



УДК 543.544.5.068.7

## Исследование загрузочных свойств монолитных колонок для ВЭЖХ на основе пористых органических полимеров

Юдина Ю.С.<sup>1</sup>, Патрушев Ю.В.<sup>1,2</sup>, Сидельников В.Н.<sup>2</sup><sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск<sup>2</sup>Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Поступила в редакцию 26.10.2016 г.

Исследованы загрузочные свойства монолитных хроматографических колонок для ВЭЖХ с сорбентами на основе 1-винилимидазола и 4-винилпиридина. Проведено сравнение загрузочных свойств данных колонок с коммерческой микронасадочной колонкой Диасфер-250-СТ. Показано, что при составе элюента ацетонитрил/вода, равном 60/40 величины загрузок для монолитных колонок выше, чем для насадочной колонки с аналогичными габаритами. При составе элюента ацетонитрил/вода, равном 20/80 величины загрузок для монолитных колонок и для насадочной колонки примерно одинаковы.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, монолитные колонки, пористые полимеры, 1-винилимидазол, 4-винилпиридин.

## The study of probe loading capacity of HPLC monolithic columns based on organic porous polymers

Yudina Y.S.<sup>1</sup>, Patrushev Y.V.<sup>1,2</sup>, Sidelnikov V.N.<sup>2</sup><sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk<sup>2</sup>Boriskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk

The loading properties of HPLC monolithic columns based on 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine were studied. These properties were compared with commercial packed column (Diasfer-250-ST) of the same dimension based on divinylbenzene-styrene polymer.

It was shown that for dried monolith sorbents the textural characteristics (specific surface area, pore volume and dimensions) can't be used as a sample loading indicator. This is connected with a porous system modification in the organic monolith placed in a «good» solvent. Diasfer column packaging material is not affected by the solvent.

Therefore, proper selection of the mobile phase composition for investigated monolithic columns allow to work with the large samples about 100 µg. This is significantly exceeds the quantity of the sample size to a Diasfer packed column (30-40 µg).

**Keywords:** HPLC, monolithic columns, porous polymer, 1-vinylimidazole, 4-vinylpyridine.

### Введение

Монолитные колонки на основе органических полимеров для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) впервые были приготовлены в конце 1980-х годов [1-4]. Основное отличие данных колонок от насадочных заключается в

том, что сорбент в виде монолита синтезирован непосредственно в колонке, распределен по её объему и имеет развитую систему транспортных пор [5]. Интерес к монолитным материалам связан как с относительной простотой приготовления, так и с возможностью создания колонок, обладающих одновременно удовлетворительной эффективностью и высокой проницаемостью [6].

Наряду с такими характеристиками хроматографических колонок, как эффективность, селективность и проницаемость, существует не менее важная – загрузочная ёмкость. При введении в колонку небольшого количества вещества пик на хроматограмме, как правило, симметричен и имеет гауссову форму. При увеличении количества введенного вещества возможно искажение формы пика и, как следствие, снижение эффективности разделения. В этом случае говорят о перегрузке колонки пробой [7-10]. Поэтому необходимо представлять, при каком количестве вводимого вещества колонка теряет свою эффективность и разделительные свойства. Загрузочные свойства хроматографических колонок определяются, прежде всего, площадью поверхности сорбента. Чем больше площадь поверхности, тем большее количество вещества можно ввести в колонку без ухудшения ее эффективности. Однако, в случае монолитных сорбентов органического происхождения ситуация несколько иная. Известно, что эти сорбенты различаются по текстурным свойствам в зависимости от того, находятся они в сухом состоянии или в среде органического растворителя [11]. Поэтому исследование свойств колонок с органическим сорбентом необходимо проводить в среде подвижной фазы (ПФ), где данный сорбент будет использован качестве материала колонки [12-16].

