

## Сравнение метиленовой селективности для обращенно-фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии

Пирогов А.В., Пашкова Е.Б., Федорова И.А., Шпигун О.А.

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва*

Поступила в редакцию 29.10.2010 г.

### Аннотация

Показана перспективность использования микроэмульсий в качестве подвижных фаз для МЭЖХ. Показано, что эффективность разделения в режиме МЭЖХ сравнима с эффективностью в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ. Предложен подход к снижению давления в хроматографической системе в режиме МЭЖХ. Повышение температуры элюента с 20° до 40°С приводит к снижению давления в 1.6 раз. Предложен оптимальный путь получения стабильных микроэмульсий. Для уменьшения времени и температуры получения микроэмульсий необходимо производить последовательное добавление ПАВ в раствор. Проведено сравнение селективности подвижных фаз на основе микроэмульсий и водно-органического элюента. Впервые показана уникальная селективность разделения для режима МЭЖХ. Установлено, что зависимость удерживания носит линейный характер.

**Ключевые слова:** микроэмульсии, микроэмульсионная жидкостная хроматография, метиленовая селективность

Advantages of microemulsions as mobile phases in liquid chromatography were shown. The efficiency in MELC mode was found to be comparable with the efficiency in reversed-phase HPLC-mode. The way to reduce pressure in the chromatographic system in MELC mode was suggested. The increase of the temperature of the mobile phase leads to the pressure reduction in 1.6 times. The optimal way to obtain stable microemulsions was worked out. It was shown that the consequent addition of the components during the microemulsion preparation is necessary to reduce time and temperature of the microemulsion pretreatment. The selectivity of the microemulsion mobile phases was compared with the selectivity of the reversed-phase ones. The unique selectivity in the MELC mode was shown. The retention dependency was found to be linear for all the microemulsion mobile phases.

**Keywords:** microemulsion, microemulsion liquid chromatography, methylene selectivity

### Введение

Микроэмульсии – это дисперсные, размером несколько нанометров капли несмешивающейся жидкости в другой жидкости. В большинстве случаев эти капли представляют собой капли «масел», таких как октан, в воде. Благодаря высокому поверхностному натяжению между «маслом» и водой, эти жидкости не смешиваются друг с другом (рис.1).

Понижения поверхностного натяжения между «маслом» и водой добиваются путем введения в смесь поверхностно активного вещества, которое делает возможным формирование капель «масла», покрытых ПАВ, так называемое, мицеллообразование. В качестве немицеллообразующих веществ, которые также формируют микроэмульсию, используют *co*-ПАВ. К ним относятся малорастворимые спирты, амины, эфиры. *Co*-ПАВ также способствует понижению

поверхностного натяжения капли. Таким образом, добавлением ПАВ и со-ПАВ добиваются формирования стабильной, оптически прозрачной микроэмульсии.

Впервые термин "микроэмульсии" использовал профессор химии Колумбийского университета, Джек Н. Шульман, в 1959 году. Альтернативными названиями микроэмульсий служат так называемые прозрачные эмульсии, или солюбилизированные нефти [1].

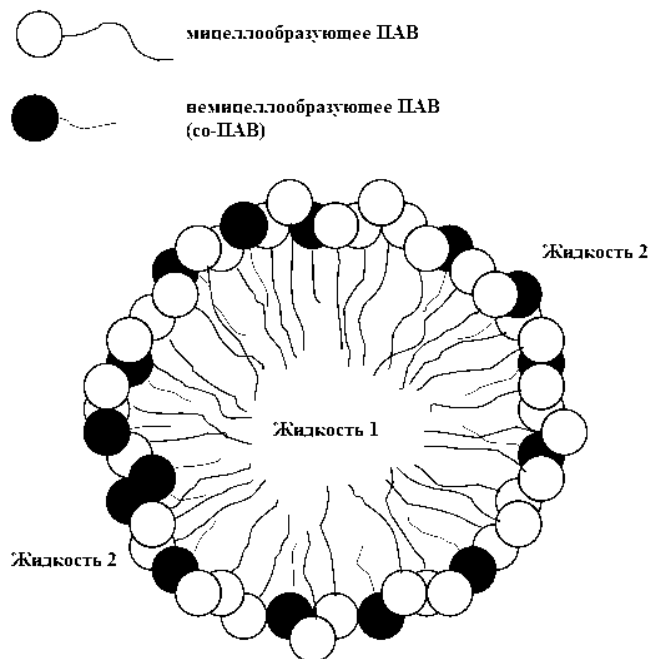


Рис. 1. Структура микроэмульсии

Микроэмульсионная жидкостная хроматография (МЭЖХ) – разновидность высокоэффективной жидкостной хроматографии, в которой подвижной фазой служат микроэмульсии. Несмотря на интенсивные исследования, многие аспекты использования микроэмульсий в аналитической химии, в частности, в ВЭЖХ, еще до конца не раскрыты. Метод МЭЖХ еще не успел обрести прочную теоретическую основу ввиду своего недавнего появления, именно поэтому исследования в этой области являются актуальными.

