

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.544

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ 3-АМИНОПРОПИЛСИЛИКАГЕЛЯ С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АЗОТА В РЕЖИМЕ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Наталья Юрьевна Чикурова¹, Анна Олеговна Шемякина², Дарья Сергеевна Крыжановская³, Олег Алексеевич Шпигун⁴, Алла Валерьевна Чернобровкина⁵

¹⁻⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

Автор, ответственный за переписку: Алла Валерьевна Чернобровкина, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Аннотация: Проведено сравнение четырех аминофаз, представляющих собой партии 3-аминопропилсиликагеля с разным количеством привитых функциональных групп. Для оценки хроматографических свойств сорбентов использовали тест Танака для гидрофильных неподвижных фаз, а также изучали удерживание полярных веществ разных классов в гидрофильном режиме. Показано, что даже небольшие изменения в содержании азота между разными партиями 3-аминопропилсиликагеля оказывают существенное влияние на удерживание полярных аналитов. Продемонстрировано, что гидрофильность матрицы оказывает наибольшее воздействие на ее хроматографическое поведение, а ее оценка с помощью теста Танака является основой для выбора партии для разделения соединений конкретных классов полярных веществ или для дальнейшего модифицирования в целях получения новых фаз.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография, 3-аминопропилсиликагель, матрица, сахара, водорастворимые витамины, аминокислоты, органические кислоты, азотистые основания, нуклеозиды, тест Танака

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-3-245-255

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-13-00140) в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды», 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: Чикурова Н.Ю., Шемякина А.О., Крыжановская Д.С., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. Сравнение свойств 3-аминопропилсиликагеля с различным содержанием азота в режиме гидрофильной хроматографии. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 3. С. 245–255.

ORIGINAL ARTICLE

COMPARISON OF THE PROPERTIES OF 3-AMINOPROPYL SILICA WITH DIFFERENT NITROGEN CONTENT IN HILIC MODE

Natalia Yu. Chikurova¹, Anna O. Shemiakina², Daria S. Kryzhanovskaya³,
Oleg A. Shpigun⁴, Alla V. Chernobrovkina⁵

¹⁻⁵ Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department

Corresponding author: Alla V. Chernobrovkina, chernobrovkina@analyt.chem.msu.ru

Abstract. A comparison of 4 amino phases representing 3-aminopropyl silica batches with different amount of grafted functional groups was made. To evaluate the chromatographic properties of the adsorbents, the Tanaka test for hydrophilic stationary phases was used, and the retention of polar substances of various classes in HILIC mode was also studied. It is shown that even small changes in nitrogen content between different batches of 3-aminopropyl silica have a significant effect on the retention of polar analytes. Hydrophilicity of a substrate was shown to have the greatest effect on its chromatographic behavior, and its evaluation using the Tanaka test is the basis for a batch selection either for separation of particular classes of polar substances or for further modification aiming at obtaining new phases.

Keywords: HILIC, 3-aminopropyl silica, substrate, sugars, water-soluble vitamins, amino acids, organic acids, nitrogenous bases, nucleosides, Tanaka test

Financial Support. The work was carried out with the support of the Russian Science Foundation, grant No. 20-13-00140, within the framework of the Program for the development of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “The future of the planet and global environmental changes”, using the equipment of the MSU Central Research Center “Technologies for obtaining new nanostructured materials and their complex research”, acquired by MSU under the program for updating the instrument base within the national project “Science” and within the framework of the MSU Development Program.

For citation: Chikurova N.Yu., Shemiakina A.O., Kryzhanovskaya D.S., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. Comparison of the Properties of 3-Aminopropyl Silica with Different Nitrogen Content in HILIC Mode // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 3. S. 245–255.

При проведении первых работ в режиме гидрофильной хроматографии (ГИХ) [1–4] в качестве неподвижной фазы использовали силикагель, модифицированный аминокпропильными группами, и на сегодняшний день аминокпропильная фаза остается одной из самых распространенных в ГИХ [5]. Аминокпропильная фаза более популярна в определении углеводов, чем немодифицированный силикагель, так как они способствуют быстрой мутаротации, предотвращая получение двойных или несимметричных пиков вследствие неполного разрешения аномеров. Тем не менее, при использовании таких сорбентов существуют некоторые проблемы, так как аминокпропильная фаза реакционноспособнее других неподвижных фаз для гидрофильной ВЭЖХ и на ней может происходить необратимая

адсорбция, особенно кислотных соединений [6]. Однако реакционноспособные аминокпропильные группы являются перспективными для последующего модифицирования в целях увеличения гидрофильности, селективности и эффективности получаемых сорбентов, что позволяет использовать 3-аминокпропилсиликагель в качестве матрицы для дальнейшего модифицирования при создании новых неподвижных фаз.

Для синтеза сорбентов, в том числе и применяющихся в ГИХ, используют разнообразные реакции карбонильных соединений с аминокпропильными группами [7]. Например, в работе [8] для создания гидрофильной фазы Chocolate HILIC на основе аминокпропилсиликагеля применяли реакцию Майяра. В работах [9–11] с аминокпропильными группами

ми проводили реакцию Уги, одной из ключевых стадий которой является образование основания Шиффа с карбонильным соединением.

Силикагель с аминопропильными группами также легко вступает во взаимодействие с галогенсодержащими соединениями разнообразного строения [7]. Таким способом был получен многофункциональный сорбент для обращенно-фазовой (ОФ ВЭЖХ) и гидрофильной хроматографии при взаимодействии аминопропилсиликагеля и ацилхлорид каликс[4]арена, модифицированного тетрапропином [12].