В данной работе исследованы загрузочные свойства ВЭЖХ колонок с монолитными сорбентами на основе пористого полимера дивинилбензол (ДВБ) – стирол (Ст) с добавкой 1-винилимидазола (ВИ) и 4-винилпиридина (ВП), впервые описанных в работе [17]. Проведено сравнение загрузочных свойств монолитных колонок с коммерческой насадочной колонкой Диасфер-250-СТ на основе дивинилбензол-стирольного полимера, а также текстурных свойств сорбентов, использованных в данных колонках.

## Эксперимент

В работе использовали жидкостный хроматограф Милихром А-02 с автоматическим дозатором. В качестве колонки сравнения применяли полумикроколонку длиной 75 мм и внутренним диаметром 2 мм с сорбентом Диасфер-250-СТ (сорбент на основе дивинилбензол-стирольного полимера, диаметр гранул 5 мкм) (колонка производства ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г. Новосибирск). В работе использовали следующие реактивы: вода деионизованная (0.05 мкСм/см), ацетонитрил (НПО Экрос, Санкт-Петербург), триметилсилилпропилметакрилат, стирол (99%), дивинилбензол (80%, смесь изомеров), 1-винилимидазол (99%), 4-винилпиридин (99%), перекись бензоила, Pluronic 10R5 (все реактивы от Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

Приготовление колонок. Готовили полимеризационную смесь, состоящую из сомономеров: стирол, дивинилбензол, 1-винилимидазол (или 4-винилпиридин). Состав полимеризационных смесей представлен в табл. 1. В качестве порообразователя для формирования транспортных пор использовали полиалкиленгликоль Pluronic 10R5. Стеклообразную трубку предварительно обрабатывали 3-(триметоксисилил)-пропилметакрилатом по методике, описанной в [18]. После обработки трубку промывали ацетонитрилом, сушили в токе азота, заполняли полимеризационной смесью и запаивали оба конца. Далее трубку помещали в воздушный термостат на 4 ч. при

температуре 80°C. После этого трубку с образовавшимся монолитом охлаждали и вырезали колонку нужной длины. Таким образом были приготовлены монолитные колонки диаметром 2 мм и длиной 90 мм. Сорбент представлял собой единый проницаемый монолит по всей длине колонки, который не деформировался и не растрескивался в процессе эксплуатации.

Таблица 1. Состав полимеризационных смесей для приготовления колонок.

| Колонка | Pluronic 10R5, см <sup>3</sup> | Стирол, см <sup>3</sup> | ДВБ, см <sup>3</sup> | ВИ, см <sup>3</sup> | ВП, см <sup>3</sup> |
|---------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| ВИ25*   | 3                              | 0.5                     | 1                    | 0.5                 | 0                   |
| ВП30*   | 3                              | 0.4                     | 1                    | 0                   | 0.6                 |

\* Число в названии колонок обозначает процентное (по объему) содержание соответствующего мономера в исходной полимеризационной смеси

Определение загрузочных характеристик хроматографических колонок и текстурных свойств сорбентов. Для исследования свойств монолитных сорбентов их извлекали из готовых колонок, после чего проводили определение текстурных характеристик. Изотермы адсорбции азота для приготовленных монолитов и для сорбента Диасфер-250-СТ получали на приборе Autosorb-6В (Quantachrome, США) при 77 К. Перед измерением образцы тренировали в вакууме при 150°C в течение 20 ч. Удельную поверхность, объем пор и средний размер пор рассчитывали методом Баррета – Джойнера - Халенды (ВЖН) по адсорбционной ветви.

Определение загрузочной емкости колонок проводили по 1-нитропропану, растворенному в ацетонитриле. Эксперимент осуществлялся при составе подвижной фазы ацетонитрил/вода 60/40 и 20/80 в изократическом режиме элюирования. Объемная скорость подвижной фазы во всех измерениях составляла 100 мкл/мин.

Оценка способности к набуханию сорбента проводилась путём определения объема пика неударживаемого вещества в зависимости от состава подвижной фазы. В качестве неударживаемого вещества использовали тиомочевину. Состав подвижной фазы варьировали от 100 до 0 об. % ацетонитрила с шагом 10 об. %.