В настоящее время микроэмульсии еще не получили достаточно широкое распространение в качестве подвижных фаз для жидкостной хроматографии. В основном, область их применения ограничена определением лекарственных препаратов, как в фармацевтических субстанциях, так и в биологических жидкостях [2]. Основные области использования микроэмульсий представлены в табл. 1.

Селективности разделения веществ, строение которых различается на некоторую структурную единицу (метиленовая селективность) в жидкостной хроматографии посвящено довольно много публикаций. Это один из основных параметров, позволяющих охарактеризовать способность системы разделять гомологи. В литературе не описаны таковые характеристики для подвижных фаз на основе микроэмульсий, именно поэтому целью нашего исследования стало изучение метиленовой селективности для различных подвижных фаз в режиме МЭЖХ.

Таблица 1. Применение микроэмульсий в качестве подвижных фаз в ВЭЖХ

Применение	Условия анализа	Лит-ра
Разделение противоопухолевых препаратов	2% ДДСН, 10% <i>n</i> -бутанол, 1% <i>n</i> -октанол, 0.3% трифторуксусная кислота в 0,02М растворе фосфорной кислоты.	[3]
Разделение лекарственных средств и их примесей	3,3% ДДСН, 8% <i>n</i> -октанол, 6.6% <i>n</i> -бутанол в 10мМ растворе тетрабората натрия	[4]
Разделение симвастатина и 6 примесей	1,7% и 2,2% ДДСН, 7% бутанол, 89,9 и 90,4% водный раствор 25 мМ гидрофосфата натрия pH 7,0	[5,6]
Анализ лекарственных препаратов	3,3% ДДСН, 6.6% <i>n</i> -бутанол, 8% <i>n</i> -октан в 0,05% водном растворе трифторуксусной кислоты	[7]
Разделение лекарственных препаратов	8,33% ДДСН, 16.6% <i>n</i> -пентанол, 70% <i>n</i> -гептан, 5% раствор 70мМ ацетата натрия	[8]
Определение фосиноприлата в плазме человека	1,0% диизопропиловый эфир, 2,0% ДДСН, 6,0% <i>n</i> -пропанол, 91% водный раствор гидрофосфата натрия	[9]
Определение никардипина HCl в биологических жидкостях и препаратах	0,175 М ДДСН, 10% <i>n</i> -пропанол, 0.3% триэтиламин в 0,02М фосфорной кислоте, pH 6,5	[10]

## Эксперимент

Работу выполняли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1100 (Германия), оснащенным кварценомным градиентным насосом, он-лайн дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, спектрофотометрическим детектором со сменной длиной волны. Использовали колонку ZORBAX Eclipse XDB-C18 150 x 4,6 мм, 5 мкм (Германия). Детектирование осуществляли при 254 нм. Объем петли дозатора 20 мкл. Рабочая температура колонки +40 °С. Скорость подачи элюента составляла 0.5-0.7 мл/мин. Сбор и обработку данных проводили с использованием программно-аппаратного комплекса Chemstation, версии A.10.02.

В работе использовали ацетонитрил (gradient grade, "Panreac", Испания) и деионизованную воду с сопротивлением 18 МОм (Milli-Q, США). Для приготовления микроэмульсий применяли натрия додецилсульфат (ДДСН) (содержание вещества не менее 98%, "Panreac", Испания), *n*-бутанол (HPLC grade, "Panreac", Испания) и *n*-гептан (preparative, "Panreac", Испания). Приготовление микроэмульсий осуществляли с использованием ультразвуковой бани "УЗВ-4,0" (ЗАО "Сапфир", Россия). Точные навески отбирали на весах AR-2140 (Ohaus, США).