Распространенным методом создания новых неподвижных фаз является реакция аминогрупп с различными кислотами, в том числе и с полимерными. Например, в работе [13] на поверхности аминопропилсиликагеля была иммобилизована гуминовая кислота, в работе [14] – полимолочная кислота, а полученные сорбенты успешно применяли как в ОФ ВЭЖХ, так и в ГИХ.

Синтез новых фаз может также включать взаимодействие реакционноспособных аминогрупп с эпоксидными кольцами [10, 15, 16]. Так, реакция аминопропилсиликагеля с диглицидиловыми эфирами разного строения позволяет либо создавать дендримерные структуры при повторении циклов модифицирования [17], либо увеличивать число закрепляемых функциональных групп и осуществлять их удаление от поверхности матрицы, а также обеспечивать увеличение анионообменной селективности благодаря кватернизации атомов азота [10].

Таким образом, 3-аминопропилсиликагель представляет собой одну из самых распространенных и успешно применяемых матриц для создания новых неподвижных фаз, содержащих как гидрофильные, так и гидрофобные фрагменты. Такую аминофазу получают модифицированием поверхности силикагеля коммерчески доступным 3-аминопропилтриэтоксисилоном [7] в соответствии со схемой.

Согласно данным элементного анализа, партии полученных аминофаз различаются количеством привитых функциональных групп. При использовании их в качестве матриц для синтеза сорбентов в недавних работах [10, 11] обнаружены существенные различия хроматографических свойств 3-аминопропилсиликагеля разных партий, характеризующихся близким содержанием азота и угле-

рода. Подобные различия партий матриц могут повлечь необходимость коррекции условий синтеза и повлиять на свойства получаемых на их основе сорбентов. Поэтому актуально подробное изучение свойств аминофаз в гидрофильном режиме ВЭЖХ.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы установить влияние содержания азота на хроматографические свойства аминопропилсиликагеля при разделении веществ разных классов в режиме гидрофильной хроматографии, а также выявить хроматографические параметры, с помощью которых можно охарактеризовать разные партии таких сорбентов в целях использования подходящих фаз для разделения соединений требуемых классов или в качестве матриц для дальнейшего модифицирования.

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

В работе использовали матрицы на основе силикагеля с привитыми аминопропильными радикалами (Диасфер-110-Амин, ЗАО «БиоХим-МакСТ», Россия) со сферическими частицами диаметром 5 мкм, содержащие 1,52; 1,67; 1,70 и 2,10% азота (средний диаметр пор 11 нм, удельная поверхность 200 м²/г; характеристики сорбентов предоставлены производителем), обозначенные М1, М2, М3 и М4 соответственно.

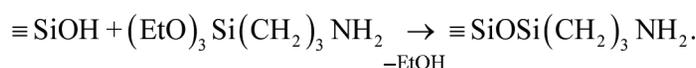
Для изучения свойств сорбентов использовали следующие вещества.

Толуол «х.ч.» («Компонент-Реактив», Россия); аденозин (>99,0%), урацил (>99,0%), теобромин (>98,0%), теofilлин (>98,0%), уридин (>98,0%), видарабин моногидрат (>98,0%), 5-метилуридин (>98,0%), 2'-дезоксинуридин (>98,0%), N,N,N-триметилфенил-аммоний хлорид (>98,0%), тозилат натрия (>90,0%) («ТСИ», Япония).

Сахара: D-(+)-рибоза (>98,0%), D-(+)-глюкоза (>99,5%), D-(+)-фруктоза (>99,9%), D-(+)-лактоза моногидрат (>98,0%), D-(+)-мальтоза моногидрат (>98,0%), D-(+)-сахароза (>98,0%), L-(+)-рамноза моногидрат (>98,0%), D-(+)-ксилоза (>98,0%), D-(+)-раффиноза пентагидрат («ТСИ», Япония).

Витамины: никотинамид (99,7%), кислота никотиновая («Sigma-Aldrich», США). Рибофлавин (В₂) (99%), пиридоксин гидрохлорид (В₆) (99%),

С х е м а



цианокобаламин (B_{12}) «ч.д.а.», аскорбиновая кислота (витамин С) (99%), тиамин (B_1) (>96%, «ТСИ», Япония).

Азотистые основания, нуклеозиды: тимин (>99%), гуанозин (>98,0%) («Sigma-Aldrich», Великобритания). Тимидин (>99,0%), аденин (>99,0%), цитозин (>99,0%), цитидин (>99,0%), гуанин (>98,0%), ксантин (>99,0%) («Sigma-Aldrich», Китай).

Органические кислоты: оксалат аммония, ацетат натрия («х.ч.» или «ч.д.а.», «Химмед», «Лабтех», Россия). Гликолевая кислота, формиат натрия, пируват натрия, малоновая кислота, яблочная кислота, сукцинат натрия, молочная кислота (все «х.ч.» или «ч.д.а.», «Panreac», Испания). Пропионат натрия «ч.д.а.» («AppliChem», Германия). Глутаровая кислота, фумаровая кислота «ч.д.а.» («Merck», Германия).

Для изучения хроматографических свойств сорбентов использовали следующие приборы: жидкостной хроматограф «Vanquish Flex» с флуоресцентным детектором «FLD» и диодно-матричным детектором «DAD» («Thermo Scientific», США); систему ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 («Thermo Scientific», США), состоящую из двухканального насоса высокого давления, автоматической системы ввода пробы, термостата для колонок и детектора на диодной матрице. Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью программного пакета Chromeleon 7 («Thermo Fisher Scientific», США). Для упаковки сорбентов использовали стальные колонки размером 100×3 , заполнение которых осуществляли с помощью насоса «Knauer K-1900» («Knauer», Германия).

