	87 \pm 9
м-нитробензойная к-та	3.5	$-(0.93 \pm 0.06)$	1.2	1	96 \pm 3	93 \pm 5	90 \pm 7	87 \pm 9
2,4-динитрофенол	4.0	$-(0.89 \pm 0.03)$	2.2	1	94 \pm 5	88 \pm 8	80 \pm 10	80 \pm 20
бензойная к-та	4.2	$-(0.96 \pm 0.05)$	0.9	1	98 \pm 2	96 \pm 4	94 \pm 5	92 \pm 7
п-метилбензойная к-та	4.4	$-(0.96 \pm 0.04)$	0.8	1	98 \pm 2	96 \pm 4	94 \pm 6	93 \pm 7
п-метоксибензойная к-та	4.5	$-(0.97 \pm 0.05)$	0.7	1	98 \pm 3	96 \pm 5	95 \pm 7	93 \pm 9
никотиновая к-та	4.8	$-(0.95 \pm 0.05)$	1.1	1	97 \pm 4	94 \pm 6	92 \pm 9	90 \pm 10
п-аминобензойная к-та	4.9	$-(0.98 \pm 0.05)$	0.5	1	99 \pm 2	98 \pm 4	97 \pm 5	96 \pm 7
3,4-диаминобензойная к-та	5.0	$-(0.93 \pm 0.07)$	2.4	1	97 \pm 3	94 \pm 5	90 \pm 8	90 \pm 10
фенилаланин	амфолит	$-(0.8 \pm 0.3)$	2.1	0.997	90 \pm 10	80 \pm 20	80 \pm 20	70 \pm 30

обмен относится к неспецифическим взаимодействиям, поэтому при доминирующем вкладе последнего аналиты могут быть разделены только на основании взаимодействий другого типа, что сокращает выбор условий их разрешения. Варьируя кислотность подвижной фазы, можно изменять состояние аналитов и, соответственно, долю ионного обмена в комплексном механизме их удерживания.

Так, при $w\text{pH} 2.85$ не все кислоты диссоциированы в достаточной степени, для аналитов с $w\text{pK}_a > 4$ наблюдается заметный вклад взаимодействий неэлектростатической природы. Соответственно, можно добиться разделения кислот разной силы за счет изменения вклада ионного обмена, варьируя концентрацию элюирующего иона в диапазоне, обеспечивающем достаточную буферную емкость.

При $w\text{pH} 5.76$ практически все кислоты диссоциированы в той или иной степени, вклад ионного обмена максимален и слабо подвержен влиянию концентрации элюирующего иона, которая уже не будет эффективным инструментом подбора условий разделения, согласно близости величин угловых коэффициентов логарифмической зависимости a к заряду

аналита (табл. 2). Таким образом, с увеличением (уменьшением) концентрации ожидается общее снижение (повышение) времен удерживания без изменения селективности разделения кислот.

Выбор условий разделения. На основании результатов независимого варьирования pH и концентрации элюирующего иона в подвижной фазе, можно определить условия полного разделения смеси ионизируемых соединений в смешанном режиме ВЭЖХ. Для того, чтобы разделить кислоты разной силы, нужно иметь в виду профиль зависимости их удерживания от pH, а именно куполообразную кривую, максимум которой определяется величиной $s\text{pK}_a$ аналита. Сильные кислоты, доминирующим механизмом для которых является ионный обмен, могут быть разделены только на основе специфических взаимодействий с сорбентом (гидрофобность SPSS и SPTS). Условием наилучшего разделения близких по силе кислот является создание в подвижной фазе $\text{pH} = \text{pK}_a$ ($w\text{pH} = 2.85$ для нитробензойных кислот). Наиболее полное разделение смеси алкил-, алкокси- и аминокислот достигается при $w\text{pH} =$