Для приготовления микроэмульсии точно взвешенную навеску ДДСН растворяли в необходимом количестве фосфатного буфера на ультразвуковой бане. Затем в смесь добавляли второе ПАВ, перемешивали, вносили гептан, бутанол и снова перемешивали на ультразвуковой бане до образования стабильной микроэмульсии. При получении микроэмульсий важно растворять ПАВ в воде последовательно. При одновременном добавлении ПАВ увеличивается время и

температура получения микроэмульсий. При последовательном введении ПАВ стабильная микроэмульсия образуется за 5 минут. При хранении при температуре +4°C микроэмульсия стабильна в течение месяца, а при +25°C - в течение недели.

В качестве модельного раствора для определения метиленовой селективности использовали смесь бензола, толуола, этилбензола, пропилбензола, и бутилбензола ("Экоаналитика", Россия) с концентрацией каждого вещества по 500 мкг/мл. Для отбора точного объема жидкостей использовали автоматический дозатор объемом 10-100 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более  $\pm 5\%$  (LABMATE, Польша). В зависимости от состава используемой подвижной фазы, данную смесь веществ разбавляли до требуемого объема раствором ацетонитрил-вода или микроэмульсией и тщательно перемешивали. Важным достоинством такой смеси является то, что времена удерживания компонентов не зависят от рН элюента.

## Результаты и их обсуждение

Обычно при изучении метиленовой селективности используют понятие инкремент – разность логарифмов факторов удерживания соответствующих пар веществ. Это важно для идентификации компонентов сложных смесей при отсутствии достоверных образцов сравнения. Параметр метиленовой селективности имеет принципиальное значение в обращенно-фазовой хроматографии, так как основными функционально активными поверхностными группами сорбента в этом случае являются именно алкильные радикалы [11].

Метиленовая селективность рассчитывается по параметрам удерживания двух веществ, различие в строение которых состоит в добавлении одной метиленовой группы: (A = R-R<sub>1</sub>) и (B = R-CH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>) [12]:

$$\alpha(CH_2) = \frac{k(B)}{k(A)} \quad \text{и} \quad \lg \alpha(CH_2) = \lg k(B) - \lg k(A)$$

Для идентификации гомологов можно использовать линейную зависимость инкремента пары от количества их метиленовых групп. Строение гомолога определяется по графику, построенному в координатах  $n(CH_2) - \lg k$ , (если его инкремент укладывается в линейный диапазон зависимости). Для этого проводят перпендикуляр от известного инкремента и экстраполируют его на ось  $n(CH_2)$ . Такой способ применим только при условии того, что последовательные инкременты отличаются на одну и ту же величину (лежат на одной прямой). Но достаточно строго это условие выполняется только для групп одинакового вида. Таким образом, часто происходит отклонение удерживания бензола в ряду алкилбензолов в координатах «число метиленовых групп» - «параметр удерживания» ( $n(CH_2) - \lg k$ ).

Кроме того, на такие отклонения сильно влияет состав подвижной фазы. Существуют данные, что минимальное отклонение от прямой достигается при 30-40% содержании ацетонитрила в подвижной фазе [13].

Одним из недостатков использования микроэмульсий в качестве подвижной фазы является необходимость проводить анализ при высоком давлении. Это связано с высокой вязкостью микроэмульсий. Чтобы понизить их вязкость, нами предложено повышение температуры элюента. При повышении температуры с 20° до 40°C наблюдается понижения давления с 160 до 100 бар. Дальнейшее повышение температуры нецелесообразно из-за ухудшения соотношения сигнал-шум детектора.

В режимах обращенно-фазовой и микроэмульсионной жидкостной хроматографии получены хроматограммы тестовой смеси (рис. 2).

По каждой из полученных хроматограмм для каждого компонента тестовой смеси рассчитаны исправленное время удерживания ( $t'$ ), коэффициент емкости ( $k'$ ) и число теоретических тарелок ( $N$ ). Эти характеристики приведены в табл. 2.