Синтез сорбентов и заполнение хроматографических колонок

Для заполнения колонок использовали смесь 10 мл 0,1 М раствора KCl, 8 мл этанола и 2 мл 1,4-диоксана для приготовления суспензии сорбентов. В качестве подвижной фазы для сорбентов на основе силикагеля применяли дегазированный ацетонитрил. Заполнение колонки проводили при давлении 300–400 бар.

Результаты и их обсуждение

Среди наиболее доступных методов предварительного исследования модифицированных сорбентов на основе силикагеля распространение получил элементный анализ. Необходимо отметить, что при определении числа закрепленных на матрице аминопропильных радикалов обычно рекомендуется опираться на данные элемент-

ного анализа по азоту, поскольку при оценке по углероду возможны ошибки из-за недостаточно полного освобождения образца от непрореагировавших якорных алкоксигрупп [7]. Тем не менее, содержание азота в партиях аминопропилсиликагеля обычно составляет 1–3%, и надежность его определения невелика. При этом аминофазы, имеющие небольшие различия в содержании азота по результатам элементного анализа, могут демонстрировать значимые различия в хроматографических свойствах, которые будут влиять не только на необходимость изменения условий элюирования при использовании таких неподвижных фаз, но и на выбор условий их последующего модифицирования в случае применения в качестве матриц новых сорбентов. В настоящей работе проведено сравнение хроматографического поведения четырех аминофаз, представляющих собой партии 3-аминопропилсиликагеля с разным числом привитых функциональных групп, согласно данным элементного анализа по содержанию углерода и азота (таблица). Сравнение сорбентов осуществляли посредством изучения их хроматографических характеристик в гидрофильном режиме по удерживанию полярных соединений на примере сахаров, витаминов, органических кислот, аминокислот, азотистых оснований и нуклеозидов.

Представлялось интересным не только оценить соответствие хроматографических свойств аминофаз и данных элементного анализа в целях предсказания их сепарационных возможностей на основании характеристик, предоставляемых производителями аминопропилсиликагеля, но также установить параметры, с помощью которых можно было бы более подробно охарактеризовать новые партии аминофаз с точки зрения их возможностей по удерживанию и разделению полярных веществ, различных по природе. Для оценки гидрофильности, катионо- и анионообменной селективности аминофаз разных партий использовали тест Танака для гидрофильных сорбентов [18, 19], результаты которого представлены в таблице. Согласно полученным данным, метиленовая селективность $\alpha(CH_2)$ и селективность по отношению к стереоизомерам $\alpha(V/A)$ не имеют значимых различий среди изученных матриц, а параметры $\alpha(Tb/Tr) < 1$ соответствуют основной природе аминофаз.

Гидрофильность. Согласно факторам удерживания уридина $k(U)$, характеризующим гидрофильность сорбентов, существует тенденция к увеличению гидрофильности фаз по мере уве-

Т а б л и ц а 1

Величины коэффициентов селективности теста Танака*. Факторы удерживания витаминов и органических кислот

Матрица		M1	M2	M3	M4
Результаты элементного анализа					
Содержание, %	углерод (C)	5,74	6,32	6,40	5,88
	азот (N)	1,52	1,67	1,70	2,10
Селективность					
Тест Танака	$k(U)$	2,49	2,90	3,95	3,55
	$\alpha (CX)$	0,04	0,00	0,06	0,03
	$\alpha (AX)$	22,21	19,06	14,31	16,55
	$\alpha (V/A)$	1,58	1,33	1,36	1,38
	$\alpha (CH_2)$	1,22	1,36	1,49	1,37
	$\alpha (OH)$	1,86	1,81	2,09	1,63
	$\alpha (Tb/Tr)$	0,74	0,72	0,72	0,69
$k'(аденозин) / k'(аденин)$		1,35	1,37	1,47	1,73
Вещество		Факторы удерживания			
Витамины	V_3 амид	0,64	0,65	0,70	0,67
	V_6	1,81	1,94	2,17	2,06
	V_1	3,20	3,23	5,10	4,72
	V_2	4,75	4,79	5,19	5,52
	V_3 кислота	10,76	13,06	12,29	10,52
	V_{12}	11,40	11,86	13,71	14,49
	C	44,25	54,83	55,18	46,13
Органические кислоты	пировиноградная	0,87	0,77	0,77	0,74
	молочная	1,86	1,77	1,83	1,71
	уксусная	2,25	2,16	2,14	1,94
	гликолевая	2,90	2,89	3,06	2,67
	аскорбиновая	4,63	4,80	5,12	4,43
	фумаровая	8,47	8,77	8,17	7,59
	глутаровая	12,60	12,62	12,29	11,27
	янтарная	14,17	14,44	14,54	13,24
	винная	17,76	19,06	21,71	18,24
	щавелевая	23,99	26,43	27,43	25,25

* Тест Танака: подвижная фаза CH_3CN – 20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор с pH 4,7 (процентное соотношение 90:10); скорость потока 0,5 мл/мин; УФ-детектирование, 254 нм. Подвижная фаза для никотинамида (V_3), V_6 , V_1 , V_2 : CH_3CN – 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор, pH 5,4 (процентное соотношение 90:10); подвижная фаза для никотиновой кислоты (V_3), V_{12} , C: CH_3CN – 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор, pH 5,4 (80:20, по объему); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 270 нм. Подвижная фаза для кислот: CH_3CN – 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0 (процентное соотношение 80:20); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 200 нм. M1–M4 – 3-Аминопропилсиликагель партий № 1–4 соответственно.