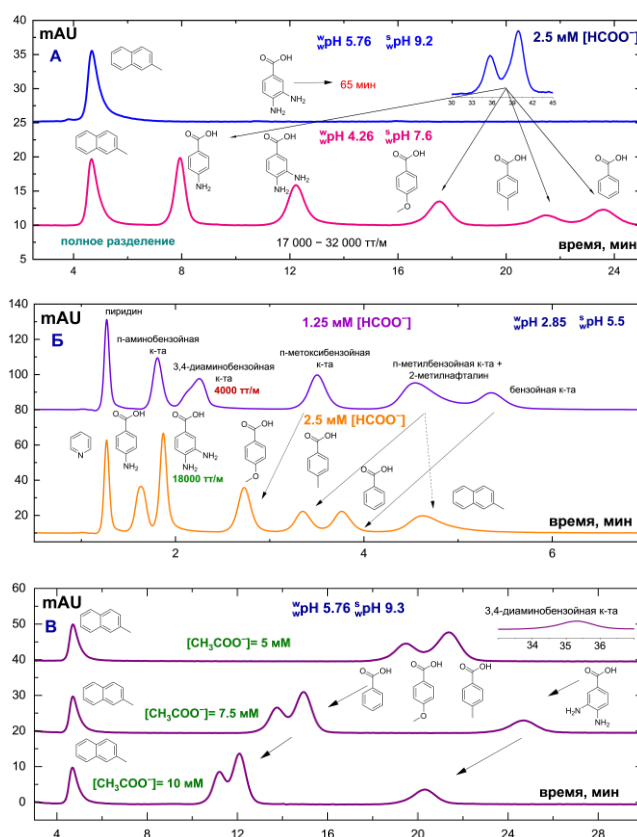


Рис. 3. Хроматограммы модельных смесей бензойных кислот, 100 ppm. А) $w_{pH} = 5.76$; 4.26 ($s_{pH} = 9.2$; 7.6); $[HCOO^-] = 2.5$ mM Б) $w_{pH} = 2.85$ ($s_{pH} = 5.5$); $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; В) $w_{pH} = 5.76$ ($s_{pH} = 9.2$); $[HCOO^-] = 5$; 7.5; 10 mM; 90 об.% CH_3CN ; $T(\text{колонки}) = 25^\circ C$; скорость потока $1 \text{ cm}^3/\text{мин}$, УФ-детектирование при 254 нм.

Fig. 3. Model mixtures of benzoic acids chromatograms, 100 ppm. А) $w_{pH} = 5.76$; 4.26 ($s_{pH} = 9.2$; 7.6); $[HCOO^-] = 2.5$ mM Б) $w_{pH} = 2.85$ ($s_{pH} = 5.5$); $[HCOO^-] = 1.25$; 2.5; В) $w_{pH} = 5.76$ ($s_{pH} = 9.2$); $[HCOO^-] = 5$; 7.5; 10 mM; 90 vol. % CH_3CN ; $T(\text{column}) = 25^\circ C$; flow rate 1 ml/min , UV detection at 254 nm.

4.26 с эффективностью до 32 000 тт/м (рис. 3а).

При $pH < pKa$ можно улучшать разрешение за счет изменения вклада ионного обмена путем варьирования концентрации элюирующего иона в подвижной фазе. Так, при $w_{pH} 2.85$ двукратное увеличение концентрации формиата в элюенте приводит к повышению селективности и позволяет разделить смесь 7 аналитов за 5 мин (рис. 3б). При этом, за счет ослабления ионного обмена также повышается эффективность – вплоть до 4 раз для некоторых веществ. При величинах pH, превышающих pKa большинства кислот, ионный обмен становится доминирующим, и разрешение ухудшается.

Таким образом, при $w_{pH} 5.76$ за счет преобладания ионного обмена в удерживании ионизированных аналитов разделение не происходит, а варьирование концентрации равнозначно изменяет факторы удерживания, не влияя на селективность (рис. 3в).

Закключение

Проведено описание ионообменных свойств новой многофункциональной колонки на основе ПС-ДВБ в режиме гидрофильной хроматографии. Продемонстрировано снижение анионообменной емкости вследствие наличия в функциональном слое сорбента аминогрупп разной степени замещенности. За счёт высо-

кой анионообменной емкости, вклад ионного обмена в удерживание соединений на данной колонке в основном определялся состоянием аналита, которое в свою очередь зависит от pH подвижной фазы и величины ${}^w pK_a$ определяемого соединения. Наилучшая селективность разделения для всех кислот достигалась при $pH \leq pK_a$. При ${}^w pH$ 2.85 кислоты с ${}^w pK_a < 4$ преимущественно удерживались по ионообменному механизму, в то время как для кислот с ${}^w pK_a > 4$ вклад ионного обмена существенно снижался при повышении концентрации элюирующего иона (90-0%). При ${}^w pH$ 5.76 показано доминирующее влияние ионного обмена для обеих групп. Полученные закономерности позволили выбрать наилучшие условия разделения кислотных и нейтральных соединений разной гидрофильности с эффективностью до 32 000 тт/м: для кислот