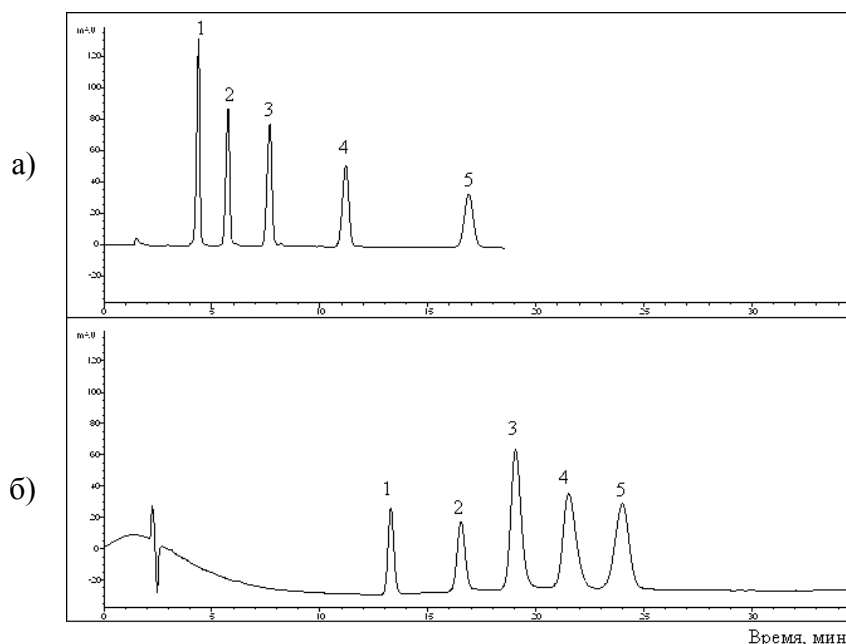


Рис. 2. Хроматограммы тестовой смеси. Режим обращенно-фазовой (А) и микроэмульсионной (Б) жидкостной хроматографии. Пики: 1- бензол, 2 – толуол, 3 – этилбензол, 4 – пропилбензол, 5 – бутилбензол. Колонка ZORBAX Eclipse XDB-C18 150 x 4,6 мм. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 254 нм

Таблица 2. Хроматографические характеристики смеси бензола, толуола, этилбензола, пропилбензола, полученные при анализе смеси с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил-вода и микроэмульсии

Элюент	Соединение	$t_R'$ , мин	$k'$	Ширина пика, мин	Эффективность, ТТ/м
Ацетонитрил-вода	бензол	2,86	1,87	0,80	3300
	толуол	4,23	2,76	0,83	5300
	этилбензол	6,16	4,03	0,88	8000
	пропилбензол	9,68	6,33	1,20	9300
	бутилбензол	15,37	10,05	1,35	16600
Микроэмульсия	бензол	11,05	4,92	1,08	16000
	толуол	14,29	6,37	1,5	12700
	этилбензол	16,82	7,49	1,8	12000
	пропилбензол	19,27	8,59	2,15	10700
	бутилбензол	21,76	9,70	2,35	11300

Соотношение ацетонитрил-вода в подвижной фазе для обращенно-фазового варианта выбрано с целью сократить время анализа (18 мин) до времени, сопоставимого с режимом МЭЖХ, и одновременно добиться хорошего разрешения пиков компонентов смеси. Зависимости исправленного времени удерживания от состава гомолога для режимов обращенно-фазовой и микроэмульсионной ВЭЖХ приведены на рис.3.