личения доли азота, а следовательно, и числа привитых функциональных групп в партиях аминопропилсиликагеля. При этом для матриц М2 и М3, имеющих сходные показатели по количеству азота, получены существенные различия по гидрофильности. Партия М3 с содержанием азота 1,70% продемонстрировала самый большой фактор удерживания уридина ($k(U) = 3,95$), превышающий таковой для М4. Наибольшее значение параметра гидроксильной селективности $\alpha(OH) = 2,09$ для М3, коррелирующей с гидрофильностью, согласно [19], подтверждает полученные для этой матрицы характеристики. Таким образом, установлены различия в данных элементного анализа и некоторых хроматографических характеристиках аминифаз в гидрофильном режиме, что вызывает необходимость изучения свойств таких сорбентов на примере разделения разнообразных классов веществ.

Нейтральные полярные сахара удобно использовать для оценки гидрофильности неподвижных фаз, поскольку они представляют собой вещества, удерживание которых обусловлено в основном распределительным механизмом в гидрофильной хроматографии. Хроматограммы смеси пяти сахаров для разных партий аминопропилсиликагеля представлены на рис. 1. Действительно, при увеличении гидрофильности фазы, оцененной по

фактору удерживания уридина $k(U)$ в тесте Танака, происходит значительное увеличение времени удерживания сахаров в соответствии с возрастанием адсорбции приповерхностного водного слоя неподвижной фазы. Данные элементного анализа, представленные для сорбентов, в случае М4 не согласуются ни с гидрофильностью, ни с удерживанием углеводов, что может быть вызвано недоступностью для аналитов некоторых аминогрупп при модифицировании в порах частиц силикагеля. Таким образом, показана прямая зависимость между гидрофильностью аминифазы, оцененной по тесту Танака, и удерживанием на ней полярных нейтральных сахаров. Необходимо отметить, что существенное изменение времени удерживания происходит даже при небольших различиях в содержании азота: для наиболее гидрофильной матрицы М3 оно возрастает в 3 раза.

Уридин, который используют в тесте Танака для оценки гидрофильности сорбентов, представляет собой нуклеозид. Было интересно рассмотреть разделение других полярных азотистых оснований и нуклеозидов [20] в целях оценки влияния гидрофильности на удерживание других веществ этого класса. Хроматограммы модельных смесей 11 азотистых оснований и нуклеозидов на аминифазах представлены на рис. 2. При увеличении гидрофильности сорбентов наблюдали увеличение

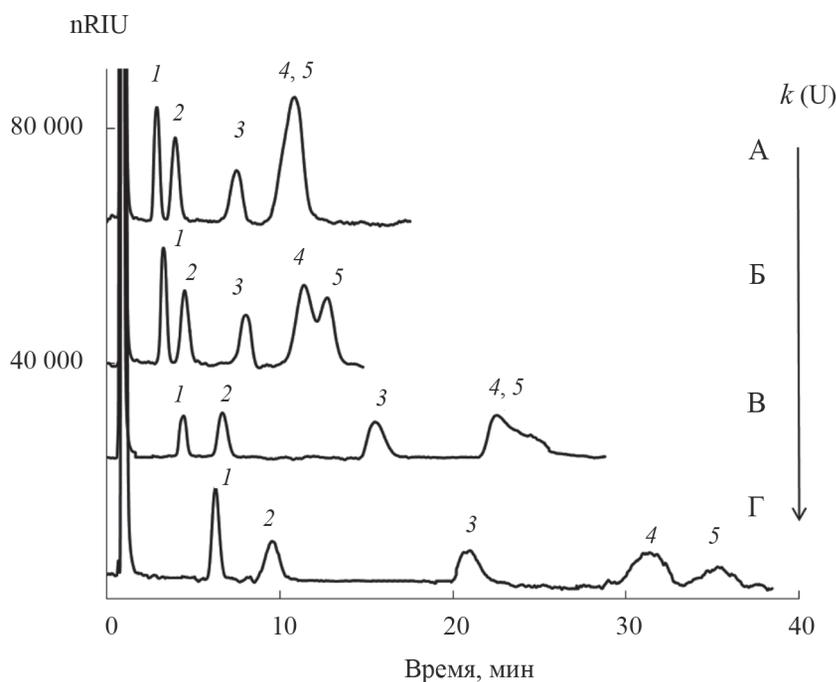


Рис. 1. Хроматограммы модельных смесей сахаров. Сорбенты: М1 (А), М2 (Б), М4 (В), М3 (Г); Подвижная фаза: $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (85:15%); скорость потока 1 мл/мин; рефрактометрическое детектирование; 1 – фруктоза (200 мг/л), 2 – глюкоза (200 мг/л), 3 – сахароза (400 мг/л), 4 – мальтоза (600 мг/л), 5 – лактоза (600 мг/л)