## Обсуждение результатов

На рис. 1 представлены изотермы адсорбции для исследованных сорбентов. Видно, что для сорбентов ВИ25 и ВП30 изотермы относятся ко второму типу, который характерен для непористых или широкопористых материалов [19]. Изотерма адсорбции для сорбента Диасфер-250-СТ имеет петлю гистерезиса и, следовательно, позволяет говорить о наличии в нем микропор. Из табл. 2 видно, что значения удельной площади поверхности и объема пор для сорбента Диасфер-250-СТ существенно превышают значения для приготовленных монолитных сорбентов ВИ25 и ВП30. Следовательно, можно ожидать, что и загрузочная емкость для колонки с сорбентом Диасфер-250-СТ должна быть выше, чем для приготовленных монолитных колонок. Вклад микропор в удельную поверхность для диасфера составляет 108 м<sup>2</sup>/г, что сопоставимо со всей удельной площадью поверхности. Монолиты ВИ25 и ВП30 не содержат микропор, что приводит к низким значениям удельной поверхности (табл. 2). Столь малые значения удельных площадей поверхности, на первый взгляд, вызывают сомнение в том, могут ли данные монолиты быть использованы в качестве хроматографических материалов. Однако известно, что органические сорбенты способны набухать в «хороших» растворителях и таким образом текстурные свойства сухого и набухшего сорбента может значительно различаться, а сам процесс набухания может приводить к изменению пористой структуры сорбента [11].

Таблица 2. Текстуальные характеристики сорбентов, используемых в работе.

| Сорбент в Колонках | $S_{уд}, \text{ м}^2/\text{г}$<br>(мезопоры) | $S_{уд}, \text{ м}^2/\text{г}$<br>(микропоры) | $V_{пор}, \text{ см}^3/\text{г}$ | $D_{пор}, \text{ \AA}$ |
|--------------------|--|---|----------------------------------|------------------------|
| ВП30               | 1.5  | -   | 0.006                            | 171                    |
| ВИ25               | 3.5  | -   | 0.015                            | 175                    |
| Диасфер-250-СТ     | 139.4  | 108   | 0.396                            | 113                    |