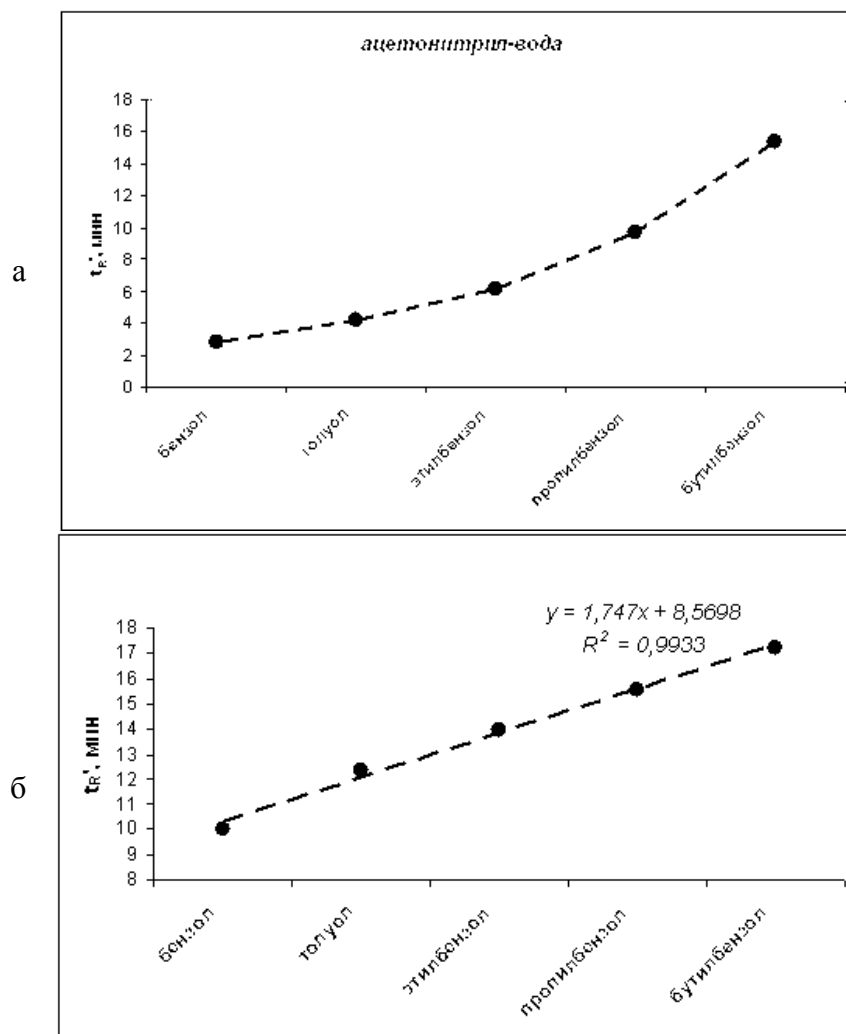


Рис. 3. Зависимость исправленного времени удерживания компонентов тестовой смеси. Режимы: Обращенно-фазовая (А), элюент ацетонитрил – вода (40:60 масс.%) и микроэмульсионная хроматография (Б), элюент: 3% ДДСН, 0,3% неионогенное ПАВ дехипон Is54, 0,8% гептан, 8% н-бутанол, фосфатный буферный раствор с рН 7

Можно сделать вывод о том, что зависимость исправленного времени удерживания гомологов для обращено-фазовой ВЭЖХ (элюент: ацетонитрил-вода) не является линейной. Это характерно для данного вида хроматографии, но увеличивает возможность ошибки идентификации.

Нами было впервые установлено, что в микроэмульсионной хроматографии аналогичная зависимость является линейной. Линейная зависимость повторяется при использовании микроэмульсий различного состава, а также при введении в качестве со-ПАВ неионогенных или анионных соединений. Это дает возможность лучше предсказывать времена удерживания компонентов анализируемой смеси. Причина получения линейной зависимости заключается, по-видимому, в ином механизме взаимодействия определяемых веществ с каплями микроэмульсий и неподвижной фазы. Кроме того, в случае микроэмульсионной ВЭЖХ повышается эффективность разделения.

Можно сделать вывод о целесообразности использования микроэмульсий в качестве подвижной фазы для определения органических гомологов. Это повышает

вероятность успешного разделения и идентификации гомологов и других родственных соединений.

### Список литературы

1. Dorsey J., DeEtchegaray M., Landy J. Enhancement in micellar liquid chromatography. // *Anal.Chem.* 1983. V.55. № 6. P. 924-928.
2. Ronald R. Eitenmiller W. O., Landen Jr. Vitamin analysis for the health and food sciences, second edition. 2007. CRC Press. 664p.
3. El-Sherbiny Mohamad D., El-Ashry S. Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography. // *J.Sep.Sci.* 2003. V.26. N.6. P. 503-509.
4. Garti N., Bisperink C. Double emulsions: progress and applications. // *Current Opinion Coll. Inter.Sci.* 1998. V.3. N.6. P. 657-667.
5. Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Jančić B., Ivanović D. Influence of structural and interfacial properties of microemulsion eluent on chromatographic separation of simvastatin and its impurities // *J.Chromatogr.A.* 2006. V.1131. N.1-2. P.67-73.
6. Malenović A, Medecina M, Ivanović D, Jančić B. Monitoring of Simvastatin Impurities by HPLC with Microemulsion Eluents // *Chromatographia.* 2006. V.63. N.13.(Supplement) P. S95-S100.
7. Marsh A., Clark B., Altria K Oil-in-water microemulsion LC determination of pharmaceuticals using gradient elution. // *Chromatographia.* 2005. V.61. N.11. P.539-547.
8. Altria K., Broderick M., Donegan S., Power J. Preliminary study on the use of water-in-oil microemulsion eluents in HPLC. // *Chromatographia.* 2005. V.62. N.7. P. 341-348.
9. Jančić B., Medenica M., Ivanović D. Malenović A., Dimković N. Development of liquid chromatographic method for fosinoprilat determination in human plasma using microemulsion as eluent. // *J.Chromatogr.A.* 2005. V. 1088. №.1-2. P.187-192.
10. Walash M., Belal F., El-Enany N., Abdelal A.N. Microemulsion liquid chromatographic determination of nifedipine hydrochloride in Pharmaceuticals preparations and biological fluids. Application to stability studies. // *J.Liq.Chromatogr. and Relat.Technol.*, 2007. V.30. N.8. P.1015- 1034.
11. Sherbiny D., Mohamad D., El-Ashry S. Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography. // *J.Sep.Sci.* 2003. V.26. N.6. P. 503-509.
12. Дейнека В.И. Хроматографические методы в исследовании биологически активных веществ растительных материалов. Автореферат дисс. д-ра хим. наук. Белгород. 2008. 48с.
13. Дейнека В.И. Метиленовая селективность в условиях обращенно-фазовой хроматографии одного ряда гомологов. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* Т.7. Вып.2. Белгород. 2007. С.236-243.