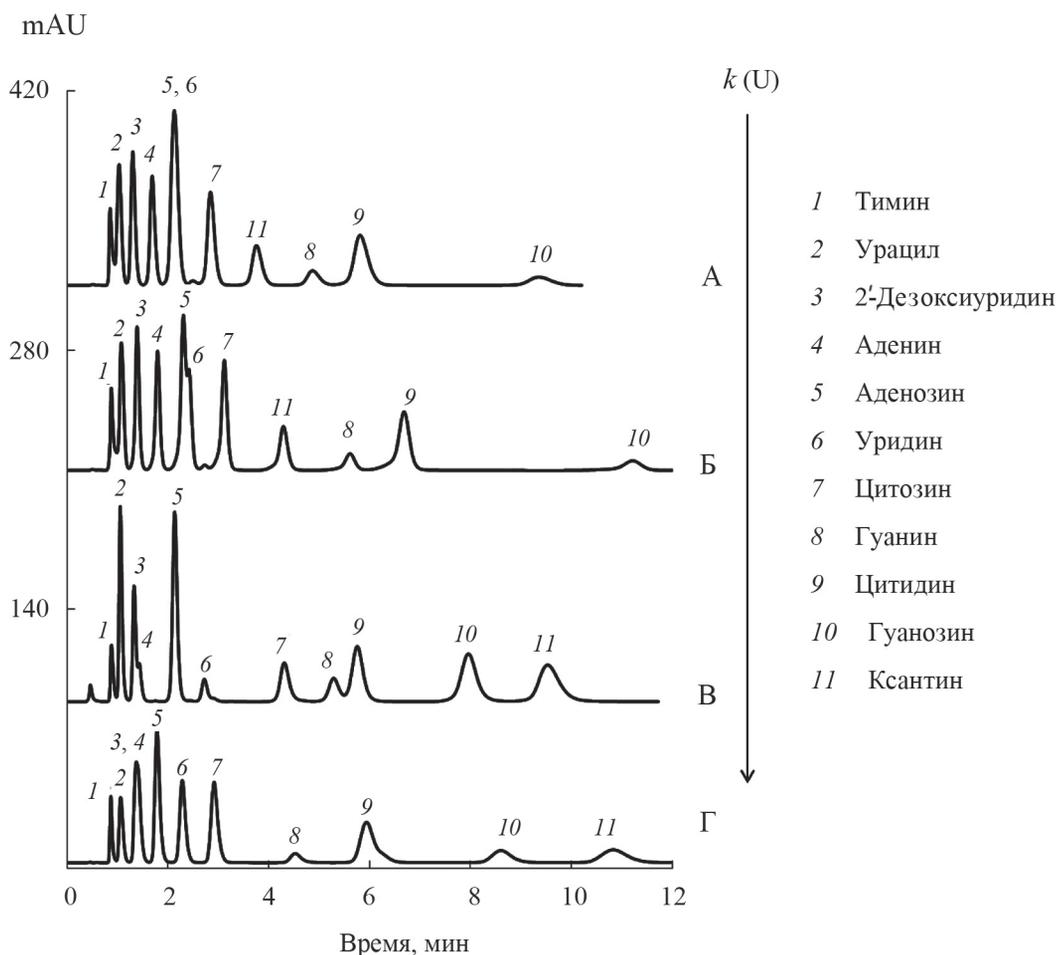


Рис. 2. Хроматограммы модельных смесей азотистых оснований и нуклеозидов. Сорбенты: М1 (А), М2 (Б), М4 (В), М3 (Г); подвижная фаза: 20 мМ ацетатно-аммонийный буферный раствор (рН 4,7) – CH_3CN (10:90%); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 254 нм; (А, Б, В) Тимин (5 мг/л), урацил, 2'-деоксиуридин (2 мг/л), аденин, аденизин (2,5 мг/л), уридин, цитозин (12,5 мг/л), гуанин (25 мг/л), цитидин (20 мг/л), гуанозин (30 мг/л), ксантин (25 мг/л); (Г) Тимин (5 мг/л), урацил, 2'-деоксиуридин (1 мг/л), аденин, аденизин (2,5 мг/л), уридин (15 мг/л), цитозин (12,5 мг/л), гуанин (15 мг/л), цитидин (15 мг/л), гуанозин (15 мг/л), ксантин (15 мг/л)

селективности для пары аденозин / уридин и ее уменьшение для пары 2'-деоксиуридин / аденин. Для фаз, характеризующихся близкой гидрофильностью (пара фаз М1 / М2, а также М3 / М4), отмечены одинаковый порядок элюирования азотистых оснований и нуклеозидов и схожая селективность по этим веществам. При этом имела место одинаковая селективность по паре уридин / цитозин для фаз М1, М2, М4 с сопоставимым количеством азота (1,52–1,70%), а для фазы М4 с 2,10% N отмечены ее возрастание и одновременное уменьшение селективности по паре цитозин / цитидин за счет значимого увеличения фактора удерживания цитозина на матрице М4. Таким образом, на удерживание и селективность в отношении азотистых оснований и нуклеозидов,

для которых характерен вклад адсорбционных взаимодействий в механизм удерживания, влияет не только гидрофильность аминофаз, но и число привитых функциональных групп.

Аналогичная тенденция наблюдается для водорастворимых витаминов [21] как нейтральных (никотинамида и пиридоксина B_6), так и заряженных (положительно заряженного тиамин B_1 и аниона аскорбиновой кислоты), в удерживание которых гидрофильность сорбента вносит большой вклад. Максимальные факторы удерживания среди всех матриц продемонстрировала наиболее гидрофильная фаза М3. В случае рибофлавина B_2 , а также цианокобаламина B_{12} , для которого характерно образование водородных связей с функциональными группами сорбента, наибольшие значения k' полу-

чены на фазе М4 с большей долей аминогрупп.