с ${}^w pK_a > 4$ – элюент с ${}^w pH$ 2.85; 4.26, $[HCOO^-] = 2.5$ мМ в ПФ; для кислот с ${}^w pK_a < 4$ – элюент с ${}^w pH$ 2.85 и $[HCOO^-] = 2.5-5$ мМ, в обоих случаях в соотношении 10/90 об.% с ацетонитрилом. Таким образом, путем грамотного варьирования влияющих параметров подвижной фазы можно добиться эффективного разделения ионизируемы соединений в изократическом гидрофильном режиме без привлечения оборудования для ионной хроматографии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Dejaegher B., Vander Heyden Y. *J. Sep. Sci. J Sep Sci*, 2010; 33(6-7): 698-715.
2. Zatrakha A. V., Smolenkov A.D., Shpigun O.A. *Anal. Chim. Acta*. 2016; 904: 33-50.
3. Chikurova N.Y., Gorbovskaia A.V., Stavrianidi A.N., Fedorova E.S., Shemyakina A.O., Buryak A.K., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V., Shpigun O.A. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(7): 637-647
4. Gorbovskaia A.V., Kvachenok I.K., Stavrianidi A.N., Uzhel A.S., Shpigun O.A. *Microchem. J.* 2024; 199: 110075.
5. McCalley D.V. *Journal of Chromatography A*. 2017; 1523: 49-71.
6. Kawachi Y. *J. Chromatogr. A*. 2011; 1218(35): 5903-5919.
7. Iverson C.D., Gu X., Lucy C.A. *J. Chromatogr. A*. 2016; 1458: 82-89.
8. Khrisanfova A., Smagina M., Maksimov G., Tsizin G., Shpigun O., Chernobrovkina A. *J. Chromatogr. A*. 2025; 1758: 466201.
9. Shemiakina A., Xie A., Maksimov G., Chernobrovkina A. *LC-GC North Am.* 2024; International: 8-18.
10. Maksimov G.S., Shemiakina A. O., Uzhel A.S., Chernobrovkina A.V. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024; 24(2): 304-320.
11. McCalley D.V. *J. Chromatogr. A*. 2018; 1534: 64-74.
12. Škeřiková V., Jandera P. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217(51): 7981-7989.
13. Huang Y., Tian Y., Zhang Z., Peng C.. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012; 905: 37-42.
14. Chernobrovkina A.V., Kryzhanovskaya D.S., Uzhel A.S., Tsizin G.I., Shpigun O.A. *Industrial laboratory. Diagnostics of materials*. 2025; 91(8): 7-15.
15. Gorbovskaia A.V., Popkova E.K., Uzhel A.S., Shpigun O.A., Zatrakha A.V. *J. Anal. Chem.* 2023; 78(6): 748-758.
16. Espinosa S., Bosch E., Roses M. *Anal. Chem.* 2000; 72(21): 5193-5200.
17. Gagliardi L.G., Castells C.B., Rafols C., Roses M., Bosch E. *Anal. Chem.* 2007; 79(8): 3180-3187.
18. Subirats X., Casanovas L., Redon L., Roses M. *Adv. Sample Prep.*, 2023; 6: 100063.
19. Horváth C., Melander W., Molnár I. *Anal. Chem.* 1977; 49(1): 142-154.
20. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M. *Anal. Chim. Acta*. 2019; 1050: 176-184.
21. Li R., Huang J. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1041(1-2): 163-169.
22. Cox G.B., Stout R.W. *J. Chromatogr. A*. 1987; 384: 315-336.
23. Jovanović M., Stojanović B.J. *J.*



Chromatogr. A. 2013; 1301: 27-37.

24. Christopherson M.J., Yoder K.J., Hill J.T. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2006; 29(17): 2545-2558.

25. Qiu J., Craven C., Wawryk N., Carroll K., Li X-F. *J. Environ. Sci. (China)*. 2022; 117: 190-196.

Информация об авторах / Information about the authors

Г.С. Максимов – аспирант, м.н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

И.А. Дубинин – студент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

А.В. Горбовская – к.х.н., н.с. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

А.В. Пирогов – д.х.н., проф. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

О.А. Шпигун – чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

А.В. Чернобровкина – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

G.S. Maksimov – the postgraduate student, Junior Researcher, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

I.A. Dubinin – student, department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.V. Gorbovskaia – Researcher, Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.V. Pirogov – Professor, Dr.Sci. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

O.A. Shpigun – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr.Sci. (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia

A.V. Chernobrovkina – associate prof., Ph.D (chemistry), department of Analytical chemistry, Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia, E-mail: chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Статья поступила в редакцию 27.10.2025; одобрена после рецензирования 20.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.

The article was submitted 27.10.2025; approved after reviewing 20.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.