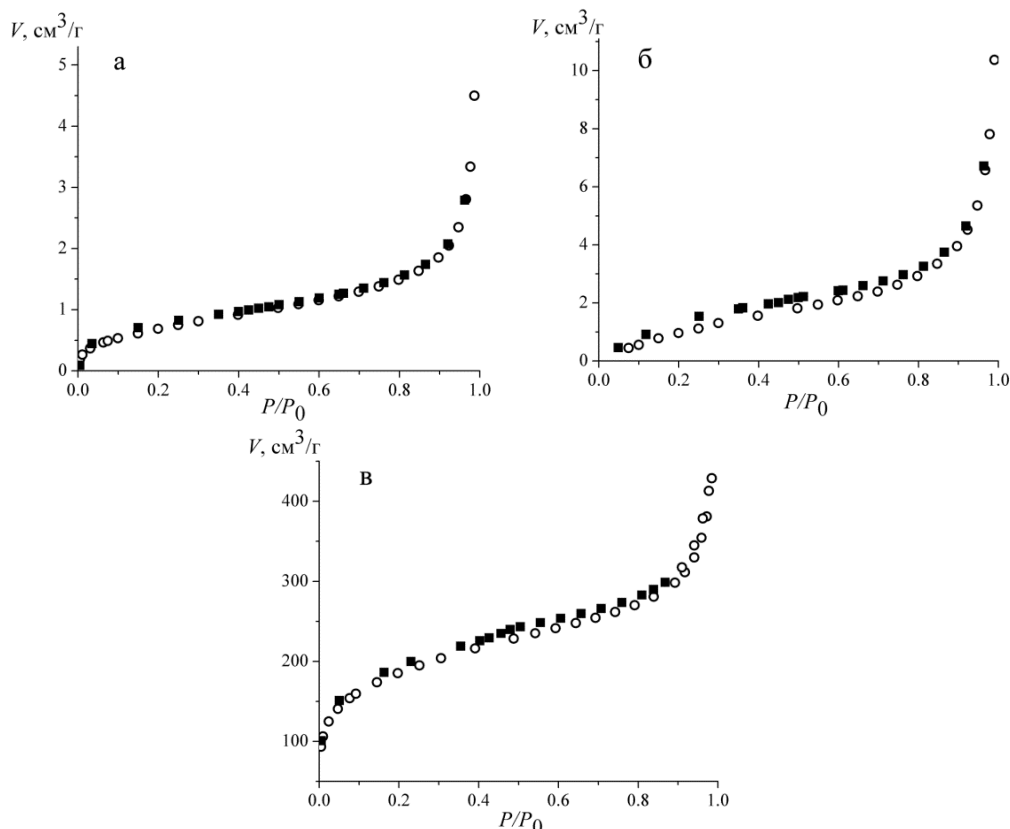


Рис. 1. Изотермы адсорбции, а – ВП30, б – ВИ25, в - Диасфер-250-СТ.

Ранее было показано, что изменение поровой системы сорбента сопровождается изменением формы элюируемых пиков и объема, в котором они могут быть элюированы [15]. Для изучения набухания исследуемых сорбентов определяли объем элюирования пика неудерживаемого вещества (тиомочевина) в зависимости от состава подвижной фазы. Для этого элюировали тиомочевину на исследуемых колонках при различном составе ПФ с содержанием в ней от 0 до 100 об. % ацетонитрила в воде, увеличивая её содержание с шагом в 10 об. %. Для каждого значения состава ПФ определяли объем, при котором происходит элюирование пика тиомочевина от его начала до конца. Из рисунка 2 видно, что для монолитных колонок при малых значениях объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе (до 20%) объемы пика тиомочевина в разы выше тех, что наблюдаются при более высоких соотношениях ацетонитрил/вода. В то же время для колонки Диасфер-250-СТ элюируемый объем не зависит от содержания воды в подвижной фазе. По всей видимости такое поведение Диасфера связано с тем, что он обладает жестко сшитой структурой с системой пор, на которую не влияет состав подвижной фазы.

На рис. 2 (вставка) представлены профили пика тиомочевина при объемной доле ацетонитрила 10% для всех исследуемых колонок. Видно, что при данном значении соотношения ацетонитрил/вода в подвижной фазе наблюдается искажение

формы пика тиомочевины для всех колонок кроме колонки Диасфер-250-СТ. Аналогичная картина наблюдается во всех случаях, когда объемная доля ацетонитрила в подвижной фазе была менее 20%. Такая ситуация может возникнуть в том случае, когда пористая структура гидрофобного монолитного сорбента плохо смачивается подвижной фазой, где основную долю (более 80%) составляет вода. Следствием этого может являться уменьшение доступного пористого пространства монолитного сорбента для элюируемых веществ.

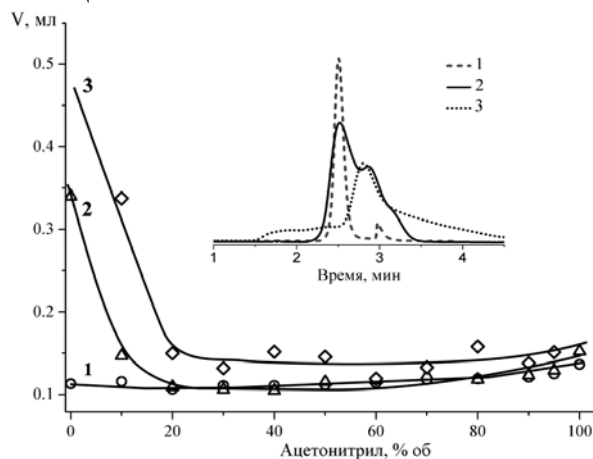


Рис. 2. Зависимости объемов элюирования пика тиомочевины от состава подвижной фазы. 1 - Диасфер-250-СТ, 2 – ВИ25, 3 – ВП30. На вставке форма пика тиомочевины при соотношении ацетонитрил/вода 10/90.