Оценить вклад образования водородных связей в удерживание аналитов позволяет применение подхода, предложенного в работе [22]. Расчет коэффициента селективности аденозина и аденина показал, что k' (аденозин) / k' (аденин) возрастает в ряду сорбентов М1, М2, М3, М4 (таблица), что согласуется с увеличением количества азота по данным элементного анализа фаз. Эти экспериментальные данные подтверждают значимое увеличение вклада образования водородных связей с аналитами для партии М4, что свидетельствует в пользу доступности привитых аминогрупп для взаимодействий с некоторыми полярными веществами.

Таким образом, по удерживанию нейтральных полярных соединений можно оценивать гидрофильность сорбентов и способность к образованию водородных связей, в то время как удерживание заряженных аналитов обычно коррелирует с ионообменной селективностью фаз и может способствовать оценке соответствующих свойств.

Ионообменная селективность. По результатам теста Танака (таблица) для всех аминофаз М1–М4 показано отсутствие катионообменной селективности α (СХ), что в сравнении с большей величиной этого параметра для силикагеля (α (СХ) = 45,10) свидетельствует об успешном модифицировании силанольных групп и экранировании поверхности частиц аминогруппами аминопропилтриэтоксисилана. При этом для полученных аминофаз отмечено проявление анионообменной селективности α (АХ).

Уменьшение α (АХ), полученной в тесте Танака, с возрастанием гидрофильности матриц свидетельствует об уменьшении концентрации аминогрупп, доступных для ионного обмена и, вероятно, о модифицировании силикагеля не только на поверхности, но и в порах, что согласуется с результатами, полученными для незаряженных модельных веществ – сахаров. Отсутствие прямой зависимости между гидрофильностью и анионообменной селективностью может быть связано с тем, что основность привитых аминокислот на силикагеле заметно уменьшается из-за их взаимодействия по типу «арочных структур» с остаточными силанольными группами [7].

Для оценки анионообменных свойств сорбентов помимо предложенного в тесте Танака *n*-толуолсульфоната использовали и другие вещества анионного характера. Показано, что увеличение факторов удерживания ксантина, имеющего отрицательный заряд в условиях анализа, в ряду

М1 < М2 < М4 < М3 согласуется с возрастанием гидрофильности $k(U)$ и уменьшением анионообменной селективности аминофаз.

В условиях разделения, используемых в настоящей работе, карбоновые кислоты [23] диссоциированы ($pK_{a,i} < 5,7$). Интересно отметить, что на самом гидрофильном сорбенте М3, несмотря на значительное уменьшение анионообменной селективности, имеют место самые большие факторы удерживания для сильноудерживаемых органических кислот: янтарной, винной и щавелевой (таблица). Таким образом, показано, что в этих условиях элюирования удерживание органических кислот определяется в большей степени гидрофильностью фаз, что может быть связано с понижением анионообменной селективности сорбентов при переходе к условиям разделения кислот (рН 7,0) и уменьшением электростатического взаимодействия отрицательно заряженных кислот и аминогрупп. Существенных различий в селективности фаз по карбоновым кислотам не наблюдали.

Для никотиновой и аскорбиновой кислот при меньшем рН, составлявшем 5,8, также отмечено уменьшение факторов удерживания на М4 и большие факторы удерживания на более гидрофильной фазе М3.

Таким образом, показано, что гидрофильность аминофазы в существенной степени определяет ее хроматографические свойства в отношении большинства рассмотренных отрицательно заряженных полярных веществ в условиях их разделения, кроме ксантина, который может стать новым индикатором анионообменной селективности гидрофильных сорбентов. Согласно полученным данным, аминогруппы матрицы М4 доступны для взаимодействия с ксантином.

Разделение аминокислот. Для разделения цвиттер-ионных аминокислот в условиях низкой концентрации фосфатного буферного раствора проводили дополнительное уравнивание колонок [24, 25]: промывали в течение 1 ч подвижной фазой состава 20 мМ фосфатный буферный раствор (рН 6,5) / ацетонитрил (30/70 об.%) при скорости потока 1 мл/мин. Несмотря на это, при переходе к рабочим условиям уравнивание колонок с аминофазами составляло несколько часов, что может быть связано с затруднением образования стабильного приповерхностного водного слоя в условиях невысокой концентрации фосфат-ионов, являющихся космотропами.

Хроматограммы модельных смесей семи аминокислот на матрицах приведены на рис. 3. При