---

**Пирогов Андрей Владимирович** - д.х.н.,  
вед. научный сотрудник, Московский  
государственный университет им.  
М.В.Ломоносова, химический факультет,  
кафедра аналитической химии., тел. (495) 939-  
46-87

**Pirogov Andrey V.** –Dr. Sc. Chem, Leading  
Scientist., the chair of analytical chemistry of  
Chemistry department of M.V. Lomonosov  
Moscow State University, Moscow, e-mail:  
[Pirogov@analyt.chem.msu.ru](mailto:Pirogov@analyt.chem.msu.ru)

**Пашкова Елена Борисовна** – аспирантка, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва, тел. (495) 939-46-87

**Федорова Ирина Александровна** – студентка. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва, тел. (495) 939-46-87.

**Шпигун Олег Алексеевич** – д.х.н., проф., Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии, Москва, тел. (495) 939-13-82

**Pashkova Elena B.** –post-graduate student., the chair of analytical chemistry of Chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: [E\\_pashkova@list.ru](mailto:E_pashkova@list.ru)

**Fedorova Irina A.** –student., the chair of analytical chemistry of Chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

**Shpigun Oleg A.** – corresponding member of Russ. Acad. Sci., Dr. Sc. Chem, Prof., the head of the laboratory of chromatography, the chair of analytical chemistry of Chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: [shpigun@analyt.chem.msu.ru](mailto:shpigun@analyt.chem.msu.ru)

УДК 543.544.6

## Влияние строения функциональной группы на свойства новых полистирол-дивинилбензольных анионообменников

Затираха А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва*

Поступила в редакцию 11.11.2010 г.

### Аннотация

В результате синтеза, включающего последовательное ацилирование сополимера стирола и дивинилбензола с 25%-ной сшивкой, восстановительное аминирование карбонильных групп и последующее алкилирование, получены новые сорбенты для ионной хроматографии. Используя различные алкилирующие агенты из класса галогеналканов и оксиранов, варьировали структуру функциональной группы анионообменников. В варианте ионной хроматографии с подавлением фоновой электропроводности и кондуктометрическим детектированием изучено поведение на полученных сорбентах семи неорганических анионов: фторида, хлорида, нитрита, нитрата, бромиды, фосфата и сульфата. Анионообменники, полученные при алкилировании оксиранами, характеризуются лучшей селективностью, более высокой эффективностью и меньшим влиянием матрицы на удерживание поляризуемых нитрат- и бромид-ионов.

**Ключевые слова:** анионообменники, полистирол-дивинилбензол, ионная хроматография

New anion exchangers for ion chromatography were obtained as a result of the synthesis including acetylation of styrene-divinylbenzene copolymer, containing 25% of divinylbenzene, reductive amination of carbonyl groups and following alkylation. The structure of functional groups was varied using different alkylating agents. By means of suppressed ion chromatography with conductometric detection the behavior of seven inorganic anions, namely, fluoride, chloride, nitrite, nitrate, bromide, phosphate and sulphate were studied on obtained anion exchangers. Anion exchangers alkylated with epoxides are characterized with higher efficiency and have less influence of polystyrene-divinylbenzene matrix on the retention of polarizable ions of nitrate and bromide.

**Keywords:** anion exchangers, polystyrene-divinylbenzene, ion chromatography