Уменьшение доступности пор должно приводить к уменьшению загрузочной емкости колонки. Рассмотрим, как меняется данная характеристика колонки в условиях, когда ПФ хорошо смачивает неподвижную фазу и сравним полученный результат с тем случаем, когда подвижная фаза слабо смачивает сорбент. Для оценки загрузочной способности колонки определяли эффективность ( $N$ ) по пику 1-нитропропана при различных количествах данного анализа. Определяли максимальную эффективность колонки  $N_{\max}$  при самом низком значении количества 1-нитропропана, введенного в колонку. Затем определяли эффективности  $N$  при различных величинах загрузки. Полученные значения делили на  $N_{\max}$ . Таким образом, исследовали изменение эффективности по отношению к максимальной эффективности колонки  $N/N_{\max}$ . На рис. 3 представлены характерные зависимости относительной эффективности колонок от величины вводимой пробы 1-нитропропана при составе ПФ вода/ацетонитрил = 40/60. Данный состав выбран по той причине, что он относится к среднему значению в той области, когда форма пиков для всех колонок не искажена и близка к гауссовой. Видно, что коммерческая насадочная колонка Диасфер-250-СТ наиболее чувствительна к величине вводимой пробы по сравнению с монолитными колонками. Если считать, что колонка перегружена тогда, когда эффективность ее уменьшается на 20 % от максимального значения, то величины перегрузки составляют 37 мкг для насадочной колонки Диасфер-250-СТ, 90 мкг для ВИ25 и 105 мкг для ВП30.

Совсем иная картина по загрузкам колонок получается при составе подвижной фазы ацетонитрил/вода 20/80. Данное соотношение элюентов было выбрано в связи тем, что 80 об. % воды в ПФ – это максимально возможные условия, при которых пики близки к гауссовой форме, что позволяет корректно рассчитать эффективность колонок. При увеличении количества воды происходит уширение пиков, они

теряют гауссову форму и даже могут иметь несколько вершин (см. вставку на рис. 2).

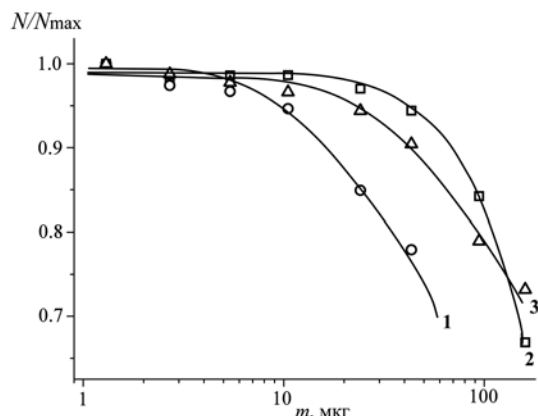


Рис. 3. Зависимости относительной эффективности от величины пробы при составе элюента вода/ацетонитрил = 40/60. 1 – Диасфер-250-СТ, 2-ВП30, 3 – ВИ25.

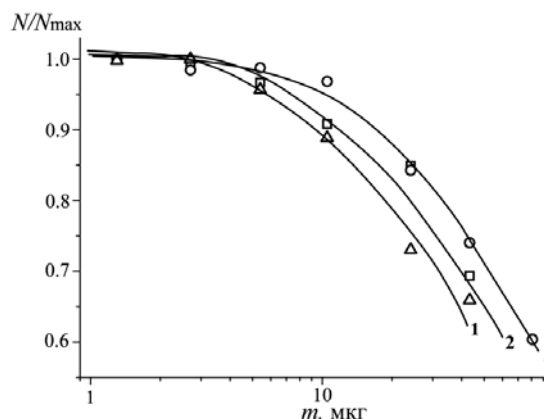


Рис. 4. Зависимости относительной эффективности от величины пробы при составе элюента вода/ацетонитрил = 80/20. 1 – ВИ25, 2-ВП30, 3 – Диасфер-250-СТ.