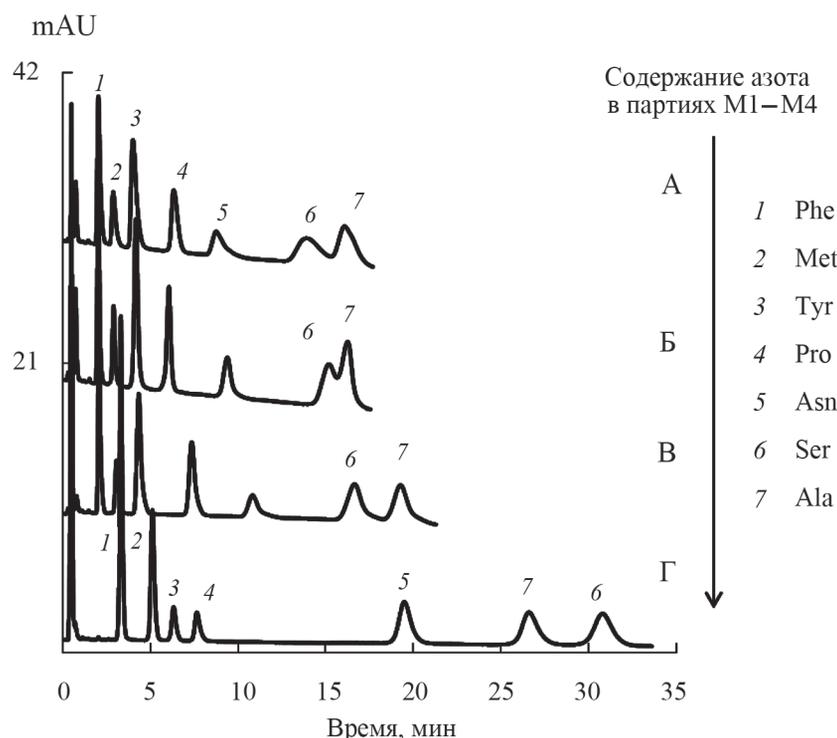


Рис. 3. Хроматограммы модельных смесей аминокислот. Сорбенты: M1 (A), M2 (Б), M3 (B), M4 (Г); подвижная фаза: 1 мМ фосфатный буферный раствор с pH 6,5 – CH₃CN (15:85%); скорость потока 1 мл/мин; УФ-детектирование при 210 нм. Phe, Met, Tyr (5 мг/л), Pro (20 мг/л), Asn (15 мг/л), Ser, Ala (50 мг/л)

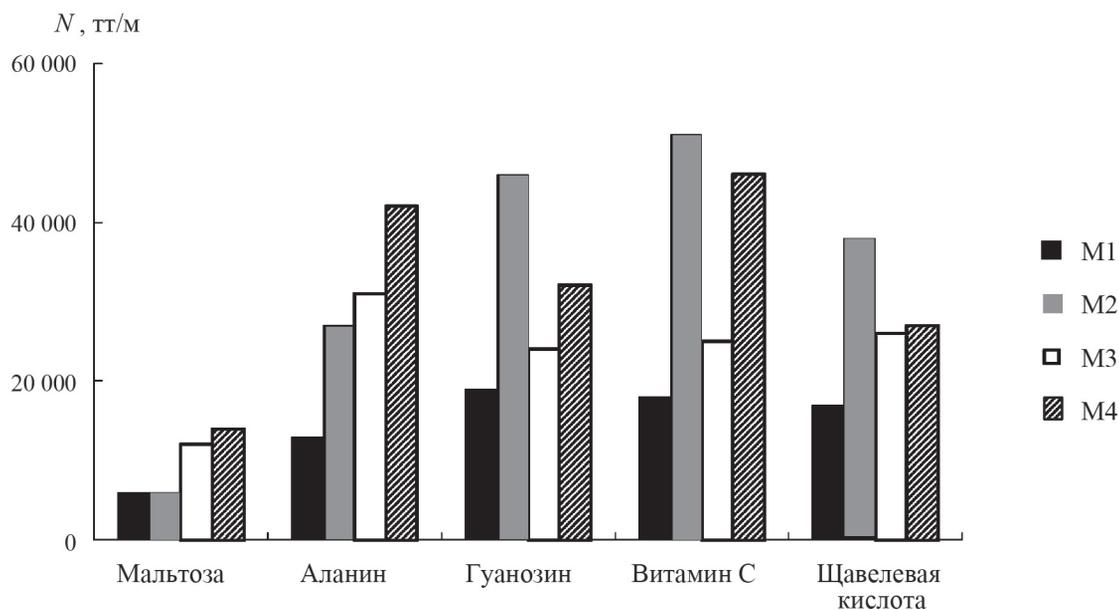


Рис. 4. Эффективность колонок по отношению к полярным веществам различных классов. Подвижная фаза для определения мальтозы: CH₃CN – H₂O (85:15%); рефрактометрическое детектирование; для аланина: CH₃CN – 1 мМ фосфатный буферный раствор, pH 6,5 (80:20%); УФ-детектирование при 210 нм; для гуанозина: CH₃CN – 20 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (90:10%); УФ-детектирование при 254 нм; для витамина С: CH₃CN – 100 мМ аммонийно-ацетатный буферный раствор (80:20%); УФ-детектирование при 270 нм; для щавелевой кислоты: CH₃CN – 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,0 (80:20%); УФ-детектирование при 200 нм; скорость потока 1 мл/мин

небольших различиях в содержании азота (матрицы М1–М3) не наблюдали значительного изменения времени удерживания аминокислот, в то время как увеличение степени покрытия силикагеля аминокислотными группами на 15–20% привело к возрастанию таковых в 2 раза, а также к обращению порядка элюирования пары серин ($\log P = -3,46$) / аланин ($\log P = -2,99$) в соответствии с увеличением их гидрофильности. Наибольшие значения времени удерживания аминокислот для матрицы М4 с максимальным содержанием азота свидетельствуют о доступности привитых аминокислотных групп для адсорбционных взаимодействий. Эта тенденция сохраняется и в увеличении доли водной части в элюенте до 20%, когда адсорбционные взаимодействия могут вносить меньший вклад по сравнению с распределительными в случае увеличения толщины приповерхностного водного слоя [26].

Дополнительно показано, что более экспрессное уравнивание аминофаз при замене буферного раствора в подвижной фазе можно осуществить путем увеличения концентрации фосфатного буфера и/или доли водной части с последующим ее снижением до требуемых для разделения величин. Такой подход позволяет ускорить замену противоионов в приповерхностном слое сорбента.