Из зависимостей на рис. 4 видно, что при большом содержании воды в ПФ (80 %) насадочная колонка Диасфер-250-СТ обладает такими же загрузочными свойствами (30 мкг), как и при содержании воды в ПФ 40%. В свою очередь, значения величин пробы для монолитных колонок при содержании воды в ПФ 80 об. % отличаются примерно в 5 раз от значений величин пробы, определяемых при 40 об. % воды в элюенте. Так, для колонки ВП30 величина загрузки составляет 30 мкг, а для колонки ВИ25 – 17 мкг. Таким образом, несмотря на большую разницу в удельной площади поверхности (см. табл. 2) загрузочные свойства исследуемых монолитных колонок и насадочной колонки примерно сопоставимы при содержании воды в ПФ 80 об. %. Возможно, это связано с тем, что при 20 об. % ацетонитрила в подвижной фазе монолитный сорбент способен в некоторой степени набухать.

### Заключение

Таким образом, исследование загрузочных свойств монолитных колонок с неподвижными фазами на основе дивинилбензол (ДВБ) – стирол (Ст) с добавкой 1-винилимидазола (ВИ) и 4-винилпиридина (ВП), и коммерческой насадочной колонки показало, что текстурные характеристики (площадь поверхности, объем и размеры пор) полученные для сухого образца не являются индикатором загрузочных возможностей. Загрузочные свойства колонок с исследованными монолитными материалами зависят от состава подвижной фазы использованной в процессе хроматографирования. При правильном подборе состава подвижной фазы монолитные колонки позволяют работать с пробами, величины которых достигают порядка 100 мкг, что, в свою очередь, значительно превышает значение величины пробы для насадочной колонки с аналогичными геометрическими размерами и сходным химическим составом сорбента.

## Список литературы

- Hjertén S., Liao J.L., Zhang R. // *J. Chromatogr. A*. 1989. Vol. 473, pp. 273-275.
- Tennikova T.B., Bleha M., Svec F. // *J. Chromatogr. A*. 1991. Vol. 555, pp. 97-107.
- Svec F., Fréchet J. // *Anal. Chem.* 1992. Vol. 64, No 7, pp. 820-822.
- Wang Q.C., Svec F., Fréchet J.M.J. // *Anal. Chem.* 1993. Vol. 65, No 17, pp. 2243-2248.
- Kubin M., Spacek P., Chromeczek R. // *Coll. Czechosl. Chem. Commun.* 1967. Vol. 32, pp. 3881-3887.
- Guiochon G. // *J. Chromatography A*. 2007. Vol. 1168, pp. 101-168.
- Davies N.H., Euerby M.R., McCalley D.V. // *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1138, pp. 65-72.
- Davies N.H., Euerby M.R., McCalley D.V. // *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1119, pp. 11-19.
- Eble J.E., Grob, R.L., Antle P.E., Snyder L.R. // *J. Chromatogr. A*. 1987. Vol. 405, pp. 31-60.
- Gray M.J., Slonecker P.J., Dennis G., Shalliker R.A. // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1096, pp. 92-100.
- Laher M., Causon T.J., Buchberger W., Hild S. et al. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85, No 12, pp. 5645-5649.
- Koeck R., Fischnaller M., Bakry R., Tesadri R. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406, No 24, pp. 5897-5907.
- Mohr J.H., Swart R., Huber C.G. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. Vol. 400, No 8, pp. 2391-2402.
- Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Pirogov A.V., Shpigun O.A. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2011. Vol. 66, No 6, pp. 351-355.
- Gritti F., Guiochon G. // *J. Chromatogr. A*. 2014. Vol. 1362, pp. 49-61.
- Nevejans F., Verzele M. // *J. Chromatogr. A*. 1985. Vol. 350, pp. 145-150.
- Юдина Ю.С. Патрушев Ю.В. // "Монолитные колонки для ВЭЖХ на основе азотистых гетероциклических соединений", Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием. 12-17 сентября 2016 г., Барнаул. 2016. С. 153.
- Gusev I., Huang X., Horváth C. // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 855, pp. 273-290.
- Sing K.S.W. // *Pure Appl. Chem.* 1982. Vol. 54, No 11, pp. 2210.

## References

- Hjertén S., Liao J.L., Zhang R., *J. Chromatogr. A*, 1989, Vol. 473, pp. 273-275.
- Tennikova T.B., Bleha M., Svec F., *J. Chromatogr. A*, 1991, Vol. 555, pp. 97-107.
- Svec F., Fréchet J., *Anal. Chem.*, 1992, Vol. 64, No 7, pp. 820-822.
- Wang Q.C., Svec F., Fréchet J.M.J., *Anal. Chem.*, 1993, Vol. 65, No 17, pp. 2243-2248.
- Kubin M., Spacek P., Chromeczek R., *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, 1967, Vol. 32, pp. 3881-3887.
- Guiochon G., *J. Chromatography A*, 2007, Vol. 1168, pp. 101-168.
- Davies N.H., Euerby M.R., McCalley D.V., *J. Chromatogr. A*, 2007, Vol. 1138, pp. 65-72.
- Davies N.H., Euerby M.R., McCalley D.V., *J. Chromatogr. A*, 2006, Vol. 1119, pp. 11-19.
- Eble J.E., Grob, R.L., Antle P.E., Snyder L.R., *J. Chromatogr. A*, 1987, Vol. 405, pp. 31-60.
- Gray M.J., Slonecker P.J., Dennis G., Shalliker R.A., *J. Chromatogr. A*, 2005, Vol. 1096, pp. 92-100.
- Laher M., Causon T.J., Buchberger W., Hild S. et al., *Anal. Chem.*, 2013, Vol. 85, No 12, pp. 5645-5649.
- Koeck R., Fischnaller M., Bakry R., Tesadri R. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, Vol. 406, No 24, pp. 5897-5907.
- Mohr J.H., Swart R., Huber C.G., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, Vol. 400, No 8, pp. 2391-2402.
- Smirnov K.N., Dyatchkov I.A., Pirogov A.V., Shpigun O.A., *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2011, Vol. 66, No 6, pp. 351-355.
- Gritti F., Guiochon G., *J. Chromatogr. A*, 2014, Vol. 1362, pp. 49-61.

16. Nevejans F., Verzele M., *J. Chromatogr. A*, 1985, Vol. 350, pp. 145-150.
17. Yudina Y.S. Patrushev Y.V., "Monolithic HPLC columns for nitrogen-based heterocyclic compounds", Proceedings of the X Russian Scientific Conference with international participation. 12-17 september 2016, Barnaul, 2016, pp. 153.
18. Gusev I., Huang X., Horváth C., *Journal of Chromatography A*, 1999, Vol. 855, pp. 273-290.
19. Sing K.S.W., *Pure Appl.Chem.*, 1982, Vol. 54, No 11, pp. 2210.

**Юдина Юлия Сергеевна** - студент факультета естественных наук Новосибирского государственного университета, Новосибирск

**Патрушев Юрий Валерьевич** - научный сотрудник, к.х.н., Институт катализа СО РАН им. Г.К. Борескова, Новосибирск

**Сидельников Владимир Николаевич** - д.х.н., профессор, старший научный сотрудник, зав. аналитической лабораторией. Институт катализа СО РАН им. Г.К. Борескова, Новосибирск

**Yudina Yulia S.** - Student of the Novosibirsk state university, Novosibirsk, E-mail: [julijaj94@mail.ru](mailto:julijaj94@mail.ru)

**Patrushev Yuri V.** - Ph.D. (chemistry), researcher. Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, E-mail: [patrush@catalysis.ru](mailto:patrush@catalysis.ru)

**Sidelnikov Vladimir N.** - prof., grand Ph.D (chemistry), senior researcher, head of the Analytical laboratory. Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk, E-mail: [vlad@catalysis.ru](mailto:vlad@catalysis.ru)