Эффективность. При рассмотрении эффективности колонок по разным классам модельных

полярных веществ наблюдали общую тенденцию к ее увеличению при возрастании доли азота в партии аминопропилсиликагеля (рис. 4). Эффективность колонки с фазой М2 по органическим кислотам, витаминам, нуклеозидам и азотистым основаниям несколько превысила таковую по сравнению с М4.

Выводы

Установлено, что содержание азота, т.е. концентрация привитых аминокислотных групп в разных партиях аминофаз коррелирует с факторами удерживания аминокислот, азотистых оснований и нуклеозидов, витаминов В₂ и В₁₂, т.е. тех веществ, для которых характерны адсорбционные взаимодействия, включая образование водородных связей с функциональными группами сорбента. Для аналитов, в удерживание которых в гидрофильном режиме распределение вносит больший вклад (таких, как углеводы), именно оценка гидрофильности способствует предсказанию свойств аминофаз. Таким образом, важно контролировать не только содержание азота в партиях 3-аминопропилсиликагеля, но и гидрофильность сорбента по тесту Танака. С помощью этого показателя можно будет судить об удерживании различных полярных веществ и выбирать требуемые партии аминофазы для хроматографического разделения соединений конкретных классов или для их дальнейшего модифицирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Linden J.C., Lawhead C.L. // J. Chromatogr. A. 1975. Vol. 105. P. 125.
- Alpert A.J., Andrews P.C. // J. Chromatogr. A. 1988. Vol. 443. P. 85.
- Нестеренко П.Н., Савельев В.И. // Журн. аналит. химии. 1990. Т. 45. № 6. С. 1134. (Nesterenko P.N., Savel'ev V.I. // J. Analyt. Chem. 1990. Vol. 45. № 6. P. 819.)
- Сапрыкин Л.В. // Химический анализ. 2005. № 1. С. 20.
- Buszewski B., Noga S. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. Vol. 402. P. 231.
- Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. // Лаборатория и производство. 2018. Т. 4. № 4. С. 76.
- Лисичкин Г.В., Фадеев А.Ю., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Мингалев П.Г., Фурман Д.Б. «Химия привитых поверхностных соединений». М., 2003. С. 592.
- Schuster G., Lindner W. // Anal. Bioanal. Chem. 2011. Vol. 400. P. 2539.
- Sýkora D., Zaruba K., Butnariu M., Tatar A., Pham H.M., Studenovský M., Rezanka P., Kral V. // J. Sep. Sci. 2020. Vol. 43. P. 4178.
- Chikurova N.Yu., Shemiakina A.O., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. // J. Chromatogr. A. 2022. Vol. 1666. P. 462804.
- Chikurova N.Yu., Shemyakina A.O., Bryskina D.E., Nuriev V.N., Komarov A.A., Statkus M.A., Stavrianidi A.N., Chernobrovkina A.V. // J. Anal. Chem. 2021. Vol. 76. P. 1083.
- Zhan W., Zhang Y., Zhang G., Bai X., Xia S., Zhao W., Yi D., Zhang S. // J. Sep. Sci. 2019. Vol. 42. P. 1299.
- Gezici O., Kara H. // Talanta. 2011. Vol. 85. P. 1472.
- Ohyama K., Takasago S., Kishikawa N., Kuroda N. // J. Sep. Sci. 2015. Vol. 38. P. 720.
- Попов А.С., Максимов Г.С., Шпигун О.А., Чернобровкина А.В. // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 9. С. 849 [Popov A.S., Maksimov G.S., Shpigun O.A., Chernobrovkina A.V. // J. Anal. Chem. 2022. Vol. 77. № 9. P. 1173].
- Yaroshenko D.V., Grigoriev A.V., Yaroshenko I.S., Sidorova A.A., Kryshen K.L., Chernobrovkin M.G., Zatirakha A.V., Chernobrovkina A.V. // J. Chromatogr. A. 2021. Vol. 1637. № 461750.
- Di Zhou, Jing Zeng, Qifeng Fu, Die Gao, Kailian Zhanga, Xiujun Ren, Kai Zhou, Zhining Xi, Lujun

- Wang // J. Chromatogr. A. 2018. Vol. 1571. P. 165.
18. Dolci M. // Runcorn, Cheshire, UK: Thermo Fisher Scientific. 2013.
19. Kawachi Y., Ikegami T., Takubo H., Ikegami Y., Miyamoto M., Tanaka N. // J. Chromatogr. A. 2011. Vol. 1218. P. 5903.
20. Chen Y., Bicker W., Wu J., Xie M., Lindner W. // J. Agric. Food Chem. 2012. Vol. 60. P. 4243.
21. Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D. // J. Sep. Sci. 2009. Vol. 32. P. 909.
22. Ibrahim M.E.A., Liu Y., Lucy C.A. // J. Chromatogr. A. 2012. Vol. 1260. P. 126.
23. Marrubini G., Pedrali A., Hemstrom P., Jonsson T., Massolini G. // J. Sep. Sci. 2013. Vol. 36. P. 3493.
24. Seidl C., Bell D.S., Stoll D.R. // J. Chromatogr. A. 2019. Vol. 1604. P. 460484.
25. McCalley D.V. // J. Chromatogr. A. 2018. Vol. 1554. P. 61.
26. Bell D.S. // HPLC abstracts. Prague. 2017.

Информация об авторах

Чикурова Наталья Юрьевна – аспирант, ассистент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (chikurova.nu@yandex.ru);

Шемякина Анна Олеговна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (a.o.shemyakina@yandex.ru);

Крыжановская Дарья Сергеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (daryakry@mail.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).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.12.2022;
одобрена после рецензирования 10.01.2023;
принята к публикации 14.01.2023.